

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 412**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/01** (2006.01)

**C12N 7/02** (2006.01)

**C12N 15/44** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2003 E 15197386 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3009507**

54 Título: **Señal para el empaquetamiento de vectores del virus de la gripe**

30 Prioridad:

**13.02.2002 US 356538 P**

**07.01.2003 US 438679 P**

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

**17.02.2021**

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION  
(100.0%)**

**614 Walnut Street  
Madison, WI 53705, US**

72 Inventor/es:

**KAWAOKA, YOSHIHIRO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 806 412 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

Señal para el empaquetamiento de vectores del virus de la gripe

## 5 Antecedentes de la invención

El genoma de los virus de la gripe A y B está compuesto por ocho segmentos de ARN monocatenarios de polaridad negativa, dos de los cuales codifican glicoproteínas de la cubierta, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). La replicación del virus de la gripe se inicia a través de la unión de las proteínas HA del virus sobre la superficie del virión a los receptores celulares que contienen ácido siálico. Después de la unión a los receptores, los viriones son captados por las células huésped mediante endocitosis. El ambiente ácido en el endosoma tardío desencadena cambios conformacionales en la HA y se inicia la fusión entre la cubierta viral y la membrana endosómica, y activa el canal iónico M2, lo que da como resultado la entrada de protones al interior del virión. Se piensa que la exposición del interior del virión a pH bajo altera las interacciones sensibles a ácido entre la proteína M1 y el complejo de ribonucleoproteína (RNP), lo que culmina en la liberación de RNP al citoplasma. A continuación, el RNP es transportado al núcleo, donde el ARNm viral y el genoma viral se sintetizan. El ARNm entra en el citoplasma y se sintetizan las proteínas virales. La nucleoproteína (NP) entra en el núcleo y encapsida el ARNV recién sintetizado y, junto con las tres proteínas subunidades de la polimerasa (PA, PB1, PB2), forma el RNP. En presencia de las proteínas M1 y NS2, se exporta el RNP hacia fuera del núcleo. Las tres proteínas asociadas a la membrana plasmática (HA, NA y M2) y el RNP interactúan y forman nuevos viriones mediante gemación. La NA es responsable de la liberación del virus desde las células infectadas a través de la eliminación del ácido siálico de los glicoconjugados celulares y las glicoproteínas virales (Lamb et al., 2000).

Los virus de tipo A se dividen en subtipos basados en las antigenicidades de HA (H1–H15) y NA (N1–N9). En las células infectadas con dos tipos diferentes de virus A se producen reagrupados intratípicos que poseen varias combinaciones de segmentos génicos (Wright et al., 2000). No obstante, en la naturaleza no se han detectado reagrupados intertípicos entre los virus de tipo A y de tipo B, aunque ambos virus circulan de forma conjunta en las poblaciones humanas.

Los investigadores han intentado sin éxito generar reagrupados entre los virus de tipo A y B en el laboratorio (Kaverin et al., 1983; Mikheera et al., 1982; Tobita et al., 1983). Muster et al. (1991) generaron un virus de tipo A mutante que contiene un segmento en el cual las regiones no codificantes de un segmento de NA se habían sustituido por otras del gen no estructural (NS) del virus de tipo B. Aunque el virus mutante se replicó más lentamente y alcanzó títulos más bajos que el virus silvestre, la generación de dicho virus sugirió que las regiones no codificantes del segmento NS de tipo B eran compatibles con los componentes del virus de la gripe de tipo A a nivel de transcripción y replicación del ARN. Por el contrario, un segmento de ARN que posee un segmento de codificación extraño flanqueado por las regiones no codificantes en 3' y 5' de un segmento de ARN del virus de la gripe A no se mantuvo de forma estable en los viriones después de un pase repetido (Luytjes et al., 1989). Muster et al. (1991) también divulgan que el virus mutante estaba atenuado en los ratones y que los animales infectados con el virus mutante eran resistentes a la exposición con el virus silvestre.

En Zhou et al. (Virology 246: 83-94, 1988) se desvelan vectores del virus de la gripe que se basan en un segmento de ARNV de la HA de la gripe A. Específicamente, se desvelan vectores en los que el ectodominio de la HA se reemplaza por el ectodominio de la proteína E2 del virus de la peste porcina clásica (VPPC), produciendo proteínas de fusión E2-HA.

Lo que se necesita es un método para identificar las secuencias del virus de la gripe para la incorporación y/o mantenimiento de secuencias unidas durante la replicación del virus de la gripe.

## 50 Sumario de la invención

La invención se refiere, en general, a un vector viral de la gripe, que comprende secuencias de incorporación (una "señal de empaquetamiento" o una señal de encapsidación del ARNV) para el virus de la gripe, para la expresión de un segmento de ácido nucleico heterólogo que comprende un marco de lectura abierto heterólogo.

La presente invención proporciona un vector viral de la gripe para la expresión y empaquetamiento de ARNV recombinante, en el que el vector comprende:

secuencias correspondientes a la región no codificante en 3' del ARNV de HA del virus de la gripe y secuencias codificantes de HA que incluyen secuencias de incorporación de HA en 3', un segmento de ácido nucleico heterólogo que comprende un marco de lectura abierto heterólogo, secuencias codificantes de HA que incluyen secuencias de incorporación de HA en 5' y la región no codificante en 5' del ARNV de HA, en donde en cuanto a las secuencias codificantes de HA, que incluyen secuencias de incorporación de HA en 3', dichas secuencias consisten en 15 nucleótidos hasta 468 nucleótidos, correspondientes a los nucleótidos 1 a 15 a 1 a 468 de la secuencia codificante de HA en 5', y en donde en cuanto a las secuencias codificantes de HA, que incluyen las secuencias de incorporación de HA en 5', dichas secuencias consisten en 80 nucleótidos hasta

518 nucleótidos, correspondientes a los últimos 80 nucleótidos codificantes de HA hasta los últimos 518 nucleótidos codificantes de HA,

en donde la región no codificante en 3' del ARNv de HA, las secuencias codificantes de HA que incluyen secuencias de incorporación de HA en 3', las secuencias codificantes de HA que incluyen secuencias de incorporación de HA en 5' y la región no codificante en 5' del ARNv de HA, son de la misma cepa o serotipo de la gripe, y

en donde el vector no codifica una HA funcional.

La presente invención también proporciona un virus de la gripe recombinante que comprende un ARNv que corresponde a un vector de la invención.

La invención también proporciona un método para expresar en una célula un marco de lectura abierto heterólogo que comprende: infectar *in vitro* una célula con un virus recombinante de la invención y detectar o determinar si en la célula se expresa un producto codificado por el marco de lectura abierto heterólogo.

También se proporciona un vector de la invención o un virus de la invención para su uso en terapia.

En general, las secuencias de incorporación están presentes en los aproximadamente 150 a aproximadamente 250 nucleótidos en un extremo o en cada uno de los extremos de la región codificante para cada segmento de ARNv de la gripe. Por ejemplo, las secuencias de incorporación del virus de la gripe comprenden secuencias correspondientes al extremo 3' del ARNv de NA, incluidas las secuencias correspondientes al extremo N de la región codificante de NA, por ejemplo 37 nucleótidos del extremo 3' del ARNv de NA de tipo A, incluidos 19 nucleótidos de la secuencia no codificante en 3' y al menos los nucleótidos correspondientes a los 19 primeros nucleótidos codificantes para NA y, opcionalmente, secuencias de incorporación correspondientes al extremo 5' del ARNv de NA, incluidas las secuencias correspondientes al extremo C de la región codificante de NA, por ejemplo 67 nucleótidos del extremo 5' del ARNv de NA de tipo A, incluidos 28 nucleótidos de la secuencia no codificante en 5' y al menos 39 nucleótidos correspondientes a los 39 nucleótidos codificantes en 3' de NA.

Las secuencias de incorporación del virus de la gripe también comprenden secuencias correspondientes al extremo 3' del ARNv de NS incluidas las secuencias correspondientes al extremo N de la región codificante de NS. En otro ejemplo, las secuencias de incorporación del virus de la gripe comprenden secuencias correspondientes al extremo 5' del ARNv de HA, incluidas las secuencias correspondientes al extremo C de la región codificante de HA, por ejemplo 135 nucleótidos del extremo 5' del ARNv de HA de tipo A, incluidos 45 nucleótidos de la secuencia no codificante en 5' y al menos 80 nucleótidos correspondientes a los 80 nucleótidos codificantes en 3' de HA y, opcionalmente, secuencias de incorporación correspondientes al extremo 3' del ARNv de HA, incluidas las secuencias correspondientes al extremo N de la región codificante de HA, por ejemplo 36 nucleótidos del extremo 3' del ARNv de HA de tipo A, incluidos 33 nucleótidos de la secuencia no codificante en 3' y al menos 3 nucleótidos correspondientes a 3 primeros nucleótidos codificantes de HA.

En otro ejemplo, las secuencias de incorporación del virus de la gripe comprenden secuencias correspondientes al extremo 5' del ARNv de PB2, incluidas las secuencias correspondientes al extremo C de la región codificante de PB2. En otro ejemplo, las secuencias de incorporación del virus de la gripe comprenden secuencias correspondientes al extremo 3' del ARNv de M, incluidas las secuencias correspondientes al extremo N de la región codificante M, por ejemplo 247 nucleótidos del extremo 3' del ARNv de M de tipo A, incluidos 26 nucleótidos de la secuencia no codificante en 3' y 221 nucleótidos de la secuencia correspondiente al extremo N de la región codificante de M, y secuencias correspondientes al extremo 5' del ARNv de M, incluidas las secuencias de incorporación correspondientes al extremo C de la región codificante de M, por ejemplo 242 nucleótidos del extremo 5' del ARNv de M de tipo A, incluidos 23 nucleótidos de la secuencia no codificante en 3' y 219 nucleótidos de la secuencia correspondiente a los últimos 219 nucleótidos para el extremo C de la región codificante M.

En otro ejemplo, las secuencias de incorporación del virus de la gripe comprenden secuencias correspondientes al extremo 5' del ARNv de NS, incluidas secuencias correspondientes al extremo N de la región codificante de NS, por ejemplo, secuencias que incluyen la secuencia no codificante en 3' y al menos los 30 primeros nucleótidos correspondientes al extremo N de la región codificante de NS y secuencias correspondientes al extremo 5' del ARNv de NS, incluidas secuencias de incorporación correspondientes al extremo C de la región codificante de NS, por ejemplo secuencias que incluyen la secuencia no codificante en 5' y al menos los últimos 30 nucleótidos de la secuencia correspondiente al extremo C de la región codificante de NS.

En otro ejemplo, las secuencias de incorporación del virus de la gripe comprenden secuencias correspondientes al extremo 5' del ARNv de PB1, incluidas las secuencias correspondientes al extremo N de la región codificante de PB1 y las secuencias correspondientes al extremo 5' del ARNv de PB1, incluidas las secuencias de incorporación correspondientes al extremo C de la región codificante de PB1. En otro ejemplo más las secuencias de incorporación del virus de la gripe comprenden secuencias correspondientes al extremo 5' del ARNv de PA, incluidas las secuencias correspondientes al extremo N de la región codificante de PA y las secuencias correspondientes al extremo 5' del ARNv de PA, incluidas las secuencias de incorporación correspondientes al extremo C de la región codificante de PA.

Las "secuencias de incorporación" del virus de la gripe, como se usa en el presente documento, son secuencias que, cuando están presentes en el ARNv con las correspondientes regiones no codificantes en 3' y 5' (homólogas), dan lugar a la incorporación en los viriones de una molécula de ácido nucleico que comprende dichas secuencias y al mantenimiento de dicha molécula en los viriones durante el pase repetido.

Como se describe más adelante en el presente documento, usando genética inversa basada en plásmidos se identificaron secuencias de incorporación de NA en virus mutantes con un segmento de NA truncado. Las secuencias de incorporación de NA estaban en una región que incluyó el extremo 3' del ARNv de NA, que se extendió en una porción de la región codificante de NA. Por tanto, esta región es útil para el empaquetamiento y mantenimiento del ARN de NA silvestre, así como ARN de NA mutantes, por ejemplo ARN con deleciones y/o inserciones internas, incluidos ARN recombinantes, para la expresión de marcos de lectura abiertos de interés, por ejemplo, un segmento de ácido nucleico heterólogo que comprende un marco de lectura abierto de interés.

Como también se describe en el presente documento, para obtener información sobre la incompatibilidad intertípica entre los virus de la gripe de tipo A y B, se usó genética inversa para generar un reagrupado que contuviera un segmento de HA de tipo B intacto en un fondo de virus de tipo A. No obstante, no se produjo virus, a pesar del hecho de que el segmento de HA de tipo B se transcribió a través del complejo de polimerasa de tipo A. Aunque un virus de tipo A con un segmento de HA quimérico compuesto por la totalidad de la secuencia codificante de HA de tipo B flanqueada por la secuencia no codificante de HA de tipo A era viable, únicamente se replicó ligeramente. Se generó una serie de virus basados en el tipo A que contenían HA quiméricas que poseían la región no codificante de tipo A junto con la secuencia codificante del péptido señal o la región transmembrana/citoplásmica del virus de tipo A, o ambas, y el resto de la región derivada de la HA de tipo B. Todos estos virus crecían a más de  $10^6$  dosis infecciosas en cultivo tisular<sub>50</sub>/ml en cultivo celular, no obstante, los virus con más de las secuencias de HA de tipo A se replicaron mejor, lo que sugiere el papel de la interacción proteína-proteína o la mayor incorporación del segmento de HA en los viriones con un crecimiento viral eficiente. Todos estos virus A/B quiméricos estaban atenuados en ratones en comparación con los virus A y B silvestres. Además, todos los animales inmunizados por vía intranasal con los virus quiméricos sobrevivían tras la exposición a una dosis letal del virus de tipo B silvestre, lo que demuestra un prometedor abordaje para el diseño de un nuevo virus para vacuna con microorganismos vivos.

Por tanto, cuando se introduce un vector viral de la gripe en una célula en presencia de proteínas virales y/o vectores codificantes de proteínas virales para una o más de PA, PB1, PB2, NP, HA, NA, M, por ejemplo M1 y/o M2, y/o NS, y ARNv o vectores para la producción de ARNv para una o más de PA, PB1, PB2, NP, HA, NA, M, por ejemplo M1 y M2, y/o NS, se produce un virus recombinante. Después, el virus recombinante se puede usar para infectar una célula. Preferentemente, el ARNv correspondiente a un vector de la invención se incorpora en viriones con una eficiencia que es de al menos un 10 %, más preferentemente al menos un 30 % e incluso más preferentemente al menos un 50 % o más, la de un ARNv silvestre correspondiente. En una realización, el vector incluye secuencias correspondientes a un ARNv silvestre y un segmento de ácido nucleico heterólogo, en el que el segmento de ácido nucleico heterólogo se introduce en secuencias en el ARNv correspondiente a la región codificante para dicho ARNv, cuya inserción preferentemente no altera sustancialmente las secuencias de incorporación. Las secuencias de incorporación de NA en 5' corresponden a secuencias en la región codificante en el extremo C de HA, secuencias correspondientes a los últimos nucleótidos 80, 268, 291 o 518, o cualquier número entero entre 80 y 518, de la región codificante de HA en el extremo C. Las secuencias de incorporación de HA en 3' corresponden a los nucleótidos 1 a 15, 1 a 216, 1 a 468, o cualquier número entero entre 15 y 468, de la región codificante HA del extremo N.

Por consiguiente, la invención proporciona vectores del virus de la gripe que incluyen secuencias correspondientes a las regiones no codificantes en 3' y 5' del ARNv de NA del virus de la gripe, secuencias de incorporación del ARNv correspondiente y un segmento de ácido nucleico heterólogo.

En el presente documento también se desvela un vector del virus de la gripe que incluye la región no codificante en 3' del ARNv de NA, secuencias de incorporación del ARNv de NA en 3' o 5' y opcionalmente, secuencias de incorporación de NA tanto en 3' como en 5', un segmento de ácido nucleico heterólogo y la región no codificante en 5' del ARNv de NA. De manera similar, se desvela un vector del virus de la gripe que incluye la región no codificante en 3' del ARNv de NS, secuencias de incorporación de NS, un segmento de ácido nucleico heterólogo y la región no codificante en 5' del ARNv de NS. También se desvela un vector del virus de la gripe que incluye la región no codificante en 3' del ARNv de M, secuencias de incorporación de M en 5' o 3' o secuencias de incorporación de M tanto en 5' como en 3'. También se desvela un vector del virus de la gripe que incluye la región no codificante en 3' del ARNv de PB2, un segmento de ácido nucleico heterólogo, secuencias de incorporación de PB2 y la región no codificante en 5' del ARNv de PB2. Cuando en un vector se emplean dos secuencias de incorporación, preferentemente estas están separadas por el segmento de ácido nucleico heterólogo. Cada vector puede emplearse para preparar el ARNv para su introducción en una célula o para expresar el ARNv en una célula, en la que hay otros ARNv del virus de la gripe y proteínas necesarias para la producción de virus.

En una realización, el segmento de ácido nucleico heterólogo comprende secuencias correspondientes a un marco de lectura abierto para un gen marcador. En otra realización, el segmento de ácido nucleico heterólogo comprende secuencias correspondientes a un marco de lectura abierto para un gen terapéutico. En una realización adicional

más, el segmento de ácido nucleico heterólogo comprende secuencias correspondientes a un marco de lectura abierto para un péptido o proteína inmunogénica de un patógeno o una célula tumoral, por ejemplo una útil para inducir una respuesta inmunitaria protectora. Por ejemplo, el segmento de ácido nucleico heterólogo puede codificar un epítipo inmunogénico útil en la terapia para el cáncer o en una vacuna.

Los vectores desvelados anteriormente que comprenden el segmento de ácido nucleico heterólogo se pueden preparar de un modo tal que la transcripción del ARNv del vector de como resultado un ARNm que codifique una proteína de fusión con una proteína de la gripe, tal como NA. Por tanto, se prevé que el segmento de ácido nucleico heterólogo se puede fusionar con secuencias de incorporación virales para codificar una proteína de fusión, por ejemplo una fusión con los 21 restos en el extremo N de NA. La proteína de fusión puede comprender secuencias de dos proteínas del virus de la gripe diferentes, incluidas las secuencias de dos proteínas NA o HA diferentes.

En otra realización, el segmento de ácido nucleico heterólogo puede comprender secuencias correspondientes a un IRES unido en 5' a un marco de lectura abierto.

Para preparar el virus recombinante usando genética inversa basada en plásmidos con una pluralidad de vectores del virus de la gripe, el ADN del virus de la gripe en un vector puede estar en orientación sentido o antisentido respecto del promotor. Por tanto, un vector puede codificar una proteína del virus de la gripe (sentido) o ARNv (antisentido) de una cepa o aislado del virus de la gripe A, B o C o un virus de la gripe recombinante (véanse los capítulos 45 y 46 de Fields Virology (Fields et al. (eds.), Lippincott–Raven Publ., Philadelphia, PA (1996)). Se puede usar cualquier promotor para expresar una proteína viral y el vector resultante incluye un promotor unido operablemente a un ADN para una proteína concreta del virus de la gripe. Promotores preferidos para los vectores que codifican el ARNv incluyen, entre otros, un promotor de la ARN polimerasa I, un promotor de la ARN polimerasa II, un promotor de la ARN polimerasa III, un promotor de T7 y un promotor de T3. El promotor de la ARN polimerasa I puede ser un promotor de la ARN polimerasa I humana. Las secuencias de terminación de la transcripción preferidas para los vectores que codifican ARNv incluyen, entre otros, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II o una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa III, o una ribozima. Por tanto, un vector para el ARNv incluye un promotor unido operablemente a un ADNc para una proteína del virus de la gripe en orientación antisentido respecto del promotor, que está unido operablemente a una secuencia de terminación de la transcripción.

Para producir virus recombinante con un vector de la invención, se pueden omitir determinados vectores de ARNv silvestre y se pueden sustituir determinados vectores de codificación de proteínas virales silvestres. Por ejemplo, para un vector de ARNv que comprende secuencias no codificantes en 3' y 5' de HA, secuencias de incorporación en 5' de HA y un segmento de ácido nucleico heterólogo correspondiente a una secuencia codificante de la proteína de virus que no son de la gripe, por ejemplo, la secuencia codificante de la proteína G de VSV, se puede omitir el vector de ARNv de HA silvestre. Los vectores se pueden introducir en una célula secuencial o simultáneamente. También se proporciona una composición que comprende una pluralidad de los vectores mencionados anteriormente, una célula huésped en contacto con uno o más de los vectores, virus preparados mediante el método y una célula infectada con el virus.

Una pluralidad de los vectores se puede unir físicamente o cada vector puede estar presente en un plásmido individual u otro, por ejemplo, vehículo de liberación de ácido nucleico lineal.

Las células huésped aumentadas con las moléculas de ADN recombinante como se ha descrito anteriormente en el presente documento son útiles para preparar virus de la gripe infecciosos de replicación defectuosa. Por ejemplo, una célula huésped transformada de forma estable con moléculas de ADN recombinante que codifican HA, NA, M1, M2 y NS2 se puede poner en contacto con una pluralidad de vectores, es decir vectores que expresan ARNv que comprende PA, ARNv que comprende NP, ARNv que comprende PB1, ARNv que comprende PB2 y, opcionalmente, ARNv que comprende un gen de interés; y vectores que codifican PA, PB1, PB2 y NP.

Los métodos de producción de virus descritos en el presente documento que no requiere infección con virus colaboradores son útiles en estudios de mutagénesis viral y en la producción de vacunas (por ejemplo, para SIDA, gripe, hepatitis B, hepatitis C, rinovirus, filovirus, paludismo, herpes y la enfermedad de la fiebre aftosa) y vectores de terapia génica (por ejemplo, para cáncer, SIDA, adenosina desaminasa, distrofia muscular, deficiencia de ornitina transcarbamilasa y tumores del sistema nervioso central).

Por tanto, se proporciona un virus recombinante de la invención para su uso en terapia médica (por ejemplo, para una vacuna o terapia génica). Por ejemplo, en el presente documento se enseña un método para inmunizar a un individuo contra un patógeno, por ejemplo, una bacteria, virus o parásito, o un tumor maligno. El método comprende la administración al individuo de una cantidad de al menos un virus aislado de la invención, opcionalmente en combinación con un adyuvante, eficaz para inmunizar al individuo. El virus comprende ARNv que comprende un polipéptido codificado por el patógeno o un polipéptido específico de tumor.

En el presente documento también se desvela un método para aumentar o incrementar la expresión de una proteína

endógena en un mamífero que tiene una indicación o enfermedad caracterizada por una cantidad menor o una falta de la proteína endógena. El método comprende administrar al mamífero una cantidad de un virus recombinante de la invención eficaz para aumentar o incrementar la cantidad de la proteína endógena en el mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Adicionalmente, en el presente documento se desvela un método para inhibir la infección y/o replicación del virus de la gripe. El método comprende poner en contacto una célula con una composición que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que comprende secuencias de incorporación del virus de la gripe para NA, M, HA, NS, NP, PB1, PB2, PA, o cualquier combinación de dichas moléculas, en una cantidad eficaz para inhibir la infección y/o replicación del virus de la gripe. La célula puede ser una célula no infectada o una que está infectada con el virus de la gripe. Las secuencias de incorporación pueden ser específicas de uno o más tipos de NA o HA. Adicionalmente, la célula puede ponerse en contacto con un inhibidor de canales de M2 o un inhibidor de la neuraminidasa.

En el presente documento también se desvela un método para identificar un agente que inhibe específicamente o previene la incorporación del ARN del virus de la gripe en viriones. El método comprende poner en contacto una célula infectada con el virus de la gripe con un agente y detectar o determinar si el agente inhibe específicamente o previene la incorporación del ARN del virus de la gripe, tal como ARNv de NA o ARNv de NA recombinante, en los viriones. También se proporcionan agentes identificados mediante el método, y usos de los mismos, por ejemplo para inhibir o prevenir la replicación del virus de la gripe.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Unión de líneas celulares resistentes a la lectina. Para cada línea celular, se incubaron las células con lectinas de *Maakia amurensis* (MAA) o *Sambucus nigra* (SNA) marcadas con digoxigenina, seguido de anticuerpo antidigoxigenina marcado con isotiocianato de fluoresceína y, después, se analizaron mediante FACS. Líneas en negrita, unión de la lectina de MAA; líneas estrechas, unión de la lectina de SNA; perfiles sombreados, control negativo (sin lectina añadida).

Figura 2. Estructuras de los genes de NA de los mutantes AL3(MaKS)-13 y K4(MaKS)-13. (A) El AL3(MaKS)-13 contiene una delección de 936 nucleótidos (de las bases 220 a 1253) que elimina una gran porción de la secuencia codificante del gen de NA. Esta mutación también mete un codón de terminación TAG dentro del marco dos bases más allá de la delección, de modo que el gen codifica únicamente un péptido de 66 aminoácidos, correspondiente a la cola citoplásmica, la región transmembrana, el tallo y una porción de la cabeza de la NA. (B) El gen de NA K4(MaKS)-13 contiene una delección de 1.066 nucleótidos (de las bases 130 a 1193) que elimina una gran porción de la secuencia codificante del gen de NA. Esta mutación también mete un codón de terminación TAG dentro del marco cuatro bases más allá de la delección, de modo que el gen codifica únicamente un péptido de 38 aminoácidos, correspondiente a la cola citoplásmica y a la región transmembrana del gen de la NA.

Figura 3. Actividad de sialidasa de los virus AM2AL3 y K4 parentales y los mutantes AL3(MaKS)-13 y K4(MaKS)-13. Para cada muestra, el virus ( $5 \times 10^2$  PFU) se incubó por duplicado durante 1 hora a 37 °C en presencia de un sustrato para la sialidasa fluorogénica (ácido 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -N-acetilneuramínico). La fluorescencia de la 4-metilumbeliferona se determinó con un fluorómetro (Labsystems Fluoroskan II) con excitación a 360 nm y emisión a 460 nm.

Figura 4A. Esquema de los vectores silvestre y NAFLAG.

Figura 4B. Esquema del método para la producción del virus NAFLAG.

Figura 4C. Inmunotinción de células MDCK infectadas con el virus NAFLAGWT o el virus NA (-). Las células se tiñeron con anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-FLAG M2 o anticuerpo policlonal anti-WSN.

Figura 5. Esquema del análisis de competición para un segmento 7 recombinante del virus de la gripe y el virus NAFLAG.

Figura 6A. Esquema de los vectores NAFLAG y NAFLAGM (-) ("-ATG")

Figura 6B. Inmunotinción de células MDCK infectadas con el virus NAFLAGM (-). Las células se tiñeron con anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 o anticuerpo policlonal anti-WSN.

Figura 7A. Análisis mediante hibridación *in situ* de células infectadas con NAFLAG y NAFLAGM (-) para la secuencia FLAG.

Figura 7B. Eficiencia de la replicación del virus NAFLAGWT o el virus NAFLAGM (-).

Figura 8A. Esquema de virus con delección de NA.

Figura 8B. Tasa de empaquetamiento de los virus con delección de NA.

Figura 9. Título vírico en el tiempo para los virus de la gripe con 6, 7 o 8 segmentos.

Figura 10. Esquema que muestra las señales de incorporación para los segmentos del virus de la gripe (punteado).

Figura 11A. Tomografía de microscopio electrónica de viriones de la gripe.

Figuras 11B-F. Imágenes en color de bastones encontrados mediante tomografía por microscopio electrónico de un virión de la gripe.

Figura 12. A) Segmentos virales para un virus de la gripe de tipo A y un virus de tipo A cuya secuencia de codificación de HA está sustituida por la de la HA de tipo B. B) Viriones para un virus de la gripe de tipo A y un virus de tipo A cuya secuencia de codificación de HA está sustituida por la de la HA de tipo B.

Figura 13. Diagrama de construcciones de HA quimérica A/B. Las construcciones de HA quimérica se produjeron

entre la HA del virus A/WSN silvestre (pPoll-WSN-HA) y del virus B/Lee silvestre (pPoll-B-HA) en un plásmido basado en pPoll (pHH21) como se describe en Neumann et al. (1999).

Figura 14. Expresión de virus de HA de tipo B y virus quiméricos HA A/B. Las células MDCK infectadas con cada virus se fijaron 24 horas después de la infección y se inmunotifieron con anticuerpos anti-A/HA, anti-B/HA o anti-A/NP.

Figura 15. Propiedades del crecimiento de virus quiméricos de HA A/B. Las células MDCK se infectaron con cada virus a una MDI de 0,01 DICT<sub>50</sub> y se vigiló el crecimiento del virus. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

Figura 16. Respuesta de anticuerpos al virus de tipo B en ratones a los que se ha inoculado virus quiméricos de HA A/B. A) A los ratones (3 ratones/grupo) se les inoculó por vía intranasal cada virus (DICT<sub>50</sub> 10<sup>3</sup>). Tres semanas después de la inoculación se tomaron lavados nasales/traqueales y muestras de suero de los ratones y se analizaron los anticuerpos IgA (lavado nasal/traqueal) o IgG (suero) anti-B específicos de virus en un ensayo de ELISA. B) También se analizaron los títulos de HI en muestras de suero. Cada barra indica el ratón individual infectado con el virus quimérico.

Figura 17. Diagrama esquemático de los ARNv de HA mutantes y su eficiencia de la incorporación en el virión. Todos los ARN de HA mutantes se muestran en orientación de sentido negativo. Cada mutante contiene el marco de lectura abierto de GFP (insertado en el marco con el marco de lectura abierto de HA) flanqueado por un codón de terminación, 3 nucleótidos de la región no codificante en 3' y 45 nucleótidos de la región no codificante en 5' del ARNv de HA (barras negras). Los mutantes se diseñaron de acuerdo con el número de nucleótidos derivados de las regiones codificantes de HA. Las regiones codificantes de HA se muestran como barras de color gris. La línea discontinua horizontal indica una delección. Las longitudes de las regiones no se escalan. La eficiencia de la incorporación del ARNv de HA mutante en VLP se determinó dividiendo el número de células que expresan GFP por el de las células que expresan NP en las células infectadas por VLP después de fijar las células 16 horas después de la infección.

Figura 18. Niveles de ARNv en células 293T transfectadas con plásmidos que expresan ARNv de HA mutantes. Las células 293T se transfectaron con pPollHA(0)GFP(0) o pPollHA(9)GFP(80) y plásmidos que expresan PA, PB1, PB2 y NP.

Figura 19. Las células infectadas por el virus VSVG(HA)GFP(NA) expresan VSV G y GFP. Las células MDCK se infectaron con el virus VSVG(HA)GFP(NA) o el virus WSN y se cubrieron con 1,0 % de agarosa. Las células infectadas se incubaron durante 48 horas a 37 °C y las placas se fotografiaron (A, B) con luz normal y (C, D) con luz fluorescente junto con luz normal limitada para identificar las placas. Las células se fijaron y permearon con 0,1 % de Triton-X100 en 3 % de solución de formaldehído. Las proteínas virales se detectaron mediante inmunotinción con el anticuerpo monoclonal anti-VSV G (E, F), el anticuerpo monoclonal anti-HA (G, H) o el anticuerpo monoclonal anti-NP (I, J) como anticuerpo primario y anticuerpo secundario biotinilado, usando el kit Vectastain ABC (Vector, Burlingame, CA).

Figura 20. Incorporación de la proteína VSV G en el virus VSVG(HA)GFP(NA). Los virus WNS, VSVG(HA)GFP(NA) y VSV concentrados se lisaron en un tampón de muestra. Las proteínas virales se trataron con 2-mercaptoetanol, se separaron mediante SDS-PAGE al 10 %, se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-VSV G o el anticuerpo monoclonal anti-WSN-HA. Las masas moleculares de las proteínas marcadoras se muestran a la izquierda.

Figura 21. Curvas de crecimiento del virus VSVG(HA)GFP(NA) en las células BHK, CHO, y MDCK. Las células BHK (A), CHO (B), y MDCK (C) se infectaron con el virus a una MDI de 0,001. A los tiempos indicados tras la infección, el título del virus en el sobrenadante se determinó usando células MDCK. Los valores son las medias de los experimentos por duplicado.

Figura 22. Diagrama esquemático de los ARNv de NS mutantes y su eficiencia de la incorporación.

Figura 23. Diagrama esquemático de los ARNv de M mutantes y su eficiencia de la incorporación.

Figura 24. Esquema de A) segmentos virales y B) viriones que expresan dos proteínas heterólogas.

Figura 25. Esquema del virus de la gripe con segmentos virales para dos proteínas heterólogas, V gp160 y gag del VIH.

Figura 26. Esquema de la producción de virus de replicación incompetente usando Cre/lox.

#### Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, los términos "aislado y/o purificado" hacen referencia a la preparación, aislamiento y/o purificación *in vitro* de una célula huésped o virus, de forma que no esté asociado con sustancias *in vivo*, o está sustancialmente purificado a partir de sustancias *in vitro*. Como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición) y, preferentemente, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 50 por ciento, más preferentemente más de aproximadamente 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición e, incluso más preferentemente, más de aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % y aproximadamente 99 %. Lo más preferentemente, la especie objeto está purificada hasta homogeneidad esencial (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición mediante métodos de detección convencionales).

Como se usa en el presente documento, la expresión “ácido nucleico recombinante” o “secuencia o segmento de ADN recombinante” hace referencia a un ácido nucleico, por ejemplo a ADN, que se ha obtenido o se ha aislado de una fuente, que puede alterarse posteriormente químicamente *in vitro*, de forma que su secuencia no es de origen natural o corresponde a secuencias de origen natural que no están colocadas como lo estarían en el genoma nativo. Un ejemplo de ADN “derivado” de una fuente sería una secuencia de ADN que se identifica como un fragmento útil o se ha transcrito de forma inversa a partir de ARN y que después se sintetiza en forma esencialmente pura. Un ejemplo de este ADN “aislado” de una fuente sería una secuencia de ADN útil que se escinde o elimina de dicha fuente por medios químicos, por ejemplo mediante el uso de endonucleasas de restricción, de forma que se puede manipular adicionalmente, por ejemplo amplificar, para su uso en la invención, mediante la metodología de ingeniería genética. El virus recombinante se prepara a partir de ácido nucleico recombinante.

Como se usa en el presente documento, un segmento o molécula de ácido nucleico “heterólogo” significa que el segmento, secuencia o molécula deriva de una fuente que es diferente de un segmento, secuencia o molécula de ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, un segmento de virus de la gripe de tipo A o una porción del mismo es heterólogo del correspondiente segmento de virus de la gripe de tipo B o una porción del mismo, un segmento o serotipo viral de NA de una cepa de la gripe es heterólogo de un segmento viral de NA de una cepa o serotipo diferente y una molécula de ácido nucleico de virus distinto de la gripe, por ejemplo, la gp160 del VIH es heteróloga de una molécula de ácido nucleico del virus de la gripe. Por el contrario, un segmento de ácido nucleico homólogo se obtiene de la misma fuente que un segmento de ácido nucleico de referencia. Por tanto, el vector de la invención es una molécula quimérica que incluye una región no codificante HA en 3', una secuencia de incorporación de HA en 3' y una secuencia de incorporación de HA 5' que son homólogas entre sí.

La frase “replicación eficiente” en el contexto de la presente invención se define como producción de títulos de alta infectividad en sistemas de cultivo tisular *in vitro*, tales como  $10^4$ – $10^{10}$  UFP/ml y, preferentemente,  $10^6$ – $10^9$  UFP/ml. La detección selectiva de virus de la gripe para su uso en replicación o producción de vacuna se puede analizar usando cualquier ensayo conocido y/o adecuado, como se sabe en la técnica. Dichos ensayos (individualmente o en cualquier combinación) que son adecuados para la detección selectiva incluyen, entre otros, replicación viral, medición cuantitativa y/o cualitativa de la inactivación (por ejemplo, mediante antisueros), transcripción, replicación, traducción, incorporación de viriones, virulencia, actividad de HA o NA, rendimiento viral y/o morfogénesis, usando procedimientos tales como genética inversa, reagrupación, complementación y/o infección. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de replicación de virus para la detección selectiva de la atenuación o inactivación del virus. Véase, por ejemplo, Krug, R.M., ed., *The Influenza Viruses*, Plenum Press, New York, (1989).

“Ácido siálico” hace referencia a una familia de aminoazúcares que contienen 9 o más átomos de carbono, por ejemplo, derivados N- y O-sustituidos del ácido neuramínico.

Como se usa en el presente documento, se pretende que “recombinación específica de sitio” incluya los tres acontecimientos siguientes: 1) delección de un segmento de ADN diana flanqueado por sitios o secuencias de recombinación específica de sitio, por ejemplo sitios *lox*; 2) inversión de la secuencia de nucleótidos de un segmento de ADN diana flanqueado por sitios o secuencias de recombinación específica de sitio, por ejemplo sitios *lox*; y 3) intercambio recíproco de segmentos de ADN diana próximos a los sitios o secuencias de recombinación específica de sitio, por ejemplo sitios *lox* localizados en moléculas de ADN diferentes. Los sistemas de recombinasa específica de sitio incluyen, entre otros, el sistema Cre/*lox* del bacteriófago P1 (patente de Estados Unidos n.º 5.658.772), el sistema FLP/FRT de levaduras (Golic y Lindquist, 1989), la Gin recombinasa de Mu (Maeser et al., 1991), la Pin recombinasa de *E. coli* (Enomoto et al., 1983), y el sistema R/R del plásmido pSR1 (Araki et al., 1992).

#### Líneas celulares y virus de la gripe que se pueden usar en la presente invención

De acuerdo con la presente invención, en la invención se puede usar cualquier célula que soporte una replicación eficiente del virus de la gripe, incluidas células mutantes que expresan niveles reducidos o disminuidos de uno o más ácidos siálicos que son receptores para el virus de la gripe. Los virus obtenidos mediante los métodos se pueden convertir en un virus reagrupado.

Preferentemente, las células son líneas celulares continuas certificadas, o certificables, por la OMS. Los requisitos para certificar dichas líneas celulares incluyen caracterización con respecto a al menos uno de la genealogía, características de crecimiento, marcadores inmunológicos, susceptibilidad de los virus, tumorigenicidad y condiciones de almacenamiento, así como mediante ensayos en animales, huevos y cultivo celular. Dicha caracterización se usa para confirmar que las células carecen de agentes inesperados detectables. En algunos países también puede ser necesaria una cariología. Además, preferentemente se analiza la tumorigenicidad en células que están al mismo nivel de pase que las usadas para la producción de vacunas. El virus se purifica, preferentemente, mediante un proceso que se ha demostrado que da resultados consistentes, antes de la inactivación o atenuación para la producción de vacunas (véase, por ejemplo, Organización Mundial de la Salud, 1982).

Se prefiere establecer una caracterización completa de las líneas celulares que se van a usar, de forma que se

pueden incluir ensayos adecuados para la pureza del producto final. Los datos que se pueden usar para la caracterización de una célula que se va a usar en la presente invención incluye (a) información sobre su origen, derivación e historial de pases; (b) información sobre su crecimiento y características morfológicas; (c) resultados de ensayos de agentes inesperados; (d) características distintivas, tales como patrones bioquímicos, inmunológicos y citogenéticos que permiten reconocer claramente a las células entre otras líneas celulares; y (e) resultados de los ensayos de tumorigenicidad. Preferentemente, el nivel del pase, o la duplicación de la población, de la célula huésped usada es lo más bajo posible.

Se prefiere que el virus producido en la célula esté altamente purificado antes de la formulación de la vacuna o la terapia génica. En general, los procedimientos de purificación tendrán como resultado una extensa eliminación del ADN celular, otros componentes celulares y agentes inesperados. También se pueden usar procedimientos que degradan o desnaturalizan extensamente el ADN. Véase, por ejemplo, Mizrahi, 1990.

#### Vacunas

Una vacuna de la invención puede comprender proteínas inmunogénicas, incluidas glicoproteínas de cualquier patógeno, por ejemplo una proteína inmunogénica de una o más bacterias, virus, levaduras u hongos. Por tanto, en una realización, los virus de la gripe de la invención pueden ser vectores de vacuna para virus de la gripe u otros patógenos virales, incluyendo, entre otros, lentivirus tales como VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del herpes, tales como CMV o VHS o virus de la enfermedad de la fiebre aftosa.

Una vacuna de virión completa se concentra mediante ultrafiltración y después se purifica mediante centrifugación zonal o mediante cromatografía. Se inactiva antes o después de la purificación usando formalina o beta-propiolactona, por ejemplo.

Una vacuna de subunidad comprende glicoproteínas purificadas. Dicha vacuna se puede preparar del siguiente modo: usando suspensiones virales fragmentadas mediante tratamiento con detergente, los antígenos de superficie se purifican mediante ultracentrifugación, por ejemplo. Por tanto, las vacunas de subunidad contienen, principalmente, proteína HA, y también NA. El detergente usado puede ser un detergente catiónico, por ejemplo tal como bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Bachmeyer, 1975), un detergente aniónico, tal como desoxicolato amónico (Laver & Webster, 1976); Webster et al., 1977); o un detergente no iónico tal como el comercializado con el nombre TRITON X100. La hemaglutinina también se puede aislar tras el tratamiento de los viriones con una proteasa tal como bromelina, después purificar mediante un método tal como el descrito por Grand y Skehel (1972).

Una vacuna fraccionada comprende viriones que se han sometido a tratamiento con agentes que disuelven lípidos. Una vacuna fraccionada se puede preparar del siguiente modo: Una suspensión acuosa del virus purificado obtenida como anteriormente, inactivada o no, se trata, con agitación, mediante disolventes lipídicos tales como éter etílico o cloroformo, asociada con detergentes. La disolución de los lípidos de la cubierta viral tiene como resultado la fragmentación de las partículas virales. Se recupera la fase acuosa, que contiene la vacuna fraccionada, constituida principalmente por hemaglutinina y neuraminidasa con su ambiente lipídico original eliminado, y el núcleo o sus productos de degradación. Después, las partículas infecciosas residuales se inactivan si todavía no se ha realizado.

Vacunas inactivadas. Las vacunas con el virus de la gripe inactivado de la invención se proporcionan inactivando los virus replicados de la invención mediante el uso de métodos conocidos, tales como, entre otros, tratamiento con formalina o  $\beta$ -propiolactona. Los tipos de vacuna con microorganismo inactivado que se pueden usar en la invención pueden incluir vacunas con virus enteros (VE) o vacunas de subviriones (SV) (fraccionadas). La vacuna VE contiene virus inactivados intactos mientras que la vacuna SV contiene virus purificados fragmentados con detergentes que solubilizan la cubierta viral que contiene lípidos, seguido de inactivación química de virus residuales.

Además, las vacunas que se pueden usar incluyen las que contienen las proteínas de superficie HA y NA aisladas, que se denominan vacunas con antígeno de superficie o de subunidades. En general, las respuestas a las vacunas SV y con antígeno de superficie (es decir, HA o NA purificadas) son similares. Una vacuna de VE inactivados experimental que contenía un antígeno NA relacionado inmunológicamente con el virus epidémico y una HA no relacionada parece ser menos eficaz que las vacunas convencionales (Ogra et al., 1977). Se prefieren las vacunas inactivadas que contienen ambos antígenos de superficie relevantes.

Vacunas con virus atenuados vivos. Las vacunas con virus de la gripe atenuados vivos también se pueden usar para prevenir o tratar la infección por el virus de la gripe, de acuerdo con etapas del método conocido. La atenuación se logra, preferentemente, en una única etapa mediante transferencia de genes atenuados desde un virus donante atenuado a un aislado replicado o virus reagrupado de acuerdo con métodos conocidos (véase, por ejemplo, Murphy, 1993). Dado que la resistencia al virus de la gripe A está mediada por el desarrollo de una respuesta inmunitaria frente a las glicoproteínas HA y NA, los genes que codifican estos antígenos de superficie deben proceder de los virus reagrupados o aislados clínicos de alto crecimiento. Los genes atenuados derivan del padre atenuado. En este abordaje, los genes que confieren la atenuación preferentemente no codifican las glicoproteínas HA y NA. De otro modo, estos genes no podrían transferirse a reagrupados portadores de los antígenos de superficie del aislado vírico clínico.

Se ha evaluado la capacidad de los virus donantes para atenuar de forma reproducible los virus de la gripe. Como ejemplo no limitante, se puede usar el virus donante adaptado al frío (af) A/Ann Arbor(AA)/6/60 (H2N2) para la producción de vacunas atenuadas (véase, por ejemplo, Edwards, 1994; Murphy, 1993). Adicionalmente, las vacunas con virus vivos reagrupados atenuados se pueden generar mediante apareamiento del donante af con un virus replicado virulento de la invención. Después, se selecciona la progenie reagrupada a 25 °C (restrictiva para la replicación del virus virulento), en presencia de un anticuerpo de H2N2, que inhibe la replicación de los virus portadores de los antígenos de superficie del virus donante af A/AA/6/60 (H2N2).

Se ha evaluado una gran serie de reagrupados H1N1 y H3N2 en seres humanos y se ha encontrado que son satisfactoriamente: (a) infecciosos, (b) atenuados para niños seronegativos y adultos sensibilizados inmunológicamente, (c) inmunogénicos y (d) genéticamente estables. La inmunogenicidad de los reagrupados af es paralela a su nivel de replicación. Por tanto, la adquisición de los seis genes transferibles del virus donante af mediante nuevos virus silvestres ha atenuado de forma reproducible estos virus para su uso en la vacunación de adultos y niños susceptibles.

Otras mutaciones atenuantes se pueden introducir en genes del virus de la gripe mediante mutagénesis dirigida a tipo para rescatar los virus infecciosos portadores de estos genes mutantes. Las mutaciones atenuantes se pueden introducir en regiones no codificantes del genoma, así como en regiones codificantes. Dichas mutaciones atenuantes también se pueden introducir en genes distintos de HA y NA, por ejemplo, el gen de la PB2 polimerasa (Subbarao et al., 1993). Por tanto, también se pueden generar nuevos virus donantes portadores de mutaciones atenuantes introducidas mediante mutagénesis dirigida a sitio y dichos nuevos virus donantes se pueden usar en la reducción de los candidatos a vacunas reagrupadas de H1N1 y H3N2 de un modo análogo al descrito anteriormente para el virus donante af A/AA/6/60. De un modo similar, otras cepas de donantes atenuados adecuadas y conocidas se pueden reagrupar con el virus de la gripe de la invención para obtener vacunas atenuadas adecuadas para su uso en la vacunación de mamíferos (Ewami et al., 1990; Muster et al., 1991; Subbarao et al., 1993).

Se prefiere que dichos virus atenuados mantengan los genes del virus que codifican los determinantes antigénicos sustancialmente similares a los de los aislados clínicos originales. Esto es porque la finalidad de la vacuna atenuada es proporcionar sustancialmente la misma antigenicidad que el aislado clínico original del virus, mientras que al mismo tiempo carece de infectividad en la medida que la vacuna causa un cambio mínimo en la inducción de una afección patogénica grave en el mamífero vacunado.

Por tanto, el virus se puede atenuar o inactivar, formular y administrar de acuerdo con métodos conocidos, como una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria en un animal, por ejemplo un mamífero. En la técnica se conocen bien los métodos para determinar si dichas vacunas atenuadas o inactivadas han mantenido una antigenicidad similar a la del aislado clínico o cepa de alto crecimiento de la que deriva. Dichos métodos conocidos incluyen el uso de antisueros o anticuerpos para eliminar los virus que expresan determinantes antigénicos del virus donante; selección química (por ejemplo, amantadina o rimantadina); actividad e inhibición de HA y NA; y detección selectiva de ADN (tal como hibridación con sonda o PCR) para confirmar que los genes donantes que codifican los determinantes antigénicos (por ejemplo, los genes de HA o NA) no están presentes en los virus atenuados. Véase, por ejemplo, Robertson et al., 1988; Kilbourne, 1969; Aymard-Henry et al., 1985; Robertson et al., 1992.

#### Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención, adecuadas para inoculación o para administración parenteral u oral, comprenden virus de la gripe atenuados o inactivados, que comprenden adicionalmente soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones o emulsiones. Las composiciones pueden además comprender agentes auxiliares o excipientes, como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Berkow et al., 1987; Goodman et al., 1990; Avery's Drug Treatment, 1987; Osol, 1980; Katzung, 1992. La composición de la invención generalmente se presenta en forma de dosis individuales (dosis unitarias).

Las vacunas convencionales generalmente contienen de aproximadamente 0,1 a 200 µg, preferentemente de 10 a 15 µg, de hemaglutinina de cada una de las cepas que entran en su composición. La vacuna que forma el constituyente principal de la composición de vacuna de la invención puede comprender un virus de tipo A, B o C, o cualquier combinación de los mismos, por ejemplo al menos dos de los tres tipos, al menos dos de diferentes subtipos, al menos dos del mismo tipo, al menos dos del mismo subtipo, o uno o más aislados o reagrupados diferentes. El virus de la gripe humana de tipo A incluye los subtipos H1N1, H2N2 y H3N2.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones y/o emulsiones, que pueden contener agentes auxiliares o excipientes conocidos en la materia. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Se pueden usar vehículos o vendajes oclusivos para aumentar la permeabilidad de la piel y potenciar la absorción del antígeno. Las formas de dosificación líquida para administración oral pueden comprender, en general, una solución liposómica que contiene la forma de dosificación líquida. Las formas adecuadas para suspender liposomas incluyen emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes y elixires que

contienen diluyentes inertes de uso habitual en la materia, tales como agua purificada. Además de los diluyentes inertes, dichas composiciones también pueden incluir adyuvantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, o agentes edulcorantes, aromatizantes o perfumantes. Véase, por ejemplo, Berkow et al., 1992; Goodman et al., 1990; Avery's, 1987; Osol, 1980; y Katzung, 1992.

5 Cuando una composición de la presente invención se usa para la administración a un individuo, puede comprender adicionalmente sales, tampones, adyuvantes u otras sustancias que son deseables para mejorar la eficacia de la composición. Para vacunas, se pueden usar adyuvantes, sustancias que pueden aumentar una respuesta inmunitaria específica. Normalmente, el adyuvante y la composición se mezclan antes de la presentación al sistema inmunitario o se presentan por separado pero en el mismo lugar del organismo que está siendo inmunizado. Los ejemplos de materiales adecuados para su uso en las composiciones de vacuna se proporcionan en Osol (1980).

15 La heterogeneidad en una vacuna se puede proporcionar mezclando virus de la gripe replicados para al menos dos cepas del virus de la gripe, tales como 2–50 cepas o cualquier intervalo o valor entre ellos. Se prefieren las cepas del virus de la gripe A o B que tienen una composición antigénica moderna. De acuerdo con la presente invención, las vacunas se pueden proporcionar para variaciones en una sola cepa de un virus de la gripe usando técnicas conocidas en la materia.

20 Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, puede además o adicionalmente comprender al menos un compuesto quimioterapéutico, por ejemplo, para terapia génica, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios o potenciadores inmunitarios y, para vacunas, agentes quimioterapéuticos incluyendo, entre otros, gamma globulina, amantadina, guanidina, hidroxibencimidazol, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$ , factor alfa de necrosis tumoral, tiosemicarbazonas, metisazona, rifampicina, ribavirina, un análogo de pirimidina, un análogo de purina, foscarnet, ácido fosfonoacético, aciclovir, didesoxinucleósidos, un inhibidor de proteasa, o ganciclovir. Véase, por ejemplo, Katzung (1992), y las referencias citadas en el mismo en las páginas 798–800 y 680–681, respectivamente.

25 La composición también puede contener cantidades variables pero pequeñas de formaldehído libre de endotoxinas, y conservantes, que se han encontrado que son seguros y no contribuyen a la aparición de efectos indeseables en el organismo al que se administra la composición.

#### Fines farmacéuticos

35 La administración de la composición (o del anticuerpo que produce) puede ser para fines “profilácticos” o “terapéuticos”. Cuando se proporciona profilácticamente, las composiciones de las invenciones que son vacunas se proporcionan antes de que cualquier síntoma de una infección patogénica se manifieste. La administración profiláctica de la composición sirve para prevenir o atenuar cualquier infección posterior. Cuando se proporciona terapéuticamente, la vacuna viral atenuada o inactivada se proporciona tras la detección de un síntoma de infección real. La administración terapéutica del o los compuestos sirve para atenuar cualquier infección real. Véase, por ejemplo, Berkow et al., 1992; Goodman et al., 1990; Avery, 1987; y Katzung, 1992.

40 Por tanto, una composición de vacuna atenuada o inactivada de la presente invención, puede proporcionarse antes del inicio de la infección (para prevenir o atenuar una infección anticipada) o tras el inicio de una infección real.

45 De un modo similar, para la terapia génica, la composición se puede proporcionar antes de que se manifieste cualquier síntoma de un trastorno o enfermedad o después de que se detecten uno o más síntomas.

50 Se dice que una composición es “farmacéuticamente aceptable” si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. Se dice que dicho agente se administra en una “cantidad terapéuticamente eficaz” si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Una composición de la presente invención es fisiológicamente significativa si su presencia produce un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor, por ejemplo potencia al menos una respuesta inmunitaria primaria o secundaria, humoral o celular contra al menos una cepa de un virus de la gripe infeccioso.

55 La “protección” proporcionada no tiene que ser absoluta, es decir la infección de gripe no tiene que prevenirse o erradicarse totalmente si hay una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población control o un conjunto de pacientes. La protección se puede limitar a mitigar la gravedad o la rapidez del inicio de los síntomas de la infección por el virus de la gripe.

#### Administración farmacéutica

60 Una composición de la presente invención puede conferir resistencia a uno o más patógenos, por ejemplo una o más cepas del virus de la gripe, mediante inmunización pasiva o inmunización activa. En la inmunización activa, una composición de vacuna con microorganismos vivos inactivados o atenuados se administra profilácticamente a un huésped (por ejemplo, un mamífero) y la respuesta inmunitaria del huésped a la administración protege contra la infección y/o la enfermedad. Para la inmunización pasiva, los antisueros producidos se pueden recuperar y

administrar a un receptor del que se sospecha que tiene una infección causada por al menos una copia del virus de la gripe.

5 La vacuna puede proporcionarse a un mamífero hembra (durante o antes del embarazo o el parto), en condiciones de tiempo y cantidad suficientes para dar lugar a la producción de una respuesta inmunitaria que sirve para proteger tanto a la hembra como al feto o neonato (mediante incorporación pasiva de los anticuerpos a través de la placenta o en la leche de la madre).

10 Por tanto, la presente divulgación incluye métodos para prevenir o atenuar un trastorno o enfermedad, por ejemplo una infección por al menos una cepa de patógeno. Como se usa en el presente documento, se dice que una vacuna previene o atenúa una enfermedad si su administración da lugar a la atenuación total o parcial (es decir, supresión) de un síntoma o afección de la enfermedad) o en la inmunidad total o parcial del individuo frente a la enfermedad.

15 Al menos un virus de la gripe, inactivado o atenuado, o una composición del mismo, de la presente invención, se puede administrar por cualquier medio que logre los fines previstos usando una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

20 Por ejemplo, la administración de dicha composición puede ser mediante diversas vías parenterales tales como las vías subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, oral o transdérmica. La administración parenteral puede realizarse mediante inyección en bolo o mediante perfusión gradual en el tiempo. Un modo preferido de usar una composición farmacéutica de la presente invención es mediante aplicación intramuscular o subcutánea. Véase, por ejemplo, Berkow et al., 1992; Goodman et al., 1990; Avery, 1987; y Katzung, 1992.

25 Un régimen típico para prevenir, suprimir o tratar una patología relacionada con el virus de la gripe comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición de vacuna como se describe en el presente documento, administrada como un tratamiento único o repetida como dosis potenciadoras o de refuerzo, en un periodo de hasta, e incluido, entre una semana y aproximadamente 24 meses, o cualquier intervalo o valor entremedias.

30 De acuerdo con la presente invención, una "cantidad eficaz" de una composición de vacuna es una que es suficiente para alcanzar un efecto biológico deseado. Se entiende que la dosificación eficaz dependerá de la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, en su caso, frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. Los intervalos de dosis eficaces proporcionados más adelante no se pretenden que limiten la invención y representan los intervalos de dosis preferidos. No obstante, la dosificación más preferida se adaptará al sujeto individual, como entiende y puede determinar un experto en la materia. Véase, por ejemplo, Berkow et al., 35 1992; Goodman et al., 1990; Avery's, 1987; Ebadi, 1985; y Katsung, 1992

40 La dosificación de una vacuna de virus atenuado para un mamífero (por ejemplo, un ser humano) u organismo adulto aviar puede ser de aproximadamente  $10^3$ – $10^7$  unidades formadoras de placas (UFP)/kg o cualquier intervalo o valor entremedias. La dosis de vacuna inactivada puede variar de aproximadamente 0,1 a 200, por ejemplo 50  $\mu$ g de proteína hemaglutinina. No obstante, la dosificación deberá ser una cantidad segura y eficaz tal como se determina mediante métodos convencionales usando las vacunas existentes como punto de partida.

45 La dosificación de la HA inmunorreactiva en cada dosis de vacuna de virus replicado se puede normalizar de modo que contenga una cantidad adecuada, por ejemplo 1–50  $\mu$ g o cualquier intervalo o valor entremedias, o la cantidad recomendada por el servicio de salud pública de EE.UU. (PHA), que normalmente es de 15  $\mu$ g, por componente para niños mayores  $\geq 3$  años de edad y de 7,5  $\mu$ g por componente para niños mayores  $< 3$  años de edad. La cantidad de NA también se puede normalizar, aunque esta glicoproteína puede ser lábil durante la purificación y almacenamiento del procesador (Kendal et al., 1980; Kerr et al., 1975). Cada dosis de 0,5 ml de vacuna contiene, 50 preferentemente, aproximadamente 1–50 billones de partículas víricas y, preferentemente, 10 billones de partículas.

La invención se describirá adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

#### 55 Ejemplo de referencia 1

##### Materiales y métodos

60 Virus y células. Los virus de H3N2 de humanos aislados de un solo paciente, bien en huevos de pollo embrionados (A/Tottori/AT1/AM2AL3/94; AM1AL3) de células de riñón canino Madin–Darby (A/Tottori/872/K4/94; K4) se obtuvieron de T. Ito (Tottori University, Tottori, Japón). Las reservas de virus cultivados en huevos de pollo embrionados de 10 días de edad (virus AMZAL3) o en células MDCK (virus K4) en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 0,3 % de seroalbúmina bovina y 0,5 mg de tripsina/ml. Las células MDCK se mantuvieron en MEM suplementado con 5 % de suero bovino de neonato (Sigma, St. Louis, MO.).

65 Generación de líneas celulares resistentes a lectina. Las células MDCK cultivadas hasta una confluencia del 75 % se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato y se incubaron con lectina de *Maackia amurensis*

(MAA(100 mg/ml; Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) o lectina de *Sambucus nigra* (SNA) (100 mg/ml; Boehringer Mannheim) en MEM que contiene 0,3 % de seroalbúmina bovina. Tras una incubación de 48 horas se sustituyó el medio por medio de crecimiento (MEM – 5 % de suero bovino fetal). La selección de la lectina se repitió como anteriormente dos veces adicionales. A continuación, las colonias de células supervivientes se clonaron y las líneas celulares seleccionadas con SNA y MAA se denominaron MDCK–Sn10 y MDCK–Ma, respectivamente.

Método HPLC fluorométrico para la determinación del contenido en ácido siálico. El contenido en ácido siálico (ácido N–acetilneuramínico [NeuAc] y ácido N–gliconeuramínico [NeuGc]) de ambas líneas celulares y el virus purificado se determinó fluorométricamente mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento, como se describe en Suzuki et al. (1997). Cada muestra se colocó en un vial con tapa de cristal molido de 5 ml y se mezcló con 100  $\mu$ l (25 mM) de ácido sulfúrico. Después, los viales se calentaron a 60 °C durante 12 horas para hidrolizar cadenas de sialoazúcar. Después de enfriar, se añadieron 50  $\mu$ l de 1,2–diamino–4,5–metilendioxi-benceno a 50  $\mu$ l del hidrolito y la mezcla se calentó a 60 °C durante 2,5 horas en oscuridad para desarrollar la fluorescencia del ácido siálico. Después se inyectó una alícuota de 10  $\mu$ l de la solución resultante en un cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento 880–PU (JASCO, Tokio Japón) equipado con una válvula inyectora de muestras (modelo 7125; Reodyne) y un espectrofotómetro fluorescente (650–105; Hirachi, Tokio, Japón) con una celda de flujo de 20– $\mu$ l y un registrador (Chromatopac C–RSA; Shionadzu, Kyoto, Japón). El espectrofotómetro fluorescente se colocó a una longitud de onda de excitación de 373 nm y una longitud de emisión de 448 nm. Se usaron mezclas estándar (200 pmol/ $\mu$ l) de NeuAc (Sigma) y NeuGc (Sigma) para establecer curvas de calibración.

Ensayo fluorométrico de la actividad sialidasa La actividad sialidasa del virus ( $5 \times 10^5$  UFP) se midió con ácido 2'–(4–metilumbeliferil)– $\alpha$ –D–N–acetilneuramínico (Sigma) como sustrato como se describe en Hara et al. (1987). En resumen, el sustrato fluorogénico, diluido a 1:2 con acetato sódico 0,5 M (pH 4,6), se añadió a un volumen igual de muestras de virus y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Las reacciones se detuvieron con 200 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> 0,5 M (pH 10,7) y después se incubó la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

Análisis de la secuencia de los genes NA y HA. El ARN viral (ARNv) total se obtuvo de la muestra de virus con el uso del kit de purificación de ARNv de Qiappin según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Inc., Valencia, Calif.). Para la producción de ADNc, el oligonucleótido Uni–12, complementario de los 12 nucleótidos de ARNv en el extremo 3' de los segmentos génicos del virus de la gripe A, se usó como cebador para la reacción con la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (Promega, Madison, WI). El ADNc del gen de NA se amplificó durante 30 rondas de PCR con los cebadores específicos del gen de NA JN2–43 (secuencia sentido en 5' de ARNc: 5'–TGGCTCGTTTCTCTACTATTGCC–3'; SEC ID N° 1) y JN2–1410r (secuencia antisentido en 3' de ARNc: 5'–TTATATAGGCATGAGATTGATGTCCG –3'; SEC ID N° 2) y 10 U de la ADN polimerasa *Pwo* (Boehringer Mannheim). Los productos de PCR resultantes se subclonaron en el vector pCR21 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y se usaron para secuenciación fluorescente automática. El gen de HA se clonó de un modo similar con los cebadores específicos del gen de HA JH3–Up (secuencia del cebador sentido en 5' del ARNc, 5'–AGCAAAAGCAGGGGATAATTCTATTAACCATGAAGAC–3'; SEC ID N° 3) y JH3–Down (secuencia del cebador antisentido en 3' del ARNc 5'–AGTAGAAACAAGGGTGTTTTAAATTAATGCACTC–3'; SEC ID N° 4). Para cada aislado se examinaron tres clones para obtener las secuencias consenso de NA y HA.

## Resultados

Generación de líneas celulares resistentes a lectina. Para producir líneas celulares con un menor nivel de expresión de ácido siálico en la superficie celular se usaron dos lectinas, SNA y MAA, que difieren en la especificidad de unión al ácido siálico. La lectina MAA se une al ácido siálico unido a galactosa mediante enlaces  $\alpha$ (2,3) (Wang et al., 1988), mientras que la lectina SNA es específica de los ácidos siálicos unidos a galactosa o a N–acetilgalactosamina mediante enlaces  $\alpha$ (2–6) (Shibuya et al., 1987). La línea celular MDCK, que soporta el crecimiento de los virus de la gripe, se usó como célula parental para la selección de lectina. Cuando se incubó en presencia de cualquier lectina, la mayoría de las células murió en un plazo de una semana. Después, los clones celulares resistentes se cultivaron para cultivos de reserva. Las líneas celulares resultantes de la selección de la lectina MAA y SNA se denominaron MDCK–Ma y MDCK–Sn10, respectivamente.

La clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) con las lectinas MAA y SNA marcadas con digoxigenina (Figura 1A) demostró niveles elevados de unión de las células MDCK a ambas lectinas, como se ha indicado anteriormente (Ito et al., 1997). Las células MDCK–Sn10 seleccionadas con lectina específica de enlaces  $\alpha$ (2,6) conservaron una fuerte unión a la lectina MAA específica de  $\alpha$ (2,3) pero mostraron unión a la lectina SNA más débil que la de las células MDCK parentales. Por el contrario, las células MDCK–Ma seleccionadas con la lectina específica del enlace  $\alpha$ (2–3) se unieron a las lectinas mucho más débilmente que las células MDCK.

Crecimiento viral en las líneas celulares MDCK–Sn10 y MDCK–Ma Para saber cómo los virus de la gripe se adaptan a las células con menor expresión del receptor se eligieron dos variantes del virus de la gripe AM2AL3 y K4) con una especificidad de unión al receptor de ácido siálico conocida (Ito et al., 1997). El virus K4 reconoce específicamente el NeuAc unido a galactosa mediante enlaces  $\alpha$ (2–6) [NeuAc $\alpha$ (2–6)Gal], mientras que el virus AM2AL3 es específico de NeuAc $\alpha$ (2–3)Gal. Ambos virus se replicaron casi tan bien en las células MDCK–Sn10 como en las células MDCK

(Tabla 1). No obstante, los títulos de ambos virus en las células MDCK–Ma fueron 1 log menores que en las células MDCK. Asimismo, tras la infección con cualquiera de los virus, incluso a una multiplicidad de infección de 10, un pequeño porcentaje de células MDCK–Ma siguió creciendo hasta la confluencia sin ningún efecto citopático. La producción de virus no se pudo detectar en estas células supervivientes mediante ensayo de hemaglutinación tras la sustitución del medio con otro que contiene tripsina, que estimula el crecimiento del virus. Las células también fueron negativas mediante tinción inmunológica para los virus de la gripe y las proteínas HA y NP (datos no mostrados), de modo que se demuestra que las células no estaban infectadas de forma persistente. Las células supervivientes se denominaron MaKS.

Tabla 1. Replicación de virus de la gripe en líneas celulares resistentes a lectina\*

Línea celular	Título (DICT <sub>50</sub> /ml)	
	AM2AL3	K4
MDCK	1,8 x 10 <sup>9</sup>	5,6 x 10 <sup>4</sup>
MDCK–Sn10	5,6 x 10 <sup>8</sup>	3,2 x 10 <sup>4</sup>
MDCK–Ma	1,8 x 10 <sup>8</sup>	5,6 x 10 <sup>3</sup>

\*La susceptibilidad de cada línea celular se determinó mediante la infección de células con AM2AL3 o K4 con virus y determinando la dosis requerida para infectar el 50 % de las células en cultivo tisular (DICT<sub>50</sub>).

El análisis FACS con las lectinas SNA y MAA demostró que las células MaKS, como las células MDCK–Ma de las que derivaron, se unieron a la lectina SNA específica de  $\alpha(2,6)$  mucho más débilmente que las células MDCK (Figura 1B). Además, el pico de unión a la lectina MAA de las células MaKS fue mucho más estrecho que en de la línea celular MDCK–Ma, con una pérdida de un pico de hombro pequeño que representa una población de unión a MAA más alta (Figura 1).

Para determinar si cantidades reducidas de ácido siálico eran responsables de la menor unión a la lectina de las células MaKS, los niveles de ácido siálico presentes en las células MaKS se cuantificaron mediante análisis cromatográfico de líquidos. La línea de células MaKS mostró niveles mucho más bajos tanto de NeuAc como de NeuGc (8,2 y 0,4 pmol/ $\mu$ g de proteína, respectivamente) que las células MDCK (216,0 y 2,5 pmol/ $\mu$ g de proteína), aunque el contenido NeuGc fue mucho menor. Estos datos demuestran una extensa reducción del determinante del receptor de ácido siálico en las células MaKS.

Adaptación del virus en células MaKS. Para determinar cómo se propagan los virus AM2AL3 y K4 y se adaptan al crecimiento en células que expresan niveles muy bajos del receptor del virus, ambos virus se sometieron a pases en serie en células MaKS en cultivo líquido. Dado que ambos virus se replicaron peor en las células MaKS que en las células MDCK (Tabla 2), los pases 1 a 3 se realizaron sin dilución y los pases 4 a 13 se realizaron a una dilución de 1:1.000. Tras el pase 8, el diámetro de las placas producidas por cualquier variante había cambiado de grande (más de 3 mm) a más pequeño (aproximadamente 1 mm). A los pases 10 y mayores, solo había placas más pequeñas cuando los virus se analizaron con células MDCK (datos no mostrados). Después de 13 pases en serie, ambos virus pudieron crecer en células MaKS tan bien o mejor que en las células MDCK (Tabla 2). Las reservas de virus producidas de cualquier variante después del pase 13 fueron AL3(MaKS)–13 y K4(MaKS)–13 amplificadas y diseñadas, respectivamente.

Tabla 2. Replicación de virus adaptados para crecer en células seleccionadas con lectina\*

Línea celular	Título (DICT <sub>50</sub> /ml)			
	AM2AL3	AL3(MaKS)–13	K4	K4(MaKS)–13
MDCK	1,8 x 10 <sup>9</sup>	5,6 x 10 <sup>4</sup>	5,6 x 10 <sup>4</sup>	5,6 x 10 <sup>4</sup>
MaKS	5,6 x 10 <sup>6</sup>	5,6 x 10 <sup>4</sup>	1,8 x 10 <sup>3</sup>	1,8 x 10 <sup>3</sup>
Resina, título de MDCK/Título de MaKS	321	1	31	0,3

\*La susceptibilidad de cada línea celular se determinó infectando las células con AM2AL3 (cultivadas en huevos), K4 (cultivadas en células MDCK). Virus de reserva AL3(MaKS)–13 (cultivados en células MaKS) o K4(MaKS)–13 (cultivados en células MaKS) y determinación de la dosis requerida para infectar el 50 % de las células de cultivo tisular (DICT<sub>50</sub>). Obsérvese que ambos virus adaptados en las células MaKS crecen en estas células, así como [AL3(MaKS)–13] o mejor que [K4(MaKS)–13] en las células MDCK, mientras que los virus originales crecen mejor en células MDCK.

Análisis mutacional de los genes HA y NA de los virus AL3(MaKS)–13 y K4(MaKS)–13. Para determinar la base molecular de la adaptación del virus a un ambiente celular caracterizados por una concentración menor del receptor, los genes de HA de los virus AL3(MaKS)–13 y K4(MaKS)–13 se sometieron a transcripción inversa, los ADNc se amplificaron mediante PCR y los productos resultantes se secuenciaron. Ninguno de los genes contenían mutaciones por comparación con los genes de HA correspondientes de los dos virus parentales.

Dado que los cambios en la actividad de NA sialidasa probablemente influyen sobre la actividad de unión al receptor y se determinó la secuencia de NA de los virus AL3(MaKS)–13 y K4(MaKS)–13. El análisis de la secuencia de los

genes de NA de ambas variantes reveló grandes deleciones internas (Figura 2). En AL3(MaKS)–13, la deleción se extendió desde los nucleótidos 220 a 1253, desplazando un marco de lectura y, por tanto, generando un codón de terminación inmediatamente después de la deleción. La capacidad de codificación de esta NA es de 66 aminoácidos, correspondiente a la cola citoplásmica, el dominio transmembrana, la región del tallo y una porción corta de la región de cabeza de NA. De un modo similar, el aislado K4(MaKS)–13 contenía una deleción en el gen de NA de las bases 130 a 1193, llevando un codón de terminación en el marco al codón 39. Como el virus AL3(MaKS)–13, el gen ya no codificó una región de cabeza catalítica completa. Por tanto, los virus pasados en una línea celular con una expresión muy baja del receptor perdieron su actividad catalítica de NA.

Para confirmar este resultado, las variantes AL3(MaKS)–13 y K4 (MaKS)–13 se analizaron para determinar la actividad sialidasa usando un sustrato sialidasa fluorescente [ácido 2'(4–metilumbeliferil)– $\alpha$ -D–N–acetilneuramínico]. Al contrario que los virus parentales, ninguno de los mutantes de deleción de NA tenía actividad sialidasa detectable (Figura 3).

Extensión de la sialilación de glicoproteínas virales. Durante la infección normal, los virus con menor actividad sialidasa no pueden crecer con eficiencia y agregarse en la superficie celular (Palese et al., 1974; Shibata et al., 1993). Entonces, ¿por qué los virus AL3(MaKS)–13 y K4(MaKS)–13, que carecen de actividad sialidasa, crecen en las células MaKS? Una posible explicación sería que dado que el contenido en ácido siálico de estas células es bajo, la extensión de la sialización de los oligosacáridos HA y NA también puede ser baja, lo que impide la agregación de los virus en la superficie de las células infectadas, incluso cuando no hay actividad de sialidasa viral. Para analizar esta hipótesis, el contenido en ácido siálico en preparaciones de virus purificadas se comparó entre los virus AM2AL3 y K4 cultivados en las células MDCK y los virus AL3(MaKS)–13 cultivados en células MaKS. El contenido en NeuAc fue similar entre las muestras de virus, aunque los virus AM2AL3 tenían menor contenido de ácido siálico (0,9 pmol de NeuAc/g de proteína) que las otras muestras (A/Tottori/872/K4/94, 3,8 pmol de NeuAc/g de proteína; AL3(MaKS)–13, 2,6 pmol de NeuAc/g de proteína).

Por tanto, los virus que carecen de actividad sialidasa pueden crecer con eficiencia en las células que expresan un nivel reducido de ácido siálico porque las glicoproteínas virales no se sialilan extensamente en comparación con aquellas en las líneas de células normales y no se unen a la HA, de modo que impide la agregación viral.

### Discusión

En estudios anteriores, el pase de los virus de la gripe A en presencia de una actividad sialidasa bacteriana exógena y anticuerpos frente a la NA viral condujo a la deleción del gen de NA viral (Liu et al., 1993; Liu et al., 1995; Yang et al., 1997). Además, los mutantes de NA obtenidos mediante dicho pase pudieron crecer en cultivos celulares que carecen de actividad sialidasa exógena, así como en huevos y ratones, como resultado de mutaciones compensatorias en la proteína HA que reducen la afinidad de la molécula por los residuos de ácido siálico (Hughes et al., 2000). Como se ha descrito en el presente documento, los virus de la gripe A pueden adaptarse para crecer en células con una expresión del receptor considerablemente reducida mediante mutaciones grandes por deleción del gen NA que anulan la actividad sialidasa. Incluso aunque la reducción de los receptores virales podía afectar en teoría a la proteína HA que se une al receptor solo se alteró el gen de NA.

¿Cuál es la base molecular de este hallazgo? En ambientes celulares normales en los que los receptores de ácido siálico son abundantes, la pérdida de actividad de NA se puede compensar mediante la reducción de la afinidad de HA viral por ácido siálico, lo que permite la liberación eficiente de la progenie de la superficie de la célula huésped e impide la agregación de viriones (Hughes et al., 2000). En ausencia de niveles altos de receptores virales, como en nuestras células MaKS, no es necesaria una reducción de la afinidad de HA para liberar la progenie viral y permitir el crecimiento de mutantes por deleción de NA. De hecho, la unión de alta afinidad de la proteína HA debe mantenerse para la replicación viral en células que expresan niveles bajos del receptor viral. No obstante, la actividad sialidasa no se requiere para la liberación de viriones y la prevención de la agregación de viriones en dicho ambiente, ya que las cantidades de ácidos siálico sobre las moléculas de la superficie celular son bastante bajas y los contenidos de ácido siálico de los viriones con deleción de NA son similares a los de los viriones silvestres. De hecho, es probable que la actividad sialidasa sea perjudicial para el crecimiento viral porque además elimina el ácido siálico determinante del receptor de la superficie celular. Recientemente, se demostró que el virus de la gripe A que carece de un tallo de NA y, por tanto, incapaz de crecer en huevos, adquirió una inserción en el tallo de hasta 22 aminoácidos mediante recombinación ARN-ARN no homóloga (Mitnau et al., 2000). En conjunto, estos hallazgos indican que los virus de la gripe se pueden adaptar a nuevos ambientes del huésped sometiéndose a cambios genéticos radicales, incluyendo inserciones y deleciones grandes.

En este y otros estudios previos (Hughes et al., 2000; Liu et al., 1993), los virus perdieron actividad sialidasa mediante deleciones internas en el segmento génico NA que no tenía los extremos del segmento que codifican la cola citoplásmica y la región transmembrana. Por tanto, las regiones conservadas del gen NA en estos mutantes pueden ser necesarias para funciones tales como la morfogénesis y la estabilidad de los viriones.

Las células MaKS tienen un contenido de ácido siálico menor que sus células parentales (MDCK). Aunque se han producido líneas celulares similares a partir de células CHO (Ray et al., 1991), no se ha demostrado que sean útiles

para los estudios del virus de la gripe por su incapacidad para soportar virus de la gripe eficientes. Por el contrario, las células MaKS derivaron de las células MDCK, una línea celular estándar en estudios de virus de la gripe y deberían ser útiles en análisis basados en receptores. Por ejemplo, dado que se sabe que los gangliósidos añadidos de forma exógena se incorporan en las membranas de la célula huésped (Carroll et al., 1985), por consiguiente, se podrían incubar gangliósidos conocidos con células MaKS y analizar su capacidad para servir como receptores virales.

Durante el siglo pasado, se produjeron tres pandemias de virus de la gripe A cuando los genes de HA o tanto de HA como de NA de virus emergentes se introdujeron en una población humana. Estudios comparativos de virus de diferentes animales huésped sugieren que estas cepas pandémicas se introdujeron mutaciones en el gen de HA (Bean et al., 1992). Si se requieren mutaciones similares en la NA para permitir que el virus cruce las barreras de las especies huésped; no obstante, la especificidad de sustrato del virus humano N2 NA, que derivó de un virus aviar cambió gradualmente durante su replicación en seres humanos (Baum et al., 1991). Los resultados descritos anteriormente en el presente documento indican que las mutaciones de NA pueden, de hecho, contribuir a la capacidad de los virus de la gripe A para adaptarse a nuevos ambientes. Por ejemplo, un virus reagrupado con NA del virus humano y el resto de los genes de un virus de pato no se replicó en patos (Hinshaw et al., 1983), aunque la NA del virus humano se originó en un virus aviar (Scholtissek et al., 1978). Esto sugiere que es probable que las mutaciones se produjeran en el gen de NA durante la adaptación en seres humanos. Los estudios comparativos de NA virales de diferentes huéspedes animales, junto con la genética inversa basada en plásmidos recién desarrollada (Fodor et al., 1999; Neumann et al., 1999) pueden proporcionar información útil en cómo estas glicoproteínas de superficie contribuyen a los cambios adaptativos entre los virus de la gripe en la naturaleza.

#### Ejemplo de referencia 2

##### Materiales y métodos

Células. Las células de riñón embrionario humano 293T se mantuvieron en medio de Dulbecco suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FCS) y las células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) se mantuvieron en medio Eagle suplementado con 5 % de suero bovino de neonato.

Genética inversa basada en plásmidos. Los virus de la gripe A se generaron usando plásmidos que poseen el ADNc de los genes virales A/WSN/33(H1N1) bajo el control de un promotor y terminados de la ARN polimerasa I (denominados plásmidos Poll) y plásmidos pCAGGS/MCS que expresan proteínas virales de la gripe como se describe en Neumann et al. (1999) (Figura 4B). En resumen, los plásmidos Pol1 y los plásmidos de expresión proteica se mezclaron con un reactivo de transfección, Trans IT LT-1 (Panvera, Madison, WI), se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se añadieron a  $1 \times 10^6$  células 293T cultivadas en Opti-MEM (GIBCO/BRL). Cuarenta y ocho horas después de la transcripción se añadieron 0,5  $\mu$ g por ml de tripsina al medio para activar la proteína HA, seguido de incubación durante 1 hora a 37 °C. Después se recogió el sobrenadante.

Plásmidos. El gen NAFLAG contiene la región no codificante en 5' del ARNc de NA; 51 codones de NA correspondientes a la cola citoplásmica (6 aminoácidos), región transmembrana (29 aminoácidos) y del tallo (16 aminoácidos) (Figura 4A); el epitopo FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys; SEC ID N° 5); dos codones de terminación secuenciales (TAA TAG; SEC ID N° 6); y 185 bases de la secuencia en el extremo 3' del ARNc de NA. Esta longitud de la secuencia en el extremo 3' es la más corta hallada en un segmento de NA truncado (Yang et al., 1997). pPol1-NAFLAGWT, que produce ARN de NAFLAG sentido negativo, se produjo delecionando los nucleótidos 173 a 1070 (en el sentido positivo) del gen WSN de NA en pT7Blue-NA (que contiene el gen A/WSN/33 NA de longitud completa flanqueado por sitios *BsmB1*) e insertando las secuencias FLAG, dos codones de terminación y un sitio *StuI* mediante PCR. Este fragmento se digirió mediante *StuI* y se produjo autoligación. El gen NAFLAG se escindió con *BsmB1* y se insertó en el sitio *BsmB1* de pHH21.

pPol1-NAFLAGM(-), para la producción de ARNv de NAFLAGM(-), carece del codón de iniciación para la proteína NA. Esto se consiguió cambiando el codón de iniciación ATG para la proteína NAFLAG truncada a GCG mediante un sistema de mutagénesis dirigida a sitio *in vitro* (GeneEditor, Promega).

pPol1NA-(183)GFP(157), que genera ARN que contiene el extremo no codificante en 3' del ARNv de NA y la secuencia complementaria que codifica una proteína de fusión con 61 codones de NA en el extremo NA, potenció la proteína fluorescente verde (eGFP, Clontech), y 185 bases del extremo 5' del ARNv de NA, se produjo mediante sustitución de los nucleótidos 203 a 1109 (en sentido positivo) del gen WSN de NA en pT7Blue-NA con un sitio *BgIII* mediante PCR inversa. El gen eGFP se clonó en este sitio *BgIII* y el sitio *StuI* en la posición 1226 (en el gen NA silvestre) en marco con la proteína NA. El gen NA-(183)GFP(157) se insertó después en el sitio *BsmB1* de pHH21.

El gen NA(0)GFP(0), que contiene la región no codificante en 3' del ARNv de NA, la secuencia codificante complementaria de eGFP, y la región no codificante en 5' del ARNv de NA, se produjo mediante PCR con cebadores oligonucleotídicos que poseen un sitio *BbsI*. Este fragmento de PCR se digirió mediante *BbsI* y se insertó en el sitio *BsmB1* de pHH21, de forma que tras la introducción del plásmido en las células, se sintetiza el ARN que contiene la secuencia codificante de eGFP en la orientación de sentido negativo flanqueada por regiones de ARNv de NA no

codificantes en 5' y 3'.

Se produjo una serie de mutantes por delección mediante mutagénesis por PCR. Los mutantes por delección de la proteína de fusión NA-eGFP se produjeron a partir del gen NA-(183)GFP(157) en el vector pT7blue. El gen NA-(183)GFP(0), que carece de todo el extremo en 3' (sentido positivo) de la región codificante de NA de NA-(183)GFP(157), se produjo mediante mutagénesis con PCR. Esta mutante contiene la región no codificante en 5' (sentido positivo), 61 aminoácidos de la secuencia de NA, el gen eGFP, dos codones de terminación y la región no codificante en 3'. Los mutantes de PCR, NA-(90)GFP(0), NA-(45)GFP(0), NA-(21)GFP(0) y NA-(18)GFP(0) contienen 30, 15, 7, o 6 delecciones de aminoácidos en el extremo N de la región codificante de NA de NA-(183)GFP(0), respectivamente.

El gen NA0G185, que contiene la región no codificante en 5', el en eGFP, dos codones de terminación y 185 nucleótidos del extremo 3' de NA (sentido positivo) se produjo del mismo modo a partir del gen NA(61)GFP. Este mutante tiene la región no codificante en 5' del ARNv de NA, el gen eGFP, dos codones de terminación y 157 nucleótidos de la región codificante en 5' de NA del ARNv. Los mutantes NA-(183)GFP(78) y NA-(183)GFP(39) son mutantes por delección de NA0G185, que tienen una mitad o un cuarto de la región codificante en 5' de Na como NA0G185, respectivamente.

Inmunotinción. Para detectar el epítipo FLAG unido al extremo C de la proteína NA truncada, las células MDCK se infectaron con virus que poseen este epítipo y se cubrieron con 0,6 % de agarosa que contiene 0,5 µg por ml de tripsina y 100 µU por ml de sialidasa de *Vibrio Cholerae* (GIBCO/BRL). Las células infectadas se fijaron con 3 % de solución de formaldehído, se permearon mediante 0,1 % Triton-X100 en 3 % de solución de formaldehído. Después, el epítipo FLAG se detectó usando un kit Vectastain ABC (Vector, Burlingame, CA) y el anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma) como anticuerpo primario e IgG anti-ratón biotinilada como anticuerpo secundario. Para identificar células infectadas por el virus WSN se usó un suero anti-WSN de conejo como anticuerpo primario.

Hibridación *in situ*. Las células infectadas se hibridaron con sonda marcada con digoxigenina (DIG) y se tiñeron usando un kit de detección de ácido nucleico DIG (Roche) conforme al protocolo del fabricante. Un oligonucleótido (100 pmol) complementario a la secuencia de nucleótidos que codifica el epítipo FLAG (GACTACAAGGACGACGATGACAAG; SEC ID N° 7) se marcó mediante el kit DIG Oligonucleotide Tailing (Roche) a 37 °C durante 6 horas. Las células infectadas por virus se fijaron con 3 % de solución de formaldehído, se permearon mediante 0,1 % Triton-X 100 en 3 % de solución de formaldehído y se prehibridaron a 65 °C durante 30 minutos en tampón de prehibridación (5x SSC, 1 % de reactivo de bloqueo del kit de detección, 0,1 % de N-lauroilsarcosina, 0,02 % de dodecilsulfato sódico [SDS]) que contiene 0,1 mg/ml de Poli(A)-ADN del kit de detección). Las sondas oligonucleotídicas (10 pmol) se añadieron al tampón de prehibridación y se hibridaron a 55 °C durante 1 hora. Las células hibridadas se lavaron durante 5 minutos con tampón de lavado (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, 0,3 % de Tween 20, pH 7,5), se bloquearon con 1 % de reactivo de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo anti-DIG (1:500) conjugado con fosfatasa alcalina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron con el tampón de lavado y se incubaron con cloruro de tetrazolo nitroazul/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (NBT/BCIP) en el tampón de detección (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 9,5) a temperatura ambiente durante 3 horas en oscuridad.

Pases competitivos. Los virus NAFLAGWT o NAFLAGM(-) (300 unidades formadoras de placa [UFP]) se mezclaron con  $3 \times 10^4$  UFP de virus NA(-) y se usaron para infectar las células MDCK subclonfluentes (multiplicidad de infección de 0,01) y se incubaron durante 72 horas en medio que contiene 0,5 µg por ml de tripsina y 100 µU por ml de sialidasa de *Vibrio cholerae*. Los virus recolectados se usaron para infectar las células MDCK. Este proceso se repitió 5 veces.

## Resultados

Un virus de la gripe A que carece del segmento génico de NA es viable. El mantenimiento del gen de NA truncado después de pases repetidos sugirió su importancia para la replicación viral. Para generar un virus de la gripe A mutante sin el segmento de ARN de NA, células 293T se transfectaron con plásmidos para la producción de ARNv, con la excepción de ARNv de NA y aquellos para la expresión de nueve proteínas estructurales. Tras la incubación del sobrenadante del cultivo de células 293T con células MDCK en presencia de sialidasa de *Vibrio Cholerae* se observaron placas (diámetros  $189 \pm 15,6$  µm). En cultivo líquido, este virus (denominado NA(-)) creció hasta  $10^5$  UFP/ml. Por tanto, fue viable un virus de la gripe A con solo 7 segmentos de ARNv.

Un segmento de NA truncado se requiere para el crecimiento viral eficiente. Para entender la base molecular para el mantenimiento estable del gen de NA truncado tras pases repetidos, el crecimiento de virus que contiene un gen de NA truncado se comparó con el virus que carece del codón de iniciación para el gen de NA, de modo que codifica el virus NA(-). Se generó un virus mutante, NAFLAGWT, mediante genética inversa. NAFLAGWT tiene un gen de NA con una delección interna y una secuencia del epítipo FLAG fusionada con el gen de NA truncado. NAFLAGWT creció hasta  $10^5$  UFP/ml y produjo placas en presencia de una sialidasa bacteriana. Las placas se inmunotifieron con anticuerpo monoclonal anti-FLAG o anticuerpo policlonal anti-WSN (Figura 4C). Las placas producidas por el virus NA(-) o NAFLAGWT se tiñeron con el anticuerpo anti-WSN, pero solo las del último virus se tiñeron con el

anticuerpo anti-FLAG.

Para determinar la diferencia en la capacidad de replicación, los virus NA(-) y NAFLAGWT se mezclaron a una proporción de 100:1 y esta mezcla se incubó con las células MDCK (Figura 5). A las 48 horas de la infección, se retiró el sobrenadante y se usó para la producción de placas, que se inmunotifieron con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG. La prevalencia del virus con el segmento de NA truncado se determinó calculando el porcentaje de placas positivas para FLAG entre las placas totales. Este procedimiento se repitió 4 veces más. Como se muestra en la Figura 7B, las placas positivas para FLAG en la población se aumentó gradualmente durante los pases, alcanzando casi el 90 % al quinto pase. Este resultado muestra que un virus con 8 segmentos (aunque el gen de NA truncado no codifica una sialidasa funcional) se cultiva mejor que un virus con 7 segmentos.

El ARN viral es importante para un crecimiento viral eficiente. Para determinar si una proteína NA truncada o ARN viral es importante para una replicación viral eficiente se construyó un gen NAFLAGM(-) que carece del codón de iniciación de NA y otro codón ATG en marco (el codón número quince) (Figura 6A). Las placas producidas por el virus NAFLAGM(-) no se detectaron mediante el anticuerpo anti-FLAG (Figura 6B), lo que indica que la proteína no se había traducido. Para garantizar que el virus NAFLAGM(-) posee el gen NAFLAGM(-) se realizó hibridación *in situ* sobre placas producidas por este virus usando una sonda específica de la secuencia FLAG. Estas placas reaccionaron con la sonda, lo que confirma la presencia del gen NAFLAGM(-) en este virus. La capacidad de replicación de este virus se comparó después con el virus de 7 segmentos descrito anteriormente. El porcentaje de placas marcadas con la sonda específica de la secuencia FLAG aumentó gradualmente (Figura 7B) y casi el 80 % de las placas se convirtió en positiva para la secuencia FLAG al quinto pase (Figura 7A). No hubo revertientes a aquellos que expresan la proteína NA truncada durante el pase, como demuestra la falta de tinción con el anticuerpo anti-FLAG. Por tanto, el propio ARN viral parece desempeñar un papel importante en la replicación viral eficiente, aunque la proteína NA truncada también puede desempeñar un papel en la replicación viral eficiente ya que la tasa a la cual NAFLAGM(-) se hizo dominante en la infección mixta fue menor que la del virus NAFLAGWT.

Una señal de empaquetamiento del ARN viral de NA se extiende a la secuencia de codificación. Incluso después de un pase extenso de los virus CK2-29 y E17E (Hughes et al., 2000), el gen de NA truncado se mantuvo, lo que sugiere que la señal para la incorporación de ARNv en los viriones (es decir, señal de empaquetamiento) está presente en la región de codificación del segmento de ARN de NA. Para comprobar esta hipótesis se insertó una secuencia de codificación de eGFP en el gen de NA truncado en marco, en el que se había deletado la secuencia de NA. Por tanto, este recombinante, denominado NA-(183)GFP(157), posee el extremo no codificante en 3' del ARNv de NA y 61 codones de la región codificante de NA en el extremo N, una región codificante de eGFP y 185 nucleótidos del extremo 5' del ARNv de NA. Se preparó un virus que posee el gen NA-(183)GFP(157) en lugar del correspondiente gen de NA silvestre y se realizaron ensayos de placas (Figura 8A). Más del 90 % de las placas expresaron eGFP, lo que indica que el gen NA-(183)GFP(157) se había incorporado en los viriones y se mantuvo durante la replicación viral (Figura 8B). Este hallazgo fue interesante considerando que la secuencia CAT flanqueada por las secuencias no codificantes de NS no se mantenía durante más de 5 pases (Luytjes et al., 1989).

Dado que la diferencia entre las construcciones NA-(183)GFP(157) y CAT es la presencia de la secuencia codificante viral se generó un gen similar a la construcción CAT, NA(0)GFP(0), que contiene la secuencia codificante eGFP flanqueada por las regiones no codificantes de NA en 3' y 5'. Esta construcción carece de la secuencia codificante de NA. Aunque el virus generado con este gen produjo placas, solo una población minoritaria (0,1 %) de placas tenía una o dos células que expresan eGFP, lo que indica que el gen NA(0)GFP(0) no se mantenía en el virus durante la replicación viral. En las células 293T transfectadas con plásmidos, incluyendo uno que expresa el gen NA(0)GFP(0) para la producción viral, eGFP se expresó en menor medida en comparación con las transfectadas con el plásmido que expresa NA(61)GFP. La cantidad del plásmido Poll para NA(0)GFP(0) se multiplicó por 10, lo que tuvo como resultado un número similar de células 293T que expresan eGFP como las células transfectadas con el plásmido Poll para NA(61)GFP. Incluso con la cantidad 10 veces mayor del plásmido Poll para este gen, solo el 1 % de las placas producidas por el virus NA(0)GFP(0) contenía células positivas para eGFP y solo unas pocas células en estas placas expresaban eGFP. Estos resultados indicaron que la señal de empaquetamiento del ARN de NA viral se extiende en la secuencia codificante de NA.

El papel de los segmentos de ARN en la producción eficiente de viriones. El papel de los segmentos de ARN en la producción eficiente de viriones. Para producir un virus de 8 segmentos, las células 293T se transfectaron con plásmidos de expresión proteica para las 9 proteínas estructurales y 8 plásmidos Poll para la producción viral normal. Asimismo, se usó un plásmido NS Poll que tiene dos mutaciones que eliminan la producción de NS2; por tanto, los virus producidos en células 293T no sufren múltiples ciclos de replicación. Además, se usaron los plásmidos Poll de HA y NA que tienen mutaciones que eliminan la producción de las proteínas HA y NA, respectivamente, de forma que el efecto de la eliminación de los segmentos génicos solo está restringida al segmento de ARN, no al producto génico. Para la producción de un virus de 7 segmentos, el plásmido Poll para el gen de NA se eliminó, aunque se incluyó un plásmido para la expresión de la proteína NA. Para preparar un virus con 6 segmentos, los plásmidos para los ARN de HA y NA se omitieron, aunque se incluyeron plásmidos para la expresión de las proteínas HA y NA.

Para comparar la producción de viriones entre estos virus, el número de viriones infecciosos producidos a partir de células transfectadas con plásmidos se tituló mediante infección de las células MDCK con estos virus y las células infectadas inmunotefñidas con el anticuerpo anti-WSN 48 horas después de la infección. Como se muestra en la figura 9, la eficiencia de la producción de viriones infecciosos se correlacionó con el número de segmentos de ARN viral; cuanto mayor es el número de segmentos de ARN viral, mejor es la producción de viriones. Estos resultados indican el papel de los segmentos de ARN viral en producciones eficientes de viriones.

El extremo 3' del ARNv de NA es importante para su empaquetamiento en viriones. Para estrechar la señal de empaquetamiento en el ARNv de NA se prepararon virus que tenían genes de NA truncados con deleciones adicionales en la región codificante en 3' o 5' (ARNv sentido) (Figura 8A). Aproximadamente el 40 % de las placas producidas por el virus NA-(183)GFP(0), que carece del extremo 5' de la región codificante de NA, expresó eGFP, aunque solo el 1,8 % de las placas producido por el virus NA0G185 que carece el extremo 3' de la región codificante de NA expresó eGFP. Estos datos indican que el extremo 3' de a región codificante de ARNv de NA es importante para el empaquetamiento de viriones (Figura 8).

### Discusión

Al producir construcciones por deleción se determinó la región codificante de NA que tuvo como resultado la incorporación del segmento de NA en los viriones. Se descubrió que ambos extremos de las regiones codificantes eran importantes, pero el extremo 3' del ARNv correspondiente al extremo 5' de la región codificante de NA fue más consecuenencial que el otro extremo. Para el segmento de NS, el extremo 3' del ARNv correspondiente al extremo 5' de la región codificante de NS parece más importante que el otro extremo para incorporación (Figura 22). Por el contrario, para los segmentos de HA, M y NP, ambos extremos son importantes, y para PB2, es importante el extremo 5' del ARNv correspondiente al extremo 3' de la región codificante de PB2. Estos resultados muestran que las secuencias importantes para la incorporación del segmento de ARNv se localizan en las regiones codificantes y, por tanto, son únicas de cada segmento. Posiblemente, dichas regiones interaccionan con otros ANR virales mediante apareamiento de bases, lo que conduce al reclutamiento de un conjunto de 8 segmentos de ARNv en un virión. Dado que la interacción entre ARNv y los componentes virales es específica del virus, dicha interacción puede ser una diana para el desarrollo de compuestos antivirales.

### Ejemplo de referencia 3

Para obtener una imagen verdadera de los contenidos del virus se realizó tomografía con microscopio electrónico (Figura 11A). Se recolectó una imagen de viriones con un espesor de 50 nm. Después se realizó un análisis de uno de los viriones y se reconstituyeron las imágenes 3D del contenido de viriones. Las estructuras (barras) dentro de la partícula están coloreadas para distinguir cada estructura (Figuras 11B-F, que muestran vistas desde arriba, laterales y desde abajo). La mayoría de estas vistas para los bastones se cortan para una vista, en la que los bastones se cortaron por el medio, se muestra toda la molécula. No obstante, todas las vistas muestran interacciones entre bastones.

Según los resultados resumidos anteriormente, incluyendo los datos que soportan que cada segmento viral contiene una secuencia única que es importante para la incorporación en viriones, que probablemente contribuya a la formación de las características morfológicas únicas de los contenidos virales, es probable que los segmentos de ARNv se incorporen de forma selectiva en los viriones de la gripe. Esta información es útil no solo para identificar las dianas para desarrollar compuestos antivirales, sino también para la preparación de vacunas con microorganismos vivos atenuados, ya que la alteración de las interacciones específicas de virus puede inhibir la replicación viral y conducir a la atenuación.

### Ejemplo de referencia 4

#### Materiales y métodos

Células. Las células de riñón embrionario humano 293T y las células COS-7 se mantuvieron en medio mínimo esencial de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) con 10 % de suero bovino fetal y antibióticos. Las células de riñón canino Madin-Derby (MDCK) se cultivaron en MEM con 5 % de suero bovino de neonato y antibióticos. Las células se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

Construcción de plásmidos. La generación de construcciones de plásmidos para la producción de ARN viral (denominados pPoll) que contienen los genes de HA de los virus A/WSN/33 (H1N1) silvestre (denominados pPoll-WSN-HA) y B/Lee/40 (pPoll-B-HA) silvestre flanqueados por el promotor de la ARN polimerasa I humana y el terminador de la ARN polimerasa de ratón se describió en Neumann et al. (1999). Una serie de construcciones de HA pPoll quiméricas A/B se produjo mediante amplificación por PCR con los cebadores y la polimerasa ProofStart (QiAGEN) y la posterior unión usando construcciones de HA silvestres (Figura 13). Todas las construcciones se secuenciaron para garantizar que no se habían incluido las mutaciones indeseadas.

Ensayos biológicos de HA expresadas en cultivo celular. Cada construcción HA pPoll quimérica A/B (1 µg) se

transfectó en células COS-7 usando el reactivo Trans IT (Mirus) junto con los otros cuatro plásmidos basados en pCAGGS (1 µg de cada uno) que expresan tres subunidades de polimerasa (PA, PB1, y PB2) y la nucleoproteína (NP) del virus A/WSN (Neumann et al., 1991). A las 48 horas de la transfección se trataron las células con sialidasa de *Vibrio cholerae* (10 U/ml) y TPCK-tripsina (2,5 µg/ml) a 37 °C durante 30 minutos. Después, las células se fijaron con 4 % de paraformaldehído y se inmunotifieron usando el anticuerpo anti-B/HA y un kit de detección de ABC comercial (Vector laboratory). Asimismo se realizaron ensayos de hemadsorción para evaluar las propiedades de unión al receptor de cada HA. En resumen, las células transfectadas se incubaron en una suspensión de glóbulos rojos de pollo al 1 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se lavaron 5 veces antes de la observación. Adicionalmente se llevaron a cabo ensayos de fusión. En resumen, las células transfectadas se incubaron en tampón HEPES (pH 5,0) a 37 °C durante 5 minutos, seguido de incubación en medio de cultivo durante 7 horas. Tras la fijación con metanol frío, las células fusionadas se inmunotifieron como se ha descrito anteriormente.

Genética inversa. El virus se generó mediante sistemas de genética inversa de A/WSN o B/Lee basados en plásmidos como se describe en Neumann et al. (1999). Los virus con genotipos silvestres producidos a partir de plásmidos se denominaron A/WSN-R o B/Lee-R, respectivamente, y se usaron como controles para comparación. Para producir virus quiméricos A/B, se usaron construcciones HA Poll quiméricas en lugar de pPoll-WSN-HA. Los virus producidos a partir de células 293T se clonaron biológicamente mediante dilución límite una vez y los virus de reserva se produjeron en células MDCK.

Infección experimental. Para analizar la patogenicidad de los virus, se infectó a ratones BALB/c hembra de cuatro semanas de edad anestesiadas con sevoflurano, por vía intranasal con los virus quimérico A/B o silvestre ( $10^5$  DICT<sub>50</sub>/50 µl). La mortalidad y los pesos corporales se monitorizaron durante 14 días después de la infección. Tres días después de la infección, se sacrificó a algunos de los ratones infectados para la determinación de los títulos de virus en órganos.

Para evaluar la eficacia de la vacuna de cada virus quimérico contra la exposición al silvestre, se infectó a los ratones por vía intranasal con los virus quimérico o silvestre ( $10^3$  DICT<sub>50</sub>/50 µl). Tres semanas después se sacrificó a un grupo de ratones para obtener los sueros y lavados traqueo-nasales para detectar anticuerpos IgA o IgG específicos de virus. Cuatro semanas después de la infección, los ratones restantes fueron expuestos intranasalmente con anestesia a 50 DL<sub>50</sub> del virus silvestre (B/Lee-R) y se les monitorizó para determinar la mortalidad y el peso corporal durante 14 días.

Detección de anticuerpo específico de virus. Las muestras de suero y de lavados traqueo-nasales se analizaron para determinar los anticuerpos IgA o IgG mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) como se describe en Kida et al. (1982). Los anticuerpos HI también se analizaron usando muestras de suero tras el tratamiento con la enzima destructora del receptor (RDEII: Denka Seiken).

## Resultados

Construcción de genes de HA quiméricos A/B. Para determinar la compatibilidad de la HA de tipo B con los componentes virales de tipo A se construyó una serie de genes quiméricos entre los genes A/WSN y B/Lee (Figura 14). Dado que las secuencias no codificantes en ambos extremos de los segmentos de ARN es probable que sean intercambiables entre los virus de tipo A y B para la transcripción y replicación del ARN (Crescenzo-Chaigne et al., 1999; Desselberger et al., 1980; Muster et al., 1981), se preparó un gen de HA quimérico que contenía las secuencias no codificantes del virus de tipo A y la totalidad de la secuencia codificante del virus de tipo B (Figura 14A, ANBH). Esta construcción produciría proteína HA de tipo B intacta. Después, se preparó un gen quimérico en el que la región de la secuencia señal de la secuencia codificante de HA de tipo B y la secuencia no codificante se cambiaron al del virus de tipo A (ANSBH). Esta construcción también produciría HA intacta de tipo B tras la eliminación del péptido señal de tipo A mediante la peptidasa de la señal celular. De un modo similar se preparó un gen quimérico en el que la secuencia codificante de las regiones citoplásmicas y transmembrana de la HA se cambió del tipo B al tipo A (ANTBH), de modo que codifica una proteína HA quimérica A/B. Se preparó un gen quimérico en el que las secuencias codificantes de las regiones señal y transmembrana/citoplásmica se cambiaron del tipo B al tipo A (ANSTBH). Esta construcción produciría la misma proteína HA quimérica que ANTBH, tras la eliminación del péptido señal. Además, se preparó una quimera que contenía todas las secuencias cadena arriba de la región correspondiente al sitio de escisión del tipo B y la región cadena abajo del virus de tipo A en la secuencia codificante de HA (ANBW). Esta construcción produciría una proteína HA quimérica que comprende la región HA1 del virus de tipo B y la región HA2 del virus de tipo A. Por último, se preparó un gen quimérico en el que la secuencia señal se cambió del tipo B al tipo A dentro de la construcción ANBW, que daría como resultado la misma proteína HA quimérica que ANBW.

Propiedades biológicas de las HA quiméricas A/B expresadas en cultivo celular. Para evaluar la funcionalidad de las HA quiméricas, cada construcción pPoll HA se transfectó a células COS-7 junto con los plásmidos que expresan PA-, PB1-, PB2- y NP del virus de tipo A. Todas las construcciones de HA quiméricas se expresaron en la superficie celular. Para analizar las actividades de unión al receptor de estas HA se realizaron ensayos de hemadsorción. Antes del ensayo, las células transfectadas se trataron con sialidasa bacteriana para eliminar el ácido

siálico terminal en las cadenas laterales de oligosacáridos de la HA, lo que interferiría con su capacidad de unión al receptor (Luo et al., 1999). Las células que expresan ANBH-, ANSBH-, ANTBH- y ANSTB se hemadsorbieron, mientras que las que expresan las otras dos (ANBW y ANSBW) no lo hicieron (Tabla 3). De un modo similar, las HA anteriores indujeron la fusión celular, aunque la última no. Estos resultados indicaron que las quimeras de HA anteriores eran biológicamente funcionales, mientras que las últimas dos no se debieron, posiblemente, a alteraciones estructurales. Como se ha previsto a partir de informes previos, la HA de tipo B funcional se produjo a partir de segmentos intactos de HA de tipo B silvestre por tipo de complejo de polimerasa A y NP (Tabla 3), lo que confirma la compatibilidad entre las estructuras del promotor de tipo B y el complejo de la polimerasa A.

Tabla 3. Propiedades de las HA quiméricas A/B expresadas en células y virus que las poseen.

Construcción de HA	Propiedad en cultivo celular <sup>a)</sup>			Generación de virus que poseen este gen <sup>b)</sup>	Título vírico en el sobrenadante de células transfectadas (DICT <sub>50</sub> /ml)	Título vírico de la reserva <sup>c)</sup> (DICT <sub>50</sub> /ml)
	Expresión en la superficie celular	Hemadsorción	Fusión			
HA silvestre						
WSN-HA	+	+	+	+	3,2 x 10 <sup>7</sup>	6,3 x 10 <sup>7</sup>
B-HA	+	+	+	-	NA <sup>d)</sup>	
Quimérico de HA A/B						
ANBH	+	+	+	+	2,0 x 10	6,3 x 10 <sup>2</sup>
ANSBH	+	+	+	+	1,1 x 10 <sup>2</sup>	2,0 x 10 <sup>6</sup>
ANTBH	+	+	+	+	2,0 x 10 <sup>4</sup>	6,3 x 10 <sup>6</sup>
ANSTBH	+	+	+	+	1,1 x 10 <sup>6</sup>	3,6 x 10 <sup>6</sup>
ANBW	+	-	-	-	NA	
ANSBW	+	-	-	-	NA	

<sup>a)</sup> Cada construcción de HA se transfectó en células COS-7 junto con plásmidos que expresan polimerasa y NP de tipo A. A las 48 horas de la transfección se analizaron las propiedades biológicas de cada HA.  
<sup>b)</sup> La generación de virus que poseen el gen de HA silvestre o quimérico junto con otros genes del virus de la gripe A se realizó mediante un sistema de genética inversa basado en plásmidos. A las 48 horas de la transfección, el sobrenadante de células 294T transfectadas se recolectó y se tituló para determinar la infectividad.  
<sup>c)</sup> La reserva de virus se preparó con células MDCK. Los virus se recogieron cuando los efectos citopáticos estaban avanzados.  
<sup>d)</sup> NA: no disponible.

Producción de virus con HA quiméricas. Para determinar si los genes de HA quiméricos funcionan durante la infección con el virus de la gripe A se preparó un virus WSN mutante en el que el gen de HA se reemplazó por un gen quimérico de HA A/B. La genética inversa basada en plásmidos permitió la generación de virus silvestre con un título de aproximadamente 10<sup>7</sup> DICT<sub>50</sub>/ml (Tabla 3). Cuando se usó pPoll-B-HA en lugar de pPoll-WSN-HA no se generó virus infeccioso. Las cuatro construcciones de HA quiméricas biológicamente funcionales (Tabla 3) se rescataron con éxito en el virus de tipo A infeccioso, aunque con diferentes eficiencias, como se juzga mediante los títulos de virus en los sobrenadantes de células transfectadas con plásmidos. El virus que posee la ANBH HA se replicó solo marginalmente, mientras que el virus con la ANSTBH HA se produjo con la eficiencia más alta y creció a más de 10<sup>6</sup> DICT<sub>50</sub>/ml. Los otros dos genes de HA quiméricos que no expresaron proteínas biológicamente funcionales no soportaron crecimiento viral. Los virus quiméricos A/B se denominan virus ANBH, ANSBH, ANTBH y ANSTBH.

Para confirmar que los virus que se produjeron de verdad contenían el ectodominio de la HA de tipo B, las células MDCK se infectaron con estos virus y se analizó su reactividad con los anticuerpos de la HA de los virus de tipo A o B (Figura 14). Las células infectadas con los virus que contienen construcciones de HA quiméricas reaccionaron con los anticuerpos anti-B/HA, así como los anticuerpos anti-A/NP, pero no con el anticuerpo anti-A/HA, lo que confirma que estos virus contienen ectodominios de HA de tipo B.

Características de crecimiento de los virus quiméricos AB en cultivo celular. Para determinar las propiedades de replicación de los virus quiméricos de HA A/B, se infectó a las células con los virus a una MDI de 0,01 y los virus resultantes se analizaron para determinar su cinética de crecimiento (Figura 15). Aunque ninguno de los virus con las HA quiméricas creció mejor que los virus A silvestres, los virus quiméricos ANSTBH y ANTBH crecieron hasta casi 10<sup>6</sup> DICT<sub>50</sub>/ml. Al contrario que los virus de tipo A y B, todos estos virus quiméricos formaron placas en forma de alfiler, que podían detectarse únicamente con inmunotinción (datos no mostrados),

Replicación de los virus quiméricos A/B en ratones. La replicación restringida de los virus quiméricos A/B en cultivo celular sugirió que estos virus pueden estar atenuados *in vivo*. Por tanto, se inoculó a los ratones por vía intranasal con los virus quiméricos de HA A/B (10<sup>5</sup>DICT<sub>50</sub>/50µl). El virus ANBH no se analizó, dado que el título de la reserva

era demasiado bajo (de aproximadamente  $10^3$  DICT<sub>50</sub>/ml). Ninguno de los otros tres virus quiméricos analizados fue mortal para los ratones, mientras que la misma dosis del virus A silvestre mató a todos los ratones infectados al tiempo que la misma dosis del virus B silvestre mató a siete de ocho ratones infectados (Tabla 4). Los virus quiméricos se recuperaron de los pulmones y los cornetes nasales el día 3 después de la inoculación, lo que indica que estos virus se replicaban en ratones. Es interesante el hecho de que la replicación de los virus quiméricos estaba más restringida en los pulmones y menos restringida en los cornetes nasales en comparación con las de los virus silvestres. Esto sugiere una posible relación entre el nivel de replicación del virus en los pulmones y la letalidad. Los ratones infectados con los virus quiméricos ANTBH y ANSTBH perdieron peso, aunque en menor medida en comparación con los de los virus A silvestres. En conjunto, estos datos indican que los virus quiméricos de HA A/B están atenuados en los ratones.

Tabla 4. Patogenicidad de los virus quiméricos A/B en ratones.

Virus <sup>a)</sup>	Replicación en órganos <sup>b)</sup>		Cambio de peso corporal (%) <sup>c)</sup>		Letalidad (%) (n.º de muertos/n.º de analizados)
	Cornetes nasales	Pulmones	Día 5	Día 14	
Virus silvestre					
A/WSN-R	5,0 ± 0,3	8,2 ± 0,1	-27,4 ± 1,1	NA <sup>c)</sup>	100 (8/8)
B/Lee-R	4,7 ± 0,1	5,6 ± 0,1	-19,3 ± 7,9	NA	87,5 (7/8)
Virus quimérico A/B					
ANSBH	4,0 ± 0,3	2,8 ± 0,3	2,6 ± 1,0	4,6 ± 1,2	0 (0/8)
ANTBH	5,3 ± 0,3	4,9 ± 0,1	-17,3 ± 0,7	-8,3 ± 0,4	0 (0/8)
ANTSTBH	5,3 ± 0,4	4,6 ± 0,1	-20,9 ± 0,3	-6,2 ± 8,8	0 (0/8)
Control (PBS) d)	ND	ND	2,9 ± 1,3	7,1 ± 0,2	0 (0/8)

<sup>a)</sup> A los ratones se inoculó por vía intranasal el virus ( $10^6$  DICT<sub>50</sub>) y se les monitorizó durante 14 días. El cambio del peso corporal se expresó como el valor medio ± desviación estándar (SD (n=3)).  
<sup>b)</sup> Los títulos víricos se determinaron en los órganos a los 3 días de la inoculación y se expresaron como el valor medio ± SD (n=3) del log<sub>10</sub> de DICT<sub>50</sub>/g.  
<sup>c)</sup> NA: no disponible.  
<sup>d)</sup> Se inoculó a los ratones control de forma simulada solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Protección de ratones inmunizados con los virus quiméricos de HA A/B tras infección con el virus silvestre. Dado que los virus quiméricos de HA A/B expresan un ectodominio de HA que deriva del virus de tipo B, se previó que estos virus proporcionarían una respuesta inmunitaria protectora a la infección por el virus B silvestre. Antes de los experimentos de exposición se determinó si los anticuerpos anti-B se producían en ratones tras la infección con los virus quiméricos. A las tres semanas de la inoculación, se detectaron IgA específica del virus de tipo B en muestras de lavado nasal/traqueal y anticuerpos IgG en muestras de suero de ratones infectados con virus quiméricos mediante una prueba de ELISA (Figura 16A). Los anticuerpos HI también se detectaron en muestras de suero de ratones infectados por el virus quimérico de HA A/B (Figura 16B). Por tanto, las respuestas de anticuerpo específicas se demostraron en todos los ratones infectados con los virus quiméricos, aunque el virus ANSBH provocó una respuesta inmunitaria menos eficiente.

Los ratones inmunizados con virus quiméricos fueron expuestos a 50DL<sub>50</sub> del virus B silvestre 4 semanas después de la inmunización (Tabla 5). Todos los ratones sobrevivieron después de la exposición, mientras que todos los ratones inmunizados de forma simulada control murieron y solo 2 de 8 ratones inmunizados con el virus WSN a una dosis sustancial ( $10^3$  DECT<sub>50</sub>) sobrevivieron tras la exposición al virus B silvestre, lo que indica un efecto protector específico de la inmunización del virus quimérico contra la infección por virus B silvestre. Además, el virus de tipo B no se recuperó de los cornetes nasales ni de los pulmones de ratones preinmunizados con virus quiméricos, con la excepción de un ratón, que recibió virus ANSBH 3 días después de la exposición (datos no mostrados).

Tabla 5. Protección de ratones inmunizados con virus quiméricos A/B contra la exposición al virus B silvestre.

Virus usado para la inmunización <sup>a)</sup>	Cambio de peso corporal (%)		Tasa de supervivencia (%) (n.º de supervivientes/n.º analizados)
	Día 5	Día 14	
Virus silvestre			
A/WSN-R	-17,5 ± 3,6	ND <sup>c)</sup>	25 (2/8)
B/Lee-R	1,8 ± 0,9	1,4 ± 0,6	100 (8/8)
Virus quimérico A/B			
ANSBH	-5,6 ± 0,8	-0,7 ± 0,7	100 (8/8)
ANTBH	0,9 ± 0,9	1,9 ± 0,9	100 (8/8)
ANSTBH	1,5 ± 0,2	2,9 ± 0,7	100 (8/8)

(continuación)

Virus usado para la inmunización <sup>a)</sup>	Cambio de peso corporal (%)		Tasa de supervivencia (%) (n.º de supervivientes/n.º analizados)
	Día 5	Día 14	
Control (PBS) <sup>d)</sup>	-20,8 ± 0,5	NA	0 (0/8)

<sup>a)</sup> Se infectó a los ratones por vía intranasal con cada virus indicado  
<sup>b)</sup> Cuatro semanas después de la inmunización se expuso a los ratones por vía intranasal el virus B/Lee-R silvestre (50DL<sub>50</sub>) y fueron monitorizados durante 14 días tras la exposición. El cambio del peso corporal se expresó como el valor medio ± SD (n=3).  
<sup>c)</sup> NA: no disponible  
<sup>d)</sup> Los ratones control fueron inmunizados de forma simulada con PBS y fueron expuestos.

### Discusión

5 Como se ha descrito en el presente documento, por primera vez se generó un virus de la gripe que posee el tipo B, y no el tipo A, HA en el fondo del virus de tipo A, de modo que posee las proteínas virales de ambos tipos A y B. ¿Qué es esencial para la generación de virus quiméricos de HA A/B? Los genes quiméricos deben transcribirse y replicarse para su mantenimiento en los viriones. Aunque están conservadas entre el mismo tipo de virus, las secuencias terminales en ambos extremos de las regiones no codificantes, que contienen las secuencias promotoras necesarias para la transcripción y replicación de ARN (Luytjes et al., 1989), difieren entre los segmentos de ARN de tipo A y de tipo B (Crescenzo-Chaigne et al., 1999; Desselberger et al., 1980). No obstante, en un estudio previo se ha demostrado que un gen indicador flanqueado por la secuencia no codificante del segmento NS del virus de tipo B se transcribió y replicó mediante una polimerasa de tipo A (Muster et al., 1991). Adicionalmente, se produjo un virus de la gripe quimérico A/B (NA/B-NS) que contenía un gen quimérico que comprende la secuencia codificante de la NA del virus de tipo A y la secuencia no codificante de NS del virus de tipo B (Muster et al., 1991). Estos datos indicaron que el complejo de la polimerasa de tipo A reconocía la secuencia promotora del gen de NS del tipo B, aunque en menor medida que el promotor homólogo de los genes del virus de tipo A.

La secuencia no codificante de cada segmento de ARN incluye dos regiones estructurales. secuencias terminales que se conservan entre los ocho segmentos de ARN y secuencias específicas del segmento interno. Dado que la actividad del promotor viene determinada principalmente por la región anterior (Portela et al., 1999), todos los segmentos génicos de tipo B probablemente se transcriban y repliquen mediante el complejo de la polimerasa de tipo A. De hecho, este concepto está avalado por los datos que muestran que la HA de tipo B se expresaba en células cotransfectadas con regiones no codificantes de tipo B que contienen pPoll-B-HA y plásmidos que expresan complejo de polimerasa de tipo A y NP (Tabla 3). Por tanto, la incapacidad para generar un virus que contiene un segmento de HA de tipo B intacto, es decir un reagrupado intertípico de HA, no se puede explicar por la ausencia de transcripción y replicación del ARN.

La restricción de la generación de los virus quiméricos puede originarse al nivel de la incorporación del segmento de ARN en los viriones; para la generación de virus, el segmento genérico debe empaquetarse en viriones. Aunque se notificó que la región no codificante del segmento NS de tipo A contenía una señal de empaquetamiento de ARN (Luytjes et al., 1989), el mecanismo de empaquetamiento de los segmentos de ARN del virus de la gripe todavía no se ha aclarado del todo. Las secuencias de características estructurales de los segmentos de ARN requeridas para la incorporación en viriones eran en gran medida desconocidas, aunque recientemente se ha mostrado que el segmento A NA RNA posee sus señales de incorporación a los viriones en ambos extremos de las regiones de codificación (Fujii et al., 2002 y Ejemplo 2). En este estudio, el virus ANSBH se replicó con más eficiencia que el virus ANBH (Figura 14 y Tabla 3). Dado que las proteínas HA expresadas en estos dos virus debían ser idénticas, a diferencia en la eficiencia de replicación puede ser el resultado de una eficiencia de empaquetamiento de ARN. Es decir, una característica estructural requerida para un empaquetamiento eficiente del ARN puede existir en la región de codificación de la secuencia señal de la HA. De un modo similar, esto también puede explicar la diferencia en la eficiencia de la replicación entre los virus ANTBH y ANSTBH, que también expresan proteínas HA idénticas. De hecho, las señales de empaquetamiento para el segmento HA de tipo A reside en ambos extremos de las regiones no codificantes (datos no publicados). Es interesante el hecho de que un gen de NA quimérico que contenía las secuencias no codificantes del virus NA de tipo A y la secuencia codificante de la NA de tipo B no rescató en el virus de tipo A (Ghate et al., 1999). Este fallo se puede explicar por la falta de una región codificante de NA de tipo A que contiene una señal de empaquetamiento del ARN, consistente con el reciente hallazgo mencionado anteriormente (Fujii et al., 2002).

También puede haber interacciones cruciales a nivel proteico para la generación de virus quiméricos de HA A/B; proteínas quiméricas se deben empaquetar en viriones y deben ser funcionales para la replicación del virus. La proteína NA tipo B suministrada en *trans* puede reemplazar la función de una NA de tipo A e incorporarse en viriones de tipo A, lo que soporta múltiples ciclos de replicación de un virus de tipo A defectuoso en NA en cultivo celular (Ghate et al., 1999 No obstante, como se ha mencionado anteriormente, no se ha generado un virus de tipo A que contiene también NA de tipo B. Aunque se generaron virus quiméricos de HA A/B, se atenuaron en comparación con

el virus silvestre. Esta atenuación puede proceder de un equilibrio subóptimo entre la actividad de unión al receptor de HA de tipo B y la actividad sialidasa de NA de tipo A. Además, la sustitución del péptido señal y / o los dominios transmembrana / citoplásmico en las HA puede haber alterada su estructura. Por ejemplo, los dominios citoplasmáticos / transmembrana en la HA puede interactuar con otros componentes virales tales como M1 que conducen a un ensamblaje del virión eficiente (Ali et al., 2000; Cenami et al., 1996; Jin et al., 1997; Zhang et al., 2000). Por lo tanto, la incapacidad de generar virus de tipo A que posea segmentos de ARN de tipo B intactos o viceversa puede explicarse por la restricción a nivel de ARN la incorporación del segmento o el nivel de interacción funcional de las proteínas, o ambos.

Los virus quiméricos de HA A/B se atenuaron en ratones con replicación restringida en pulmones y confirieron inmunidad protectora a los ratones contra la infección por el virus b silvestre, lo que sugiere un nuevo abordaje para el desarrollo de vacunas contra la gripe. En la actualidad, la administración subcutánea de las vacunas de la gripe inactivadas trivalente en el mundo, aunque sus eficacias son subóptimas. Esto se debe principalmente a la inducción insatisfactoria de la inmunidad mucosa en el tracto respiratorio superior, donde los virus de la gripe invaden al frío actuales son mezclas de los virus de tipo A y de tipo B. Potencialmente, la interferencia entre los dos virus afecta a la eficacia de la vacuna, aunque este problema se ha abordado mediante el ajuste de la relación de dosis virales. Un virus de tipo A con la HA quimérica A / B permitiría la producción de vacunas contra la gripe con microorganismos vivos basadas en un único virus atenuado en lugar de dos virus atenuados, lo que elimina la potencial interferencia entre los virus de tipos A y B.

Por lo tanto, al contrario que con una vacuna con microorganismos vivos atenuados que tiene una mezcla de los virus de tipo A y B, con información limitada sobre las mutaciones atenuantes para la cepa de vacuna de tipo B, se puede producir un virus que contiene HA y NA de tipo B en el fondo del virus de tipo A. Este abordaje permite la producción de vacunas basadas en una cepa de vacuna maestra con mutaciones atenuantes bien definidas para la expresión de HA y NA tipo A, así como de tipo B. Por otra parte, el conocimiento de las señales de empaquetamiento para los segmentos virales también estimula el desarrollo de vacunas contra la gripe con microorganismos vivos atenuados mejoradas.

#### Ejemplo 5

##### Materiales y métodos

Células y virus. Las células de riñón embrionario humano 293T (un derivado de la línea 293 en el que se insertó el gen del antígeno 40T del virus de simio) se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero bovino fetal (FCS) al 10 %. Para las células de riñón de hámster neonato (BHK), células de ovario de hámster chino (CHO) y células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) se usaron DMEM que contiene 5 % de FCS y MEM que contiene 10 % y 5 % de suero bovino de neonato, respectivamente. Todas las células se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. El virus A/WSN/33 (H1N1) (WSN) se generó mediante genética inversa como se describe en Neumann et al. (1999) y se propagaron en células MDCK. La cepa Indiana de VSV generada por genética inversa se propagó en las células BHK.

Genética inversa. Para la generación de partículas similares al virus de la gripe (VLP) y virus mutantes de la gripe A, se usaron plásmidos que poseen el ADNc de los genes virales WSN bajo el control del promotor de la ARN polimerasa I humana y el terminador de la ARN polimerasa I de ratón (denominados plásmidos Poll) y el vector de expresión de proteínas eucariotas pCAGGS/MCS (controlado por el promotor de la β-actina de pollo). En resumen, los plásmidos Poll y los plásmidos de expresión proteica se mezclaron con un reactivo de transfección, Trans IT LT-1 (Panvera, Madison, WI), se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añadieron a 1 x 10<sup>6</sup> células 293T cultivadas en Opti-MEM (GIBCO/BRL). Seis horas más tarde, la mezcla de reactivos de transfección de ADN se reemplazó con Opti-MEM I que contiene 0,3 % de BSA y 0,01 % de FCS. Cuarenta y ocho horas más tarde, se recogieron las VLP o los virus mutantes de la gripe A en el sobrenadante. Los transfectantes generados en este estudio contienen todos un segmento de ARNV de HA mutante junto con otros segmentos de ARNV del virus WSN u se designan con el nombre del segmento de ARNV de HA mutante (por ejemplo, una VLP que contiene el segmento de ARN HA(0)GFP(0) se designa la VLP de HA(0)GFP(0)).

Plásmidos de construcción. Se usó pPollHA(0)GFP(0) para producir ARN de sentido negativo que contiene la región no codificante en 3' del ARNV de HA, la secuencia codificante complementaria de la proteína fluorescente verde (GFP, Clontech) potenciada y la región no codificante en 5' del ARNV de HA. En resumen, el gen GFP se amplificó mediante PCR con cebadores que contienen los sitios *BsmBI* y la secuencia no codificante en 3' o 5' de HA, se digirió con *BsmBI* y se clonó en el sitio *BsmBI* del plásmido Poli. La introducción de este plásmido en las células da

lugar a un ARN que contiene la secuencia de codificación de GFP en orientación de sentido negativo, flanqueada por las regiones no codificantes en 5' y 3' de ARNv de HA.

5 El plásmido pPollHA(468)GFP(513) se produjo del siguiente modo: para la producción de ARNv de WSN el pPollHA se amplificó primero mediante PCR inversa usando los cebadores en orientación inversa-inversa Bam500R (5'-GCGGATCCTCCCCTATGGGAGCATGATAC-3'; SEC ID N° -9) y Xba1218F (5'-GCTCTAGAACTCTGTTATCGAGAAAATG-3'; SEC ID N° 10). El producto de la PCR se digirió con *Bam*HI y *Xba*I, y, a continuación, el gen GFP se clonó en el sitio *Bam*HI y *Xba*I. El plásmido resultante, pPollHA(468)GFP(513), se utilizó para la producción de ARN de sentido negativo, que contiene la región no codificante en 3' y 468 bases de la región codificante de ARNv de HA, la secuencia codificante de GFP, 513 bases de la región codificante en 5' y la región no codificante en 5' de ARNv de HA. Una serie de mutantes de delección de HA también se produjo mediante PCR inversa de la misma manera. Los mutantes se designaron de acuerdo con el número de nucleótidos derivados de la región codificante de HA, por ejemplo, el segmento de ARN HA(9)GFP(80) contiene la región no codificante de HA en 3', 9 nucleótidos de la secuencia codificante de HA que corresponden a la región en el extremo N, el marco de lectura abierto de GFP, 80 nucleótidos de la secuencia codificante de HA corresponde a la región en el extremo C y la secuencia no codificante de HA en 5'. Todas las construcciones de plásmidos se secuenciaron para garantizar que las mutaciones no deseadas no se introdujeron mediante la PCR.

20 Mediante PCR se produjo pPollHA(0)VSVG(0), que se utilizó para producir RNA de sentido negativo que contiene la región no codificante del ARNv de HA en 3', la secuencia de codificación complementaria de V SVG y la región no codificante en 5' del ARNv de HA. En resumen, el gen G de VSV se amplificó mediante PCR utilizando pCAGGS-VSVG como molde y los cebadores que contienen los sitios *Bsm*BI y la secuencia no codificante de HA en 3' y 5'. A continuación, se digirió el producto de la PCR con *Bsm*BI y se clonó en el sitio *Bsm*BI del vector pHH21. El plásmido pPollHA(9)VSVG(80) se produjo mediante la clonación de las secuencias codificantes de VSV G en el sitio *Bam*HI y el sitio *Xba*I de pPollHA(9)GFP(80). El pPollINA(183)GFP(157), que contiene los extremos no codificantes en 3' del ARNv de NA y una secuencia complementaria que codifica una proteína de fusión que posee 61 codones de NA en el extremo B y GFP, dos codones de terminación consecutivos (TAA-TAG) y 185 bases del extremo 5' del ARNv de NA, se produjo del siguiente modo. La región correspondiente a los nucleótidos 203 a 1109 (sentido positivo) del gen de NA de WSN en pT7Blue-DNA se sustituyó primero con un sitio *Bgl*II mediante PCR inversa. El gen de GFP se clonó después en este sitio *Bgl*II y el sitio *Stu*I en la posición 1226 (en el gen NA silvestre) en marco con la proteína NA. El gen NA-(183)GFP(157) se insertó después en el sitio *Bsm*BI de un plásmido Poll, pHH21.

35 El plásmido pPollINA(183)GFP(157)Met(-), utilizado para la producción de ARN de NA(183)GFP(157)Met(-) de sentido negativo, que carece del codón de iniciación para la proteína de NA, se generó de la siguiente manera. El codón de iniciación ATG y otro ATG en el codón decimoquinto del gen NA(183)GFP(157) en pPollINA(183)GFP(157) se cambió a GCG mediante mutagénesis dirigida a sitio *in vitro* (GeneEditor, Promega). La construcción resultante, pPollINA(183)GFP(157)Met(-) contiene la región no codificante en 3' (19 nucleótidos), 183 nucleótidos correspondientes a la región codificante de NA en el extremo N, el marco de lectura abierto de GFP, dos codones de terminación consecutivos (TAA-TAG), 157 nucleótidos correspondientes a la región codificante de NA en el extremo C y la región no codificante de NA en 5' (28 nucleótidos), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa I humana y el terminador de la ARN polimerasa I de ratón.

45 Ensayo de inmunotinción. Dieciséis horas después de la infección con VLP DE LA GRIPE, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron con 3,7 % de formaldehído (en PBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de tratamiento con 0,1 % Triton X-100 y SE procesaron. Para examinar la eficacia de la generación de VLP, 10<sup>6</sup> células se incubaron con 0,1 ml del sobrenadante del cultivo de las células 293T transfectadas con el plásmido y el número de células positivas para NP, tal como se detecta mediante el ensayo de inmunotinción, se registró a las 16 horas de la infección.

50 Transferencia de tipo western. Las VLP o virus mutantes se centrifugaron durante 1,5 horas a 50.000 x g a 4 °C. Las VLP concentradas o los virus se resuspendieron en tampón de lisis (KCl 0,6 M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 0,5 % de Triton X-100). Los lisados se colocaron en geles de SDS-poliacrilamida al 15 %, se electrotransferieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), se bloquearon durante la noche a 4 °C con 5 % de leche descremada en PBS y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-virus WSN, el anticuerpo monoclonal anti-HA o el anticuerpo monoclonal anti-VSVG durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces con PBS que contenía 0,05 % de Tween-20. Los anticuerpos unidos se detectaron con un kit VECTASTAIN ABC (Vector) y el kit de inmunotinción Konica (Konica).

60 Hibridación de tipo Northern. El ARNv presente en las células 293T transfectadas con los plásmidos Poll se extrajo con el kit de extracción de ARN Isogen (Nippon Gene, Tokio, Japón) 24 horas después de la transfección. Los ARN se glioxalaron en tampón de glioxal / DMSO / fosfato a 50 °C durante 1 hora y se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % en tampón fosfato 10 mM (pH 7,0). Los ARN se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con una sonda oligonucleotídica complementaria a la secuencia de GFP(ATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGG; SEC ID N° 8) (10 pmol), que se marcó usando un kit DIG Oligonucleotide Tailing (Roche) a 37 °C durante 30 minutos. La hibridación se realizó utilizando la sonda de GFP en Easy Hyb (Roche) durante la noche a 42 °C. Las bandas de ARN se detectaron mediante el uso del kit de detección

de ácido nucleico DIG (Roche). En resumen, la membrana hibridada se lavó con un tampón de lavado (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, 0,3 % de Tween 20, pH 7,5), se bloquearon con 1 % de reactivo de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo anti-DIG (1:5000) conjugado con fosfatasa alcalina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavó la membrana con el tampón de lavado y se incubaron con cloruro de tetrazolo nitroazul/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (NBT/BCIP) en el tampón de detección (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 9,5) a temperatura ambiente en oscuridad. Las bandas de ARN se detectaron usando el kit de detección de ácido nucleico DIG (Roche). El ARN control se extrajo de células 293T transfectadas de forma simulada.

10 Propiedades de replicación de los virus transfectantes. Las células BHK, CHO, o MDCK en pocillos por duplicado de placas de 24 pocillos se infectaron con un virus, se cubrieron con medio MEM que contiene 0,01 % de FCS y se incubaron a 37 °C. En diferentes momentos, los sobrenadantes se analizaron para detectar el virus infeccioso en ensayos de placas en células MDCK.

## 15 Resultados

20 La región codificante del ARNv de HA se requirió para la incorporación del segmento de HA en viriones. Para determinar si son necesarias las regiones codificantes de ARNv de HA para su incorporación al virión como para ARNv de NA, se construyeron dos plásmidos: pPollHA(0)GFP(0) que solo contiene las regiones no codificantes en 3' y 5' del ARNv de NA y la secuencia codificante de GFP y pPollHA(468)GFP(513) en el que la secuencia codificante de GFP se insertó en marco del gen de HA tras la delección de la secuencia de HA en las posiciones nucleotídicas 500–1218 (en orientación de sentido positivo) (Figura 17). Esta última construcción posee la región no codificante en 3' de HA (33 nucleótidos), 468 nucleótidos correspondientes a la región codificante en el extremo N, el marco de lectura abierto de GFP con un codón de terminación, 513 nucleótidos correspondientes a la región codificante de HA en el extremo C y la región no codificante de HA en 5' (45 nucleótidos). La proteína de fusión resultante contiene los 25 156 aminoácidos en el extremo N de HA y la totalidad de la secuencia de GFP.

30 Para generar VLP que poseen estos ARNv de HA mutantes, las células 293T se transfectaron con pPollHA(0)GFP(0) o pPollHA(468)GFP(513), y 7 plásmidos de ARN de Poli para la producción de los segmentos de ARN viral de la gripe restantes y los plásmidos de expresión de proteínas para nueve proteínas virales (es decir, PA, PB1, PB2, NP, HA, NA, M1, M2 y NS2). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las VLP en los sobrenadantes de los cultivos de células 293T se recogieron y se usaron para infectar las células MDCK. Dado que las VLP resultantes poseían HA mutante, expresaron GFP y todas las proteínas virales excepto HA. En consecuencia, no se generó ningún virus progenie infeccioso (datos no mostrados). La eficiencia de la incorporación en el virión del ARNv de HA mutante se determinó dividiendo el número de células que expresan GFP (es decir, el número de VLP que poseía el segmento que codifica el gen de GFP) con el de células que expresan NP (es decir, el número de todas las VLP infecciosas) a las 16 horas de la infección. El título de todas las VLP infecciosas en el sobrenadante del cultivo de las células 293T transfectadas con pPollHA(468)GFP(513) (es decir, el número de células positivas para NP) era  $7,4 \times 10^5$  VLP infecciosas / ml y el título de VLP que contienen ARN de HA HA(468)GFP(513) (es decir, el número de células positivas para GFP) fue de  $3,2 \times 10^5$  / ml VLP/ml. Estos resultados indicaron que el 42,8 % de todas las VLP infecciosas genera albergaba ARNv de HA mutante (Figura 18). Por el contrario, solo el 3,9 % de las VLP poseía el segmento de ARN HA(0)GFP(0) (Figura 18). Estos resultados sugirieron que se requieren las regiones codificantes del ARNv de HA para la incorporación de un segmento de HA en viriones de la gripe.

45 Ambos extremos 3' y 5' de la región codificante del ARNv de HA son importantes para la incorporación del segmento de HA en viriones. Previamente se demostró que el extremo 33 de la región codificante de ARNv de NA desempeña un papel más crucial en la incorporación al virión que el extremo 5'. Por lo tanto, se determinó si 3', 5' o ambos extremos eran importantes para incorporación al virión del segmento de ARNv de HA. Para abordar esta cuestión, se preparó el gen HA(0)GFP(1011), que carecía del extremo 3' de la región codificante del ARNv de HA y el y el gen HA(966)GFP(0), que carecía del extremo 5' de la región codificante de ARNv de HA (Figura 17) y la incorporación del virión de estos ARNv de H se analizó como se ha descrito anteriormente. Aunque las cantidades de ambos ARNv en las células transfectadas con plásmido fueron comparables a las del ARNv de HA(468)GFP(513) (datos no mostrados), la eficiencia de la incorporación del segmento tanto de HA(0)GFP(1011) como de HA(966)GFP(0) fue de solamente 6,8 % y 8,4 %, respectivamente (Figura 17), lo que indica que ambos extremos 3' y 5' de la región codificante del ARNv de HA desempeñaban un papel importante en la incorporación al virión de segmento HA.

60 Para definir aún más la región crítica en el ARNv de HA para su incorporación en los viriones, se generó una serie de VLP, que poseen ARNv de HA truncados con una delección adicional en la región codificante en el extremo 3' y / o 5' (Figura 17). Después se determinó la eficiencia de la incorporación del ARNv de HA mutante en las VLP. Dado que la delección adicional en el extremo 3' que deja solo 15 nucleótidos y en el extremo 5' que deja 268 nucleótidos no afectó a la eficacia de la incorporación del ARNv de HA (compárese HA(468)GFP(513) con HA(15)GFP(268)), se prepararon construcciones con delección adicionales utilizando pPollHA(15)GFP(268), que posee 15 nucleótidos del extremo 3' y 268 nucleótidos de el extremo 5' de la región codificante de HA. Aunque el alcance de la incorporación del ARNv se redujo gradualmente a medida que las delecciones aumentaron, 80 nucleótidos de la región codificante en 5' de HA parecían mínimamente necesarios para la incorporación eficiente al virión del ARNv de HA (compárese 65

HA(15)GFP(80) con HA(15)GFP(75)). Otro análisis de delección demostró que HA(9)GFP(80) que deja 9 residuos de nucleótidos de la región codificante de HA en el extremo 3' dio lugar a la incorporación eficiente en el virión de un ARNv de HA (más del 65 %), aunque el nivel de ARNv de HA(9)GFP(80) presente en las células transfectadas no difirió apreciablemente de la del ARNv de HA(0)GFP(0) (figuras 17 y 18). Estos resultados indican que se requieren 9 nucleótidos en el extremo 3' y 80 nucleótidos en el extremo 5' de la región codificante de HA para una incorporación eficiente del ARNv de HA en los viriones.

Generación de un nuevo virus de la gripe A cuyos genes de HA y NA contienen las secuencias codificantes de genes extraños. Dado que se había determinado las secuencias necesarias para la incorporación del segmento de HA en los viriones, se examinó si un gen extraño flanqueado por dichas secuencias podría incorporarse en los virus de la gripe A y se mantenían durante el pase repetido. Como un gen extraño modelo, la secuencia codificante de VSV G se insertó en los sitios *Bam*HI y *Xba*I de pPolIIHA(9)GFP(80) en lugar de la secuencia de GFP. La construcción resultante se denominó pPolIIHA(9)VSVG(80), que posee la región no codificante en 3' de HA (33 nucleótidos), 9 nucleótidos correspondientes a la región codificante en el extremo N, el marco de lectura abierto de VSV G con un codón de terminación (1552 nucleótidos), 80 nucleótidos correspondientes a la región codificante de HA en el extremo C y la región no codificante de HA en 5' (45 nucleótidos). Como control, se construyó un vector, pPolIIHA(0)VSVG(0), que posee solamente las regiones no codificantes en 3' y 5', pero no la región codificante del ARNv de HA. Dado que la proteína G de VSV se debe sustituir para las proteínas HA y NA, la región codificante de NA puede sustituirse por un gen extraño. Por tanto, pPolIINA(183)GFP(157)Met(-) se construyó para la producción de un segmento de ARN de NA recombinante que contiene la secuencia codificante de GFP y las secuencias codificantes de NA requeridas para la incorporación eficiente al virión del segmento de NA. En esta construcción, el codón de iniciación para el marco de lectura abierto de NA se destruyó mediante la sustitución de ATG por GCG. Por lo tanto, la lectura abierta de GFP se traduciría a partir de su propio codón de iniciación.

Las células 293T se transfectaron con plásmidos para la producción de los segmentos HA(9)VSVG(80) y NA(183)GFP(157)Met(-) recombinantes y los 6 segmentos de ARN viral restantes, así como los plásmidos para la expresión de las proteínas polimerasa del virus de la gripe, NP, M1, M2, NS2 y G de VSV. A las 72 horas después de la transfección, se recogieron los sobrenadantes de las células 293T y los ensayos de placas se llevaron a utilizando células MDCK. Un virus transfectante que aloja el segmento de ARN HA(9)VSVG(80) y el segmento de ARN NA(183)GFP(157)Met(-) (designado virus VSVG(HA)GFP(NA)) era viable y produjo placas que expresaban GFP en ausencia de tripsina (Figura 19). La inmunotinción confirmó la expresión de G de VSV, pero no de HA, que contiene placas (Figura 19). Las células infectadas con el virus VSVG(HA)GFP(NA), pero el virus WSN control, también expresaron GFP. Por el contrario, no se observaron placas cuando se usó el plásmido pPolIIHA(0)VSVG(0) en lugar de pPolIIHA(9)VSVG(80), aunque se detectaron células individuales que expresan GFP y / o proteína NP en células MDCK (datos no mostrados). Por otra parte, se observó que tanto VSVG como GFP siguieron expresándose en las células MDCK infectadas con el virus VSVG(HA)GFP(NA) después de cinco pases consecutivos (datos no mostrados). No se detectó ninguna mutación en la región de HA restante del segmento de ARN de HA(9)VSVG(80) del virus VSVG(HA)GFP(NA) después de cinco pases. Sin embargo, se encontraron tres mutaciones, Ile a Leu en la posición 57, Gln a His en la posición 95 y Gln a terminación en la posición 499 en las secuencias de aminoácidos de VSVG. Aunque la proteína G de VSV silvestre tiene 29 residuos de dominio citoplásmico, los últimos 13 residuos de este dominio se deleccionaron debido a la mutación de Gln a terminación en la posición 499.

Propiedades biológicas del virus VSVG(HA)GFP(NA). Para determinar si la proteína G de VSV de verdad se incorpora en los viriones compuestos de otras proteínas virales de la gripe se realizó un análisis de transferencia de tipo Western con virus VSVG(HA)GFP(NA) y WSN (control) concentrados. Como se muestra en la Figura 20, la proteína G de VS, pero no HA, se detectó en viriones de VSVG(HA)GFP(NA), lo que confirma la incorporación de la proteína G de VSV.

Después, se analizaron las propiedades de crecimiento del virus VSVG(HA)GFP(NA) en las células BHK, CHO, o MDCK. Las células se infectaron a una MDI de 0,001 y los rendimientos de virus en el sobrenadante del cultivo se determinaron en diferentes momentos después de la infección a 37 °C mediante ensayo de placas en células MDCK. Aunque menor que el del virus WSN, el título máximo del virus VSVG(HA)GFP(NA) en las células BHK y MDCK alcanzó al menos 10<sup>6</sup> UFP por ml (Figura 21). Al contrario del mal crecimiento del virus WSN en las células CHO, el virus VSVG(HA)GFP(NA) creció tan bien en estas células, como en las otras dos líneas celulares analizadas (Figura 21). Por otra parte, durante la replicación en cada una de las líneas de células, las células infectadas con el virus VSVG(HA)GFP(NA) expresaron GFP.

Estos resultados indicaron que los segmentos HA(9)VSVG(80) y NA(183)GFP(157)Met(-) se incorporaron de manera eficiente en los viriones de la gripe y que dos genes extraños podían mantenerse de forma estable en el virus de la gripe A durante el pase repetido.

### Discusión

La determinación de los mecanismos de empaquetamiento del es crítica para la comprensión del ciclo de vida del virus de la gripe, así como para el desarrollo de vectores basados en el virus de la gripe para la expresión de proteínas extrañas. En este estudio se demostró que eran necesarias secuencias en ambos extremos 3' y 5' de las

regiones codificantes en el ARNv de HA para la incorporación eficiente de este segmento en los viriones. Por otra parte, usando este conocimiento se generó un nuevo virus basado en la gripe que poseía dos segmentos de ARN recombinantes que contienen las secuencias codificantes de G de VSV y de GFP flanqueadas por las secuencias necesarias para la incorporación en los viriones del ARNv de HA y del ARNv de NA, respectivamente, lo que demuestra la expresión estable de dos genes extraños.

Se han notificado varios enfoques para el desarrollo de vectores de vacuna basados en el virus de la gripe A para la expresión de genes o partes de genes a partir de agentes infecciosos no relacionados. Se han insertado polipéptidos cortos en los sitios antigénicos de HA, lo que da lugar a respuestas inmunológicas positivas contra los péptidos insertados. Para la expresión de polipéptidos y proteínas más largos, los genes extraños se han insertado en uno de los genes del virus de la gripe, en el que las proteínas extrañas se expresaron mediante la utilización de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) o la proteasa 2A del virus de la enfermedad de la fiebre aftosa. En este documento se ha establecido un nuevo sistema para la expresión de una proteína extraña, explotando las señales de incorporación en los viriones en acción *cis* en los ARNv de NA y HA. Este sistema permitió que el virus basado en la gripe incorporara más de 1,5 kb de un gen extraño (por ejemplo, G de VSV), lo que demuestra el potencial de este sistema de vector. Como se ha demostrado la eficacia de vacuna de las VLP de la gripe de replicación incompetente en ratones, las VLP basadas en la gripe de replicación incompetente con un segmento de ARN recombinante que contiene un gen de un patógeno no relacionado pueden servir como una vacuna prometedora. Este potencial es especialmente atractivo para la vacunación contra el VIH, la enfermedad de la fiebre aftosa y otras infecciones, en el que cualquier inversión de virus vivos para vacuna al silvestre es absolutamente inaceptable o en el que la eficacia de las vacunas inactivadas puede ser limitada debido a la inducción limitada de respuestas de inmunidad mucosa y citotóxica de linfocitos T. Por lo tanto, mediante el uso de este enfoque se puede usar un virus de la gripe como un vector de vacuna. Por ejemplo, se puede hacer un virus que contenga una región de codificación de gp160 del VIH en lugar de HA y una región de codificación de gag en lugar de NA (Figuras 24 y 25). Por otra parte, si G de VSV reemplaza a HA, M2 ya no es necesaria y, por lo tanto, tres genes virales pueden reemplazarse por genes heterólogos. Por ejemplo, HA puede reemplazarse por gp160 del VIH, NA por gag y M2 por nef. El virus de la gripe recombinante resultante se puede usar como vacuna o como un refuerzo para la otra vacuna contra el VIH, por ejemplo, una vacuna de ADN del VIH, para mejorar o inducir inmunidad, incluyendo inmunidad mucosa. Como alternativa, una vacuna puede ser una vacuna multivalente basada en un virus de la gripe recombinante en el que el segmento de codificación de NA se sustituye por el de otro patógeno, por ejemplo, la glicoproteína D del virus del herpes, cuya vacuna puede dar lugar a una respuesta inmunitaria protectora frente a las infecciones por el virus de la gripe y por el virus del herpes.

Los vectores virales derivados de adenovirus, retrovirus y virus de la viruela introducen eficientemente genes extraños en las células diana. Dado que estos virus contienen ADN, o tienen intermedios de la replicación de ADN que podrían integrarse en el cromosoma huésped, no se puede eliminar el riesgo de resultados adversos. Por el contrario, tal integración es improbable en los virus de la gripe debido a la falta de una fase de ADN en las células infectadas. Además, dado que el virus VSVG(HA)GFP(NA) no requiere tripsina para la escisión de HA, a diferencia de los virus típicos de la gripe, puede presentar un uso más amplio. Además, se puede generar el virus recombinante con tropismo celular deseado mediante la alteración de una glicoproteína en la superficie del virión. Por lo tanto, el sistema que utiliza las señales que actúan en *cis* en los segmentos de ARNv para la incorporación al virión permite el diseño de vectores de virus basados en virus de la gripe recombinantes que pueden liberar múltiples genes extraños en las células diana.

El ensamblaje y la liberación de los virus de las células epiteliales se polarizan en algunos virus, que se producen de manera selectiva ya sea en la superficie apical o basolateral. Se piensa que la gemación de virus polarizados desempeña un papel en la determinación de la patogenia de las infecciones virales. El virus de la gripe A produce gemación apicalmente a partir de las células epiteliales infectadas y las proteínas HA, NA, y M2 expresadas individualmente también se dirigen a la superficie apical de las células. Por otro lado, el VSV se libera desde la superficie basolateral de las células infectadas y la proteína G de VSV se transporta a la superficie basolateral. En el presente estudio, un virus VSVG(HA)GFP(NA) recombinante, que posee G de VSV en lugar de las proteínas HA y NA, se ha generado con éxito. Sin embargo, la proteína G de VSV de este virus recombinante carecía de los últimos 13 restos del dominio citoplasmático debido a una mutación puntual. Se sabe que la delección de estos 13 residuos en el dominio citoplásmico produce una proteína que se transporta de manera más eficiente a la superficie apical de la superficie basolateral. Por lo tanto, es probable que la mutación introducida en la proteína G de VSV en el virus VSVG(HA)GFP(NA) estimule su transporte eficiente a la superficie apical, lo que da lugar a una gemación eficiente del VSVG(HA)GFP(NA).

Las pandemias de gripe generalmente se producen cuando un virus cuyas HA y / o NA son inmunológicamente distintas de las de la cepa circulante anterior aparece tras la reagrupación de los segmentos del ARN del virus de la gripe. Las secuencias en los extremos 3' y 5' de las regiones codificantes dentro de los ARNv de HA, NA, M y S son necesarias para su incorporación eficiente en los viriones. El empaquetamiento de los segmentos del ARNv (más probablemente como un complejo de ribonucleoproteína viral) está mediado por las interacciones ARN-ARN que ocurren en *trans* entre los segmentos de ARN viral. Si es así, las señales de incorporación específicas dentro de cada segmento pueden restringir el reagrupamiento de los segmentos de ARN. Empíricamente, se sabe que los segmentos de ARN viral no se reagrupan al azar. Se piensa que las interacciones funcionales entre las proteínas

(por ejemplo, la formación del complejo de la polimerasa, HA-NA y asociaciones funcionales HA-M2 escindibles) se restringen la reagrupación aleatoria. Además de estas restricciones al reagrupamiento a nivel de proteínas, puede existir una restricción similar a nivel de ARN. En este contexto, es interesante observar que, tanto en las pandemias de 1957 como de 1968, el gen PB1, además de los genes de HA y / o NA se introdujeron en los virus humanos a partir de virus aviares, lo que sugiere una posible relación entre los segmentos de ARN de HA y de PB1. La caracterización adicional de las regiones críticas para la incorporación al virión de otros segmentos de ARN puede proporcionar una clave para entender el reagrupamiento de segmentos de ARN, lo que lleva a la predicción de la aparición de nuevas cepas pandémicas del virus de la gripe A.

En resumen, con la información sobre las señales de empaquetamiento de ARNv se pueden desarrollar nuevas vacunas contra la gripe y vectores de vacunas basados en la gripe.

#### Ejemplo de referencia 6

Como se ilustra en la Figura 26, se puede fabricar una línea celular que expresa constitutivamente un ARN similar al del virus de la gripe que codifica una proteína, por ejemplo, NS2, aunque este ARN carece de una señal de incorporación. También se puede preparar un virus que bloquea la secuencia de codificación de NS2 (NS2 KO) también (Neumann et al., 2000; Watanabe et al., 2002). Cuando el virus NS2 KO infecta las células normales no se producirá virus progenie, ya que el virus carece de NS2. Por el contrario, cuando el virus NS2 KO infecta las células que expresan un ARN similar al del virus de la gripe que codifica NS2 pero que carece de una señal de incorporación, NS2 se expresa tras la infección viral y se produce progenie del virus NS2 KO. Sin embargo, el ARN similar al del virus de la gripe que codifica NS2 no será incorporado en el virus NS2 KO porque carece de una señal de incorporación al virión. Por lo tanto, NS2 KO sigue siendo incompetente para la replicación en las células normales. Este sistema se puede usar para la producción de células productoras de virus incompetentes para la replicación. Usando este sistema, se pueden producir células productoras que expresan proteínas virales, cuya toxicidad para las células típicamente prohibiría la generación de líneas celulares que las expresan constitutivamente. Por lo tanto, en esta solicitud, el conocimiento de las señales de incorporación al virión puede emplearse para diseñar un sistema que no permita que un segmento específico se incorpore en los viriones.

#### Referencias

- Air et al., *Struct. Func. Genet.*, 6:341 (1989).  
 Ali et al., *J. Virol.*, 74:8709 (2000).  
 Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3ª edición, ADIS Press, LTD., Williams y Wilkins, Baltimore, MD (1987).  
 Baum et al., *Virology*, 180:10 (1991).  
 Bean et al., *J. Virol.*, 66:1129 (1992).  
 Berkow et al., *The Merck Manual*, 15ª edición, Merck and Co., Rahway, NJ (1987).  
 Carroll et al., *Virus Res.*, 3:165 (1985).  
 Crescenzo-Chaigne et al., *Virology*: 265:342 (1999).  
 Desselberger et al., *Gene*, 8:315 (1980).  
 Ebadi, *Pharmacology*, Little, Brown and Co., Boston, MA (1985).  
 Edwards, *J. Infect. Dis.*, 169:68 (1994).  
 Enami et al., *J. Virol.*, 70:6653 (1996).  
 Ewami et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3802 (1990).  
 Fodor et al., *J. Virol.*, 23:9679 (1999).  
 Fujii et al., *Virus*, 52:203 (2002).  
 Ghatge et al., *Virology*, 264:265 (1999).  
 Goodman et al., eds., *Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, NY (1990).  
 Hara et al., *Anal. Biochem.*, 164:138 (1987).  
 Hinshaw et al., *Virology*, 128:260 (1983).  
 Hughes et al., *J. Virol.*, 74:5206 (2000).  
 Ito et al., *J. Virol.*, 71:3357 (1997).  
 Jambrina et al., *Virology*, 235:209 (1997).  
 Jin et al., *EMBO J.*, 16:1236 (1997).  
 Katzung, ed., *Basic and Clinical Pharmacology*, FIFA Edition, Appleton and Lange, Norwalk, Conn. (1992).  
 Kaverin et al., *J. Gen. Virol.*, 64:2139 (1983).  
 Kawaoka et al., *J. Virol.*, 63:4603 (1989).  
 Kendal et al., *Infect. Immun.*, 29:966 (1980).  
 Kerr et al., *Lancet*, 1:291 (1975).  
 Kida et al., *Virology*, 122:38 (1982).  
 Kilbourne, *Bull. M2 World Health Org.*, 41:643 (1969).  
 Kobasa et al., *J. Virol.*, 71:6706 (1997).  
 Krug, R.M., ed., *The Influenza Viruses*, Plenum Press, New York (1989).  
 Lamb et al., In B.N. Fields, a.m. Knipe, y P.M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers,

- Philadelphia, PA, p. 1353–1395, (1996).  
 Lamb et al., Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology* (4th den) (Knipe, D. M., et al. eds) pp. 1487–1531 (2000).  
 5 Laver et al., *Virology*, 51:383 (1973).  
 Liu et al., *J. Virol.*, 69:1099 (1995).  
 Liu et al., *Virology*, 194:403 (1993).  
 Luo et al., *J. Gen. Virol.*, 80:2969 (1999).  
 Luytjes et al., *Cell*, 59:1107 (1989).  
 10 Maassab et al., *Rev. Med. Virol.*, 9:237 (1999).  
 Mikheeva et al., *Arch. Virol.*, 73:287 (1982).  
 Mitnaul et al., *J. Virol.*, 74:6015 (2000).  
 Mizrahi, ed, *Viral Vaccines*, Wiley–Liss, New York (1990).  
 Murphy, *Infect. Dis. Clin. Pract.*, 2:174 (1993).  
 Muster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5177 (1991).  
 15 Neumann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:9345 (1999).  
 Neumann et al., *EMBO J.*, 19:6751 (2000).  
 Ogra et al., *J. Infect. Dis.*, 135:499 (1977).  
 Palese et al., *Virology*, 61:397 (1974).  
 Portela et al., *Adv. Virus Res.*, 54:319 (1999).  
 20 Ray et al., *J. Biol. Chem.*, 268:18 (1991).  
 Robertson et al., *Biological*, 20:213 (1992).  
 Robertson et al., *Giornale di Igiene e Medicina Preventiva*, 29:4 (1988).  
 Rogers et al., *Virology*, 127:361 (1983a).  
 Rogers et al., *Virology*, 131:394 (1983b).  
 25 Scholtissek et al., *Virology*, 87:13 (1978).  
 Shibata et al., *J. Virol.*, 67:3264 (1993).  
 Shibuya et al., *J. Biol. Chem.*, 262:1596 (1987).  
 Subbarao et al., *J. Virol.*, 67:7223 (1993).  
 Suzuki et al., *FEBS Lett.*, 404:192 (1997).  
 30 Tobita et al., *Arch. Virol.*, 75:17 (1983).  
 Wagner et al., *Rev. Med. Virol.*, 12:159 (2002).  
 Wang et al., *J. Biol. Chem.*, 263:4576 (1988).  
 Warening et al., *Vaccine*, 19:3320 (2001).  
 Watanabe et al., *J. Virol.*, 76:767 (2002).  
 35 Webster et al., *Microbiol. Rev.*, 56:152 (1992).  
 Wiley et al., *Annu. Ref. Biochem.*, 56:3665 (1987).  
 Wright et al., *Orthomyxoviruses*, In: *Fields Virology*, Knipe et al. (eds), Lippincott–Raven Publishers, Philadelphia, PA (2000).  
 Wright et al., *Orthomyxoviruses*. In *Fields Virology* (4<sup>a</sup> edn) (Knipe, D. M., et al. eds) pp. 1533–1579 (2000).  
 40 Yang et al., *Virology*, 229:155 (1997).  
 Zhang et al., *J. Virol.*, 74:4634 (2000).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> Wisconsin Alumni Research Foundation Kawaoka, Yoshihiro  
 <120> Señal para el empaquetamiento de vectores del virus de la gripe  
 <130> 27.18.85511/02  
 50 <140> US 60/356538  
 <141> 13-02-2003  
 <150> US 60/356.538  
 55 <151> 13-02-2002  
 <160> 10  
 <170> PatentIn version 3.5  
 60 <210> 1  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65 <220>



# ES 2 806 412 T3

<220>

<223> Oligonucleótido sintetizado complementario a la secuencia de nucleótidos que codifica el epítipo FLAG

<400> 7

5 gactacaagg acgacgatga caag 24

<210> 8

<211> 31

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda oligonucleotídica sintetizada complementaria a la secuencia de la GFP

<400> 8

15 atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag g 31

<210> 9

<211> 29

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR sintetizado

25

<400> 9

gcggatcctc ccctatggga gcatgatac 29

<210> 10

30 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador de PCR sintetizado

<400> 10

gctctagaaa ctctgtatc gagaaaatg 29

**REIVINDICACIONES**

1. Un vector del virus de la gripe para la expresión y empaquetamiento de ARNv recombinante, en el que el vector comprende:
 

5                    secuencias correspondientes a la región no codificante en 3' del ARNv de HA del virus de la gripe y secuencias codificantes de HA que incluyen secuencias de incorporación de HA en 3', un segmento de ácido nucleico heterólogo que comprende un marco de lectura abierto heterólogo, secuencias codificantes de HA que incluyen secuencias de incorporación de HA en 5' y la región no codificante en 5' del ARNv de HA,

10                   en donde en cuanto a las secuencias codificantes de HA, que incluyen secuencias de incorporación de HA en 3', dichas secuencias consisten en 15 nucleótidos hasta 468 nucleótidos, correspondientes a los nucleótidos 1 a 15 a 1 a 468 de la secuencia codificante de HA en 5', y en donde en cuanto a las secuencias codificantes de HA, que incluyen las secuencias de incorporación de HA en 5', dichas secuencias consisten en 80 nucleótidos hasta 518 nucleótidos, correspondientes a los últimos 80 nucleótidos codificantes de HA hasta los últimos 518

15                   nucleótidos codificantes de HA,

                      en donde la región no codificante en 3' del ARNv de HA, las secuencias codificantes de HA que incluyen secuencias de incorporación de HA en 3', las secuencias codificantes de HA que incluyen secuencias de incorporación de HA en 5' y la región no codificante en 5' del ARNv de HA, son de la misma cepa o serotipo de la gripe, y

20                   en donde el vector no codifica una HA funcional.
  
2. El vector de la reivindicación 1, en donde las secuencias de incorporación de HA en 5' incluyen al menos 291 nucleótidos correspondientes a los últimos 291 nucleótidos codificantes de HA o en donde las secuencias de incorporación de HA en 3' incluyen al menos 216 nucleótidos correspondientes a los primeros 216 nucleótidos codificantes de HA.
  
3. El vector de la reivindicación 1 o 2, en donde el segmento de ácido nucleico heterólogo comprende además una secuencia interna de entrada al ribosoma.
  
4. El vector de la reivindicación 1 o 2, en donde el marco de lectura abierto heterólogo comprende secuencias correspondientes a un marco de lectura abierto para un gen marcador, o una proteína inmunogénica, o un péptido de un patógeno, o una proteína terapéutica.
  
5. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las secuencias de incorporación son de un virus de la gripe de tipo A.
  
6. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las secuencias de incorporación son de un virus de la gripe de tipo B.
  
7. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el marco de lectura abierto heterólogo codifica una proteína de fusión.
  
8. Un virus de la gripe recombinante que comprende un ARNv correspondiente al vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
  
9. El virus recombinante de la reivindicación 8, en donde el marco de lectura abierto heterólogo comprende secuencias correspondientes a un marco de lectura abierto para un gen marcador, o una proteína inmunogénica, o un péptido de un patógeno, o una proteína terapéutica.
  
10. El virus recombinante de la reivindicación 8, en donde el marco de lectura abierto heterólogo comprende secuencias correspondientes a un marco de lectura abierto para una proteína transmembrana, o secuencias correspondientes a un marco de lectura abierto para una proteína con actividad de fusión a la membrana, o secuencias correspondientes a un marco de lectura abierto para una proteína de la cápside viral, o secuencias correspondientes a un marco de lectura abierto para una proteína G del virus de la estomatitis vesicular.
  
11. Un método para expresar en una célula un marco de lectura abierto heterólogo, que comprende:
 

                      infectar *in vitro* una célula con el virus recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 y

                      detectar o determinar si en la célula se expresa un producto codificado por el marco de lectura abierto heterólogo.
  
12. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en terapia.
  
13. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para su uso en terapia.
  
14. El virus de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para su uso en la prevención, inhibición o tratamiento

de una infección por un patógeno o de un cáncer, o el virus de la reivindicación 8 o 9 para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad caracterizada por una disminución de la cantidad o ausencia de una proteína endógena.

- 5 15. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en la prevención o inhibición de una infección por el virus de la gripe.

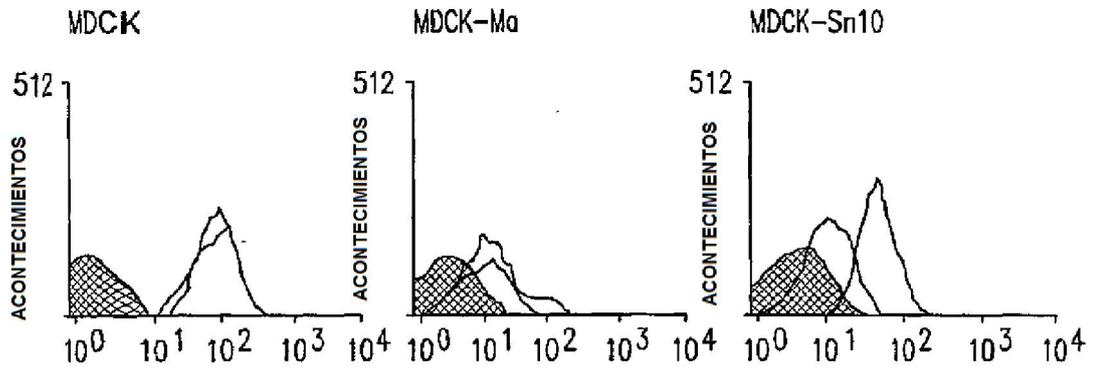


FIG. 1A

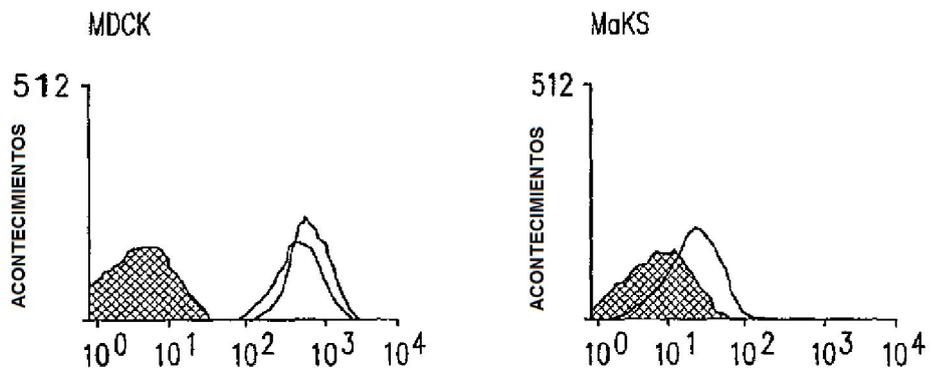


FIG. 1B

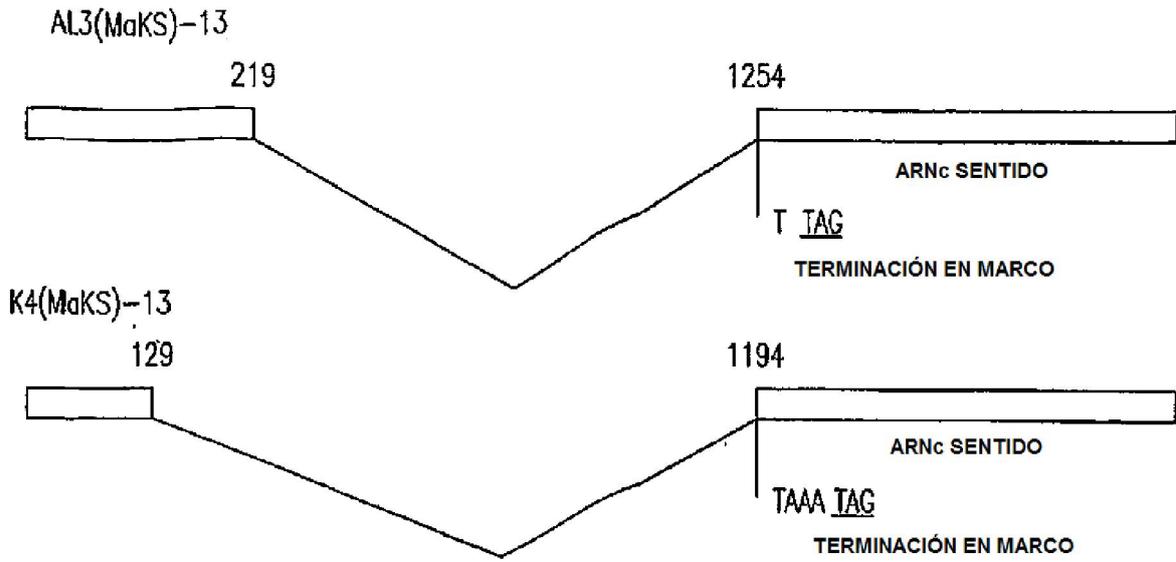


FIG. 2

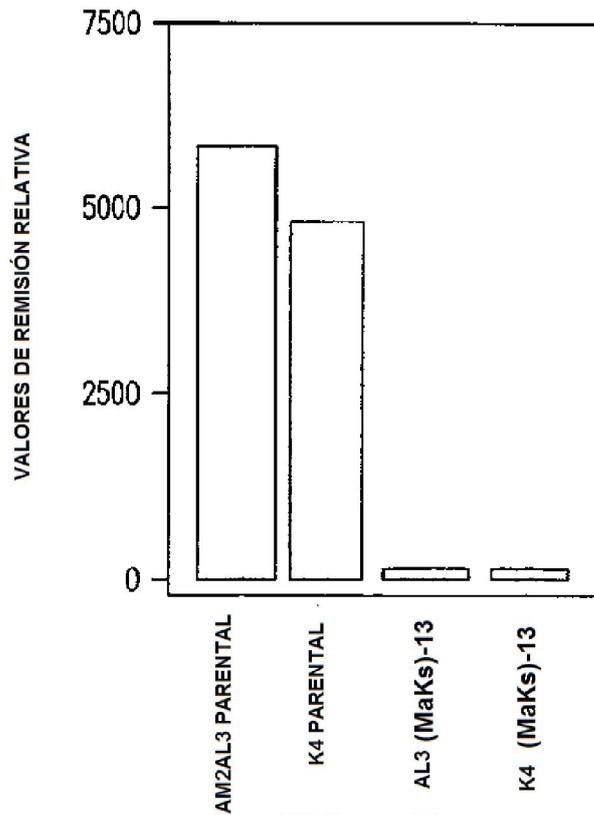


FIG. 3

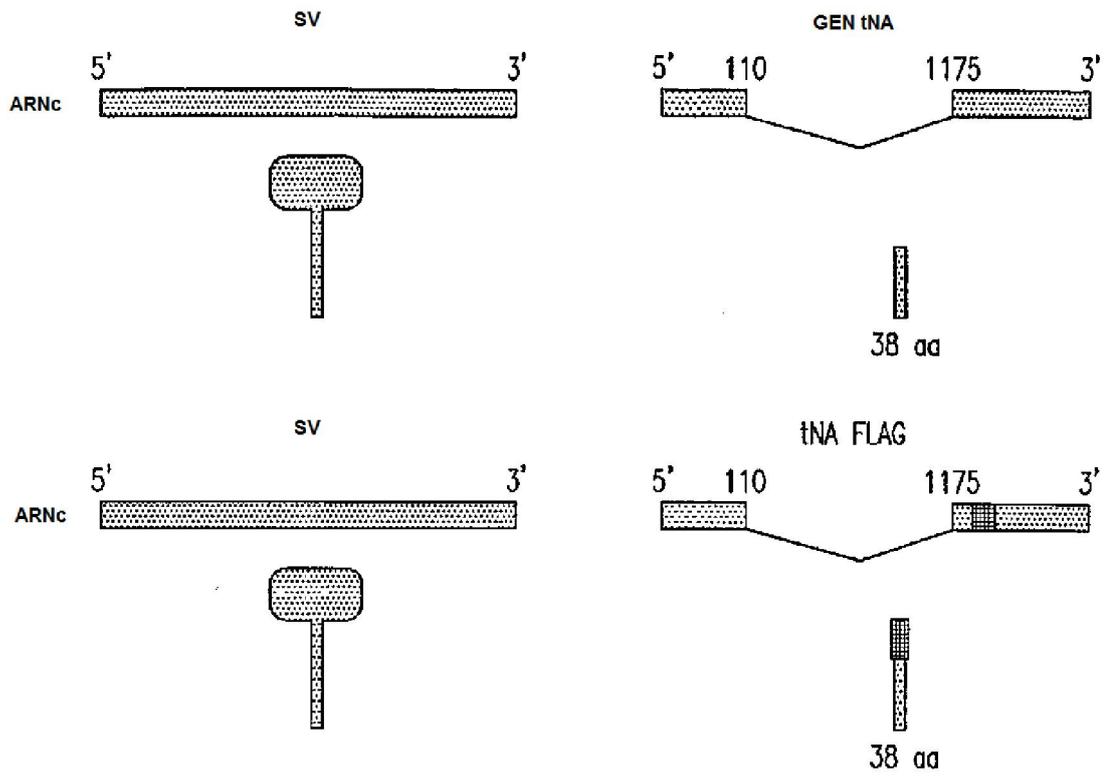


FIG. 4A

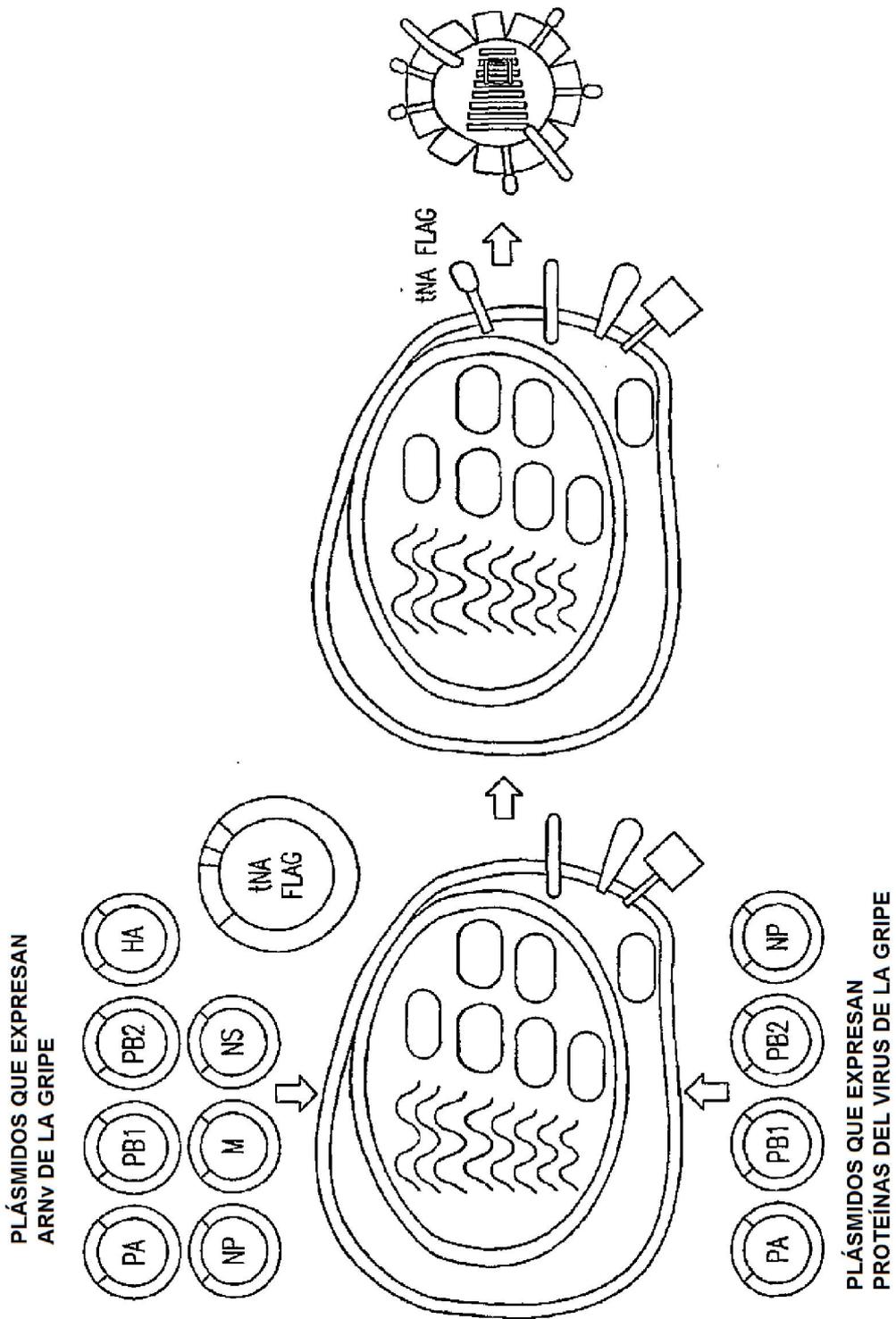


FIG. 4B

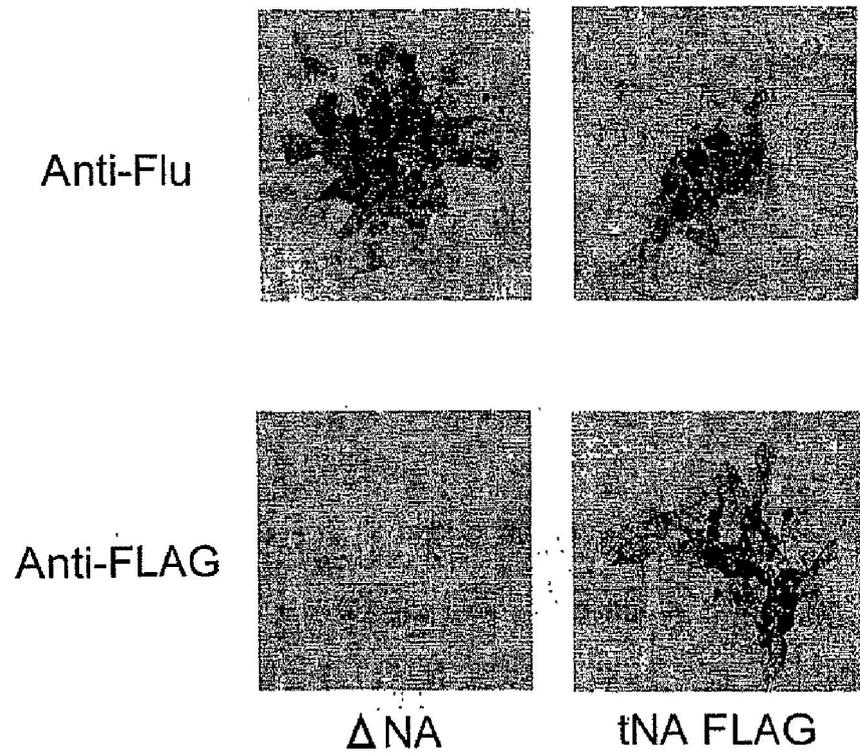


FIG. 4C

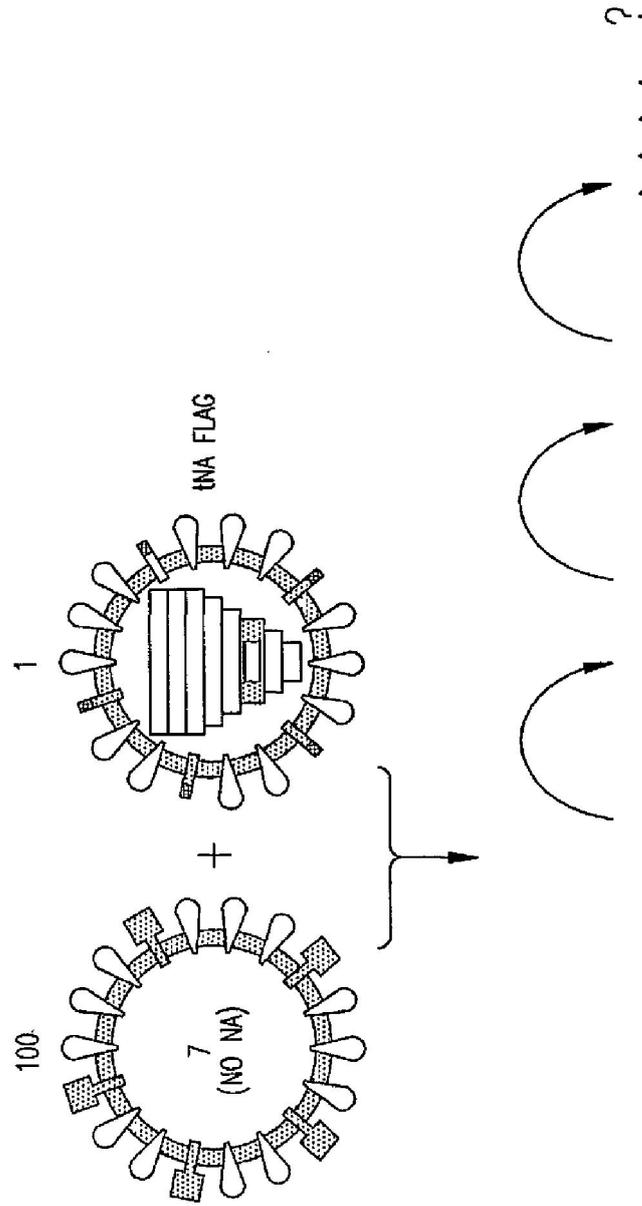


FIG. 5

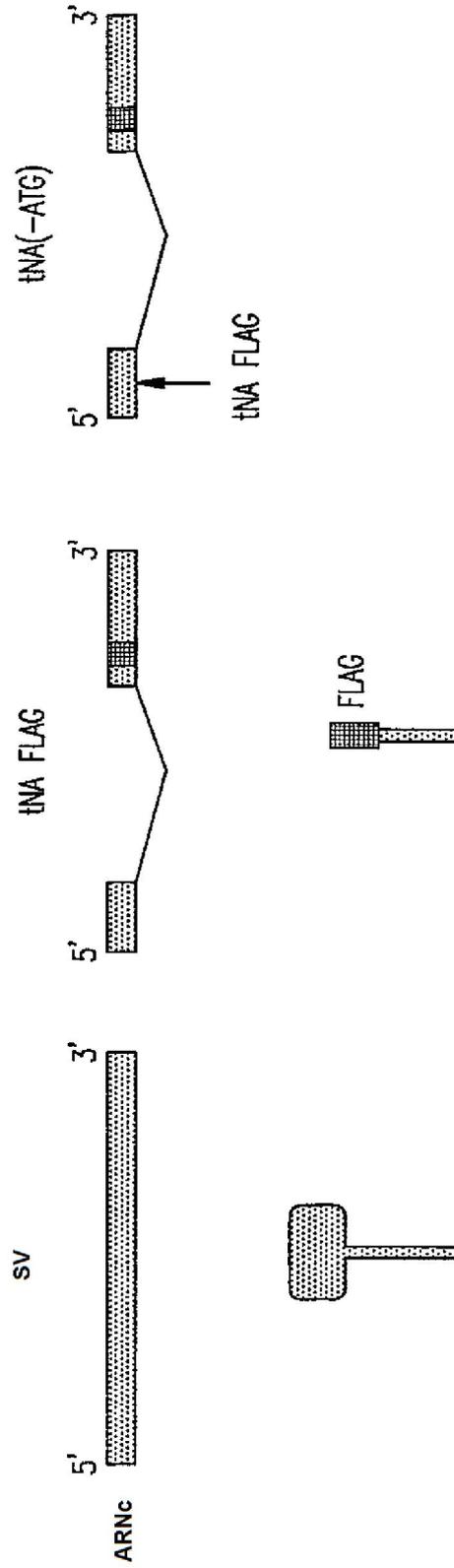


FIG. 6A

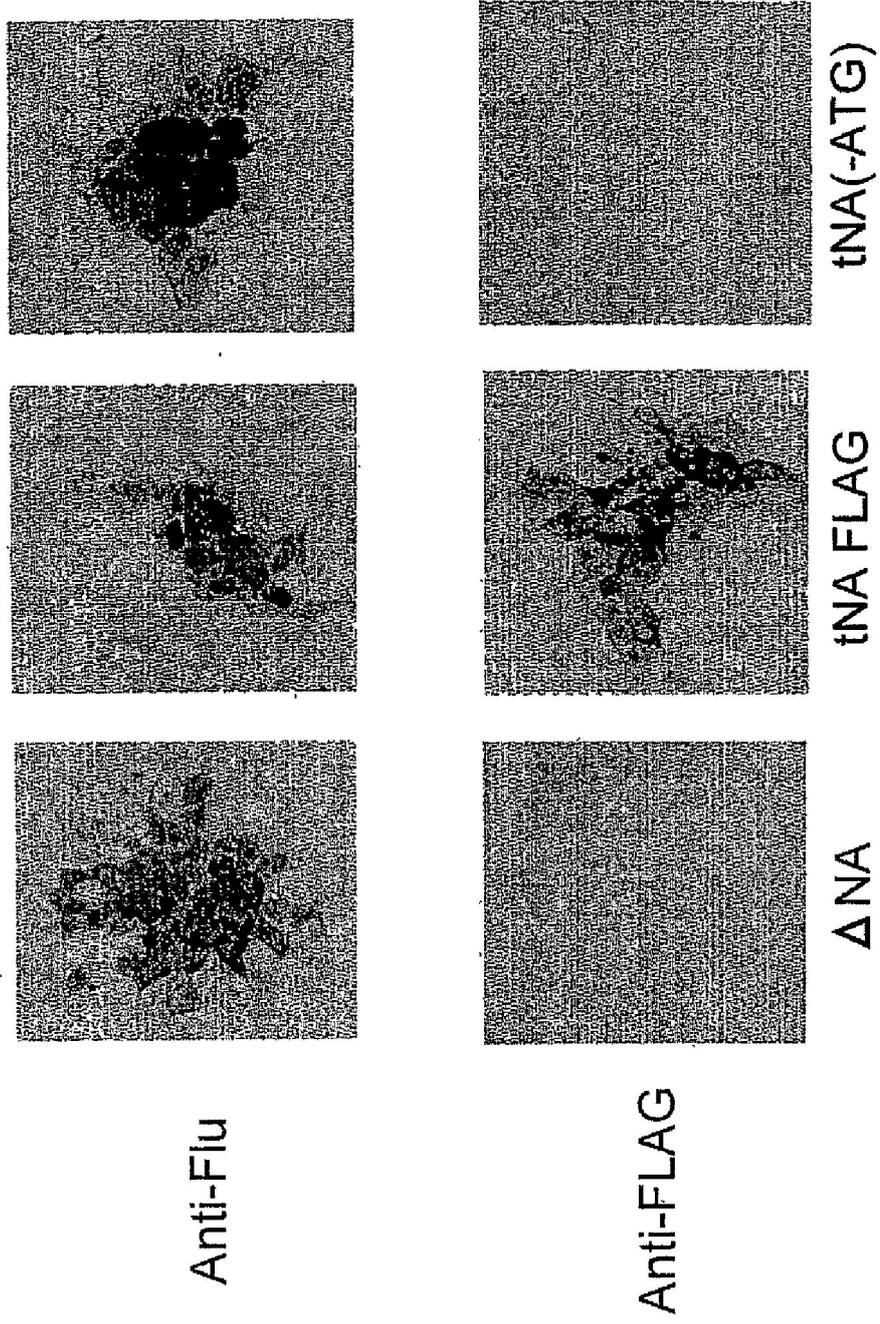


FIG. 6B

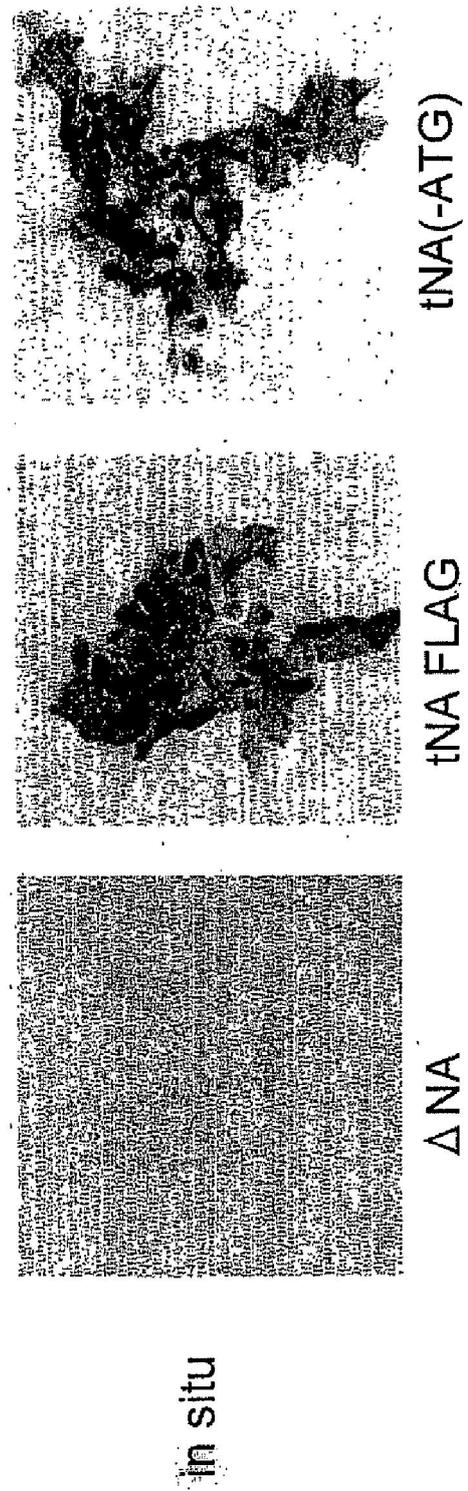


FIG. 7A

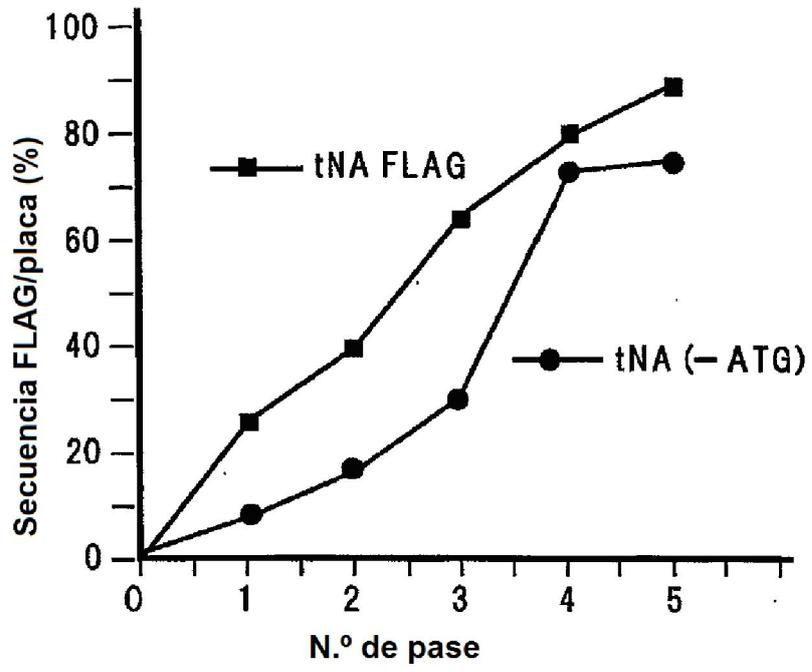


FIG. 7B

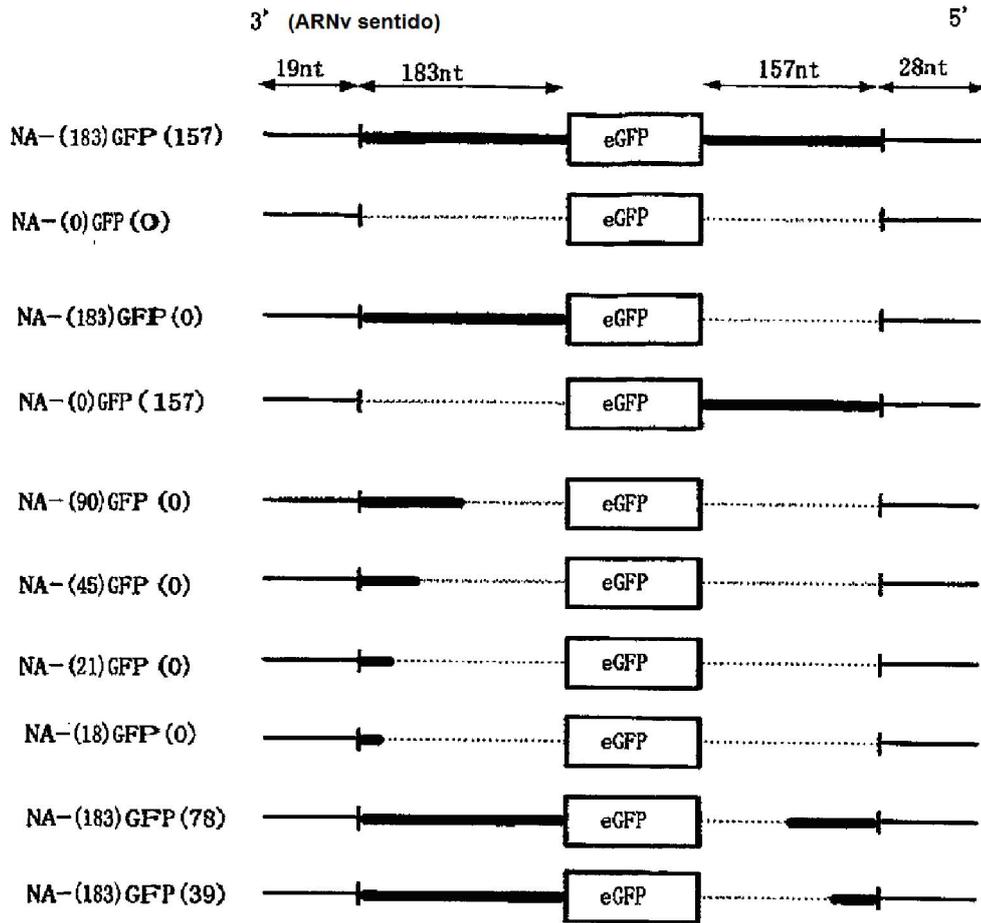


FIG. 8A

virus	tasa de empaquetamiento (%)
NA(183)GFP(157)	91
NA(0)GFP(0)	0,1
NA(183)GFP(0)	38
NA(0)GFP(157)	1,9
NA(90)GFP(0)	40
NA(45)GFP(0)	38
NA(21)GFP(0)	39
NA(18)GFP(0)	6,9
NA(183)GFP(78)	78
NA(183)GFP(39)	71

FIG. 8B

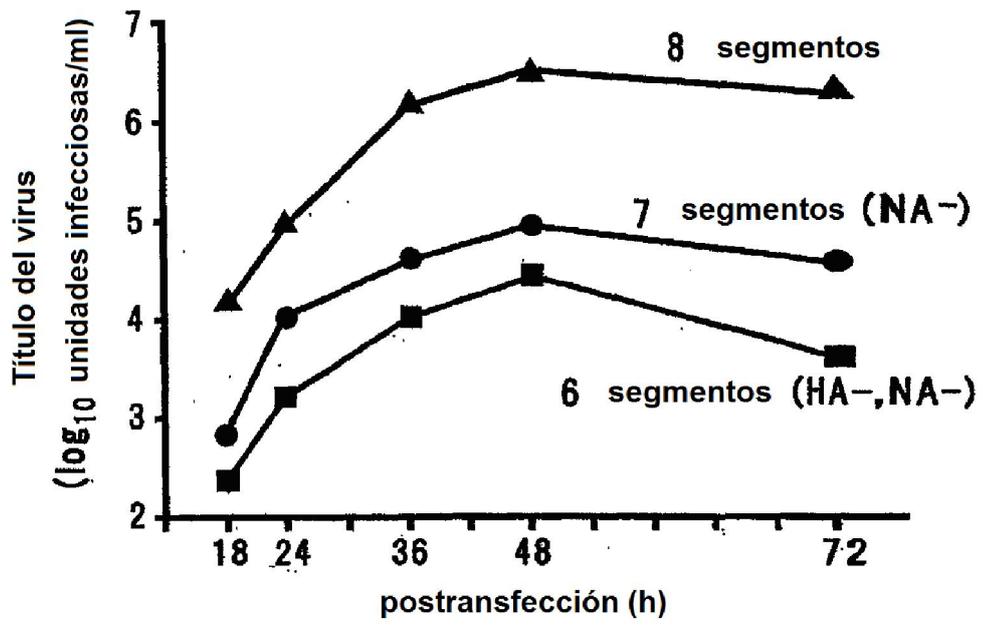


FIG. 9

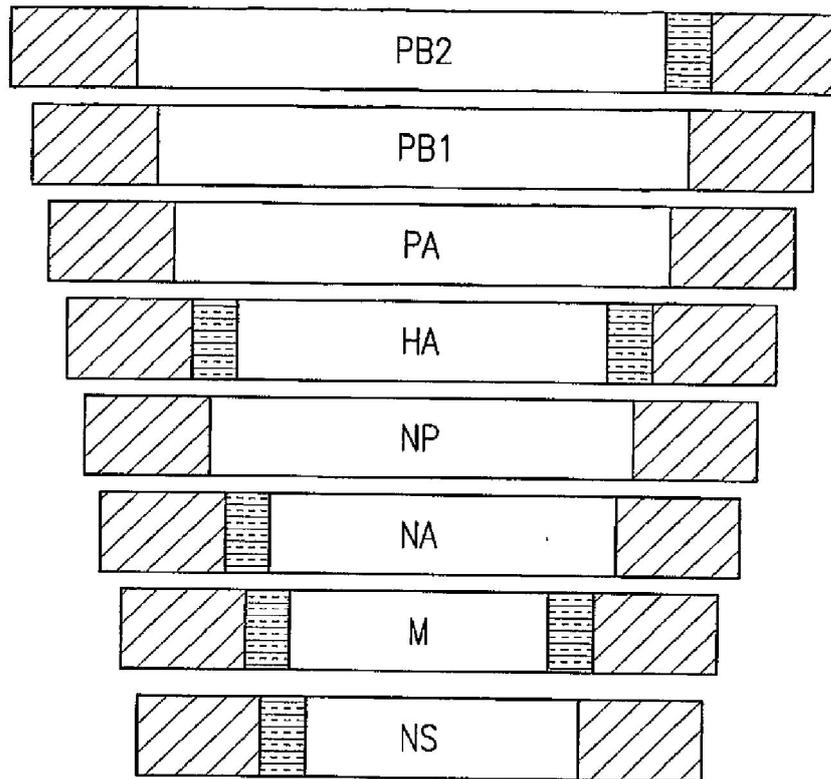
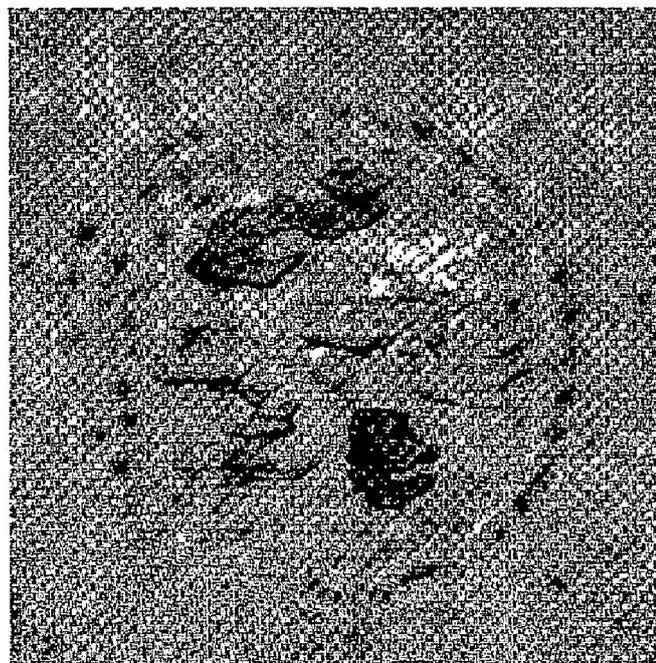


FIG. 10



**FIG. 11A**



**FIG. 11B**



FIG. 11C

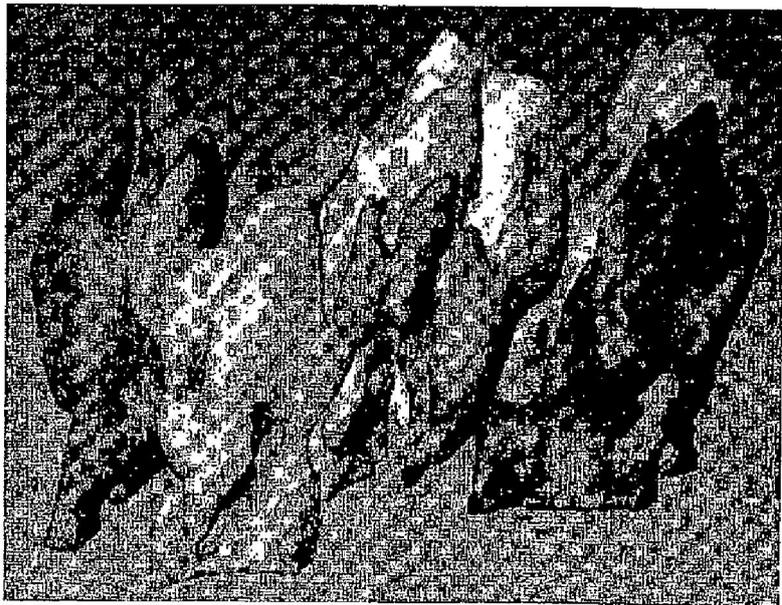


FIG. 11D



FIG. 11E



FIG. 11F

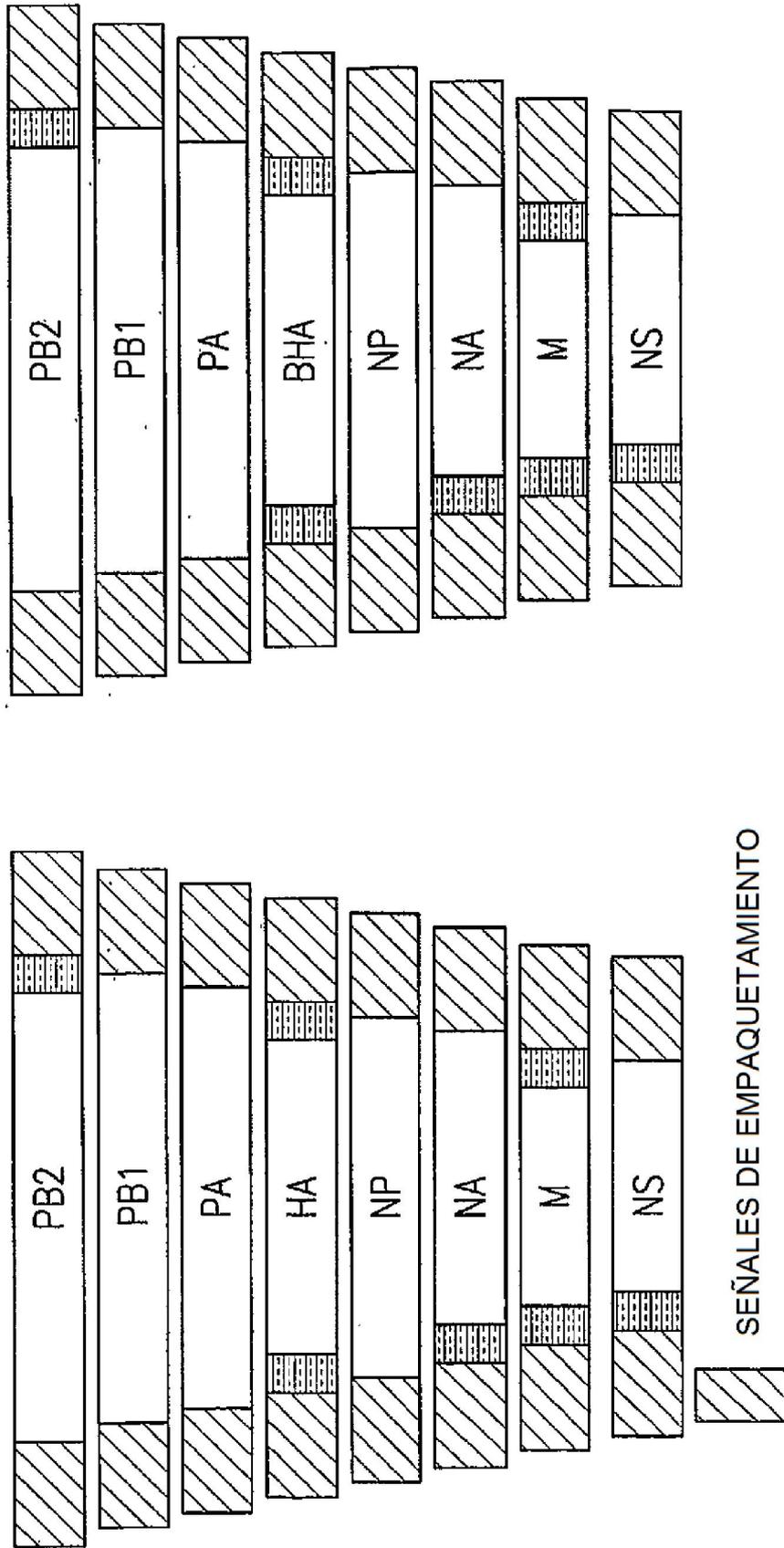


FIG. 12A

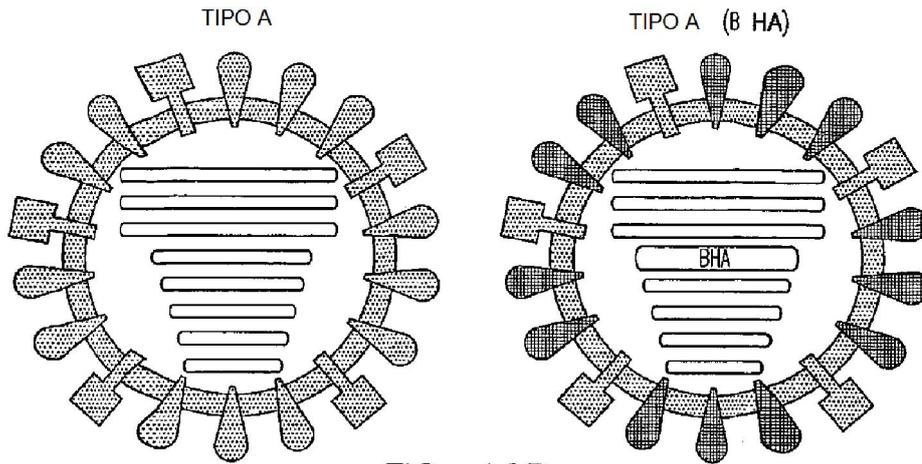


FIG. 12B

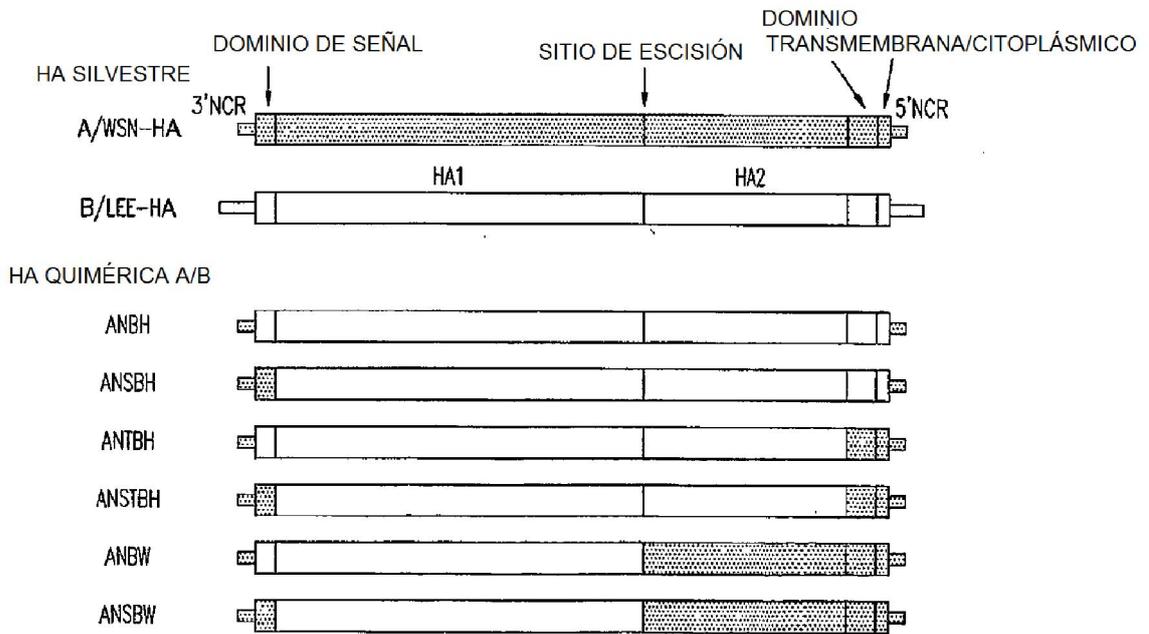


FIG. 13

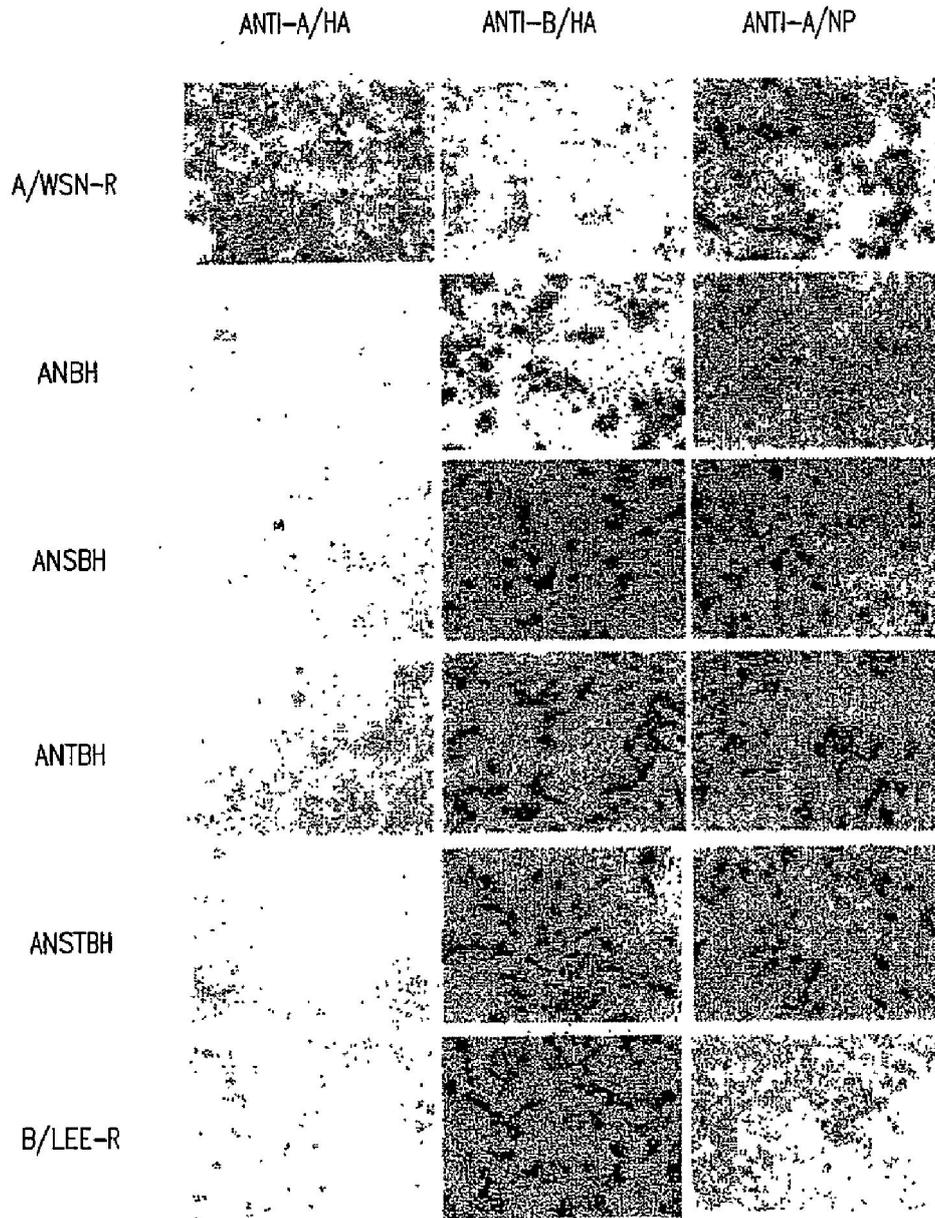


FIG. 14

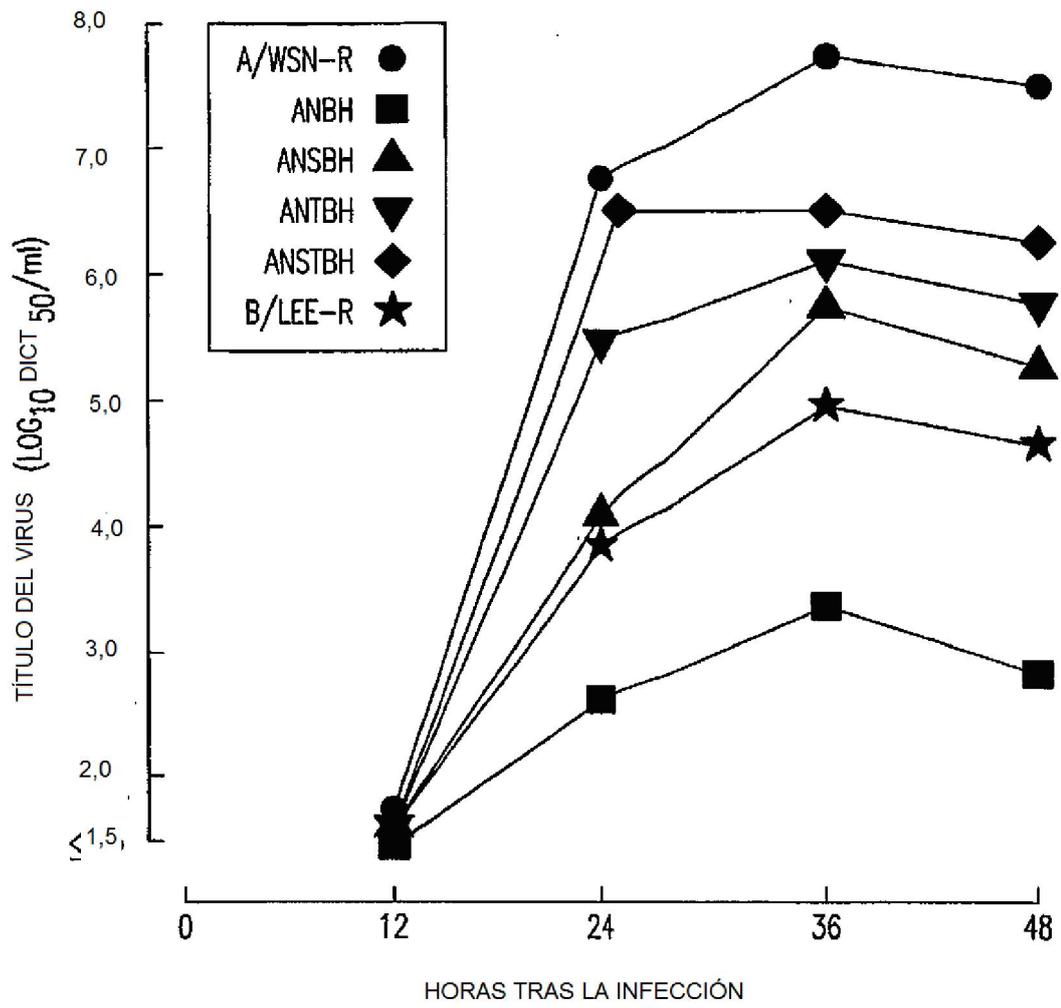


FIG. 15

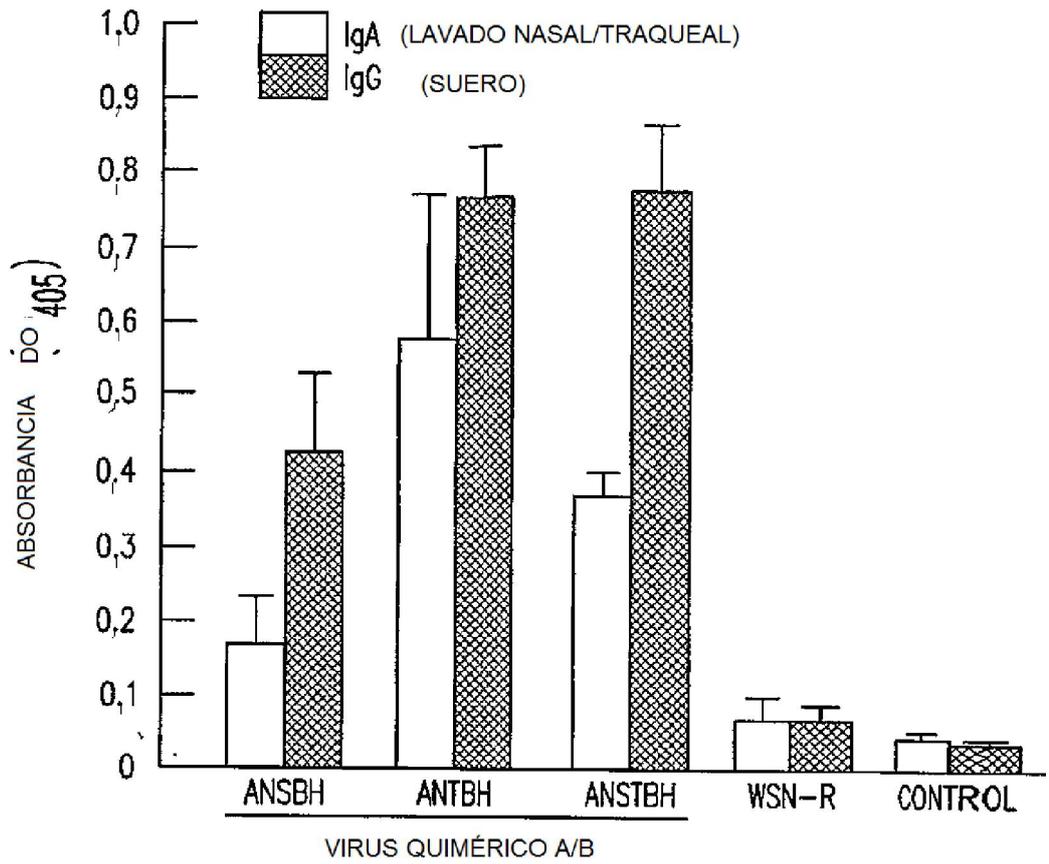


FIG. 16A

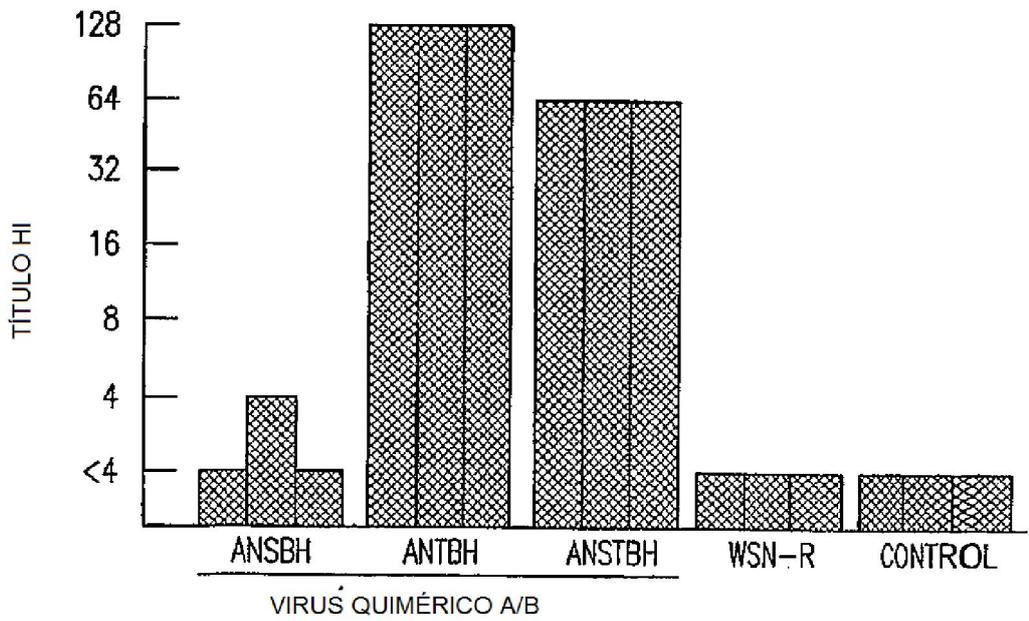


FIG. 16B

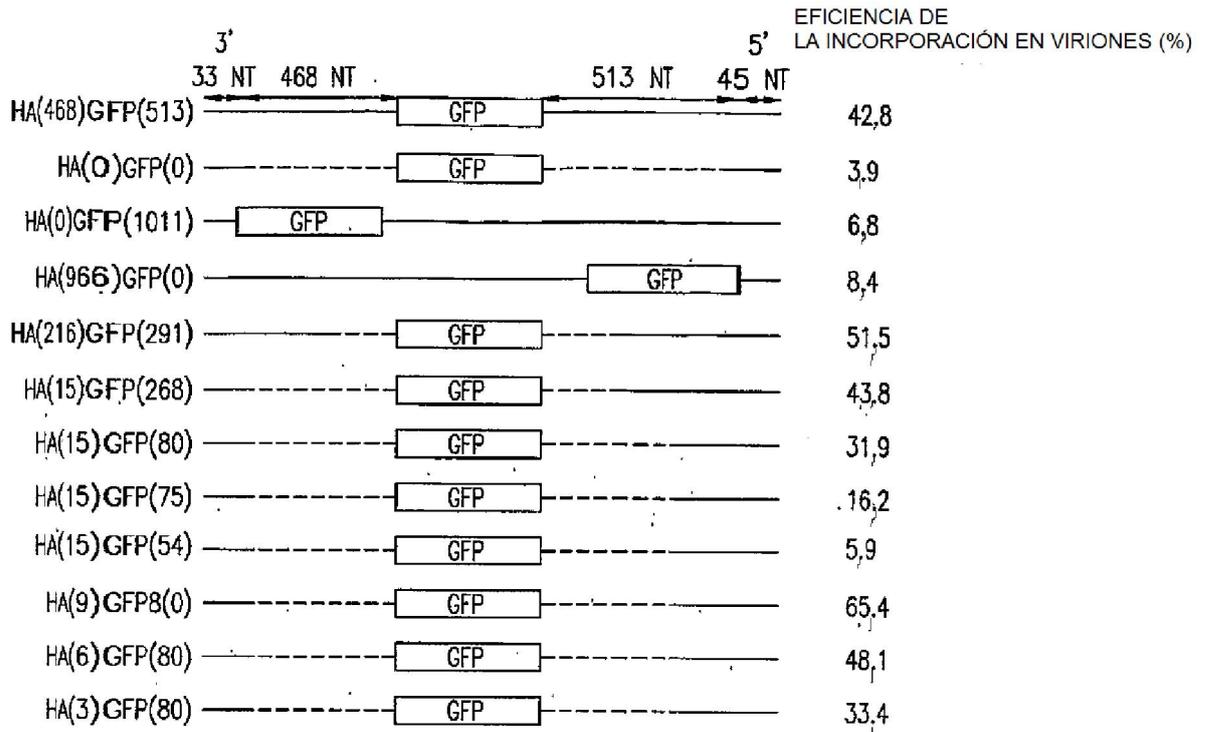


FIG. 17

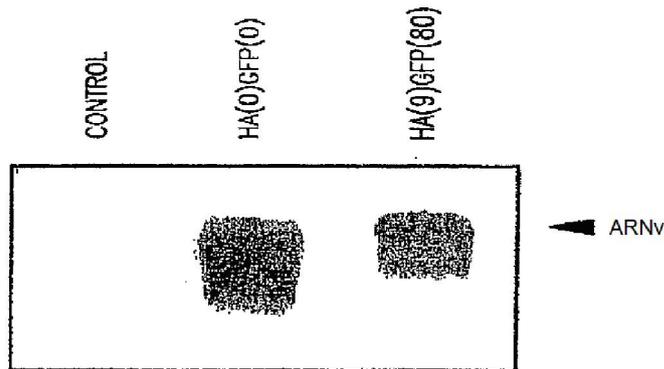


FIG. 18

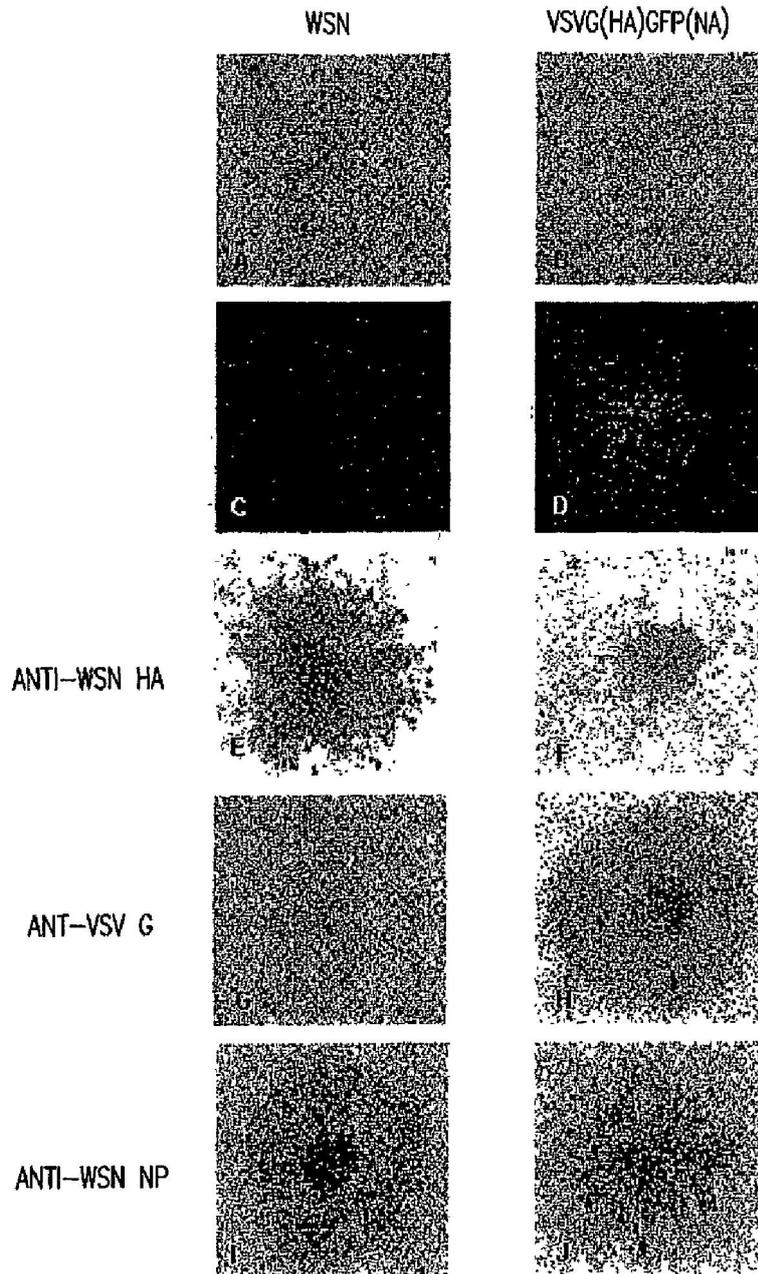


FIG. 19

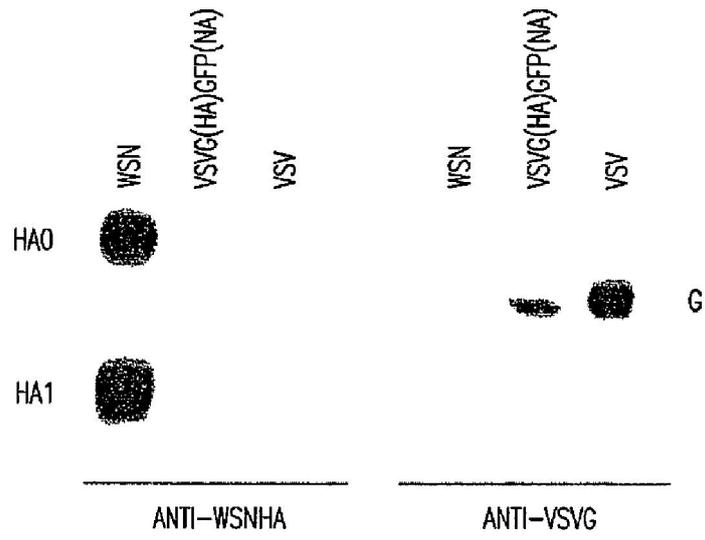


FIG. 20

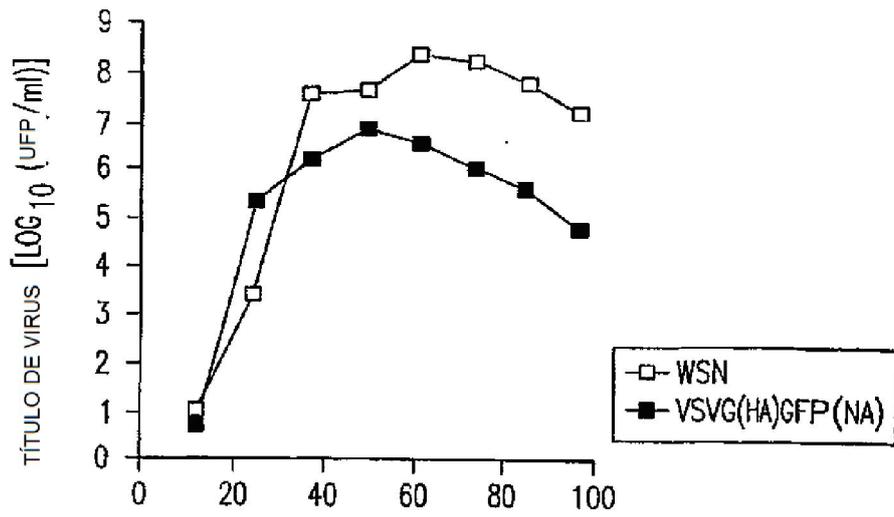


FIG. 21A

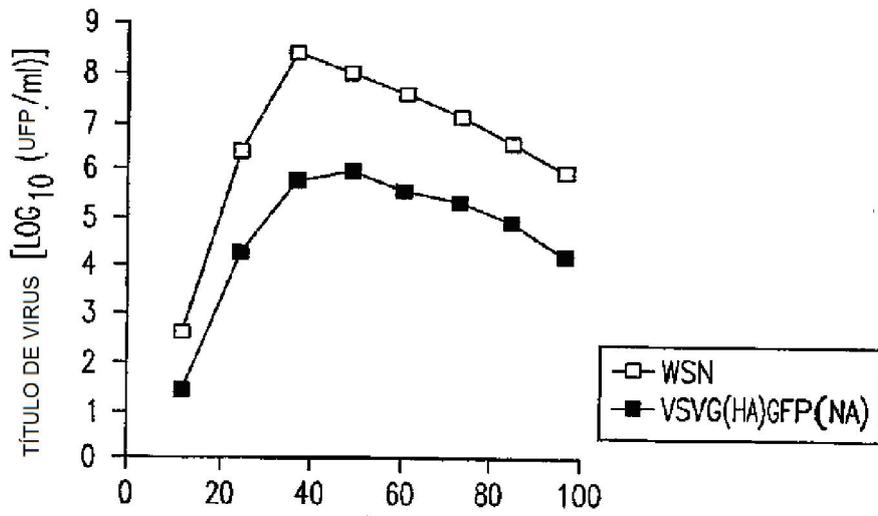


FIG. 21B

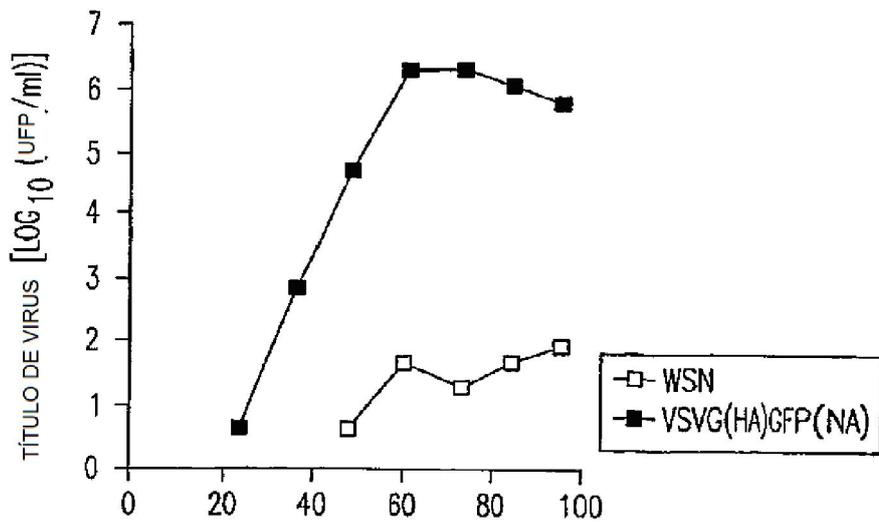


FIG. 21C

EFICIENCIA DE LA INCORPORACIÓN DE SEGMENTOS DE ARN DE NS MODELO

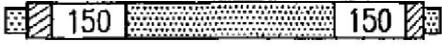
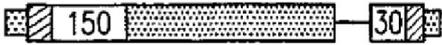
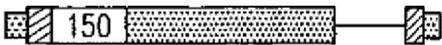
SEGMENTOS DE ARN DE NS MODELO	EFICIENCIA DE LA INCORPORACIÓN (%)
	62,4
	47,0
	20,0
	47,0
	2,0
	3,9
	0,5

FIG. 22

EFICIENCIA DE LA INCORPORACIÓN DE SEGMENTOS DE ARN DE M MODELO

	EFICIENCIA DE LA INCORPORACIÓN (%)
	80,54
	11,43
	0,25
	1,67

FIG. 23

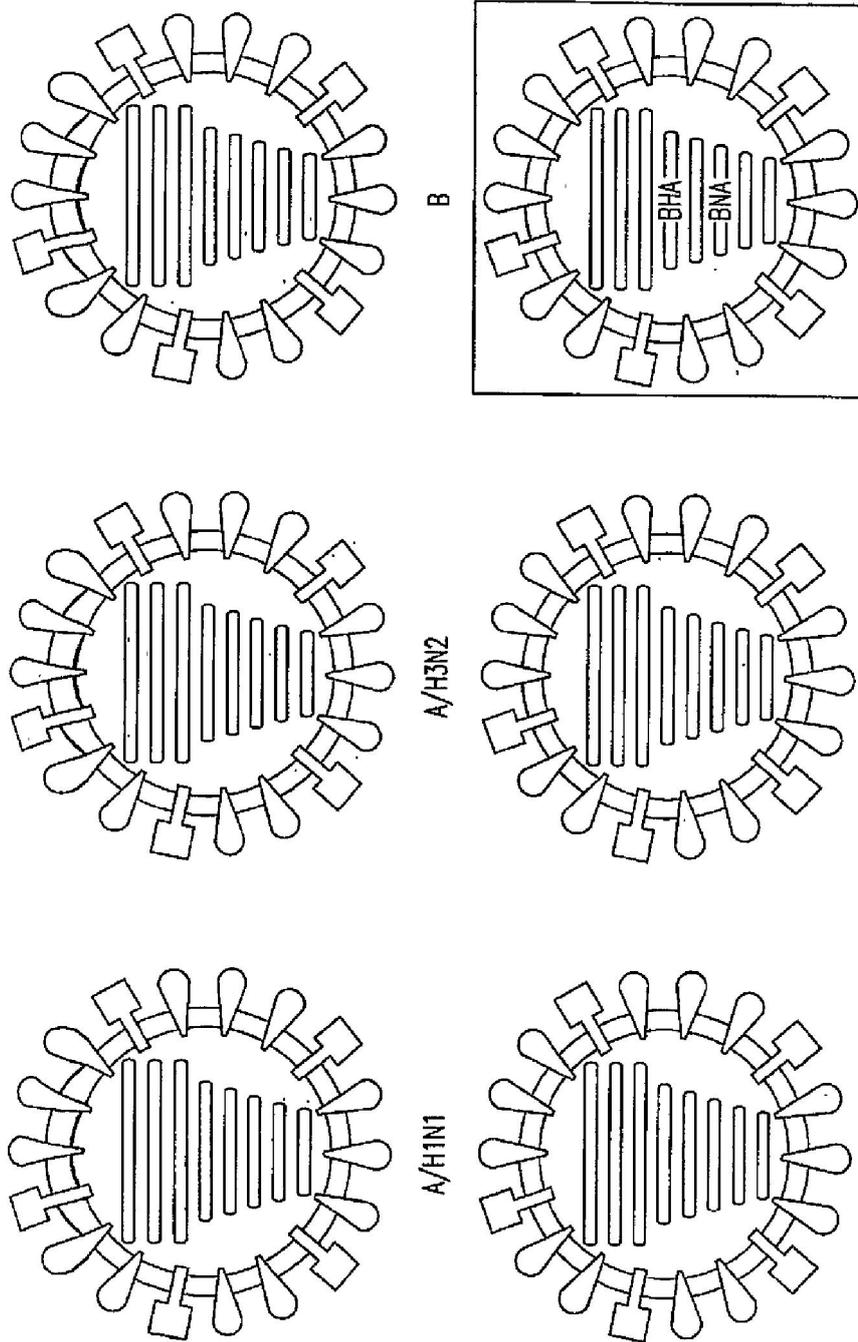
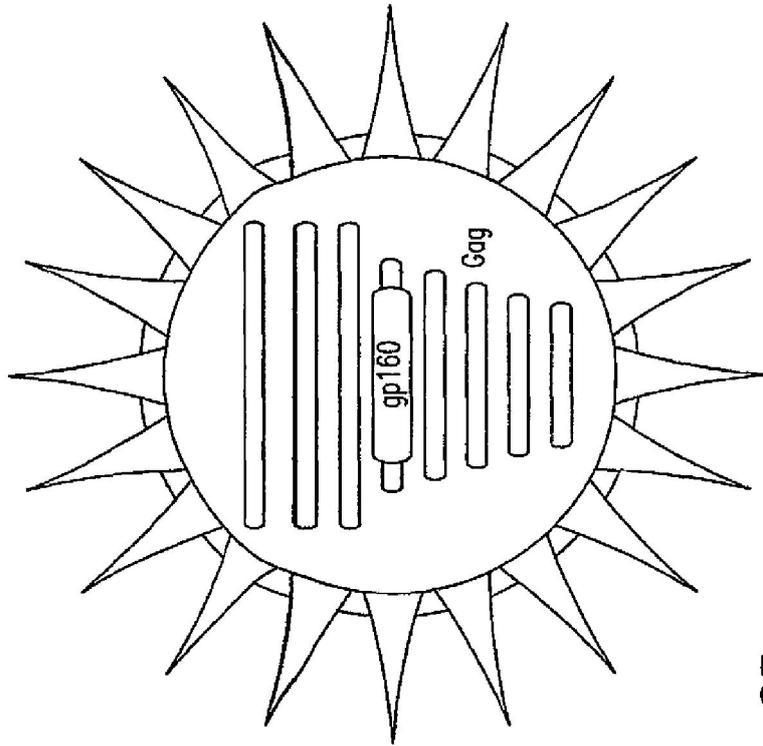


FIG. 24

VACUNA PARA LA INFECCIÓN POR VIH



VIRUS VSVG(HA)GFP(NA)

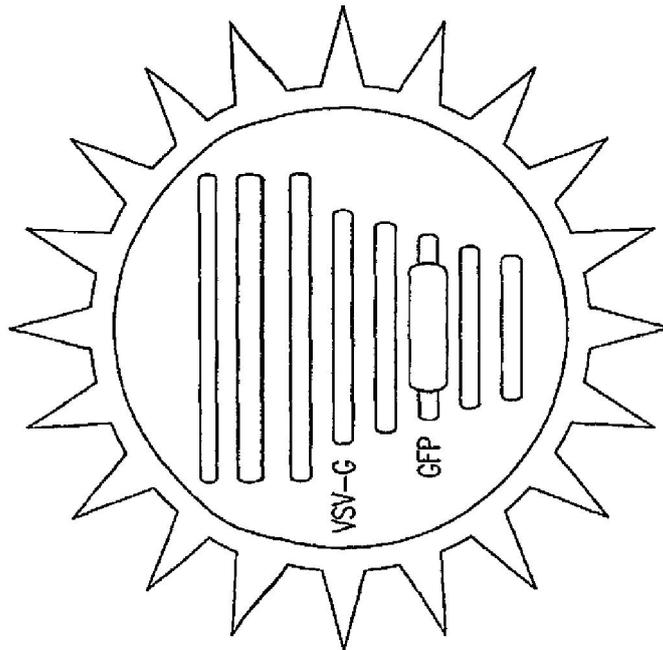


FIG. 25

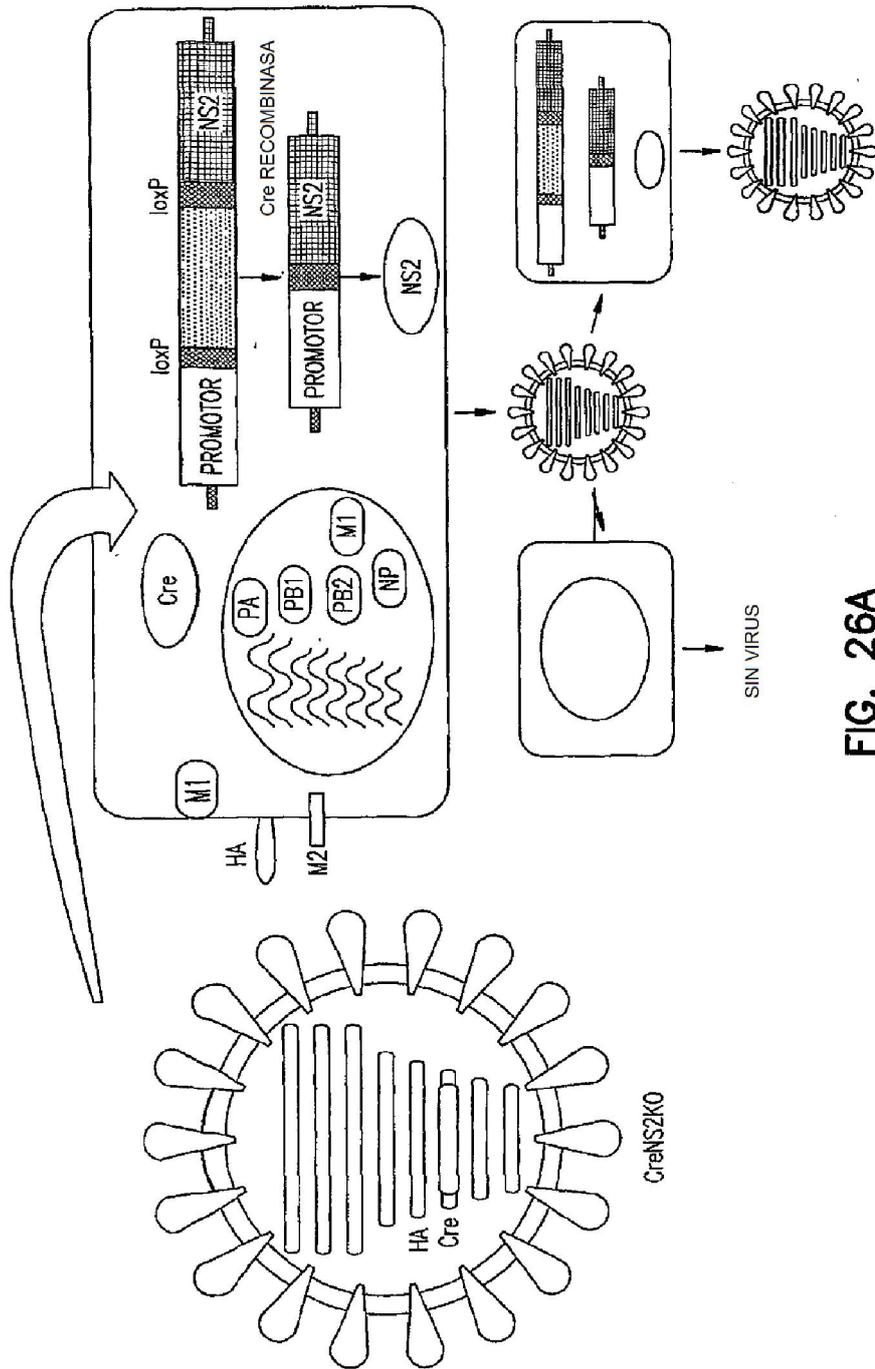


FIG. 26A

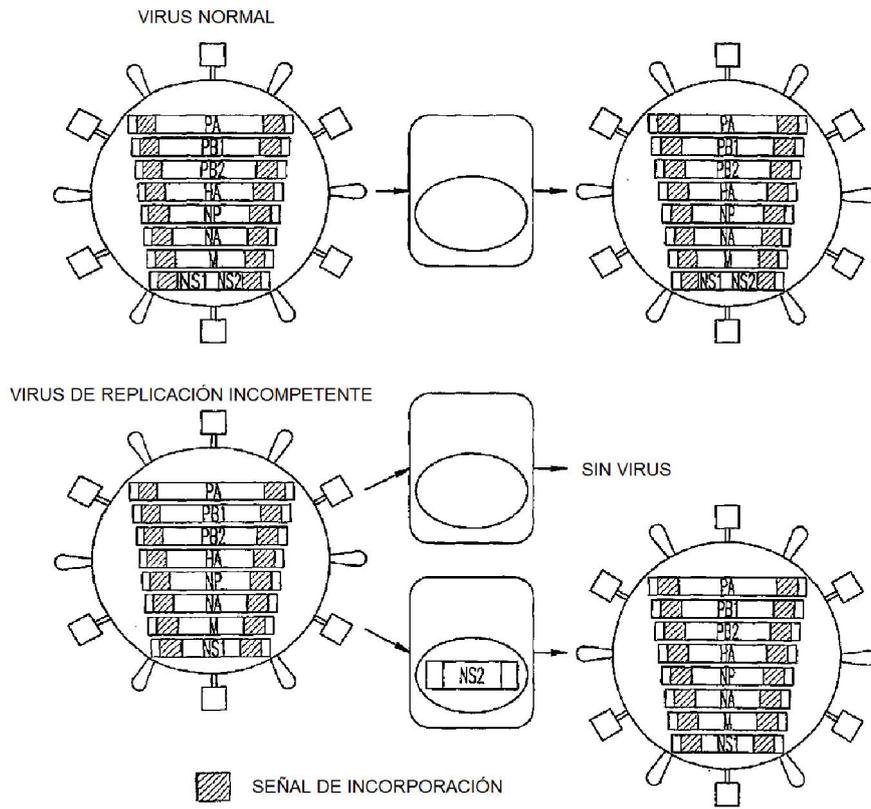


FIG. 26B