



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 315**

51 Int. Cl.:
C12N 7/02 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C07K 14/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99927175 .2**
96 Fecha de presentación : **03.06.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1090108**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2001**

54 Título: **Procedimientos novedosos para rescatar virus de ARN.**

30 Prioridad: **03.06.1998 US 87800 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.05.2011

73 Titular/es: **WYETH HOLDINGS CORPORATION**
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US

72 Inventor/es: **Parks, Christopher, L.;**
Sidhu, Mohinderjit, S.;
Udem, Stephen, A. y
Kovacs, Gerald, R.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 358 315 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

Procedimientos novedosos para rescatar virus de arn

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos mejorados para producir virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden designado virus Mononegavirales. Las realizaciones preferidas se refieren a procedimientos de producción de tales virus como virus atenuados y/o infecciosos tales como el virus del sarampión (VS), el virus respiratorio sincitial (VRS) y el virus paragripal humano (VPH). Los virus recombinantes pueden prepararse a partir de clones de ADNc y, por consiguiente, pueden obtenerse virus que tienen cambios definidos en el genoma.

10 **Antecedentes de la invención**

Los virus de ARN monocatenario de sentido negativo envueltos son excepcionalmente reconocidos y expresados. El ARN genómico de virus monocatenarios de sentido negativo cumple dos funciones de molde en el contexto de una nucleocápside: como molde para la síntesis de ARN mensajeros (ARNm) y como molde para la síntesis de la hebra de antigenoma (+). Los virus de ARN monocatenario de sentido negativo codifican y encapsidan su propia ARN polimerasa dependiente de ARN. Los ARN mensajeros sólo se sintetizan una vez que el virus ha entrado en el citoplasma de la célula infectada. La replicación vírica se produce después de la síntesis de los ARNm y requiere la síntesis continua de proteínas víricas. La hebra de antigenoma (+) recientemente sintetizada sirve de molde para generar otras copias de ARN genómico de hebra (-).

20 El complejo de la polimerasa actúa y consigue la transcripción y la replicación engranando las señales de acción cis en el extremo 3' del genoma, en particular la región promotora. Entonces, los genes víricos se transcriben desde el molde del genoma unidireccionalmente desde su extremo 3' hasta 5'. Siempre hay menos ARNm preparado a partir de los genes en la dirección 3' (por ejemplo, el gen de polimerasa (L)) con respecto a sus vecinos en la dirección 5' (es decir, el gen de nucleoproteína (N)). Por tanto, siempre hay un gradiente de abundancia de ARNm según la posición de los genes con respecto al extremo 3' del genoma.

25 El análisis genético molecular de tales virus de ARN no segmentado ha demostrado ser difícil hasta hace poco debido a que el ARN genómico desnudo o el ARN producido intracelularmente a partir de un plásmido transfectado no es infeccioso (Boyer y Haenni, 1994). Este problema técnico se ha superado mediante el desarrollo de tecnología de rescate de ADNc inteligente que permite el aislamiento de virus de ARN de hebra negativa no segmentado recombinante (Pattnaik y col., 1992; Schnell, Mebatsion y Conzelmann, 1994). Las técnicas para el rescate de estos
30 diferentes virus de hebra negativa siguen un tema común, teniendo cada una componentes necesarios distintivos para el rescate satisfactorio (Baron y Barrett, 1997; Collins y col., 1995; Garcin y col., 1995; Hoffman y Banerjee, 1997; Lawson y col., 1995; Radecke y col., 1995; Schneider y col., 1997; He y col., 1997; Schnell, Mebatsion y Conzelmann, 1994; Whelan y col., 1995). Después de la transfección de un plásmido de ADNc genómico se produce una copia exacta del ARN del genoma mediante la acción combinada de la ARN polimerasa T7 de fago y una
35 secuencia de ribozimas codificada por vector que escinde el ARN para formar los extremos 3'. Este ARN está encapsidado y es replicado por proteínas víricas inicialmente suministradas por plásmidos de expresión cotransfectados. En el caso del sistema de rescate del virus del sarampión (VS) (Radecke y col., 1995) se preparó una línea celular estable que expresaba ARN polimerasa T7 y las proteínas N del VS (proteína de la nucleocápside) y P (subunidad de la polimerasa de fosfoproteína). Por tanto, el rescate del VS puede lograrse cotransfectando esta
40 línea celular con un clon de ADNc genómico del VS que contiene un promotor de la polimerasa T7 apropiadamente posicionado y un plásmido de expresión que contiene el gen de la polimerasa del VS (L).

El rescate satisfactorio del ADNc del virus del sarampión requiere aparentemente que se produzcan numerosos acontecimientos moleculares después de la transfección que incluyen: 1) síntesis precisa de longitud completa del ARN del genoma por ARN polimerasa T7 y procesamiento del extremo 3' por la secuencia de ribozimas; 2) síntesis
45 de proteínas N, P y L víricas a niveles apropiados para iniciar la replicación; 3) la encapsidación *de novo* de ARN genómico en estructuras de la nucleocápside transcripcionalmente activas y competentes en la replicación; y 4) expresión de genes víricos a partir de nucleocápsides recientemente formadas a niveles suficientes para que progrese la replicación. Exactamente no se ha determinado qué etapas pueden ser limitantes de la velocidad en el rescate satisfactorio, pero la eficiencia del rescate puede mejorarse posiblemente estimulando una cualquiera de las
50 etapas anteriormente mencionadas.

La presente invención busca mejorar la capacidad de recuperación de virus de ARN recombinantes deseados tales como el VS. Se sostiene que la capacidad para obtener el virus replicante a partir del rescate puede disminuir a medida que el polinucleótido que codifica el genoma nativo y el antigenoma de un virus deseado se modifica cada vez más. Por consiguiente, la presente invención busca superar un obstáculo tal ya que estos procedimientos

pueden mejorar sustancialmente la probabilidad de obtener un virus recombinante deseado a partir de un procedimiento de rescate.

Resumen de la invención

5 La presente invención proporciona un procedimiento para producir un virus recombinante del orden Mononegavirales que comprende; (a) en al menos una célula huésped, realizar la transfección de una composición de rescate que comprende (i) un vector de transcripción que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un genoma o antígenoma de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales y (ii) al menos un vector de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislada que codifica las proteínas de acción trans necesarias para la encapsidación, la transcripción y la replicación en una célula huésped en condiciones suficientes para permitir la coexpresión de estos vectores y la producción del virus recombinante; (b) calentar la composición de rescate transfectada hasta una temperatura de choque térmico eficaz en condiciones suficientes para aumentar la recuperación del virus recombinante; y opcionalmente (c) recoger el virus recombinante resultante.

15 Un procedimiento adicional se refiere a producir un virus Mononegavirales recombinante que comprende; a) en al menos una célula huésped, realizar la transfección de una composición de rescate que comprende (i) un vector de transcripción que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un genoma o antígenoma de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales y (ii) al menos un vector de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica las proteínas de acción trans necesarias para la encapsidación, la transcripción y la replicación en condiciones suficientes para permitir la coexpresión de dichos vectores y la producción del virus recombinante; b) transferir la composición de rescate transfectada sobre al menos una capa de células Vero; y opcionalmente recoger el virus recombinante.

Otros aspectos de la presente invención se refieren a procedimientos de combinar las etapas no solapantes de los procedimientos anteriores junto con realizaciones preferidas para crear otros procedimientos mejorados.

25 En realizaciones alternativas, la presente invención proporciona un procedimiento para hacer virus de ARN del orden Mononegavirales que son atenuados, infecciosos o ambos. Realizaciones adicionales se refieren a los virus producidos a partir de los procedimientos de la presente invención, además de vacunas que contienen tales virus. Se observa que tales virus pueden ser humanos o no humanos, tales como murinos o bovinos.

30 Las realizaciones anteriormente identificadas y las realizaciones adicionales que se tratan en detalle en este documento representan los objetos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa un diagrama de flujo del procedimiento de rescate modificado. Este procedimiento incluye el uso de una etapa de choque térmico y la transferencia de células transfectadas a una monocapa de células Vero.

35 La Figura 2 es un autorradiograma que muestra el efecto del choque térmico sobre la expresión génica de minireplicones del Ejemplo 4 mediante el uso de ensayos de CAT.

La Figura 3 es un autorradiograma que muestra los resultados de ensayos de CAT para los experimentos de transfección de ARN de minireplicones del Ejemplo 5.

40 La Figura 4A es una transferencia Western usando anticuerpo específico para una marca de epítipo que se expresa a partir de un vector de expresión de CMV en los experimentos del Ejemplo 6 referentes a la estimulación de la expresión génica de minireplicones por hsp70.

La Figura 4B es un autorradiograma que muestra los resultados del ensayo de CAT a partir de la cotransfección de células 293-3-46 con el vector de expresión hsp70, ADN de minireplicones y plásmido de expresión L.

45 La Figura 5 es una tabla (Tabla 1) que representa el recuento de placas a partir de seis experimentos de rescate independientes que se realizaron para probar el efecto del choque térmico como se describe en el Ejemplo 2. Claramente se muestra la ventaja del procedimiento de choque térmico.

La Figura 6 es un diagrama del plásmido pGK16.2 que contiene un gen 1 de T7 del Ejemplo 10.

Descripción detallada de la invención

Como se observa en lo que antecede, la presente invención se refiere a un novedoso procedimiento de producción de virus de ARN recombinante. Tales procedimientos en la materia se denominan en lo sucesivo procedimientos de

“rescate” o de genética inversa. Procedimientos de rescate a modo de ejemplo para diferentes virus de hebra negativa no segmentados se desvelan a continuación con referencia a las publicaciones: Baron y Barrett, 1997; Collins y col., 1995; Garcin y col., 1995; He y col., 1997; Hoffman y Banerjee, 1997; Lawson y col., 1995; Radecke y Billeter, 1997; Radecke y col., 1995; Schneider y col., 1997; Schnell, Mebatsion y Conzelmann, 1994; Whelan y col., 1995. Publicaciones adicionales sobre el rescate incluyen la solicitud de patente internacional publicada WO 97/06270 para VS y otros virus de la subfamilia de los *Paramyxovirinae*, y para el rescate de VRS la solicitud de patente internacional publicada WO 97/12032; estas solicitudes se incorporan por este documento por referencia.

Después de la transfección de un plásmido de ADNc genómico se produce una copia exacta de ARN de genoma por la acción combinada de ARN polimerasa T7 de fago y una secuencia de ribozimas codificada por vector que escinde el ARN para formar los extremos 3'. Este ARN está encapsidado y es replicado por proteínas víricas inicialmente suministradas por plásmidos de expresión cotransfectados. En el caso del sistema de rescate del VS (Radecke y col., 1995) se preparó una línea celular estable que expresaba ARN polimerasa T7 y las proteínas N del VS (proteína de la nucleocápside) y P (fosfoproteína). Por tanto, el rescate del VS puede lograrse cotransfectando esta línea celular con un clon de ADNc genómico del VS que contiene un promotor de polimerasa T7 apropiadamente posicionado y un plásmido de expresión que contiene el gen de la polimerasa del VS (L).

Uno de los primeros pocos procedimientos de rescate se desveló para el virus del sarampión. El virus del sarampión (VS) es un miembro del género de los *Morbillivirus* en la familia de los *Paramyxoviridae* y, al igual que todos los miembros de esta familia, el VS es un virus envuelto que contiene un genoma de ARN de sentido negativo no segmentado (Lamb y Kolakofsky, 1996). El análisis genético molecular de esta familia de virus ha demostrado ser difícil hasta hace poco debido a que el ARN genómico desnudo o el ARN producido intracelularmente a partir de un plásmido transfectado no es infeccioso (Boyer y Haenni, 1994). Este problema técnico se ha superado mediante el desarrollo de tecnología de rescate de ADNc inteligente que permite el aislamiento de virus de ARN de hebra negativa recombinante (Pattnaik y col., 1992; Radecke y Billeter, 1997; Schnell, Mebatsion, y Conzelmann, 1994).

Una breve visión general de las etapas básicas de estos procedimientos y composiciones de rescate en este documento se describe adicionalmente a continuación:

La transcripción y la replicación de genomas víricos de ARN monocatenario de sentido negativo se consiguen mediante la actividad enzimática de una proteína multimérica que actúa sobre el núcleo de la ribonucleoproteína (nucleocápside). El ARN genómico desnudo no puede servir de molde. En su lugar, estas secuencias genómicas sólo son reconocidas cuando están completamente encapsidadas por la proteína N en la estructura de la nucleocápside. Es sólo en ese contexto que las secuencias promotoras terminales genómicas y antígenómicas son reconocidas para iniciar las rutas de transcripción o replicación.

Todos los *Paramyxovirus* requieren tres proteínas víricas N, P y L para que avancen estas rutas de polimerasa. Los *Pneumovirus* que incluyen el VRS también requieren el factor de extensión de la transcripción, M2, para que la ruta de transcripción avance eficazmente. Cofactores adicionales también pueden desempeñar una función, que quizás incluyan las proteínas NS1 y NS2 codificadas por virus, además de quizás las proteínas codificadas por células huésped.

Brevemente, todos los procedimientos de rescate de Mononegavirales pueden resumirse del siguiente modo: cada uno requiere un ADN clonado equivalente del genoma vírico deseado situado entre un promotor de ARN polimerasa dependiente de ADN adecuado (por ejemplo, el promotor de ARN polimerasa T7) y una secuencia de ribozimas de autoescisión (por ejemplo, la ribozima de la hepatitis delta) que se inserta en un vector de transcripción adecuado (por ejemplo, un plásmido bacteriano propagable). Este vector de transcripción proporciona el molde de ADN fácilmente manipulable a partir del cual la ARN polimerasa (por ejemplo, ARN polimerasa T7) puede transcribir fielmente una copia de ARN monocatenario del antígenoma (o genoma) vírico con los extremos 5' y 3' precisos, o casi precisos. La orientación de la copia de ADN genómico vírico y el promotor de flanqueo y las secuencias de ribozimas determinan tanto si se transcriben como si no el antígenoma como los equivalentes de ARN de genoma. Para el rescate de la nueva progenie de virus también se requieren las proteínas de acción trans específicas para virus necesarias para encapsidar los transcritos de ARN de antígenoma o de genoma vírico monocatenario desnudo en moldes funcionales de la nucleocápside: la proteína de la nucleocápside vírica (N o NP), la fosfoproteína asociada a polimerasa (P) y la proteína de polimerasa (L). Estas proteínas comprenden la ARN polimerasa dependiente de ARN vírico activo que debe engranar este molde de la nucleocápside para lograr la transcripción y la replicación. Ciertos virus seleccionados para el rescate pueden requerir proteínas adicionales tales como un factor de extensión de la transcripción.

Por consiguiente, en cada procedimiento se empleará una composición de rescate. Tales composiciones son muy conocidas en la técnica. La siguiente descripción no es limitante de composiciones de rescate que pueden emplearse en los procedimientos de la presente invención. La composición de rescate comprende (i) un vector de

transcripción que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un genoma o antigenoma de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales y (ii) al menos un vector de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislada que codifica las proteínas de acción trans necesarias para la encapsidación, la transcripción y la replicación en una célula huésped en condiciones suficientes para permitir la coexpresión de estos vectores y la producción del virus recombinante.

La molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia que codifica al menos un genoma o antigenoma de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales. Basándose en la reclasificación revisada en 1993 por el Comité internacional de la taxonomía de virus se ha establecido un orden, designado Mononegavirales. Este orden contiene tres familias de virus envueltos con genomas de ARN no segmentado monocatenario de polaridad menos (sentido negativo). Estas familias son *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Filoviridae*. La familia de los *Paramyxoviridae* se ha dividido adicionalmente en dos subfamilias, *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*. La subfamilia de los *Paramyxovirinae* contiene tres géneros, *Respirovirus* (conocidos anteriormente como *Paramyxovirus*), *Rubulavirus* y *Morbillivirus*. La subfamilia *Pneumovirinae* contiene el género *Pneumovirus*.

La nueva clasificación se basa en criterios morfológicos, la organización del genoma vírico, actividades biológicas y la vinculación de secuencias de los genes y productos génicos. La característica distintiva morfológica entre virus envueltos para la subfamilia de los *Paramyxovirinae* es el tamaño y la forma de las nucleocápsides (diámetro 18 nm, 1 µm de longitud, sitio de 5,5 nm), que tienen una simetría helicoidal de la mano derecha. Los criterios biológicos son: 1) reactividad cruzada antigénica entre miembros de un género, y 2) la presencia de actividad de neuraminidasa en los géneros *Respirovirus*, *Rubulavirus* y su ausencia en el género *Morbillivirus*. Además, se consideran variaciones en el potencial de codificación del gen P, como es la presencia de un gen adicional (SH) en *Rubulavirus*.

Los *Pneumovirus* pueden distinguirse de los *Paramyxovirinae* morfológicamente debido a que contienen estrechas nucleocápsides. Además, los *Pneumovirus* tienen grandes diferencias en el número de cistrones que codifican proteínas (10 en *Pneumovirus* frente a 6 en *Paramyxovirinae*) y una proteína de unión (G) que es muy diferente de la de los *Paramyxovirinae*. Aunque los *Paramyxovirus* y los *Pneumovirus* tienen seis proteínas que parece que se corresponde en función (N, P, M, G/H/HN, F y L), sólo las dos últimas proteínas presentan vinculación de secuencias significativa entre las dos subfamilias. Varias pneumoproteínas víricas carecen de homólogos en la mayoría de los *Paramyxovirus*, concretamente las proteínas no estructurales NS1 y NS2, la proteína hidrófoba pequeña S y una segunda proteína M2. Algunas proteínas paramixovíricas, concretamente C y V, carecen de homólogos en *Pneumovirus*. Sin embargo, la organización genómica básica de los *Pneumovirus* y los *Paramyxovirus* es la misma. Lo mismo es cierto de *Rhabdovirus* y *Filovirus*. La Tabla 1 presenta la actual clasificación taxonómica de estos virus, junto con ejemplos de cada género.

Tabla 1

Clasificación de virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado
del orden Mononegavirales

Familia *Paramyxoviridae*

Subfamilia de los *Paramyxovirinae*

Género *Respirovirus* (conocido anteriormente como *Paramyxovirus*)

Virus Sendai (virus paragripal de ratón tipo 1)

Virus paragripal humano (VPH) tipos 1 y 3

Virus paragripal bovino (VPB) tipo 3

Género *Rubulavirus*

Virus simio 5 (SV5) (virus paragripal canino tipo 2) Virus de las paperas

Virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) (*Paramyxovirus* aviar 1)

Virus paragripal humano (VPH) tipos 2, 4a y 4b)

Género *Morbillivirus*

Virus del sarampión (VS)

Morbillivirus de delfín

Virus del moquillo canino (VMC)

Virus de la peste-des-petits-ruminants

Virus del moquillo focino

Virus de la peste bovina

Subfamilia de los *Pneumovirinae*

Género *Pneumovirus*

Virus respiratorio sincitial humano (VRS)

Virus respiratorio sincitial bovino

Virus de la neumonía de ratones

Virus de la rinitis del pavo

Familia de los *Rhabdoviridae*

Género *Lyssavirus*

Virus de la rabia

Género *Vesiculovirus*

Virus de la estomatitis vesicular (VEV)

Género *Ephemerovirus*

Virus de la fiebre efímera bovina

Familia de los *Filoviridae*

Género *Filovirus*

Virus de Marburg

5 Como se observa anteriormente, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia que codifica al menos un genoma o antígeno de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales. La molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una secuencia de polinucleótidos que codifica un genoma, antígeno o una versión modificada de los mismos. En una realización, el polinucleótido codifica un promotor operativamente ligado, el genoma o antígeno deseado y un terminador de la transcripción.

10 En una realización preferida de la presente invención, el polinucleótido codifica un genoma o antígeno que ha sido modificado a partir de un virus de ARN natural mediante inserción, transposición, delección o sustitución de nucleótidos. Se presenta que la capacidad para obtener virus replicantes a partir del rescate puede disminuir a medida que el polinucleótido que codifica el genoma y el antígeno nativo está cada vez más modificado. En tales casos, la presente invención es particularmente valiosa ya que estos procedimientos pueden mejorar sustancialmente la probabilidad de rescate de virus recombinantes. La secuencia del genoma o antígeno puede derivarse de la de un virus humano o no humano. La secuencia de polinucleótidos también puede codificar un genoma quimérico formado a partir de unir recombinantemente un genoma o antígeno de dos o más fuentes. Por ejemplo, uno o más genes del grupo A de VRS se insertan en lugar de los genes correspondientes del grupo B de VRS; o uno o más genes de VPH bovino (VPHB), VPH-1 o VPH-2 se insertan en lugar de los genes correspondientes de PIN-3; o VRS puede sustituir genes de VPH, etc. En realizaciones adicionales, el polinucleótido codifica un genoma o antígeno para un virus de ARN del orden Mononegavirales que es un virus humano, bovino o murino. Como los virus recombinantes formados mediante los procedimientos de la presente invención pueden emplearse como herramientas en estudios de investigación de diagnóstico o como vacunas terapéuticas o

20

profilácticas, el polinucleótido también puede codificar una forma natural o una atenuada del virus de ARN seleccionado. En muchas realizaciones, el polinucleótido codifica una forma infecciosa atenuada del virus de ARN. En realizaciones particularmente preferidas, el polinucleótido codifica un genoma o antigenoma de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales que tiene al menos una mutación atenuante en la región promotora genómica 3' y que tiene al menos una mutación atenuante en el gen de ARN polimerasa como se describe por la solicitud de patente internacional publicada WO 98/13501, que se incorpora por este documento por referencia.

Las diversas necesidades para producir un virus recombinante pueden variar. Por consiguiente, pueden seleccionarse más virus de cualquier familia particular: la familia de los *Paramyxoviridae*, la familia de los *Rhabdoviridae* o la familia de los *Filoviridae*.

Además de secuencias de polinucleótidos que codifican las formas modificadas del genoma y antigenoma deseados como se ha descrito anteriormente, la secuencia de polinucleótidos también puede codificar el genoma o antigenoma deseado junto con uno o más genes heterólogos. Los genes heterólogos pueden variarse según se deseen. Dependiendo de la aplicación del virus recombinante deseado, el gen heterólogo puede codificar un cofactor, citocina (tal como una interleucina), un epítipo de linfocitos T colaboradores, un marcador de restricción, adyuvante o una proteína de un patógeno microbiano diferente (por ejemplo, virus, bacteria u hongo), especialmente proteínas que pueden provocar una respuesta inmunitaria protectora. El gen heterólogo también puede usarse para proporcionar agentes que se usan para terapia génica. En realizaciones preferidas, los genes heterólogos codifican citocinas tales como interleucina 12 que se seleccionan para mejorar las características profilácticas o terapéuticas del virus recombinante.

En vista de algunas de las necesidades actuales para vacunas mejoradas y el aumento de la flexibilidad en el tratamiento de patógenos víricos, la molécula de ácido nucleico aislada comprende un polinucleótido que codifica un virus de ARN seleccionado del grupo que consiste en VMC, VEV, VS, VRS, VPH, virus de las paperas y virus de la rabia. Otras preferencias entre este conjunto de virus de ARN es el grupo que consiste en VS, VRS, VPH y VPB.

Para realizaciones empleando virus atenuados, numerosas formas de tales virus son muy conocidas en la técnica, junto con procedimientos básicos para introducir mutaciones atenuantes para generar un virus modificado. Se usan medios convencionales tales como mutagénesis química durante el crecimiento del virus en cultivos celulares a los que se les ha añadido un mutágeno químico, seguido de selección de virus que se ha sometido a pases a temperatura inferior a la óptima con el fin de seleccionar mutaciones sensibles a la temperatura y/o adaptadas al frío, identificación de virus mutantes que producen pequeñas placas en cultivo celular y pase a través de huéspedes heterólogos para seleccionar mutaciones de gamas de huéspedes. Un medio alternativo de introducción de mutaciones atenuantes comprende hacer mutaciones predeterminadas usando mutagénesis dirigida a sitio. Pueden introducirse una o más mutaciones. Estos virus se criban entonces para la atenuación de su actividad biológica en un modelo animal. Los virus atenuados se someten a secuenciación de nucleótidos para localizar los sitios de mutaciones atenuantes.

Las diversas proteínas de acción trans requeridas para realizar el rescate también son muy conocidas en la técnica. Las proteínas de acción trans requeridas para el rescate del virus del sarampión son la proteína de encapsidación N y las proteínas complejas de polimerasa, P y L. Para el VPH-3, la proteína de encapsidación se designa NP, y las proteínas complejas de polimerasa también se denominan en lo sucesivo P y L. Para el VRS, las proteínas de acción trans específicas para virus incluyen N, P y L, más una proteína adicional, M2, el factor de extensión de la transcripción codificado por el VRS.

Las proteínas de acción trans víricas pueden generarse a partir de uno o más vectores de expresión (por ejemplo, plásmidos) que codifican las proteínas requeridas, aunque algunas o todas las proteínas de acción trans requeridas pueden producirse dentro de la célula huésped seleccionada manipulada para contener y expresar estos genes específicos para virus y productos génicos como transformantes estables.

La elección del vector de expresión además de la molécula de ácido nucleico aislada que codifica las proteínas de acción trans necesarias para la encapsidación, la transcripción y la replicación puede variar dependiendo de la selección del virus deseado. Los vectores de expresión se preparan con el fin de permitir su coexpresión con el (los) vector(es) de transcripción en la célula huésped y la producción del virus recombinante bajo condiciones seleccionadas.

Las circunstancias típicas (aunque no necesariamente exclusivas) para el rescate incluyen un medio apropiado de células de mamífero en el que la polimerasa T7 esté presente para accionar la transcripción del ARN monocatenario antigenómico (o genómico) a partir del vector de transcripción que contiene ADNc genómico vírico. Tanto cotranscripcionalmente como poco después, este transcrito de ARN de antigenoma (o genoma) vírico es encapsidado en moldes funcionales por la proteína de la nucleocápside y es engranado por los componentes de

polimerasa requeridos producidos simultáneamente a partir de plásmidos de expresión cotransfectados que codifican las proteínas de acción trans específicas para virus requeridas. Estos acontecimientos y procedimientos conducen a la transcripción requerida de ARNm víricos, la replicación y amplificación de nuevos genomas y, por tanto, a la producción de una novedosa progenie vírica, es decir, el rescate.

5 Para el rescate de rabia, VEV, VS5 y Sendai, la polimerasa T7 se proporciona por el virus de la variolovacuna recombinante VTF7-3. Sin embargo, este sistema requiere que el virus rescatado se separe del virus de la variolovacuna por medios físicos o bioquímicos o por pases repetidos en células o tejidos que no son un buen huésped para poxvirus. Para el rescate de ADNc del VS, este requisito se evita creando una línea celular que expresa polimerasa T7, además de las proteínas N y P víricas. El rescate se logra transfectando el vector de expresión de genoma y el vector de expresión del gen L en la línea celular de linfocitos T colaboradores.
10 Preferentemente, la línea celular de linfocitos T colaboradores produce pocos o ningún virus de progenie en células de mamífero y puede explotarse para rescatar el o los virus de ARN deseado(s). El virus colaborador puede usarse como fuente de polimerasa T7, por ejemplo VMA/T7 (descrito más adelante). Después de la expresión simultánea de las proteínas de encapsidación necesarias, el ARN vírico antígenómico sintético de longitud completa se encapsida,
15 se replica y se transcribe por proteínas de polimerasa víricas y los genomas replicados se encapsidan en viriones infectados. Además de tales antígenomas, los análogos de genoma se han rescatado satisfactoriamente para Sendai y VPH-3 (Kato y col. y la solicitud de patente internacional publicada WO 98/53708).

Como se observa anteriormente, VMA/T7 (un mutante atenuado del virus de la variolovacuna) es un ejemplo de un virus colaborador modificado que puede emplearse en el rescate de un virus de ARN rescate. Generalmente, el virus colaborador modificado es un virus que ha sido alterado a partir de un virus natural para presentar actividad vírica
20 disminuida, o no, en líneas celulares no permisivas. Las características del VMA establecen las características preferidas en un virus colaborador modificado. La cepa de VMA del virus de la variolovacuna proporciona una atractiva alternativa a las cepas más citopáticas. El VMA se desarrolló durante el programa de erradicación de la viruela en Turquía y Alemania por pases seriados (> 570) del virus de Ankara de la variolovacuna citopática en fibroblastos de embriones de pollitos. Se ha bajado de categoría a un patógeno de nivel 1 de Biosafety y puede ser usado por trabajadores de laboratorio sin vacunar. El VMA contiene seis deleciones principales (> 15% del genoma) que producen una pérdida de más de 30.000 pares de bases (Antoine y col., 1998). El VMA se replica en un número limitado de líneas celulares (Carroll y Moss, 1997; Drexler y col., 1998) y se bloquea en un estado tardío en morfogénesis vírica en células no permisivas (Sutter y Moss, 1992). Además, el VMA no induce el efecto citopático grave (ECG) observado con las cepas naturales. Una ventaja importante del VMA con respecto a otros poxvirus limitados a huéspedes (por ejemplo, NYVAC, ALVAC y la viruela aviar) es que la replicación del ADN vírico y, por tanto, la transcripción de casi todas las clases de genes (temprana, intermedia y tardía) es perfecta. Los genes extraños pueden expresarse eficazmente bajo todas las clases de promotores. Se ha informado de dos VMA recombinantes que expresan el gen 1 de T7 de bacteriófago. Los virus híbridos de VMA/T7 contienen una copia integrada del gen 1 de T7 bajo la regulación de tanto el promotor temprano/tardío débil 7,5K (Sutter y col., 1995) como del promotor tardío fuerte 11K (Wyatt y col., 1995). Ambos se han usado como virus colaborador en sistemas de expresión transitorios para rescatar genéticamente virus de ARN de hebra negativa (Collins y col., 1995; Leyrer y col., 1998; Schneider y col., 1997; Barron, M.D. y Barrett, T. Rescue of rinderpest virus from a cloned cDNA. *Journal of Virology*. 71(2):1265-71, 1997 Feb.; Durbin, A.P., Hall, S.L., Siew, J.W., Whitehead, S.S., Collins, P.L., y Murphy, B.R. Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA. *Virology*. 235(2): 323-332, 1997; He y col., 1997).).

A pesar de los beneficios de emplear un virus colaborador tal como un virus colaborador atenuado como VMA/T7, el ciclo de replicación simultáneo de VMA/T7 u otro virus colaborador puede suprimir los acontecimientos genéticos que se requieren para el rescate de un virus recombinante heterólogo. Por consiguiente, en realizaciones preferidas de la presente invención, cuando un virus colaborador se emplea, también se emplea un inhibidor de la síntesis de ADN. Esta realización produce una mejora en el sistema de rescate. Un inhibidor de la síntesis de ADN permite que se produzca el rescate, a la vez que también la inhibición (o la inhibición sustancial) de la síntesis de ADN del virus colaborador. Inhibidores de la síntesis de ADN a modo de ejemplo tales como AraC (citosina-beta-D-arabinofuranósido) e hidroxurea bloquean el ciclo de replicación del virus colaborador en un momento crucial en el ciclo vital vírico. Como la transcripción génica vírica intermedia y tardía sólo se inicia en genomas víricos nacientes, estas dos clases de genes son silenciosas como resultado del bloqueo por AraC o hidroxurea. El AraC bloquea la replicación incorporándose en el ADN, mientras que la hidroxurea inhibe la ribonucleótido-reductasa, reduciendo el conjunto celular de desoxirribonucleótidos. Hay disponibles muchos inhibidores de la síntesis de ADN adicionales. Los inhibidores de la síntesis de ADN adicionales son conocidos por bloquear la síntesis de ADN celular, pero no se recomiendan para uso en el bloqueo de la replicación del VMA. Estos incluyen: inhibidores de ADN polimerasa (como afidicolina), inhibidores de la topoisomerasa (ejemplos como la camptotecina que bloquea las topoisomerasas de tipo I; novobiocina y ácido nalidíxico que bloquean las topoisomerasas de tipo II) e inhibidores de ADN girasa (como heliquinomicina). Los inhibidores de la síntesis de ADN que bloquean la síntesis de ADN celular serían más

eficaces para virus colaboradores que dependen mucho de las enzimas celulares para realizar las funciones de replicación.

Una clara ventaja de usar inhibidores de la síntesis de ADN durante un acontecimiento de rescate genético es que deberá haber muy poca o ninguna contaminación del virus de ARN rescatado con un virus colaborador modificado. En el VMA, el ciclo de replicación en células no permisivas se detiene en una etapa muy tardía en la morfogénesis, produciendo partículas víricas que son no infecciosas. La infección de células semipermissivas produce crecimiento vírico limitado, que está contraindicado en los experimentos de rescate genético. Bajo bloqueo por AraC o hidroxiaurea, la inhibición concomitante de la síntesis tardía de proteínas produce la completa ausencia de partículas víricas. El virus rescatado se amplifica directamente en una línea celular que es permisiva para el crecimiento del virus colaborador. Las cantidades de inhibidores de la síntesis de ADN usadas para la transfección se determinan fácilmente por experimentos de prueba para analizar el crecimiento del virus colaborador.

Se entiende que los acontecimientos moleculares requeridos para la conversión de un ADNc vírico en un virus de ARN recombinante implican la transcripción por polimerasa T7 y la replicación de genoma de longitud completo tanto de hebra negativa como positiva por tres o más factores de acción trans vírica (N, P y L, en el caso de VS). La replicación simultánea del VMA produce el agotamiento de recursos intracelulares y extracelulares durante todo el acontecimiento de rescate, probablemente comprometiéndolo cierto grado. El bloqueo de la expresión de genes intermedios y tardíos produce la conservación de estos recursos, y es quizás un motivo de porqué se potencia el rescate genético en presencia de inhibidores.

El efecto citopático (ECG) inducido por la infección vírica se reduce sustancialmente en células infectadas por el VMA con respecto a células infectadas por el virus natural. Se reduce adicionalmente en células infectadas por el VMA tratadas con inhibidores de la síntesis de ADN. La prolongación de la vida de la célula infectada permite la expresión de una mayor variedad de genes extraños. Esto puede ser otro componente ventajoso para rescates genéticos mejorados.

El uso de otros promotores (muy tempranos, tempranos/intermedios, intermedios o tempranos/tardíos) para accionar la expresión de T7 puede potenciar rescates genéticos, preferentemente en presencia de inhibidores de la replicación de ADN. Los promotores del virus de la variolovacuna son adecuados para los procedimientos de la presente invención.

Entonces, las células huésped se transforman o se transfectan con los al menos dos vectores de expresión descritos anteriormente. Las células huésped se cultivan en condiciones que permitan la coexpresión de estos vectores para producir el virus atenuado infeccioso.

Entonces, el virus infeccioso rescatado se prueba para su fenotipo deseado (sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío, morfología de placas y atenuación de la transcripción y la replicación), primero por medios *in vitro*. Las mutaciones en la región promotora genómica 3' de acción cis también se prueban usando el sistema de minireplicones en el que la encapsidación de acción en trans requerida y las actividades de polimerasa se proporcionan por virus naturales o colaboradores de vacuna, o por plásmidos que expresan los diferentes genes N, P y L que albergan mutaciones atenuantes específicas para genes (Radecke y col. (1995) y Sidhu y col. (1995)).

Si está presente el fenotipo atenuado del virus rescatado, los experimentos de exposición se realizan con un modelo animal apropiado. Los primates no humanos proporcionan el modelo animal preferido para la patogénesis de enfermedad humana. Estos primates se inmunizan primero con el virus atenuado recombinantemente generado, luego se exponen a la forma natural del virus.

Las células huésped que pueden emplearse en los procedimientos de rescate de la presente invención son aquellas que permiten la expresión de los vectores de los constituyentes requeridos necesarios para la producción del virus recombinante deseado. Tales células huésped pueden seleccionarse de una célula procariota o una célula eucariota, y preferentemente una célula de vertebrado. En general, las células huésped preferidas se derivan de una célula humana tal como una célula de riñón embrionario humano. Radecke y col., 1995, desvelan el uso de una célula huésped que se deriva de una línea de células de riñón embrionario humano designada 293 3-46. También pueden usarse células Vero, además de muchos otros tipos de células, como células huésped. Lo siguiente son ejemplos de células huésped adecuadas: (1) líneas de células primarias diploides humanas: por ejemplo, células WI-38 y MRC5; (2) línea de células diploides de mono: por ejemplo, FRhL - células de pulmón de Rhesus fetal; (3) línea de células continuas casi primarias: por ejemplo, AGMK - células de riñón de mono verde africano; (4) células 293 humanas (con reservas) y (5) otras posibles líneas celulares tales como CHO, MDCK (riñón canino Madin-Darby), fibroblastos de embrión de pollo primario. En realizaciones alternativamente preferidas se añade un reactivo que facilita la transfección para aumentar la captación de ADN por las células. Muchos de estos reactivos se conocen en la técnica. LIPOFECTACE (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y EFFECTENE (Qiagen, Valencia, CA) son ejemplos comunes. Lipofectace y Effectene son ambos lípidos catiónicos. Ambos recubren el ADN y potencian la captación de

ADN por células. Lipofectace forma un liposoma que rodea el ADN, mientras que Effectene recubre el ADN, pero no forma un liposoma.

Como muchos de los virus de ARN empleados en la presente invención son patógenos humanos, en tales casos se emplea preferentemente una célula de primate. Hay excepciones tales como el virus del moquillo canino y otros *Morbillivirus* que infectan mamíferos no humanos. Todos estos virus sólo infectan células eucariotas. El virus del sarampión está principalmente limitado a tipos de células de primate. Algunas líneas celulares eucariotas funcionan mejor que otras en la propagación de virus y algunas líneas celulares no funcionan en absoluto para algunos virus. Se emplea una línea celular que proporciona efecto citopático detectable con el fin de que pueda detectarse fácilmente el rescate del virus viable. En el caso del sarampión y posiblemente otros virus, las células transfectadas se cultivan en células Vero debido a que el virus se propaga rápidamente en células Vero y hace fácilmente detectables las placas. Ésta es otra característica importante de la invención. En general se emplea una célula huésped que es permisiva para el crecimiento de los virus seleccionados. En algunos casos, la célula huésped es un "tipo de célula de complementación". En el caso del virus del sarampión se usan células 293-3-46 (Radecke y col., 1995) debido a que expresan los genes N y P del virus del sarampión, además del gen de ARN polimerasa T7. Otros sistemas no tienen esta limitación debido a que todas las proteínas víricas necesarias se proporcionan por plásmidos de expresión y virus de la variolovacuna que expresa ARN polimerasa T7.

El vector de transcripción y el vector de expresión pueden ser vectores de plásmido designados para la expresión en la célula huésped. El vector de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislada que codifica las proteínas de acción trans necesarias para la encapsidación, la transcripción y la replicación puede expresar estas proteínas a partir del mismo vector de expresión o al menos dos vectores diferentes. Estos vectores se conocen generalmente de los procedimientos de rescate básicos y no necesitan alterarse para uso en los procedimientos mejorados de la presente invención.

En un procedimiento mejorado de la presente invención se usa una temperatura de choque térmico eficaz. Una temperatura de choque térmico eficaz es una temperatura por encima de la temperatura estándar sugerida para realizar el rescate de un virus recombinante. En muchos casos, una temperatura de choque térmico eficaz está por encima de 37°C. Si se lleva a cabo un procedimiento de rescate a una temperatura de choque térmico eficaz, el procedimiento de rescate genera un aumento en la recuperación del virus recombinante deseado con respecto al nivel de recuperación del virus recombinante cuando el rescate se realiza en ausencia del aumento de temperatura. La temperatura de choque térmico eficaz y el tiempo de exposición pueden variar basándose en el sistema de rescate usado. Tales discrepancias de temperatura y tiempo pueden resultar de las diferencias en el genoma vírico seleccionado o tipo de célula huésped. Aunque la temperatura puede variar, una temperatura de choque térmico eficaz puede determinarse fácilmente realizando varios procedimientos de rescate de prueba con un virus recombinante particular y estableciendo un porcentaje de tasa de recuperación del virus recombinante deseado a medida que varían la temperatura y el tiempo de exposición. Ciertamente, el extremo superior de cualquier intervalo de temperatura para realizar el rescate es la temperatura a la que los componentes de la transfección se destruyen o se reduce o disminuye su capacidad para funcionar en la transfección.

A continuación se muestra una lista a modo de ejemplo de intervalos de temperatura:

de 38°C a aproximadamente 50°C, de 39°C a aproximadamente 49°C, de 39°C a aproximadamente 48°C, de aproximadamente 40°C a aproximadamente 47°C, de aproximadamente 41°C a aproximadamente 47°C, de aproximadamente 41°C a aproximadamente 46°C, siendo de aproximadamente 42°C a aproximadamente 46°C el más preferido. Alternativamente se observa que las temperaturas de choque térmico de 43°C, 44°C, 45°C y 46°C son particularmente preferidas.

Sin quedar ligado por lo que sigue, por este documento se especula que emplear una temperatura elevada para la temperatura de choque térmico durante el rescate desencadena una respuesta celular y síntesis asociada a las proteínas de choque térmico (denominadas en lo sucesivo hsp). Se reconoce que el choque térmico induce la respuesta de estrés celular y la síntesis de un grupo de proteínas multifuncionales llamadas proteínas de choque térmico (hsp) (Craig, 1985; Gunther y Walter, 1994; Lindquist, 1986). Muchas, pero no todas, las hsp están codificadas por genes altamente inducibles y estas proteínas se sintetizan a niveles elevados para ayudar a la célula a recuperarse del estrés. Las hsp inducibles también están presentes en la célula en el nivel basal indicativo de las diversas funciones que desempeñan estas proteínas en la función celular normal. Algunas de las hsp también se llaman chaperonas debido a que desempeñan una función importante en ayudar al apropiado plegamiento de proteínas (Gething, 1996; Martin y Hartl, 1997). Otras funciones atribuidas a las hsp incluyen funciones en el tráfico de proteínas en la célula, modulación de la función de enzimas y proteínas, participación en la replicación de ADN e implicación en la replicación vírica y patogénesis (Franke, Yaun y Luban, 1994; Friedman y col., 1984; Gething, 1996; Glick, 1995; Hu, Toft y Seeger, 1997; Lund, 1995; Martin y Hartl, 1997; Pratt, 1992; Santoro, 1996).

La familia de la proteína de choque térmico de mamífero 70 (hsp70) es un grupo relacionado de proteínas de aproximadamente 70 kD de tamaño. La forma inducible principal de la hsp70 (hsp72) tiene un peso molecular aparente de 72 kD. La proteína hsp70 de 73 kD (hsp73) se expresa en la célula constitutivamente y se ha llamado una proteína relacionada de choque térmico (hsc73, (Gunther y Walter, 1994)). Estas proteínas participan en algunas de las funciones mencionadas anteriormente y participan como uno de los factores de células huésped que aumenta la expresión génica de VMC nativo (no rescatado) en respuesta a choque térmico. La isoforma de hsp72 se copurifica con la fracción de nucleocápsides del VMC que contienen actividad de transcripción vírica potenciada (Oglesbee y col., 1996).

En vista de los resultados ejemplares de los inventores como se describen en este documento, puede deducirse que el efecto de temperatura de choque térmico sobre la expresión génica de VMC y la expresión génica para otros virus que pueden rescatarse según los procedimientos descritos en este documento es debido, al menos en parte, a la inducción de hsp70. Por consiguiente, realizaciones alternativas de la presente invención se refieren al uso de una temperatura de choque térmico eficaz que puede efectuar la inducción de hsp, especialmente una hsp 70 tal como hsp 72.

En la realización de las pruebas para establecer la temperatura de choque térmico seleccionada también puede seleccionarse un tiempo deseado para realizar el procedimiento de choque térmico. Un tiempo suficiente para aplicar la temperatura de choque térmico eficaz es el tiempo durante el cual hay un aumento en la recuperación del virus recombinante deseado con respecto al nivel de recuperación de virus recombinante cuando el rescate se realiza en ausencia de un aumento de temperatura con respecto a la temperatura estándar sugerida para realizar el rescate. La longitud de tiempo apropiada puede variar basándose en el sistema de rescate. Tal discrepancia en el tiempo también puede resultar de las diferencias en el genoma vírico seleccionado o el tipo de célula huésped. Aunque el tiempo puede variar, el periodo de tiempo para aplicar una temperatura de choque térmico eficaz puede determinarse fácilmente realizando varios procedimientos de rescate de prueba con un virus recombinante particular y estableciendo una tasa o porcentaje de recuperación del virus recombinante deseado a medida que se varían la temperatura y el tiempo. Ciertamente, el límite superior para cualquier variable de tiempo usada en realizar el rescate es el periodo de tiempo a la que los componentes de la transfección se destruyen o se reduce o disminuye su capacidad para funcionar en la transfección. El periodo de tiempo para el procedimiento de choque térmico puede variar de varios minutos a varias horas, siempre que se obtenga el aumento deseado en la recuperación de virus recombinante.

Aunque el tiempo de exposición de las células transfectadas a la temperatura de choque térmico eficaz puede variar con cada sistema de rescate, a continuación se muestra una lista a modo de ejemplo de intervalos de tiempo de exposición (en minutos):

de aproximadamente 5 a aproximadamente 300, de aproximadamente 15 a aproximadamente 300, de 15 a aproximadamente 240, de aproximadamente 20 a aproximadamente 200, de aproximadamente 20 a aproximadamente 150, siendo de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 el intervalo más deseado.

Pueden emplearse numerosos medios para determinar el nivel de recuperación mejorada del virus recombinante deseado. Como se observa en los ejemplos en este documento puede usarse un gen indicador de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) para monitorizar el rescate del virus recombinante. La actividad correspondiente del gen indicador establece el nivel inicial y el nivel de expresión mejorado del virus recombinante. Otros procedimientos incluyen detectar el número de placas de virus recombinante obtenidas y verificar la producción del virus rescatado por secuenciación. La recuperación mejorada deberá presentar un aumento de al menos aproximadamente el 25 % o al menos aproximadamente el 40%. Preferentemente, el aumento en el virus recombinante recuperado es aproximadamente 2 veces. Aproximadamente se ha observado un aumento de 5 a 10 veces en la cantidad de virus recombinante.

Un procedimiento sugerido para determinar el nivel de recuperación mejorada del virus recombinante deseado implica preparar varios cultivos celulares idénticamente transfectados y exponerlos a diferentes condiciones de choque térmico (tiempo y temperatura variables), y luego comparar con células de control transfectadas y mantenidas a una temperatura constante de 37°C. 72 horas después de la transfección, las células transfectadas se transfieren a una placa de 10 cm que contiene una monocapa de aproximadamente el 75% de células Vero confluentes (o tipo de células de elección para determinar la formación de placas del virus recombinante) y la incubación continúa hasta que las placas sean visibles. Después de esto, las placas se cuentan y se comparan con los valores obtenidos de células de control. Las condiciones de choque térmico óptimas deberán maximizar el número de placas.

Se desvela que la composición de rescate transfectada, como está presente en la(s) célula(s) huésped, se somete a una etapa de expansión en placa o etapa de amplificación. Esto proporciona un procedimiento de rescate mejorado

para producir un virus Mononegavirales recombinante, procedimiento que comprende; (a) en una célula huésped, realizar la transfección de una composición de rescate que comprende (i) un vector de transcripción que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un genoma o antígenoma de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales y (ii) al menos un vector de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislada que codifica las proteínas de acción trans necesarias para la encapsidación, la transcripción y la replicación en condiciones suficientes para permitir la coexpresión de dichos vectores y la producción del virus recombinante; (b) transferir la composición de rescate transfectada sobre al menos una capa de células de expansión en placa (células PE); y (c) opcionalmente recoger el virus recombinante. Frecuentemente, la célula huésped empleada en la realización de la transfección no es favorable para el crecimiento del virus recombinante deseado. La recuperación de virus recombinante a partir de las células transfectadas puede mejorarse seleccionando una célula de expansión en placa en la que el virus nativo o el virus recombinante presenta crecimiento potenciado. Cualquiera de las diversas placas o recipientes conocidos en la técnica puede emplearse para la etapa de expansión en placa. Preferentemente, las células transfectadas que contienen la composición de rescate se transfieren sobre una monocapa de células PE. En particular, la capa de células PE deberá ser al menos aproximadamente el 50% de confluyente. Alternativamente, las células PE son al menos aproximadamente el 60% de confluentes o incluso al menos aproximadamente el 75% de confluentes. Con el fin de lograr la expansión en placa, las células transfectadas se transfieren a recipientes de células PE de forma que el área superficial de las células PE sea mayor que el área superficial usada para preparar el virus transfectado. Según se desee puede emplearse una relación de área superficial potenciada de 2:1 a 100:1. Se prefiere un área superficial potenciada de al menos 10:1. Las células de expansión en placa se seleccionan basándose en el crecimiento satisfactorio del virus nativo o recombinante en tales células. Las células Vero funcionaron bien en los experimentos a modo de ejemplo tratados en este documento y, por consiguiente, se prefieren como células PE.

Se logran procedimientos de rescate mejorados adicionales reemplazando los medios de transfección antes de, o simultáneamente con, una expansión en placa con células Vero o un procedimiento de choque térmico. La sustitución de medios puede producirse en diversos momentos antes de la expansión en placa o temperatura de choque térmico; sin embargo, la sustitución de los medios después de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 horas de incubación de las células transfectadas puede ir seguida de un punto de partida y luego ajustarse según se desee después de esto a partir de la realización de ejecuciones de prueba de los procedimientos de rescate.

Virus de ARN monocatenario segmentado

Aunque uno de los aspectos importantes de la presente invención es la aplicación de estos procedimientos mejorados en la recuperación de virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado, los procedimientos de la presente invención pueden ser útiles para potenciar el rescate de muchos tipos de virus de ARN, incluyendo virus de ARN monocatenario de sentido negativo segmentado. Basándose en la reclasificación revisada en 1993 por el Comité internacional de la taxonomía de virus, este último grupo de virus pertenecen a tres familias de virus que son los *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* y *Arenaviridae*.

Familia *Orthomyxoviridae*

Género *Influenzavirus A, B*

Vertebrados, virus de la gripe A

Género *Influenzavirus C*

40 Vertebrados, virus de la gripe C

Género "virus similares a *Thogoto* no identificados"

Vertebrados: virus *Thogoto*

Familia *Bunyaviridae*

Género *Bunyavirus*

45 Vertebrados: virus *Bunyamwera*

Género *Nairovirus*

Vertebrados: enfermedad de los ovinos de Nairobi

Género *Phlebovirus*

Vertebrados: virus siciliano de la fiebre de las moscas de los arenales

Género *Hantavirus*

Vertebrados: virus Hantaan

Género *Tospovirus*

5 Plantas: virus de la marchitez manchada del tomate

Familia *Arenaviridae*

Género *Arenavirus*

Vertebrados: virus de la coriomeningitis linfocítica

Género *Tenuivirus*

10 Plantas: virus del rayado del arroz

De estas familias de virus segmentados son de particular interés los virus que presentan posibles riesgos para la salud de los seres humanos. La genética inversa (o rescate) ha proporcionado una ruta para producir gripe A recombinante ensamblando el ARN de virión con un complejo de transcriptasa activo para el genoma para iniciar la replicación (Enami y Palase). El procedimiento implica la transcripción *in vitro* de una copia de ADNc, creando un segmento del gen del virus deseado, nativo o mutado, en una copia de ARNv y la recuperación del virus. El ARNv se mezcla con proteínas RNP (obtenidas de viriones purificados) y luego se transfectan en una célula con un virus colaborador (por ejemplo, un virus natural correspondiente al virus recombinante deseado). Por ejemplo, en la preparación de la gripe A recombinante, el virus de la gripe A se emplea para proporcionar proteínas que replican el gen de ARN transfectado. Se forma una mezcla de virus recombinante y virus colaborador. Como el virus colaborador está presente en gran exceso se emplea un fuerte sistema de selección tal como un sistema de selección de anticuerpo para separar selectivamente la progenie (Enami y Palase, 1991). El procedimiento de choque térmico de la presente invención puede emplearse para aumentar el volumen de la mezcla resultante y la cantidad de virus recombinante obtenida sometiendo la composición de rescate apropiada, de ARN, RNP y cualquier componente adicional tal como complejos de transcriptasa activos cuando la coinfección se realiza con el virus colaborador.

Específicamente, el procedimiento de choque térmico de la presente invención también puede emplearse para mejorar la eficiencia del procedimiento usado para producir partículas similares a virus encapsidando el minigenoma de CAT:ARN similar a la gripe sintético en las células COS-1 mediante clones de ADNc que expresan variolovacuna-polimerasa T7 de 10 proteínas codificadas por el virus de la gripe A (Mena y col., 1996). En una realización adicional, el procedimiento de choque térmico de la presente invención puede emplearse en mejorar la eficiencia de un sistema independiente de colaborador para el rescate de un genoma de ARN de hebra negativa segmentado del bunyavirus Bunyamwera (Bridgen y Elliott, 1996). Este sistema es similar al usado para experimentos de rescate de virus de ARN de sentido negativo no segmentado (en vez del descrito para el rescate de los virus de la gripe segmentados). Se construyeron plásmidos que contienen copias de ADNc de longitud completa de los tres segmentos del genoma de ARN del bunyavirus Bunyamwera y se flanquearon por las secuencias promotoras de T7 y de ribozimas para generar copias genómicas de los ARN con los extremos genómicos precisos. Cuando las células que expresan polimerasa T7 y proteínas del bunyavirus Bunyamwera recombinante se transfectaron con estos plásmidos, los ARN de antígeno de longitud completa se transcribieron y se encapsidaron intracelularmente, y a su vez éstos se replicaron y se encapsidaron en partículas de bunyavirus infeccioso.

Las observaciones descritas en este documento de que el choque térmico potencia el rescate del VS recombinante y aumenta la expresión del gen indicador CAT de minireplicones del VS, combinadas con los resultados que indican que la actividad de la L polimerasa de VMC es estimulada por hsp72 (Oglesbee y col., 1996), da lugar a la creencia de que la inducción de hsp72 puede ser sustancialmente responsable del efecto de choque térmico descrito en este documento. Esta posibilidad se examinó expresando uno de los genes para hsp72 a partir de un vector de expresión durante experimentos de minireplicones de CAT. La expresión de una versión marcada con epítipo de la proteína hsp se confirmó por análisis de transferencia Western (Ejemplo 6). La presencia del vector de expresión de hsp aumentó los niveles de CAT en células transfectadas hasta 20 veces (Ejemplo 6). Estos resultados sugieren que la expresión de alto nivel de hsp72 puede aumentar la eficiencia del rescate de virus. Además, estos resultados implican que una línea celular estable que expresa altos niveles de hsp72 puede ser favorable para el rescate. Idealmente, la línea celular estable expresaría la hsp72 de un promotor inducible de forma que pudiera regularse la cantidad de expresión del gen de hsp72. Esto permitiría seleccionar un periodo de tiempo de inducción y el nivel de inducción que maximizara el rescate y también evitara cualquier efecto posiblemente tóxico a la línea celular de

expresión de alto nivel constitutiva del gen de hsp.

Los virus recombinantes preparados a partir de los procedimientos de la presente invención pueden emplearse para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Preferentemente, los virus recombinantes preparados a partir de los procedimientos de la presente invención se usan solos o conjuntamente con productos farmacéuticos, antígenos, agentes inmunizantes o adyuvantes como vacunas en la prevención o la mejora de la enfermedad vírica. Estos agentes activos pueden formularse y administrarse mediante medios convencionales, es decir, usando un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no deben interpretarse como limitantes de la invención como se describen anteriormente en este documento.

Ejemplos

PROCEDIMIENTOS y MATERIALES

Células, virus y transfección.

Se mantuvieron células 293-3-46 (Radecke y col., 1995) y células 293 (Graham y col., 1977) en medio esencial mínimo modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (SBF). Se cultivaron células 293-3-46 con selección en medios que contenían G418 (geneticina, Gibco-BRL) a 1,5 mg por ml. Se cultivaron células Vero en DMEM que contenía SBF al 5% y se cultivaron células en suspensión HeLa en medio esencial mínimo (SMEM) complementado con SBF al 10%. El VS (Edmonston B) se propagó en cultivos en suspensión de HeLa como se describe anteriormente (Udem, 1984).

Las transfecciones se realizaron usando el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio (Ausubel y col., 1987; Graham y van der Eb, 1973). Células 293-3-46 ó 293 usadas para la transfección se sembraron sobre placas de 6 pocillos y se cultivaron a aproximadamente el 50-75% de confluencia. Las células se alimentaron 1-3 horas antes de la transfección con 4,5 ml de medio fresco que carecía de G418. Las mezclas de transfección se prepararon combinando los ADN apropiados en un volumen final de 225 µl en agua seguido de la adición de 25 µl de CaCl₂ 2,5 M. La mezcla de ADN-calcio se agitó cuidadosamente con vórtex a la vez que añadieron lentamente 250 µl de 2X solución salina tamponada con HEPES (NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, HEPES 50 mM, pH 7,05). El precipitado se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, luego se añadió a las células. Las células se incubaron durante la noche (14-16 horas), luego se eliminó el medio de transfección y las células se aclararon y se alimentaron con medio fresco que carecía de G418. La infección de células transfectadas se realizó con 5 unidades formadoras de placa (ufp) por célula después de eliminar el medio de transfección. Las infecciones se incubaron 2 horas antes de sustituir el medio. En ese momento, las placas que contenían las células que iban a someterse a choque térmico se envolvieron en parafilm y se transfirieron a un baño de agua a 44°C y se incubaron 3 horas antes de transferirse a una estufa de incubación a 37°C. Las células se recogieron 48 h después de la iniciación de la transfección para el análisis de expresión génica transitoria o se recogieron 72 horas (o como se observa de otro modo en este documento) para los experimentos de rescate. Los ensayos con cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se realizaron como se ha descrito previamente (Sidhu y col., 1995, y Parks y Shenk, 1996).

Las células recogidas para el rescate de virus se sacaron de los pocillos mediante pipeteado repetido del medio sobre la monocapa para desprender las células y romper la monocapa en pequeños grupos. No se usaron agentes de disociación de células. Las células y 5 ml de medio se distribuyeron inmediatamente sobre una monocapa de células Vero próxima a confluyente que crecía en 10 ml de medio sobre una placa de 10 cm. Cuatro a cinco días después, las placas fueron visibles y las monocapas se tiñeron para el recuento de placas o se recogieron para preparar una disolución madre de virus recombinante.

Las transfecciones de ARN se realizaron como se ha descrito anteriormente para ADN con la siguiente modificación. El ARN para la transfección se preparó *in vitro* usando los reactivos de ARN polimerasa T7 en el kit Megascript (Ambion). Los precipitados de ARN-fosfato de calcio se incubaron con células 293 durante 5-6 horas y luego se eliminaron. La transfección y la infección se llevaron a cabo simultáneamente mediante la adición de virus al medio de transfección. Después de sustituir los medios de transfección-infección, muestras de células apropiadas se sometieron a choque térmico a 43-44°C. Las células se recogieron 24-28 horas después de iniciarse la transfección/infección.

ADN recombinante

El plásmido de ADNc del VS de longitud completa (VS p(+)) y el plásmido de expresión del gen L de VS (pEMC-La) fueron generosamente proporcionados por Martin Billeter y Frank Radecke (Radecke y col., 1995). Se ha descrito la preparación del minireplicón de CAT (Sidhu y col., 1995). El plásmido de expresión de hsp70 se clonó amplificando

el ADNc (Hunt y Morimoto, 1985) a partir de ARN extraído de células 293-3-46 sometidas a choque térmico. La reacción de PCR con transcripción inversa (RT/PCR) se realizó con la mezcla de enzimas de alta fidelidad que contenía transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney, ADN polimerasa de Taq y ADN polimerasa de *Pwo* encontrados en los reactivos del kit Titan (Boehringer Mannheim). El ADNc de hsp70 se clonó en el plásmido de expresión pCGN (Tanaka y Herr, 1990) para generar un constructo de expresión que contenía la marca de epítipo de HA de la gripe en la región codificante del extremo amino.

Secuenciación de ADN

La secuencia del VS se determinó secuenciando ADN amplificado por RT/PCR. El ARN de células infectadas por el VS se preparó por el procedimiento de extracción con isotiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi., 1987) y la RT/PCR se realizó usando reactivos en el kit Titan (Boehringer Mannheim). El ADN amplificado se purificó en geles de agarosa de bajo punto de fusión. El fragmento de PCR se secuenció usando reacciones terminadoras con colorante (Applied Biosystems) y se analizaron en un secuenciador automatizado ABI Prism™ (Perkin-Elmer). La confirmación de secuencias de ADN de plásmidos también se realizó con el secuenciador automatizado.

15 Ejemplo 1

Protocolo de rescate de ADNc

Este protocolo se resume en la Figura 1.

El día antes de empezar la transfección, las células 293-3-46 se dividen en placas de seis pocillos usando DMEM complementado con suero bovino fetal al 10% (SBF) y 1,5 mg/ml de antibiótico G418. Una placa de 10 cm confluyente se divide en una placa de seis pocillos si se espera usarla al día siguiente. Se transfectan doce pocillos por experimento de rescate con el fin de aumentar la probabilidad de recuperación del virus recombinante.

Aproximadamente una a tres horas antes de la transfección, el medio se sustituye en cada pocillo con 4,5 ml de DMEM complementado con SBF al 10% (sin G418) y luego se inicia la transfección.

Precipitado de fosfato de calcio:

Se combinan agua y ADN en un volumen de 225 μ l en un tubo de polipropileno de 5 ml estéril. Se usan cinco (5) μ g de VS p(+) y 100 ng del plásmido de expresión L (pEMC-La) por transfección. Se añaden veinticinco (25) μ l de CaCl_2 2,5 M y se mezclan. Se añaden gota a gota doscientos cincuenta (250) μ l de 2X HBS a la vez que se agita cuidadosamente con vórtex el tubo. Después de añadir la HBS, los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos (la HBS es 2X solución salina tamponada con HEPES: NaCl 280 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM, HEPES 50 mM, pH 7,05 (Ausubel y col., 1987). Es útil fijar transfecciones individuales para cada pocillo en vez de hacer una mezcla de transfección madre mayor. El precipitado se añade gota a gota al medio y las células se incuban durante la noche durante aproximadamente 12 a 16 horas.

Entonces, el medio se elimina y se lavan las células. Las células se aclaran dos veces con HEPES/solución salina (NaCl 150 mM, HEPES 50 mM, MgCl_2 1 mM, pH7,2). Antes de incubarse las células se añaden 5 ml de medio (DMEM, SBF al 10%, sin G418).

CHOQUE TÉRMICO: Después de añadir medio fresco como se ha descrito anteriormente, la placa de seis pocillos se sella con parafilm y se transfiere a un recipiente Tupperware con una tapa. El recipiente se sumerge en un baño de agua a 43-44°C y se incuba durante 3 horas. Después de esta etapa de choque térmico, el parafilm se quita de la placa y las células se transfieren a una estufa de incubación a 37°C. Las células se incuban durante un total de aproximadamente 72 horas después del inicio de la transfección.

Después de completarse la incubación se lleva a cabo una etapa de expansión en placa con células Vero. Las células Vero se preparan el día antes de usarse dividiendo una placa de 10 cm en cuatro o cinco placas de 10 cm. Después de la incubación durante la noche, las células son aproximadamente el 75% de confluentes. Se preparan placas suficientes de manera que hay una placa de células Vero por pocillo transfectado. Aproximadamente 72 horas después de iniciarse la transfección, cada pocillo de células 293-3-46 transfectadas se transfiere a una placa de 10 cm que contiene células Vero. Las células 293-3-46 se transfieren mediante pipeteado repetido de 5 ml de medio de cultivo sobre las células para desplazarlas del pocillo y romper la monocapa en pequeños grupos de células. Pipetear cuidadosamente para evitar la lisis de células, pero con suficiente fuerza para desplazar las células. Entonces, los 5 ml de medio de cultivo que contienen la célula transfectada se distribuyen en la placa de 10 cm de células Vero que ya contiene 10 ml de medio de cultivo. Dependiendo del sistema de rescate deberá dejarse suficiente tiempo, aproximadamente 4-5 días, para visualizar las placas. El virus recombinante se recoge raspando las células y recogiénolas por centrifugación. Las células se resuspenden en 1 ml de DMEM libre de suero

(Gibco/BRL) que carece de suero y se congelaron-descongelaron una vez para liberar el virus.

Ejemplo 2

En este ejemplo, el procedimiento de rescate descrito en el Ejemplo 1 se repitió seis veces, junto con un control en el que no se aplicó choque térmico. Los resultados de los seis experimentos de rescate independientes se muestran en la Figura 5. El ADNc del VS usado en todos los experimentos contuvo secuencias de Edmonston B (Radecke y col., 1995). Las transfecciones se realizaron como se ha descrito anteriormente y la incubación de choque térmico fue 3 horas a 44°C. El experimento 1 se puntuó placas más o menos, y en los restantes experimentos se contaron las placas. Los experimentos realizados en este ejemplo revelaron lo siguiente:

Las dos modificaciones de la técnica de rescate convencional (Radecke y col., 1995), una etapa de choque térmico y una etapa de expansión en placa, fueron cada una eficaces en aumentar enormemente el número de cultivos transfectados que produjeron virus recombinante. Antes de emplear estas modificaciones, sólo aproximadamente el 2-3% de los cultivos transfectados produjeron virus recombinante. En el procedimiento anterior, del 50 a aproximadamente el 90% de los cultivos transfectados produjeron virus recombinante.

Ejemplo 3

15 Modificación de la expansión en placa

La etapa de expansión en placa en el protocolo de rescate en el Ejemplo 1 se estableció a partir del siguiente tipo de experimentos que se realizan en ausencia de un tratamiento con choque térmico.

Los experimentos se realizaron sin la etapa de expansión en placa del Ejemplo 2, a la vez que se siguieron los procedimientos explicados resumidamente por Radecke y col. (1995). En estos experimentos, las células transfectadas se transfirieron de un pocillo en una placa de seis pocillos a una placa de 10 cm para permitir 4-5 días de crecimiento celular adicional y tiempo adicional para que se revelaran las placas. No se detectaron placas usando este procedimiento. En el segundo tipo de experimento, las células transfectadas se recogieron mediante raspado y centrifugación y se resuspendieron en medio OPTIMEM libre de suero (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Las células se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación para liberar el virus, y este lisado celular se aplicó a una placa de 10 cm que contenía células Vero que fueron aproximadamente el 75% de confluentes. Cuatro a cinco días después, las células Vero se examinaron para las placas. Aproximadamente el 2-3% de los cultivos fueron positivos para placas del virus del sarampión. Siguiendo el protocolo de expansión en placa explicado resumidamente en el Ejemplo 2 se logró una mejora de 10-20 veces con respecto a la tasa de éxito del 2% exactamente descrita. Parece importante que las células no se sometieran a un ciclo de congelación-descongelación antes de la etapa de expansión en placa, como se muestra en el Ejemplo 2.

Ejemplo 4

El choque térmico aumenta la expresión de minireplicones

Para examinar los posibles mecanismos para los resultados de rescate mejorados después del choque térmico se probó el efecto del choque térmico sobre la expresión génica de un minireplicón del VS (véase la Figura 2 para los resultados). El minireplicón de plásmido (pMV107CAT) se diseñó para dirigir la síntesis mediada por ARN polimerasa T7 de una copia de ARN de sentido negativo del gen CAT flanqueado por extremos del VS (Sidhu y col., 1995). Este plásmido se usó para transfectar células 293-3-46 para la síntesis intracelular de ARN de minireplicón. La replicación y la expresión de ARN de minireplicón en células 293-3-46 se llevó a cabo mediante la complementación con proteínas del VS proporcionadas por infección, o complementadas con un plásmido de expresión L debido a que las células proporcionan tanto proteínas N como P. Las células 293-3-46 se transfectaron durante la noche con ADN de plásmido del minireplicón VS-CAT (1 µg). Algunas transfecciones (carriles 3 y 7) también recibieron el plásmido de la presión del gen L de VS (100 ng) para proporcionar la complementación de L. Aproximadamente 14 horas después de la transfección, el medio se sustituyó y las células se infectaron por el VS durante 2 horas (carriles 4 y 8) con 5 ufp (unidades formadoras de placa) por célula. Después de la infección, el medio se sustituyó y los cultivos celulares apropiados (carriles 5-8) se sometieron a choque térmico a 44°C durante 3 horas. Las células se recogieron 48 horas después de iniciarse la transfección y los ensayos de CAT se realizaron como se describe en los procedimientos anteriores.

Cuando se examina el efecto del choque térmico sobre la expresión del minireplicón, el rescate que emplea el choque térmico produjo un fuerte aumento en la actividad del gen CAT (Figura 2). Los experimentos mostrados en la Figura 2 se realizaron con ADN de minireplicón y se llevan a cabo similarmente a los experimentos de rescate, excepto que las células se recogieron 48 horas después de la transfección. La complementación por virus se realizó infectando células transfectadas con 5 ufp por célula después de eliminar el medio de transfección. La

complementación con un plásmido de expresión L se hizo simplemente mediante cotransfección con el ADN de minireplicón. Los resultados indican que el choque térmico estimula la expresión cuando se usó en cualquier forma de complementación. En múltiples experimentos, la expresión de CAT generada por la complementación con el plásmido de expresión L aumentó 2-10 veces por el choque térmico (véanse los carriles 3 y 7). Similarmente, también se aumentó la actividad de CAT cuando se usó complementación vírica y produjo una potenciación de aproximadamente 5 veces (carriles 4 y 8). Como es de esperar, las transfecciones de control negativo que no recibieron plásmido de CAT (carriles 1 y 5) o una fuente de complementación L (carriles 2 y 6) produjeron niveles muy bajos de actividad de CAT de fondo.

Ejemplo 5

Existió la posibilidad de que el aumento de expresión del minireplicón pudiera relacionarse con un mayor nivel de actividad de polimerasa T7 después del choque térmico. La mayor actividad de la polimerasa T7 podría resultar de un aumento de la expresión del gen en células 293-3-46 después del choque térmico. El gen de polimerasa T7 se expresa a partir del promotor/potenciador temprano inmediato del CMV en células 293-3-46 (Radecke y col., 1995) y se ha mostrado que el promotor/potenciador del CMV responde a choque térmico (Andrews, Newbound y Lairmore, 1997). Para excluir esta posibilidad se transfectaron células con ARN de minireplicón y se sometieron a un tratamiento de choque térmico que se usa en el Ejemplo 4. Además, en este ejemplo, para excluir la posibilidad de que el efecto del choque térmico estuviera relacionado con el aumento de la expresión de los genes del VS presentes en la línea de células 293-3-46, las transfecciones de ARN se realizaron en células 293 (Graham y col., 1977). Las células 293-3-46 no expresan establemente ningún gen del VS. El protocolo de transfección usado en este experimento se modificó para acomodar la transfección de ARN (véase la sección de Procedimientos anterior). Se transfectaron cinco μg de ARN por el procedimiento de fosfato de calcio. La infección por el VS de las células apropiadas se realizó añadiendo virus inmediatamente después de que se añadiera la mezcla de transfección al medio. Después de añadir el precipitado a las células, el VS (5 ufp por célula, carriles 3 y 6 de la Figura 3) se añadió a los medios de cultivo para iniciar la infección inmediatamente para reducir la posibilidad de degradación de ARN intracelular antes de que pudiera encapsidarse en nucleocápsides. Después de una incubación de transfección-infección de 5-6 horas, el medio se sustituyó y las muestras de células apropiadas se sometieron a choque térmico 2 horas a 44°C antes de devolverse a 37°C. Los extractos de células se prepararon 24-28 horas después del inicio de la transfección-infección para los ensayos de CAT.

Los resultados de la transfección de ARN fueron similares a los resultados de la transfección de ADN. El choque térmico aumentó sustancialmente la expresión de CAT en células que se infectaron (Figura 3, véanse los carriles 3 y 6). No se observó actividad de CAT en células que no recibieron ARN de minireplicón (carriles 1 y 4) ni complementación vírica (carriles 2 y 5). Los resultados de la transfección de ARN también excluyen la posibilidad de que el aumento de la actividad de ARN polimerasa T7 fuera responsable del efecto de choque térmico en el experimento de transfección de ADN mostrado en la Fig. 2.

Ejemplo 6

Estimulación de la expresión de minireplicones por hsp70.

Oglesbee y col. han determinado que la isoforma de hsp70 inducible, hsp72, se copurifica con nucleocápsides del VMC y que estas nucleocápsides muestran actividad de transcripción *in vitro* potenciada (Oglesbee, Ringler y Krakowka, 1990; Oglesbee y col., 1996). Para evaluar si la hsp72 participó en el efecto de choque térmico que se observó en los ejemplos anteriores se realizaron experimentos que sustituyeron esencialmente la expresión en exceso del gen de hsp70 por el tratamiento de choque térmico del Ejemplo 1 (los resultados se muestran en la Figura 4). El ADNc de hsp70 inducible (Hunt y Morimoto, 1985, Wu y col., 1985) se clonó a partir de ARN preparado a partir de células sometidas a choque térmico con arreglo al Ejemplo 2. El ADNc se clonó en un vector de expresión de CMV, plásmido pCGN (Tanaka, 1990), junto con una marca de epítipo de gripe. La región codificante del extremo amino del gen de hsp 70 se fusionó a la marca de epítipo HA de gripe (Tanaka y 375-386, 1990) que tenía la secuencia Y P Y D V P DY A. El ADNc de hsp70 se clonó para expresar la proteína hsp70 con un extremo amino que contenía el epítipo HA. El uso de este plásmido permite que se siga la expresión del ADNc de hsp70 usando anticuerpo contra la marca de la gripe incluso en presencia del fondo de isoformas de hsp70 endógenas. Se analizaron extractos de células completas preparados a partir de células transfectadas por transferencia Western (Parks y Shenk, 1996) usando un anticuerpo específico para la marca de epítipo (Figura 4A). Los análisis de Western de extractos de células transfectadas mostraron que el plásmido de expresión (Figura 4A) produce un polipéptido marcado ligeramente más grande de 70 kD.

La cotransfección de células 293-3-46 con el vector de expresión de hsp70 junto con el plásmido de expresión L y ADN de minireplicón produjo un aumento de la expresión de CAT (véase la Figura 4B). En este sistema de ensayo transitorio, la expresión en exceso de hsp70 aumentó el bajo nivel de complementación de L nada menos que 20

veces. Este aumento en la expresión de CAT inducida por el vector de expresión de hsp70 es evidentemente específica debido a que requiere la presencia del plásmido de polimerasa L y no aumenta la actividad de CAT de fondo observada cuando L está ausente o el plásmido de CAT se omite de la transfección. Estos resultados sugieren fuertemente que hsp70 es al menos en parte responsable del efecto de choque térmico en la expresión del minigenoma.

Ejemplo 7

Rescate de choque térmico de expresión de minireplicones en células Vero

Como una continuación del Ejemplo 4, las células 293-3-46 se sustituyeron por células Vero.

Materiales: para los experimentos de transfección de células Vero, las proteínas N, P y L del sarampión se proporcionan mediante ADN de plásmido y la ARN polimerasa T7 se proporciona mediante infección por el VMA/T7 (Wyatt y col.). La transfección incluyó 100 ng de minireplicón, 400 ng del plásmido N, 300 ng del plásmido P y cantidades de plásmido L como se muestra en la Tabla 2 más adelante. Las transfecciones de control negativo carecieron del soporte del plásmido L. Además, las células Vero se transfectaron con LIPOFECTACE (comprado de Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) como reactivo de transfección. Para cada prueba se usan 2 unidades formadoras de placa (UFP) de VMA/T7 (Wyatt y col.) por reacción de transfección. Se probaron dos volúmenes de LIPOFECTACE para determinar la cantidad óptima para la transfección eficiente de células Vero. La transfección se realiza con dos cantidades diferentes de plásmido de expresión de proteínas L. Para el choque térmico, las células se transfieren a un baño de agua a 44°C durante 3 horas. Las células de control no se someten a choque térmico.

VMA/T7: VMA/T7 es un virus híbrido que contiene una copia integrada del gen 1 de T7 bajo la regulación del promotor tardío fuerte 11K (Wyatt y col. 1995).

Plásmidos de expresión:

El plásmido L se proporcionó por Radecke y Billeter. Básicamente, el gen L del sarampión se clonó en el vector de plásmido pEMC (Moss y col., 1990) mediante procedimientos de clonación desvelados por Radecke y col. (1995) para generar el plásmido pEMC-La. Este vector incluye un sitio interno de entrada de ribosomas y una secuencia de poli-A del extremo 3' para facilitar la expresión de genes clonados en células eucariotas. El mismo vector se usa para preparar vectores para cada uno de los genes N y P. Las regiones codificantes de las proteínas N y P se amplificaron por PCR a partir del ADNc genómico del virus del sarampión (Radecke y col., 1995), luego se clonaron entre los sitios NcoI y BamHI del vector pEMC para generar pT7-N y pT7-P.

Protocolo de células Vero para choque térmico:

Para LIPOFECTACE Y EFFECTENE

LIPOFECTACE:

Se cultivan células Vero en placas de cultivo de seis pocillos hasta que son aproximadamente el 50-80% de confluentes. Las células a aproximadamente el 75% de confluencia son deseables debido a que en esta fase todavía se están dividiendo rápidamente y de forma sana, y la mayor densidad celular ayuda a compensar la muerte celular provocada durante la transfección, infección por el VMA/T7 y choque térmico. La mezcla de ADN-lípidos para la transfección se prepara combinando ADN (N, P, L y minireplicón del VS) y 200 µl de DMEM libre de suero en un tubo de microcentrífuga. Se añadió LIPOFECTACE (12 ó 15 µl dependiendo del experimento) a la mezcla de ADN-medio y se mezcló cuidadosamente seguido de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente. Al final de la incubación, la mezcla de ADN-LIPOFECTACE se combina con 800 µl de DMEM libre de suero que contiene la cantidad apropiada de VMA/T7 para dar una cantidad final de aproximadamente 2 UFP por célula. El medio se elimina de los cultivos de células Vero y se sustituye por la mezcla de transfección que contiene ADN, LIPOFECTACE y VMA/T7. Las células se incuban en una unidad de estufa de incubación a 37°C a 5% de CO₂ durante 2-6 horas. Para las células Vero, esta incubación parecer ser óptima a las 2-3 horas. Al final de este periodo de incubación se añade 1 ml de DMEM complementado con suero bovino fetal al 10% a las células y los cultivos celulares apropiados se someten a choque térmico durante 2-3 horas a 44°C (parece que 3 horas es óptimo para las células Vero). Para realizar el choque térmico, la placa de 6 pocillos se transfiere a una bolsa de plástico Ziplock y luego se sumerge en un baño de agua a 44°C. Al final del periodo de choque térmico de 2-3 horas, las células se sacan de la bolsa de plástico y se devuelven a la estufa de incubación a 37°C para la incubación durante la noche. Al día siguiente, el medio se reemplaza por 2 ml de DMEM fresco que contiene suero bovino fetal al 10%. Aproximadamente 48 horas después de la transfección, las células se recogen para preparar el extracto para los ensayos de CAT o las células se recogen y se transfieren a una placa de 10 cm que contiene una monocapa de células Vero para permitir la expansión en placa.

Entonces, las células se analizaron para la actividad de CAT. La actividad de CAT se estimuló aproximadamente 7 veces por choque térmico cuando se usó en las condiciones de 12 µl de LIPOFECTACE y 100 ng de plásmido L. La actividad de CAT se estimuló aproximadamente 2 veces por choque térmico cuando se usó en las condiciones de 15 µl de LIPOFECTACE y 100 ng de plásmido L. Véase la siguiente Tabla 2.

5

Tabla 2

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------|-----|-----|----|-----|-----|----------------------------|-----|-----|----|------|-----|
| Carriles | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| ng de L | 0 | 100 | 200 | 0 | 100 | 200 | 0 | 100 | 200 | 0 | 100 | 200 |
| Actividad relativa | - | 1,0 | 0,2 | - | 4,7 | 0,1 | - | 7,0 | 5,4 | - | 10,3 | 4,1 |
| Lipofectace (µl) | 12 | 12 | 12 | 15 | 15 | 15 | 12 | 12 | 12 | 15 | 15 | 15 |
| Choque térmico | Sin choque térmico | | | | | | Choque térmico durante 3 h | | | | | |

Ejemplo 8

Comparación de los reactivos para facilitar la transfección para el rescate de choque térmico en células Vero

El experimento anterior se repitió usando tanto LIPOFECTACE como EFFECTENE (Qiagen Inc., Valencia, CA).

10 Para EFFECTENE, el protocolo es esencialmente idéntico, excepto para la preparación de la mezcla de ADN-lípido. El ADN se mezcla con 100 µl de solución salina tamponada proporcionada con el reactivo EFFECTENE. Entonces se añaden 8 µl de reactivo de condensación de EFFECTENE y la mezcla se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añaden 25 µl (o la cantidad especificada en la figura) de EFFECTENE y la mezcla se incuba durante 15 minutos adicionales. Después de la incubación de 15 minutos, el complejo de ADN-EFFECTENE

15 se mezcla con 900 µl de medio libre de suero que contiene suficiente VMA/T7 para proporcionar aproximadamente 2 UFP por célula. En esta fase, la aplicación de la mezcla de ADN-VMA/T7 a las células y todas las etapas posteriores son idénticas a las etapas seguidas para LIPOFECTACE.

Los resultados se muestran a continuación en las Tablas 3a y 3b.

20 (Lipo=LIPOFECTACE). La actividad de minireplicones aumentó cuando el choque térmico se realizó 2 horas después de la transfección.

Tabla 3a

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------|-----|-----------|-----|-----|-----|----------------------|-----|-----------|-----|-----|-----|
| Carriles | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Actividad relativa | - | 1,0 | - | 0,2 | 0,9 | 0,2 | - | 7,2 | - | 5,4 | 5,2 | 5,0 |
| Reactivo (µl) | 15 | 15 | 8 | 8 | 25 | 6 | 15 | 15 | 8 | 8 | 25 | 6 |
| Plásmido L | - | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + |
| Reactivo | Lipo | | Effectene | | | | Lipo | | Effectene | | | |
| Tratamiento | Sin choque térmico | | | | | | Choque térmico a 2 h | | | | | |

Tabla 3b

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------|-----|-----------|-----|-----|-----|
| Carriles | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Actividad relativa | | 0,8 | | 0,9 | 0,0 | 0,2 |
| µl de reactivo | 5 | 5 | | | 5 | |
| Reactivo | Lipo | | Effectene | | | |
| Tratamiento | Choque térmico a 6 h | | | | | |

Ejemplo 9Transfección de células Vero con la técnica del tampón modificado

Materiales: BES es {ácido N,N-bis[2-hidroxietil]-2-aminoetanosulfónico}

Transfección de células Vero para el rescate usando el procedimiento de BES/fosfato de calcio

5 Se cultivan células Vero en placas de cultivo de seis pocillos hasta que son aproximadamente el 50-80% de
 confluentes. Las células son aproximadamente el 75% de confluentes debido a que en esta fase todavía se están
 dividiendo rápidamente y de forma sana, y la mayor densidad celular ayuda a compensar la muerte celular
 provocada durante la transfección, infección por el VMA/T7 y choque térmico. El día de la transfección, las células se
 10 alimentan con 4,5 ml de medio por pocillo y se transfieren a una unidad de estufa de incubación a 37°C (o
 temperatura menor si se está rescatando un virus sensible a la temperatura) y 3% de CO₂. El medio rutinariamente
 usado por los inventores es DMEM complementado con suero bovino fetal al 10% (funcionarán otros medios). La
 transfección se inicia aproximadamente dos a cuatro horas después de alimentar las células. Los precipitados de
 ADN-fosfato de calcio para la transfección se preparan en tubos de polipropileno de 5 ml. Los ADN para el rescate,
 15 que incluyen plásmidos de expresión para N, P y L y el minireplicón del VS, se combinan con agua hasta un volumen
 final de 225 µl. A continuación se añaden 25 µl de CaCl₂ 2,5 M y los tubos se mezclan cuidadosamente. Después de
 preparar todas las mezclas de ADN-CaCl₂, los precipitados se preparan añadiendo 250 µl de 2X solución salina
 tamponada con BES (2X BBS: NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, BES 50 mM, pH 6,95-6,98). El 2X BBS se añade
 gota a gota a cada tubo a la vez que se agita cuidadosamente con vórtex continuamente durante la adición de BBS.
 Después de añadir el 2X BBS, los tubos se incuban 20 minutos a temperatura ambiente. Al final de la incubación a
 20 temperatura ambiente, los precipitados de 500 µl se añaden a las células gota a gota y la placa se balancea
 cuidadosamente para asegurar el mezclado de los precipitados con el medio. Después de añadir los precipitados se
 añaden aproximadamente dos unidades formadoras de placa (ufp) de VMA/T7 o VMA/T7-GK16 directamente al
 medio y la placa se balancea para mezclarse cuidadosamente. Si se usa GK16 se añade un inhibidor de la síntesis
 de ADN al medio en esta etapa. Se añade tanto citosina arabinósido (AraC) como hidroxiurea (HU) al medio a 20 µg
 25 por ml o 10 mM, respectivamente. 3 horas después de la transfección, las células se transfieren a una bolsa de
 plástico Ziplock y se sumerge en una unidad de baño de agua a 44°C para el choque térmico. Las células se incuban
 a 44°C durante 2-3 horas (cuanto más prolongadas sean las 3 h parece que funciona mejor), luego se transfieren de
 nuevo a la unidad de estufa de incubación a 3% de CO₂ para la incubación durante la noche. Al día siguiente, el
 medio y los componentes de transfección se eliminan de las células y las células se lavan 2X con solución salina
 30 tamponada con HEPES (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM), luego se añade medio fresco. Se repone
 AraC o HU en cultivos que se infectaron por el VMA/T7-GK16. Las células se incuban un día adicional en una unidad
 de estufa de incubación a los 37°C y 5% de CO₂ convencionales (si está rescatándose un virus sensible a la
 temperatura las células pueden incubarse 2 días a la menor temperatura apropiada después de añadir medio fresco).
 Entonces, las células transfectadas se recogen para una etapa de expansión en placa para el rescate de virus o se
 35 recogen para preparar extractos de células para ensayos de CAT. Las células transfectadas se raspan en el medio y
 se transfieren a tanto una placa de 10 cm como a un matraz T25 que contiene una monocapa confluyente al 50% de
 células Vero (u otro tipo de células permisivas de elección). Las células cocultivadas se incuban a 37°C (o a la
 temperatura apropiada como se observa anteriormente) 4 a seis horas, luego se sustituye el medio. La sustitución
 del medio en esta etapa es esencial cuando las células transfectadas contenían inhibidores de la síntesis de ADN
 40 para evitar la inhibición del crecimiento celular en el cocultivo durante la etapa de expansión en placa.
 Aproximadamente cuatro a cinco días después de iniciarse la etapa de expansión en placa las placas son visibles y
 las células pueden recogerse para generar una reserva de lisado de congelación-descongelación del virus rescatado.
 Los resultados de un ensayo de CAT se muestran en las siguientes Tablas 4a y 4b. El procedimiento de BES/fosfato
 de calcio potenció la actividad.

45

Tabla 4a

| Carriles | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------|---|-----|---|------|---|------|
| Actividad relativa | 0,11 | 1,0 | 0,16 | 1,76 | 0,16 | 2,93 |
| Cantidad de ADN | 100 ng VS-CAT 400 ng de N 300 ng de P 100 ng de L | | 200 ng VS-CAT 800 ng de N 600 ng de P 200 ng de L | | 400 ng VS-CAT 1600 ng de N 1200 ng de P 400 ng de L | |
| Plásmido L | - | + | - | + | - | + |
| Reactivo | LIPOFECTACE | | | | | |
| Tratamiento | Choque térmico | | | | | |

Tabla 4b

| Carriles | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|---|------|---|------|---|------|
| Actividad relativa | 0,22 | 4,50 | 0,18 | 7,24 | 0,28 | 2,50 |
| Cantidad de ADN | 100 ng VS-CAT 400 ng de N 300 ng de P 100 ng de L | | 200 ng VS-CAT 800 ng de N 600 ng de P 200 ng de L | | 400 ng VS-CAT 1600 ng de N 1200 ng de P 400 ng de L | |
| Plásmido L | - | + | - | + | - | + |
| Reactivo | BES/fosfato de calcio | | | | | |
| Tratamiento | Choque térmico | | | | | |

5 Para las técnicas de transfección para lo anterior véanse Chen y col., 1987 y Tognon y col., 1996.

Ejemplo 10

Rescate mejorado basado en el uso de inhibidores de la síntesis de ADN y un virus de la variolovacuna modificado recombinante Ankara (VMA) que sintetiza la ARN polimerasa T7 de bacteriófago bajo el control de un promotor temprano/tardío fuerte

10 Basándose en lo anterior se planteó que inhibiendo específicamente la replicación de ADN vírico del VMA/T7 colaborador los inventores podrían: 1. Bloquear todo el crecimiento de VMA/T7, 2. reducir adicionalmente el ECG en células infectadas y 3. potenciar la eficiencia de rescates genéticos de virus de ARN. Los inhibidores (citosina-beta-D-arabinofuranósido, AraC e/o hidroxiurea) bloquean la síntesis de ADN vírico, y posteriormente la expresión génica intermedia y tardía vírica. Se manipuló un VMA/T7 recombinante (MVGK16) que contenía una única copia del gen 1

15 de T7 bajo el control de la transcripción del promotor del virus de la variolovacuna temprano/tardío fuerte. Los estudios preliminares en los que se usó MVGK16 como virus colaborador para el rescate genético de minigenomas de sarampión y ADNc de sarampión de longitud completa han indicado que el tratamiento de células infectadas por AraC o hidroxiurea produce un potenciamiento del rescate genético del virus heterólogo (datos no mostrados).

Plásmidos y virus. Para este estudio los inventores eligieron el plásmido de expresión/recombinación pSC65 del

virus de la variolovacuna. Este plásmido permite la expresión de genes extraños bajo la regulación de un promotor temprano/tardío vírico genéticamente manipulado; también proporciona un marcador de selección lacZ bajo la regulación del promotor vírico 7.5K. El gen 1 de T7 (Moffatt y col., 1984) se escindió de pT7-neo (proporcionado por Dr. Sally Lee, Wyeth-Lederle Vaccines) como un fragmento BamHI y se subclonó en el sitio BgIII de pSC65 (Chakrabarti y col., 1997) para generar pGK16.2 (Figura 6). Los plásmidos recombinantes se secuenciaron usando la secuenciación del ciclo terminador con colorante y el secuenciador de ADN 377 ABI (Applied Biosystems)

Se infectaron fibroblastos de embrión de pollo (CEF; Spafas) por el VMA a una multiplicidad de infección (MOI) igual a 0,5 unidades formadoras de placa (UFP) por célula y se transfectaron con pGK16.2 usando el reactivo facilitador de la transfección DOTAP (Boehringer Mannheim). La recombinación homóloga con ADN del VMA produce la interrupción del gen tk vírico y la inserción del gen 1 de T7 y lacZ. Los virus recombinantes (MVGK16) se purificaron en placa tres veces consecutivamente sobre células CEF usando un ensayo colorimétrico en placa X-gal. El MVGK16 recombinante fue estable a lo largo de tres rondas consecutivas de purificación en placa y cuatro rondas de amplificación en CEF como fue evidente por la inmunotinción con antisuero policlonal de conejo contra polimerasa T7 y el virus de la variolovacuna (datos no mostrados).

Rescates genéticos. El procedimiento de BES/fosfato de calcio anterior se repitió con el sistema de expresión VMA/GK16 que contenía el promotor temprano/tardío para la transcripción de T7. Las modificaciones para el protocolo de rescate anterior para BES/fosfato de calcio se observan en este documento. Si se usa GK16, un inhibidor de la síntesis de ADN se añade al medio en esta fase. Tanto la citosina arabinósido (AraC) como la hidroxurea (HU) se añade al medio a 20 µg por ml o 10 mM, respectivamente. Las células se incuban durante la noche en una unidad de estufa de incubación al 3% de CO₂. La transfección y el choque térmico se completan siguiendo el protocolo anterior para el ejemplo del BES. Se repone AraC o HU en cultivos que se infectaron por VMA/GK16. Las células se incuban un día adicional en una unidad de estufa de incubación a los 37°C y 5% de CO₂ convencionales (si está rescatándose un virus sensible a la temperatura las células pueden incubarse 2 días a la menor temperatura apropiada después de añadir medio fresco). Entonces, las células transfectadas se recogen para una etapa de expansión en placa. Las células transfectadas se raspan en el medio y se transfieren a tanto una placa de 10 cm como a un matraz T25 que contiene una monocapa confluyente al 50% de células Vero (u otro tipo de células permisivas de elección). Las células cocultivadas se incuban a 37°C (o a la temperatura apropiada) 4 a seis horas, luego se sustituye el medio. Es particularmente importante sustituir el medio en esta fase cuando las células transfectadas contenían inhibidores de la síntesis de ADN. No se desea la inhibición del crecimiento celular en el cultivo durante la etapa de expansión en placa. Aproximadamente cuatro a cinco días después de iniciarse la etapa de expansión en placa las placas deberán ser visibles y las células pueden recogerse para generar una reserva de lisado de congelación-descongelación del virus rescatado.

Experimentos de rescate genético. El protocolo anterior produjo una mejora acorde en el número de pocillos con una indicación positiva de rescate. Véase la Tabla 5 a continuación. Los experimentos se puntúan más (+) o menos (-) después del primer pase de virus recombinante sobre células Vero. Los números de placas en pocillos positivos oscilaron de 1 a 50. Todos los experimentos contuvieron 20 µg/ml de AraC en medio durante la transfección durante la noche y el posterior periodo de incubación de 24 h cuando se usó VMA/T7-GK16. Para el experimento en el día 9, la hidroxurea 10 mM se sustituyó por el inhibidor de la síntesis de ADN AraC.

Tabla 5

| Muestra | Día 1 | Día 9 | Día 10 | Día 16 | Día 23 | Día 30 | Fuente de T7 |
|---------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------------|
| 1 | + | + | - | - | - | + | VMA/T7 |
| 2 | - | + | - | + | + | + | VMA/T7 |
| 3 | + | - | - | - | - | + | VMA/T7 |
| 4 | - | - | - | - | - | + | VMA/T7 |
| 5 | + | + | - | - | - | + | VMA/T7 |
| 6 | - | + | - | - | - | - | VMA/T7 |
| 7 | + | + | + | | + | + | VMAGK16 |
| 8 | + | + | + | + | + | + | VMAGK16 |

(cont.)

| Muestra | Día 1 | Día 9 | Día 10 | Día 16 | Día 23 | Día 30 | Fuente de T7 |
|---------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------------|
| 9 | + | - | + | - | + | - | VMAGK16 |
| 10 | + | + | + | - | + | + | VMAGK16 |
| 11 | + | + | + | + | + | + | VMAGK16 |
| 12 | + | + | - | - | + | + | VMAGK16 |

REFERENCIAS

- 5 Andrews, J. M., Newbound, G. C. y Lairmore, M. D. (1997). Transcriptional modulation of viral reporter gene constructs following induction of the cellular stress response. *Nucleic Acids Research* 25, 1082-1084.
- Antoine, G., Scheiflinger, F., Domer, F. y Falkner, F.G. The complete genomic sequence of the modified vaccinia virus Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*. 244(2):365-96, 1998 May.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Siedman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K., Eds. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. Nueva York: Greene Publishing Associates and Wiley Interscience.
- 10 Baron, M. D. y Barrett, T. (1997). Rescue of rinderpest virus from cloned cDNA. *J. Virol.* 71, 1265-1271.
- Blumberg, M. B., Chan, J. y Udem, S. A. (1991). Function of Paramyxovirus 3' and 5' end sequences. En "The Paramyxoviruses" (D. W. Kingsbury, Ed.), pp. 235-247. Plenum, Nueva York.
- Boyer, J.-C. y Haenni, A.-L. (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* 198, 415-426.
- 15 Bridgen, A. y Elliott, R.M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 15400-15404, 1996.
- Carroll, M.W. y Moss, B. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology*. 238(2):198-211, 1997 Nov.
- 20 Chakrabarti, S., Sister, JR y Moss, B. Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. *BioTechniques* 23:1094-1097, December 1997.
- Chen, C. y H. Okayama. 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.* 7:2745-2752.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* 162, 156-159.
- 25 Collins, P.L., Hill, M.G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R.M. y Murphy, B.R. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 92(25):11563-11567, 1995.
- Craig, E. A. (1985). The heat shock response. *CRC Critical Reviews Biochem.* 18, 239-280.
- 30 Drexler, I., Heller, K., Wahren., B., Erfle, V. y Sutter, G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *Journal of General Virology*. 79 (Pt 2):347-52, 1998 Feb.
- Enami M. y Palase P. (1991). High-efficiency formation of influenza virus transfectants. *J. Virology* 65, 2711-2713.
- 35 Franke, E., Yaun, H. y Luban, J. (1994). Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372, 359-362.
- Friedman, D., Olson, E., Georgopoulos, C., Tilly, K., Herskowitz, I. y Banuett, F. (1984). Interactions of bacteriophage and host macromolecules in the growth of bacteriophage lamda. *Microbiol. Rev.* 48, 299-335.

- Garcin, D., Pelet, T., Calain, P., Sakai, Y., Shioda, T., Roux, L., Curran, J. y Kolakofsky, D. (1995). A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendia paramyxovirus from cDNA; generation of a novel copyback nondefective interfering virus. *EMBO J.* 14, 6087-6094.
- Gething, M.-J. (1996). Molecular chaperones: clasping the prize. *Current Biol* 6(12), 1573-1576.
- 5 Glick, B. S. (1995). Can Hsp70 proteins act as force-generating motors. *Cell* 80, 11-14.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. y Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-72.
- Graham, F. L. y van der Eb, A. J. (1973). A technique for the assay of infectivity of human adenovirus DNA. *Virology* 52, 456-467.
- 10 Gunther, E. y Walter, L. (1994). Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia* 50, 987-1001.
- He, B., Paterson, R. G., Ward, C. D. y Lamb, R. A. (1997). Recovery of infectious SV5 from cloned DNA and expression of a foreign gene. *Virology* 237, 249-260.
- 15 Hoffman, M. A. y Banerjee, A. K. (1997). An infectious clone of human parainfluenza virus type 3. *J. Virol.* 71, 4272-4277.
- Horikami, S. M. y Moyer, S. A. (1991). Synthesis of leader RNA and editing of the P mRNA during transcription by purified measles virus. *J. Virol.* 65, 5342-5347.
- Hu, J., Toft, D. O. y Seeger, C. (1997). Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO J.* 16, 59-68.
- 20 Hunt, C. y Morimoto, R. I. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 6455-6459.
- Kato, A., et al., (1996). *Genes to Cells*, 1, 569-579.
- Lamb, R. A. y Kolakofsky, D. (1996). Paramyxoviridae: the viruses and their replication. Third ed. En "Fields Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, T. O. Monath, J. L. Melnick, B. Roizman y S. E. Straus, Eds.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- 25 Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A. y Rose, J. K. (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 4477-4481.
- Leyrer, S., Neubert, W.J. y Sedlmeier, R. Rapid and efficient recovery of Sendai virus from cDNA: factors influencing recombinant virus rescue. *Journal of Virological Methods.* 75(1):47-58, 1998 Nov.
- 30 Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.
- Lund, P. A. (1995). The roles of molecular chaperones in vivo. *Essays in Biochemistry* 29, 113-123.
- Martin, J. y Hartl, F. U. (1997). Chaperone-assisted protein folding. *Current opinion structural Biol* 7, 41-45.
- Mena et al., *J. Virology*, 70, 5016-5024, 1996.
- 35 Moffatt, B. A., Dunn, J. J. y Studier, F. W. Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Journal of Molecular Biology.* 173 (2): 265-9, 1984 Feb. 25.
- Moss, B., O. Elroy-Stein, T. Mizukami, W. A. Alexander y T. R. Fuerst. 1990. New mammalian expression vectors. *Nature* 348:91-92.
- Moyer, S. A., Baker, S. C. y Horikomi, S. M. (1990). Host cell proteins required for measles virus reproduction. *J. Gen. Virol.* 71, 775-783.
- 40 Oglesbee, M., Ringler, S. y Krakowka, S. (1990). Interaction of canine distemper virus nucleocapsid variants with 70K heat-shock protein. *J. Gen. Virology* 71, 1585-1590.
- Oglesbee, M., Tatalick, L., Rice, J. y Krakowka, S. (1989). Isolation and characterization of canine distemper virus nucleocapsid variants. *J. Gen. Virology* 70, 2409-2419.

- Oglesbee, M. J., Kenney, H., Kenney, T. y Krakowka, S. (1993). Enhanced production of Morbillivirus gene-specific RNAs following induction of the cellular stress response in stable persistent infection. *Virology* 192, 556-567.
- 5 Oglesbee, M. J., Zheng, L., Kenney, H. y Brooks, C. L. (1996). The highly inducible member of the 70 kDa family of heat shock proteins increases canine distemper virus polymerase activity. *J. Gen. Virology* 77, 2125-2135.
- Ogura, H., Sato, H., Kamiya, S. y Nakamura, S. (1990). Temperature elevation enhances cell surface expression of measles fusion protein in infected cells. *J. Gen. Virology* 71, 2475-2478.
- 10 Parks, C. L. y Shenk, T. (1996). The serotonin 1a receptor gene contains a TATA-less promoter that responds to MAZ and Sp1. *J. Biol. Chem.* 271, 4417-4430.
- Pattnaik, A. K., Ball, L. A., LeGrone, A. W. y Wertz, G. W. (1992). Use of T7 phage polymerase and hepatitis delta virus ribozyme sequences for cDNA synthesis and processing. *Cell* 69, 1011-20.
- Pratt, W. B. (1992). Control of steroid receptor function and cytoplasmic-nuclear transport by heat shock proteins. *BioEssays* 14, 841-848.
- 15 Pratt, W. B. y Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock proteins and immunophilin chaperones. *Endocrine reviews* 18, 306-360.
- Radecke, F. y Billeter, M. A. (1997). Reverse genetics meets the nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Rev. Med. Virology* 7, 49-63.
- 20 Radecke, F., Spielhofer, P., Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dotsch, C., Christiansen, G. y Billeter, M. A. (1995). Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J.* 14(23), 5773-5784.
- Robbins, S. J., Bussell, R. H. y Rapp, F. (1980). Isolation and partial characterization of two forms of cytoplasmic nucleocapsids from measles virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 47, 301-310.
- Santoro, M. G. (1996). *Viral Infection. Experientia* 77, 337-357.
- 25 Schneider, H., Spielhofer, P., Kaelin, K., Dotsch, C., Radecke, F., Sutter, G. y Billeter, M.A. Rescue of measles virus using a replication-deficient vaccinia-T7 vector. *Journal of Virological Methods.* 64(1):57-64, 1997 Feb.
- Schnell, M. J., Mebatsion, T. y Conzelmann, K.-K. (1994). Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* 13, 4195-4203.
- 30 Sidhu, M. S., Chan, J., Kaelin, K., Spielhofer, P., Radecke, F., Schnieder, H., Masurekar, M., Dowling, P. C., Billeter, M. A. y Udem, S. A. (1995). Rescue of synthetic measles virus minireplicons: measles genomic termini direct efficient expression and propagation of a reporter gene. *Virology* 208, 800-807.
- Sutter, G. y Moss B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 89(22): 10847-51, 1992 Nov 15.
- Sutter, G., Ohlmann, M. y Erfle, V. Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Letters.* 371(1):9-12, 1995 Aug.
- 35 Tanaka, M. y Herr, W. H. C. (1990). Differential transcriptional activation by oct-1 and oct-2: interdependent activation domains induce oct-2 phosphorylation. *Cell* 60, 375-386.
- Tognon, M., E. M. Cattozzo, S. Bianchi y M. G. Romanelli. 1996. Enhancement of HSV-DNA infectivity, in Vero and RS cells, by a modified calcium-phosphate transfection technique. *Virus Genes* 12:193-197.
- 40 Udem, S. A. (1984). Measles virus: conditions for the propagation and purification of infectious virus in high yield. *J. Virological Methods* 8, 123-136.
- Whelan, S. P. J., Ball, L. A., Barr, J. N. y Wertz, G. T. W. (1995). Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 8388-8392.
- Wu, B., Hunt, C. y Morimoto, R. (1985). Structure and expression of the human gene encoding the major heat shock protein HSP70. *Mol. Cell Biol.* 5, 330-341.
- 45 Wyatt, L.S., Moss, B. y Rozenblatt, S. Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA

polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology*. 210(1):202-5, 1995 Jun.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un virus Mononegavirales recombinante que comprende;
 - 5 a) en al menos una célula huésped, realizar la transfección, en medio, de una composición de rescate que comprende (i) un vector de transcripción que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un genoma o antigenoma de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales y (ii) al menos un vector de expresión que comprende una o más moléculas de ácido nucleico aislada que codifican las proteínas de acción trans necesarias para la encapsidación, la transcripción y la replicación en condiciones suficientes para permitir la coexpresión de dichos vectores y la producción del virus recombinante; y
 - 10 b) calentar la composición de rescate transfectada hasta una temperatura de choque térmico eficaz en condiciones suficientes para aumentar la recuperación del virus recombinante.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende además recoger el virus recombinante.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de choque térmico eficaz es superior a 37°C.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de choque térmico eficaz está en el intervalo de 37°C a aproximadamente 54°C.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de choque térmico eficaz está en el intervalo de 38°C a aproximadamente 49°C.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de choque térmico eficaz está en el intervalo de 39°C a aproximadamente 48°C.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de choque térmico eficaz está en el intervalo de 41°C a aproximadamente 47°C.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células transfectadas se someten a la temperatura de choque térmico eficaz durante aproximadamente 5 a aproximadamente 300 minutos.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células transfectadas se someten a la temperatura de choque térmico eficaz durante aproximadamente 15 a aproximadamente 240 minutos.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células transfectadas se someten a la temperatura de choque térmico eficaz durante aproximadamente 15 a aproximadamente 200 minutos.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que después de la etapa (b) la composición de rescate transfectada se transfiere sobre al menos una capa de células Vero.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la capa de células Vero es una monocapa.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el virus del ARN del orden Mononegavirales es un virus humano, bovino o murino.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un genoma o antigenoma de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales es una quimera de más de una fuente de genoma o antigenoma.
15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un genoma o antigenoma de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales codifica un virus atenuado o una forma infecciosa del virus.
16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un genoma o antigenoma de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales codifica una forma infecciosa del virus.
17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un genoma o antigenoma de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales codifica un virus atenuado.
18. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un genoma o

antigenoma de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado del orden Mononegavirales codifica un virus atenuado infeccioso.

19. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el virus de ARN es un virus de la familia de los *Paramyxoviridae*.
- 5 20. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el virus de ARN es un virus de la familia de los *Rhabdoviridae*.
21. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el virus de ARN es un virus de la familia de los *Filoviridae*.
22. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el virus de ARN es un virus seleccionado del grupo que consiste en VS, VRS, VPH y VPB.
23. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el virus de ARN es un virus VS.
- 10 24. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido codifica genoma o antigenoma de un virus de ARN seleccionado del grupo que consiste en los virus VRS y las proteínas de acción trans necesarias para la encapsidación, la transcripción y la replicación son N, P, L y M2.
25. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido codifica genoma o antigenoma de VS y las proteínas de acción trans necesarias para la encapsidación, la transcripción y la replicación N, P y L.
- 15 26. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido codifica genoma o antigenoma de VPH-3 y las proteínas de acción trans necesarias para la encapsidación, la transcripción y la replicación NP, P y L.
27. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula huésped es una célula procariota.
28. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula huésped es una célula eucariota.
29. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula huésped es una célula de vertebrado.
- 20 30. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula huésped es una *E. coli*.
31. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula huésped se deriva de una célula humana.
32. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula huésped se deriva de una célula embrionaria humana.
33. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula huésped se deriva de una célula de riñón embrionario humano.
- 25 34. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el vector de transcripción comprende además un gen de polimerasa T7.
35. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la composición de rescate comprende además un virus colaborador sin modificar o modificado.
- 30 36. El procedimiento de la reivindicación 35, en el que el virus colaborador proporciona un gen de polimerasa T7 para la transcripción de la secuencia de polinucleótidos que codifica un genoma o antigenoma del virus de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado en el que la composición de rescate comprende además un virus colaborador modificado.
37. El procedimiento de la reivindicación 35, en el que el gen T7 está bajo el control regulador de un promotor tardío o un promotor temprano/tardío.
- 35 38. El procedimiento de la reivindicación 37, en el que el gen T7 está bajo el control regulador de un promotor temprano/tardío.
39. El procedimiento de la reivindicación 34, en el que la transfección se realiza en presencia de un inhibidor de la síntesis de ADN.
40. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula huésped para la transfección es una célula Vero.

FIG. 1

PROTOCOLO DE RESCATE

**Transfectar células 293-3-46 con
plásmido de ADNc genómico del VS y
plásmido de expresión L**

14-16 h

**Sustituir el medio de transfección
Choque térmico 3 h a 44°C**

72 h después de empezar
la transfección

**Transferir células transfectadas de
un pocillo de una placa de seis pocillos
a una monocapa de células Vero
en una placa de 10 cm**

3-5 días después de la
transferencia a la
placa de 10 cm

**Contar las placas
Recoger el virus recombinante**

FIG. 2

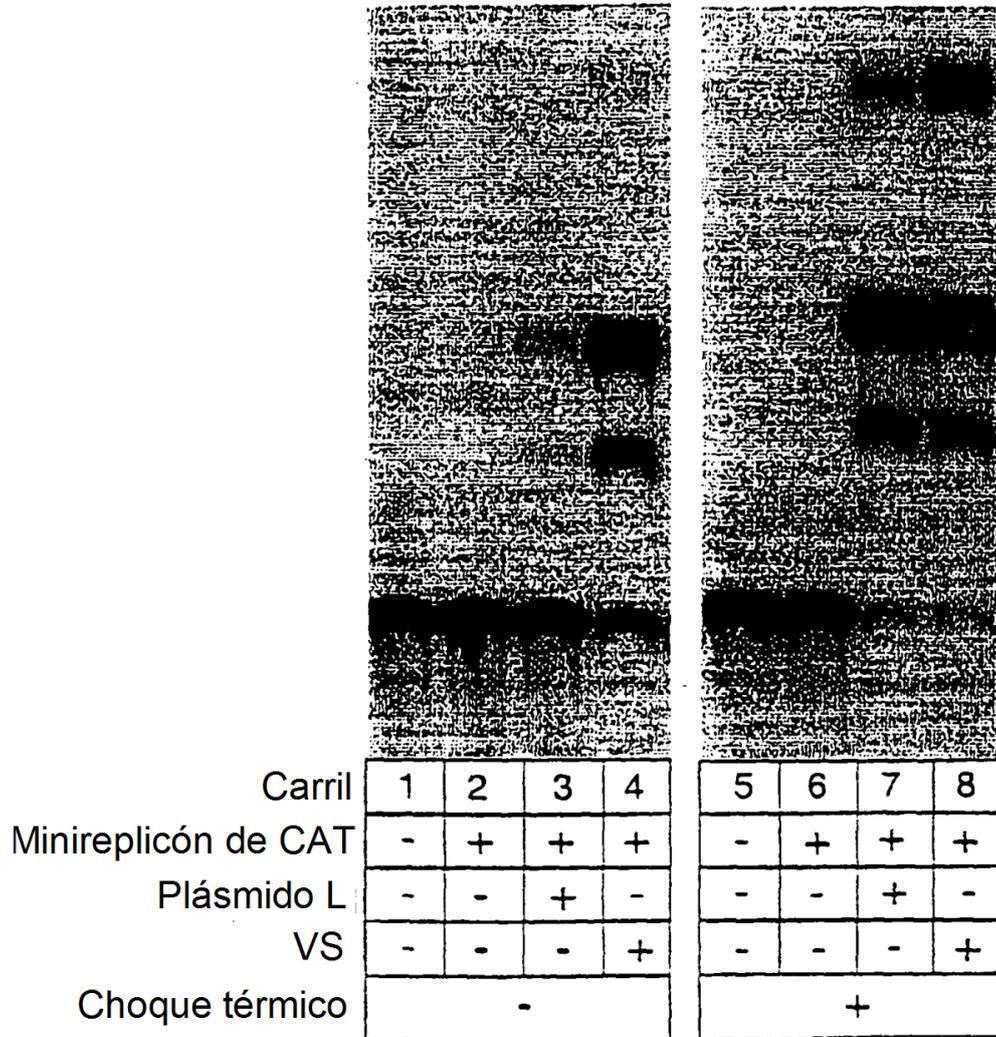
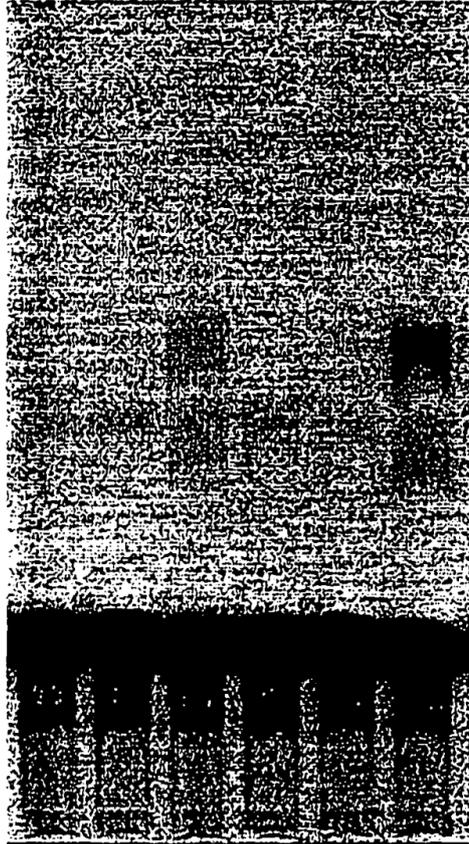


FIG. 3



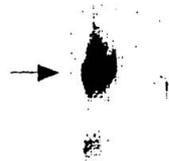
| | | | | | | |
|----------------|---|---|---|---|---|---|
| Muestra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| ARN de CAT | - | + | + | - | + | + |
| VS | - | - | + | - | - | + |
| Choque térmico | - | | | + | | |

FIG. 4

A.

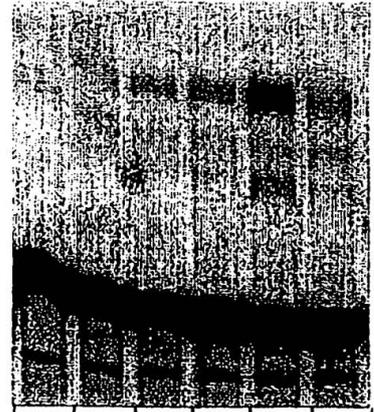


Transferencia Western anti-gripe



Plásmido
CMV-HSP70 + -

B.



| | | | | | | |
|-----------------|-----|---|-----|-----|-----|-----|
| Plásmido L | - | + | + | + | + | + |
| µg de CMV-HSP70 | 5,0 | 0 | 0,6 | 1,2 | 2,5 | 5,0 |

FIG. 5

| Transfección | EXP 1 | EXP 2 | EXP 3 | EXP 4 | EXP 5 | EXP 6 | |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 22 | 14 | 0 | Sin choque térmico |
| 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 5 | |
| 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | 37 | 15 | |
| 4 | 0 | 1 | 0 | 6 | 0 | 49 | |
| 5 | 0 | 50+ | 1 | 9 | 0 | 0 | |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | |
| 7 | | | 0 | 0 | 0 | 50+ | |
| 8 | | | 0 | 7 | 2 | 1 | |
| 9 | | | 0 | 50+ | 1 | 0 | |
| 10 | | | 0 | 1 | 16 | 1 | |
| 11 | | | 1 | 1 | 0 | 0 | |
| 12 | | | 0 | 50+ | 0 | 0 | |
| 13 | + | 50+ | 1 | 50+ | 11 | 50+ | Choque térmico |
| 14 | + | 50+ | 50+ | 50+ | 50+ | 50+ | |
| 15 | + | 50+ | 4 | 50+ | 50+ | 13 | |
| 16 | + | 0 | 4 | 14 | 50+ | 1 | |
| 17 | + | 50+ | 50+ | 29 | 50+ | 0 | |
| 18 | + | 4 | 50+ | 50+ | 18 | 5 | |
| 19 | + | | 1 | 32 | 50+ | 50+ | |
| 20 | + | | 50+ | 50+ | 50+ | 1 | |
| 21 | + | | 3 | 50+ | 50+ | 41 | |
| 22 | + | | 10 | 4 | 50+ | 2 | |
| 23 | + | | 3 | 50+ | 50+ | 50+ | |
| 24 | + | | 8 | 50+ | 50+ | 15 | |

Figura 6

