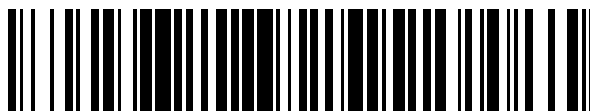


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 000**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04821356 .5**
96 Fecha de presentación: **08.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1737987**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.01.2007**

54 Título: **MÉTODOS PARA DETECTAR POXVIRUS.**

30 Prioridad:
08.12.2003 US 528438 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.08.2012

73 Titular/es:
**LOMA LINDA UNIVERSITY
LOMA LINDA CAMPUS
LOMA LINDA, CA 92350, US**

72 Inventor/es:
**DUERKSEN-HUGHES, Penelope J.;
FILIPPOVA, Maria y
FODOR, Istvan**

74 Agente/Representante:
Urizar Anasagasti, José Antonio

ES 2 386 000 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**ANTECEDENTES**

5 [0001] Se necesitan métodos rápidos y precisos para detectar agentes que podrían ser usados en un ataque bioterrorista, en particular los agentes de "Categoría A". Los agentes de Categoría A, como se definen por los Centros estadounidenses para el Control y Prevención de Enfermedad (CCD) incluyen organismos que representan un riesgo de salud pública porque pueden ser fácilmente diseminados o transmitidos de persona a persona y resultan en elevados índices de mortalidad. La viruela, un agente de Categoría A, es considerado como una amenaza particularmente peligrosa puesto que los índices de mortalidad podrían elevarse hasta un 25% a partir de la exposición al virus de la viruela.

10 [0002] Métodos anteriores para detectar virus como el virus de la viruela implican el proceso lento de cría de partículas de virus viables a partir de una muestra que contiene potencialmente el virus. Métodos más recientes basados en PCR o anticuerpos son potencialmente más veloces y sensibles, y pueden ser incorporados posiblemente dentro de dispositivos portátiles. Sin embargo, es necesario saber lo suficiente sobre el agente vírico de interés para diseñar cebadores adecuados o generar anticuerpos con el fin de usar tales métodos. Esto significa que un agente vírico puede ser creado por ingeniería genética, o puede mutar de modo natural, de modo que su genoma o proteínas no serían detectados por medio de esos métodos. Además, ensayos basados en anticuerpos y PCR no distinguen entre agentes infecciosos, viables y agentes no viables o inactivados.

RESUMEN

15 [0003] La presente invención es solamente definida por las reivindicaciones. Los presentes métodos permiten la detección de poxvirus infecciosos viables en una muestra. Los presentes métodos determinan si un poxvirus está presente en una muestra al contactar la muestra con un primer grupo de células huésped capaces de ser infectadas por poxvirus y transfectando transitoriamente las células huésped con un constructo indicador. El constructo indicador comprende una secuencia indicadora unida operativamente a una secuencia promotora específica de virus que aumenta la transcripción de la secuencia indicadora cuando la célula huésped sea infectada por el poxvirus. El presente método además incluye el paso de determinar un nivel de expresión de la secuencia indicadora en las células huésped, determinando de ese modo si el poxvirus está presente o no en la muestra. La transfección fugaz puede ser llevada a cabo por transducción, electroporación, choque térmico, o lipofección.

20 [0004] Los presentes métodos son particularmente ventajosos para detectar virus de ADN replicante citoplasmático, incluyendo aquellos de la familia Poxviridae tales como la vaccinia y la variola (viruela) en cuyo caso la secuencia promotora puede ser la secuencia de SEC N° ID. 1. Tales virus pueden ser detectados, por ejemplo, en muestras comprendiendo tejido de un sujeto animal humano o no humano, tal como sangre, plasma, fluido fibroespinal, o saliva. De manera alternativa, la muestra puede estar derivada de un sujeto tratado con un constructo vírico terapéutico.

25 [0005] El promotor de virus específico usado en los presentes métodos aumenta la transcripción de la secuencia indicadora en presencia de una pluralidad de virus de ADN, generalmente virus de la misma familia. Esto es ventajoso cuando se realiza un ensayo de control positivo junto con los presentes métodos. El ensayo de control positivo incluye los pasos de transfectar de forma transitoria un segundo grupo de células huésped con el constructo indicador, infectar el segundo grupo de células huésped con un segundo virus de ADN, y entonces determinar un nivel de expresión de la secuencia indicadora en el segundo grupo de células huésped, de ese modo determinando que puede ser detectada la presencia del virus de ADN de interés en la muestra.

30 [0006] En una realización, los presentes métodos determinan si un poxvirus está presente en una muestra o no. En esta realización, células huésped capaces de ser infectadas por un poxvirus son contactadas con una muestra transflectada de forma transitoria con un constructo indicador. El constructo indicador comprende una secuencia indicadora operativamente unida a una secuencia promotora específica de poxvirus. El nivel de expresión de la secuencia indicadora en las células

huésped es determinada entonces, de ese modo determinando si el poxvirus esta presente en la muestra o no. La secuencia indicadora usada en esta realización puede ser, por ejemplo, cualquiera de la SEC ID N° 1. ID, SEC ID N°2, SEC ID N° 3, o SEC ID N° 4. Esta realización puede además comprender el paso de comparar el nivel de expresión de la secuencia indicadora a una curva de calibración con el fin de determinar cuantitativamente la cantidad de poxvirus en una muestra, donde los puntos de datos sobre la curva de calibración están determinados contactando muestras teniendo un título conocido de poxvirus con grupos respectivos de células huésped capaces de ser infectadas por el poxvirus, transfectando de forma transitoria las células huésped con un constructo indicador comprendiendo una secuencia indicadora operativamente unida a una secuencia promotora específica de poxvirus, y determinando un nivel de expresión de la secuencia indicadora en cada uno de los grupos de las células huésped.

DIBUJOS

[0007] Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor a la vista de la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas, y figuras anexas donde:

15 La Figura 1 es un gráfico describiendo los resultados de un experimento en que diferentes títulos de virus de vaccinia fueron detectados empleando el presente método.

[0008] Todas las dimensiones especificadas en esta revelación son a modo de ejemplo únicamente y no tienen intención de ser limitativas. Además, las proporciones mostradas en estas figuras no están necesariamente a escala. Como será entendido por aquellos con conocimiento en la materia con referencia a esta revelación, las dimensiones reales de cualquier dispositivo o parte de un dispositivo revelado en esta revelación será determinado por su uso pretendido.

DESCRIPCIÓN

Definiciones

[0009] Tal como se usan aquí, los siguientes términos tienen los significados dados abajo, a menos que se tenga intención clara de darles un significado distinto por el contexto en que tal termino es usado.

[0010] "Virus de ADN citoplasmático-replicante" se refiere a un virus que almacena información genética al menos de manera parcial en ácido desoxirribonucleico (ADN) y que transcribe tal información genética fuera del núcleo de una célula huésped que lo infecta, por ejemplo, en el citoplasma de una célula huésped. Virus de ADN citoplasmático replicante incluyen virus de la familia Poxviridae.

[0011] " Promotor E/L " se refiere a un promotor de poxvirus temprano-tardío sintético descrito en Chakrabarti, S., Sisler, J. R., y Moss, B., "Promotor temprano/tardío de virus de vaccinia, sintético, compacto para la expresión de proteína," BioTechniques, 23:1094-1097 (1997) y teniendo la secuencia AAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTTTTTGGGAATATAAATA (SEC ID N° 1).

[0012] "Expresión" de una secuencia nucleótida se refiere a la transcripción de la secuencia y su subsecuente traducción en un polipéptido.

[0013] "Nivel de expresión," con referencia a una secuencia indicadora (como se define abajo) se refiere a la abundancia de la secuencia indicadora. La abundancia de un indicador correspondiente a la secuencia indicadora es detectada normalmente en los presentes métodos como un proxy para el nivel de expresión de la secuencia indicadora, y determinar el nivel de expresión de una secuencia indicadora puede comprender determinar la abundancia del indicador correspondiente en una célula huésped o grupo de células huésped.

[0014] Un "vector de expresión" es un constructo de ácido nucleico generado de forma recombinante o sintética comprendiendo ADN u otros ácidos nucleicos capaces de ser reconocidos y transcritos por factores de transcripción viral y celular en una célula huésped, en particular los factores de transcripción de un virus para ser detectado por los presentes métodos. El vector de expresión puede ser, por ejemplo, parte de un plásmido o virus.

[0015] "Célula huésped" se refiere a una célula eucariota capaz de ser infectada con un virus en un ensayo de acuerdo a los presentes métodos.

[0016] "Secuencia nucleótida" se refiere a una cadena de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, por ejemplo. oligonucleótidos o polinucleotidos, en forma de cadena sencilla o doble.

[0017] El término "operativamente ligado" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos funcionalmente relacionadas. Cuando un promotor controla y/o mejora la transcripción de una secuencia nucleótida, se dice que está operativamente ligado a la secuencia nucleótida.

5 **[0018]** "Promotor" se refiere a una secuencia o secuencias nucleótidas, normalmente comprendiendo un sitio ligante de factor de transcripción que dirige y/o mejora la transcripción de otra secuencia nucleótida.

[0019] "Secuencia indicadora" se refiere a una secuencia nucleótida que puede ser transcrita y detectada, o cuyo producto de traducción polipéptida puede ser detectado, tal como por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, luminiscentes, o químicos.
10 "Constructo indicador" se refiere un vector de expresión comprendiendo una secuencia indicadora operativamente ligada a un promotor. "Indicador" se refiere a un producto de traducción polipéptida de una secuencia indicadora.

[0020] "Transfección" se refiere a un proceso por el que secuencias nucleótidas exógenas, típicamente ADN, entran en una célula huésped receptora. Para propósitos de los presentes métodos, la transfección incluye procesos en los que secuencias nucleótidas son físicamente o químicamente transferidas dentro de una célula, tal como a través de electroporación o lipofección, así como los procesos mediados víricamente, por ejemplo transducción. "Transfección transitoria" se refiere a métodos de transfección en que el ADN exógeno no es establemente incorporado dentro del ADN cromosomal de las células huésped receptoras y funciona durante un tiempo limitado. El ADN transitoriamente transfectado se localiza en general predominantemente dentro del citoplasma de las células.

[0021] "Promotor específico de virus" se refiere a un promotor que dirige y/o aumenta la transcripción de otra secuencia nucleótida únicamente en presencia de factores de transcripción u otras proteínas codificadas por un virus particular o por un número limitado de virus de un género o familia.

[0022] Como aquí es usado, el término "comprenden" y las variaciones del término, tal como "comprendiendo" y "comprende," no pretenden excluir otros aditivos, componentes, números enteros o pasos.

Métodos

30 **[0023]** Los presentes métodos son ensayos basadas en células que permiten la detección de virus de ADN, en particular virus de ADN citoplasmático replicante. Ensayos basadas en células de la técnica anterior para detectar virus de ADN involucraron la creación de células que eran transfectadas establemente con una secuencia indicadora bajo el control de un promotor específico de este virus, de manera que el promotor y las secuencias indicadoras eran incorporadas dentro de un ADN cromosomal de células huésped. Este enfoque adolece de la
35 tendencia de las secuencias indicadoras en el núcleo de tales células transfectadas establemente a ser silenciadas a lo largo del tiempo, de tal modo que no sean nunca más transcritas en la presencia de los factores de transcripción apropiados.

[0024] En los presentes métodos, las células huésped son transitoriamente transfectadas con un constructo indicador, de tal modo que hay poca oportunidad de que ocurra el silenciamiento del gen. Muchas más copias de una secuencia indicadora pueden ser también ubicadas dentro de una célula usando transfección transitoria, de este modo incrementando la sensibilidad de los presentes métodos. Con respecto a los virus de ADN citoplasmáticos replicantes, la transfección transitoria tiene la ventaja adicional de localizar constructos indicadores predominantemente en el
45 sitio de la transcripción génica viral, por ejemplo, en el citoplasma de la célula huésped, que incrementa más la sensibilidad del presente ensayo.

[0025] Para detectar la presencia de virus viables infecciosos de ADN, de acuerdo a los presentes métodos las células huésped son colocadas en contacto con una muestra. La muestra puede ser cualquier muestra sospechosa de contener un virus de interés. En una realización, la muestra comprende tejido o fluido (tal como sangre, plasma, fluido cerebroespinal o saliva) derivado de un sujeto humano o animal. La muestra puede también ser derivada de una fuente inanimada, tal como una muestra de partícula líquida o sólida recogida del medio, por ejemplo de la superficie de un objeto. La muestra debería estar en una condición que no interfiera sustancialmente con el

crecimiento o metabolismo de las células huésped, sin embargo. Por ejemplo, debería estar a una temperatura propiciadora de viabilidad y crecimiento celular, y no debería comprender sustancias que maten células huésped o inhiban los mecanismos celulares necesitados por un virus de interés para replicarse en las células huésped.

5 **[0026]** Además de contactar un grupo de células huésped con una muestra, grupos adicionales de células huésped son preferiblemente expuestos a otras condiciones con el fin de conducir ensayos positivos y negativos de control. Con el fin de verificar que la sustancia portadora usada para recoger la muestra y/o el medio de crecimiento usado para cultivar las células huésped no contiene un virus de interés, un ensayo de control negativo es efectuado. En el ensayo de control negativo,
10 un grupo de células huésped es contactado con el portador y/o el medio de crecimiento en lugar de con la muestra, y entonces se lleva a cabo un ensayo como aquí se describe.

[0027] Un ensayo de control positivo, usando las células huésped expuestas a una solución conocida por contener una cantidad específica de un virus apropiado, es también preferiblemente realizada en los presentes métodos. El virus usado como un control positivo puede ser el mismo
15 virus que el virus de interés a detectar, o puede ser otro virus capaz de efectuar la transcripción de una secuencia indicadora que es transitoriamente transfectada dentro de las células huésped. En una realización preferente, el virus usado en el ensayo de control positivo es un virus diferente que es menos infeccioso para humanos y/o es menos virulento que el virus a ser detectado en los presentes métodos. Más comúnmente, el virus usado en el ensayo de control positivo es del
20 mismo género o familia que el virus a ser detectado. Por ejemplo, el virus de vaccinia puede ser usado como un control positivo para un ensayo de viruela como se describe aquí, en tanto en cuanto el promotor en el constructo indicador permita la expresión tanto de la viruela como de los factores de transcripción de vaccinia. Si el virus a ser detectado es altamente infeccioso y/o virulento, tal como el virus de viruela, el uso de virus menos infecciosos o virulentos en el ensayo
25 de control positivo tiene la ventaja de reducir el riesgo para los técnicos que llevan a cabo el presente ensayo.

[0028] Las células huésped deberían ser capaces de ser infectadas por el virus de interés así como por un virus usado como un control positivo, si un virus diferente es usado para el ensayo de control positivo. Las células huésped deberían también tener la capacidad de expresar la
30 secuencia indicadora y/o el indicador a niveles fácilmente detectables cuando se infecten por el virus de interés. Preferentemente, son usadas células huésped tales que sean significativamente confluyentes, tal como 50%- 70% confluyentes, al tiempo del ensayo. Una mayoría de células huésped están también preferiblemente en fase registro cuando se exponen a la muestra a ser ensayada, por ejemplo están creciendo a una velocidad relativamente constante y generalmente
35 exponencial.. Dependiendo del método de análisis a utilizar, las células huésped pueden ser colocadas sobre cubre objetos de cristal o pueden ser directamente colocadas en pocillos de plástico por comodidad.

[0029] Usando el criterio anterior, un experto en la materia puede elegir una célula huésped apropiada para usar en los presentes métodos. Para detectar virus de ADN capaces de infectar
40 humanos, se prefieren líneas celulares de humanos u otros mamíferos. Por ejemplo, las células huésped pueden ser células U2OS, derivadas de células de osteosarcoma humano, células de riñón de mono CV-1, células (CHO) de ovario de hamster chino, o células (BHK) de riñón de bebé de hamster.

[0030] Las células huésped son preferiblemente transfectadas transitoriamente con un constructo
45 indicador en los presentes métodos tras un tiempo apropiado seguido de la exposición de las células huésped a una muestra, por ejemplo tiempo suficiente para permitir que ocurra la infección de las células huésped. Cuando se ensaya la presencia de poxvirus, entre aproximadamente 30 y 60 minutos es generalmente un periodo de tiempo suficiente. Se prefiere la transfección de células huésped después del contacto con una muestra (y cualquier virus contenido aquí), ya que se cree
50 que la infección viral de tales células facilita la transferencia del constructo indicador dentro de las células.

[0031] Las células huésped pueden ser transfectadas alternativamente justo antes de contactar con una muestra. En esta realización, células huésped transfectadas son colocadas

preferiblemente en contacto con una muestra tan pronto después de la transfección como sea practicable, generalmente dentro de alrededor de una semana y/o dentro de alrededor de 10-15 divisiones de célula. Preferentemente, las células huésped transfectadas son expuestas a una muestra dentro de 96 horas post-transfección y/o dentro de 4-8 división de células. Cuando un vector viral es usado para trasfectar las células huésped, el vector viral puede ser contactado con las células huésped al mismo tiempo que una muestra es colocada en tal contacto.

[0032] La transfección transitoria puede ser realizada de cualquier manera conocida en la técnica, incluyendo la infección con un vector viral, electroporación, choque térmico, y lipofección. En una realización, el método de transfección usado es lipofección, que puede ser realizado por ejemplo con el Reactivo de Transfección FuGENE 6 (disponible de Roche Diagnostics Corporation, Roche Applied Science, P.O. Box 50414, 9115 Hague Road, Indianapolis, IN). En otra realización, el ensayo es realizado como un modelo co-infección, por inserción del constructo indicador dentro de un vector viral, tal como un constructo de adenovirus o retrovirus. Una ventaja del enfoque basado en adenovirus es que pueden transportarse altos niveles de la secuencia indicadora dentro del citoplasma de una célula huésped, incrementando la sensibilidad del ensayo. Transfección transitoria puede ser también llevada a cabo por medio del uso de un cañón de genes, tal como el Helios gene Gun System (disponible de Bio-Rad Laboratories, Hercules, California), que bombardea células con partículas (típicamente partículas de oro) cubiertas con ácidos nucleicos.

[0033] Además de transfectar un constructo indicador, vectores de expresión comprendiendo controles positivos y negativos son también preferiblemente transfectados en grupos de células huésped que han sido colocadas en contacto con la muestra de interés. Un vector de expresión sirviendo como un control negativo puede comprender, por ejemplo, la secuencia indicadora usado en el constructo indicador que no está operativamente unido a un promotor. Un control positivo puede comprender por ejemplo, la secuencia indicadora operativamente ligada a un promotor constitutivo fuerte en las células huésped, tal como un promotor CMV.

[0034] El promotor usado en el constructo indicador en los presentes métodos es específico del virus de interés o de un grupo limitado de virus del mismo género o familia, de tal modo que el indicador será expresado en la presencia de tal/es virus. El promotor puede también ser específico de una etapa del ciclo de vida de un virus o de la expresión de un gen viral particular. En una realización preferente, se usa un promotor que es activo en diferentes etapas del ciclo de vida de un virus, para incrementar el nivel de expresión de una secuencia indicadora y por ello la sensibilidad del ensayo.

[0035] Indicadores usados en el ensayo son fracciones detectables conocidas por los entendidos en la materia. Ejemplos de indicadores incluyen Proteína Fluorescente Verde (PFV), luciferasa, beta-galactosidasa, y fosfatasa alcalina segregada (FASE). En una realización preferente, el gen indicador es Proteína Fluorescente Verde Mejorada (PFVA), que es una versión de (PFV) que ha sido optimizada para fluorescencia más brillante y expresión más alta en células mamíferas. En realizaciones del presente ensayo usadas para medir cuantitativamente la presencia de un virus de ADN en una muestra, el indicador es preferiblemente luciferasa.

[0036] El método de medir un indicador depende del indicador usado, como será entendido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la expresión de PFVA puede ser medida por microscopio de fluorescencia invertida, usando un instrumento tal como un microscopio estéreo de fluorescencia Leica (disponible de Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con un suministro de energía de lámpara de mercurio de 100 w conectado a un cámara DCA. En este caso, preferiblemente se toman medidas aproximadamente veinticuatro horas después de la transfección transitoria de la secuencia PFVA a las células huésped que contactan con una muestra. La fluorescencia emitida desde células en una placa de 96 pocillos puede ser también medida con un fluorimetro de microplaca (tal como el Lector de Microplaca Fluorescente FL600 disponible de Bio-Tek Instruments, Inc., Highland Park, P.O. Box 998, Winooski, Vermont). Cuando el indicador es detectable por fluorescencia, el nivel de expresión del indicador puede ser expresado como (magnitud de señales fluorescentes de ensayo)/ (magnitud de señales fluorescentes de referencia), donde las señales de referencia puede, por ejemplo, estar derivadas de un ensayo de control negativo o un número de ensayos de control negativo agregados.

[0037] En otra realización, la medida del indicador puede ser realizada usando citometria de flujo, usando un instrumento tal como el Sistema BD FACSCaliber (disponible de BD Biosciences, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, New Jersey). En otra realización, tal como cuando el indicador es EGFP, la medida puede ser realizada por muestra ELISA o inmunoblotting, usando cualquiera de un número de anticuerpos disponibles comercialmente específicos para PFVA.

[0038] Después del contacto de muestra y la transfección, se mide la expresión de la secuencia indicadora. Después de medir la abundancia de la secuencia indicadora o el indicador, las medidas son analizadas para determinar si el virus de interés esta presente en la muestra o no. El análisis puede incluir crear controles usando muestras apropiadas de la población general (si la muestra es una muestra de tejido), incluyendo controles positivos conocidos por contener el virus de interés y controles negativos conocidos por no obtener el virus, y usando medidas tomadas de aquellas muestras para calcular o estimar un número de parámetros en la muestra, tal como la presencia de virus y título. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del ensayo son preferentemente calculados. Estos análisis estadísticos permiten el desarrollo del criterio para determinar si una medida particular de la expresión de secuencia indicadora es probable que indique la presencia de un virus de interés en una muestra o no.

[0039] En una realización, la determinación de si una medida particular de la expresión de secuencia indicadora indica o no la presencia de un virus de interés en una muestra se hace comparando el nivel de expresión de la secuencia indicadora con una curva de calibración. Los puntos de datos sobre la curva de calibración pueden estar determinados contactando en primer lugar muestras teniendo un conocido titulo del virus de interés con células huésped capaces de ser infectadas por el virus, transfectando transitoriamente las células huésped con un constructo indicador como aquí se ha descrito, y entonces determinando el nivel de expresión de la secuencia indicadora en las células huésped.

[0040] Los resultados de los presentes métodos están disponibles generalmente dentro de una cuestión de horas a días y son generalmente más veloces que los métodos basados en el cultivo, lo cual es importante cuando se trate con un brote de un agente contagioso tal como la viruela. Además, los presentes métodos pueden distinguir entre la presencia de agentes infecciosos viables y no viables o materia inactivada. Adicionalmente, los presentes métodos son menos susceptibles de resultados negativos falsos debido a la ingeniería genética o mutaciones comparados con anticuerpos o métodos basados en PCR. Ya que los métodos de la presente invención están basados en células, son adecuados para usar en hospitales u otras instalaciones con capacidades de laboratorio. Adicionalmente, los presentes métodos pueden ser fácilmente automatizados usando un equipo robótico disponible para el análisis de alto flujo, como será entendido por los expertos en la técnica.

[0041] Los presentes métodos pueden, además de detectar contagios virales, ser usados para monitorizar sujetos humanos o no humanos tratados con un constructo viral terapéutico basado en un virus de ADN que es administrado en el curso de un régimen de terapia génica. La muestra en este caso comprendería tejido de tal sujeto, y el ensayo sería usado para detectar la presencia de partículas de virus infeccioso en la muestra.

Promotores

[0042] Promotores de virus de ADN conocidos en la técnica pueden ser usados en los métodos presentes. Cuando la presencia de un virus particular va a ser ensayada, un promotor que es específico de ese virus, o que es específico de un número limitado de virus de un género en particular o familia, es elegido para uso. Se prefiere que los promotores virales no tengan homología significativa con promotores en el núcleo de células huésped, con el fin de minimizar la expresión de fondo y disminuir la incidencia de positivos falsos.

[0043] Los presentes métodos son particularmente ventajosos para la detección de poxvirus. Los poxvirus cortan la transcripción de genes celulares para maximizar la producción de sus propias proteínas, y como resultado, la transcripción de genes virales y traslación de proteínas de virus es mucho más elevada (hasta y más allá de 1000-veces) que las de la célula huésped. Cuando el virus a ser detectado es viruela, promotores de viruela o vaccinia son preferiblemente seleccionados. El virus de viruela tiene 3 clases de promotores, que son activos, respectivamente,

en las etapas temprana, intermedia y tardía de replicación. Una comparación de las secuencias de esas 3 clases de promotores de virus de viruela es mostrada abajo en la Tabla 1 (con nucleotidos no críticos diseñados con una "N").

5

Tabla 1

	Núcleo	Iniciador
Temprana	AAAANTGAAANNNTA (SEC ID N° 2) o AAAANTNGAAANNNTA (SEC ID N° 3)	A/G
Intermedia	TNNNTTNAANNAA (SEC ID N° 4)	TAAA (SEC ID N° 5)
Tardía	A/T-rich	TAAATG/A (SEC ID N° 6)

10 **[0044]** Los presentes métodos pueden hacer uso de promotores que ocurren de manera natural, tal como los mostrados en la Tabla 1, o alternatively pueden hacer uso de un promotor sintético específico de poxvirus para controlar la expresión de un gen indicador. Un promotor sintético que contiene elementos de tanto los promotores tempranos y tardíos, el promotor T/T, responde a los poxvirus (incluyendo vaccinia y variola) en diferentes etapas del ciclo de vida viral. El uso de tales promotores incrementa la sensibilidad del presente ensayo y detecta poxvirus a lo largo de todo su ciclo de vida. Este promotor no tiene homología significativa con promotores en células huésped mamíferas. El uso de un promotor como el promotor T/T que está activo con tanto virus de viruela como vaccinia tiene la ventaja adicional de permitir el uso de un virus de vaccinia en el ensayo de control positiva en lugar del virus de viruela.

15 **[0045]** Fick et al (1999) Arch. Virol. 144: 1229-1239 informa la identificación y la caracterización de un elemento promotor bidireccional tardío/temprano de virus de dermatitis nodular contagiosa.

20 **[0046]** Srinivasan et al (2003) Avian Diseases 47: 286-295 investiga la modulación de expresión de gen por medio de seis promotores tardíos de poxvirus aviar (VSF)

[0047] Macaulay and McFadden (1989) Virology 172: 237-246 informa la caracterización de un promotor temprano de Virus de Fibroma Shope.

Ejemplo 1: Ensayo de poxvirus con Células U2OS

25 **[0048]** Un ensayo fue realizado para detectar la presencia de poxvirus en una muestra. El constructo indicador fue creado usando un plásmido sin promotor codificando para EGFP, pEGFP1, obtenido de Clontech (1020 East Meadow Circle, Palo Alto, California). El promotor T/T fue insertado corriente arriba de la secuencia EGFP en el sitio clonante múltiple del plásmido. Este plásmido fue designado pEGFP-1 E/L.

30 **[0049]** Un segundo vector de expresión fue construido del mismo plásmido, pEGFP1, para servir como un control positivo. Un promotor constitutivo fuerte CMV fue insertado dentro del sitio clonante múltiple en lugar del promotor T/T. Este vector fue designado pEGFP-1 CMV. Los clones candidatos fueron identificados usando digestiones de restricción de endonucleasa con enzimas esperados para cortar en sitios de inserción, y la identificación de los productos deseados fue confirmada por secuenciación.

35 **[0050]** Una línea de células U2OS, obtenible del American Type Culture Collection (HTB-96), fue seleccionada como la línea celular huésped. Esas células fueron 50%- 70% confluentes al tiempo del ensayo. Las células U2OS fueron colocadas en pacas un día antes del ensayo sobre cubre objetos de cristal en pocillos individuales de una placa de 6 pocillos, a una densidad de 2.5×10^5 células por pocillo.

40

[0051] Mientras en crecimiento de etapa log, células fueron expuestas bien a medios (McCoy's 5a provisto de medio con 1.5 mL-glutamina, 90%; más serum bovino fetal, 10%) solos como control negativo o a soluciones conteniendo la cepa Lister de virus de vaccinia. Las células fueron sembradas con virus con un MOI de 1 (es decir, un virus por célula). 30 minutos después de la infección inicial, las células fueron entonces transfeccionadas transitoriamente usando el Reactivo de Transfección FuGENE 6. Los vectores de expresión transfectados fueron o bien p PFVA -1 (como control negativo), p PFVA -1 CMV (como control positivo) o p PFVA -1 T/T (el vector experimental).

[0052] A continuación, el virus de vaccinia infeccioso fue detectado al medir la expresión del indicador, PFVA, por microscopio de fluorescencia invertida, usando un microscopio estereó de fluorescencia Leica equipado con un suministro de energía con lámpara de 100W de mercurio que está conectada a una cámara DCA. Fue detectada fluorescencia veinticuatro horas después de la transfección transitoria del gen indicador dentro de células huésped. Las células transfectadas con un plásmido codificando para PFVA bajo el control del promotor T/T mostraron fluorescencia fuerte en la presencia de virus de vaccinia, como hicieron los transfectados con un plásmido codificando para PFVA bajo el control del promotor CMV en la ausencia de virus de vaccinia. Únicamente fluorescencia débil fue detectada en los pocillos sobrantes.

Ejemplo 2: Ensayo de poxvirus usando Titulos Virales Diferentes

[0053] Células de riñón de mono CV-1 fueron colocadas en placas en una placa de microtitulación de 6 pocillos, y al siguiente día fueron infectadas con virus de vaccinia (cepa Lister) con 10 unidades de formación de placa (UFP) por pocillo o 100 UFP por pocillo, seguido por la transfección con un plásmido llevando el gen PFV bajo el control del promotor T/T. La transfección fue llevada a cabo usando un reactivo de transfección basada en lipidos, Reactivo de Transfección GENEPORTER (disponible de Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA, USA). Células de control negativo fueron transfectadas con el plásmido, pero no infectadas con virus de vaccinia.

[0054] Fueron visualizadas las células usando un microscopio de fluorescencia 100TV Axiovert Carl Zeiss. Células no fluorescentes fueron detectadas en pocillos de control negativo. Sin embargo, células fluorescentes fueron detectadas en el día 1 en pocillos inoculados con o bien 10 o 100 PFU, y el número de células fluorescente aumentó significativamente en ambos casos el día 2.

Ejemplo 3: Ensayo Cuantitativo de Poxvirus

[0055] Células CV-1 fueron sembradas dentro de placas de microtitulo de 96 pocillos y luego infectadas con dosis de virus de vaccinia comprendiendo 5, 10, 20, 40, y 80 PFU por pocillo. Las células fueron entonces transfectadas con un plásmido llevando el gen luciferasa operativamente vinculado al promotor T/T. En el día 2 de post-infección, las células fueron lisadas y la bioluminiscencia de los extractos fue medida en cada pocillo con un luminómetro (detectando la intensidad de luz) en la presencia de un sustrato de luciferasa.

[0056] Los resultados son mostrados en la Figura 1. Todos los pocillos de control conteniendo células CV-1 o bien infectadas con el virus, o transfectadas con el plásmido (pero no ambos), emitieron luz a o bajo 0.015 ULR (Unidades de Luz Relativa). Titulos crecientes de virus en pocillos de no-control correspondieron a lecturas de ULR más elevadas.

[0057] Aunque la presente invención ha sido discutido en considerable detalle con referencia a ciertas realizaciones preferidas, otras realizaciones son posibles. Los pasos revelados para los presentes métodos no tienen intención de ser limitativos ni tienen la intención de indicar que cada paso descrito es esencial para el método, sino que son pasos a modo de ejemplo únicamente. De ahí, el ámbito de las reivindicaciones que se acompañan no debe estar limitado a la descripción de las realizaciones preferidas contenidas en esta revelación.

LISTADO DE SECUENCIA

[0058]

<110> Loma Linda University

<120> METODOS PARA DETECTAR VIRUS DE ADN

<130> 14751-1PCT
 <160> 9
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 5 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Variola
 <400> 1
 aaaaattgaa attttatttt tttttttgg aatataaata 40
 10 <210> 2
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Variola
 <220>
 15 <221> característica miscelánea
 <222> (5)..(5)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> característica miscelánea
 20 <222> (11)..(13)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 2
 aaaantgaaa nnnta 15
 <210> 3
 25 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Variola
 <220>
 <221> característica miscelánea
 30 <222> (5)..(5)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(7)
 35 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (12)..(14)
 <223> n is a, c, g, or t
 40 <400> 3
 aaaantnaaa annnta 16
 <210> 4
 <211> 14
 <212> DNA
 45 <213> Variola
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (2)..(4)
 <223> n is a, c, g, or t
 50 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7) .. (7)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (11) .. (12)
 <223> n is a, c, g, or t
 5 <400> 4
 tnnnttnaaa nnaa 14
 <210> 5
 <211> 4
 <212> ADN
 10 <213> Variola
 <400> 5
 taaa 4
 <210> 6
 <211> 6
 15 <212> ADN
 <213> Variola
 <220>
 <221> R
 <222> (6)..(6)
 20 <223> Iniciador de etapa tardía de virus de viruela
 <400> 6
 taaatr 6
 <210> 7
 <211> 61
 25 <212> DNA
 <213> Virus de Hepatitis B
 <400> 7

 gggaggagat taggttaaag gtctttgtat taggaggctg taggcataaa ttggtctgcg 60

 c 61

 30
 <210> 8
 <211> 108
 <212> ADN
 35 <213> Virus de Hepatitis B
 <400> 8

 gggggaggag attaggttaa aggtctttgt attaggaggc tgtaggcata aattggtctg 60
 cgcaccaaca tcatgcaact tttcacctc tgccataatca tctcttgt 108

 40
 <210> 9
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> Virus de Hepatitis B
 45 <400> 9

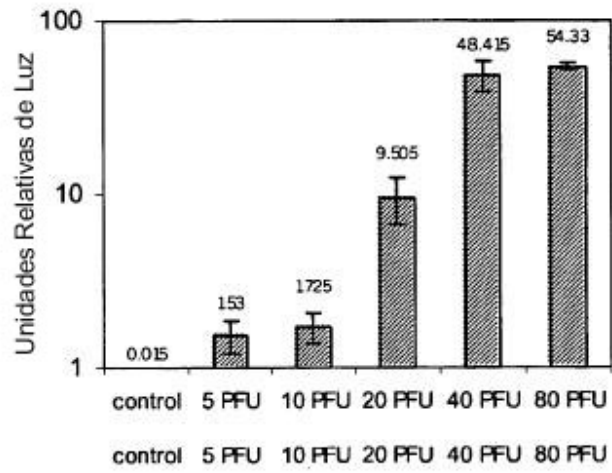
ES 2 386 000 T3

```
gatgattagg cagaggggaa aaaggtgcat ggtgctggtg aacagaccaa tttatgccta    60
cagcctecta gtacaaagac ctttaacctt gtctctctccc ctaactctct ccagtcttta    120
aacaacagct ctttgaagta tgcctcaagg tcggtc                                156
```

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para determinar si el poxvirus está presente en una muestra, comprendiendo los pasos de:
- (a) poner en contacto la muestra con células huésped capaces de ser infectadas por poxvirus;
- 10 (b) transfectar transitoriamente las células huésped con un constructo indicador comprendiendo una secuencia indicadora operativamente unida a una secuencia promotora específica de poxvirus; y
- (c) determinar un nivel de expresión de la secuencia indicadora en las células huésped, determinando por ello si el poxvirus está presente en la muestra.
- 15 2. El método de la Reivindicación 1, en donde la secuencia promotora comprende una secuencia seleccionada del grupo consistiendo de SEC ID N^o. 1, SEC ID N^o. 2, SEC ID N^o. 3, y SEC ID N^o. 4.
3. El método de la Reivindicación 1, que comprende además el paso de comparar el nivel de expresión de la secuencia indicadora con una curva de calibración a fin de determinar cuantitativamente la cantidad de poxvirus en la muestra, en donde los puntos de datos sobre la curva de calibración están determinados:
- 20 (i) contactando una muestra teniendo un título conocido del poxvirus con células huésped capaces de ser infectadas por el poxvirus;
- (ii) transfectando transitoriamente las células huésped con un constructo indicador comprendiendo una secuencia indicadora operativamente unida a una secuencia promotora específica de poxvirus; y
- 25 (iii) determinando un nivel de expresión de la secuencia indicadora en las células huésped.
4. El método de la Reivindicación 1, en donde el paso (b) es realizado por un método seleccionado del grupo consistiendo de transducción, electroporación, choque térmico, y lipofección.
5. El método de la Reivindicación 1, en donde la muestra comprende tejido de un animal humano o no humano.
- 30 6. El método de la Reivindicación 5, en donde la muestra es seleccionada del grupo consistiendo de sangre, plasma, fluido cerebroespinal, y saliva.
7. El método de la Reivindicación 5, en donde la muestra es derivada de un animal tratado con un constructo viral terapéutico.
8. El método de la Reivindicación 1, en donde el paso de determinar un nivel de expresión de la secuencia indicadora es realizado determinando la abundancia de un indicador, en donde el indicador es el producto de traslación de la secuencia indicadora.
- 35 9. El método de la Reivindicación 8, en donde el indicador es seleccionado del grupo consistiendo de Proteína Fluorescente Verde Aumentada (PFVA), Proteína Fluorescente Verde (PFV), luciferasa, beta-galactosidasa, y fosfatasa alcalina segregada (FASE).
- 40

Figura 1



5

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

10 Esta lista de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha tomado gran cuidado al recopilar las referencias, los errores, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido

Literatura no de Patentes citada en la descripción

- 15 • **Chakrabarti, S. ; Sisler, J. R. ; Moss, B.** Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. BioTechniques, 1997, vol. 23, 1094-1097 **[0011]**
- **Fick et al.** Arch. Virol., 1999, vol. 144, 1229-1239 **[0045]**
- **Srinivasan et al.** Avian Diseases, 2003, vol. 47, 286-295 **[0046]**
- **Macaulay ; McFadden.** Virology, 1989, vol. 172, 237-246 **[0047]**

20

25

30