

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 138**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/70** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12P 21/06** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/12** (2006.01)  
**A61K 39/21** (2006.01)  
**A61K 39/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.1999 E 10012455 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2336370**

54 Título: **Sistemas de expresión de ARN del virus recombinante de la enfermedad de Newcastle y vacunas**

30 Prioridad:

**14.09.1998 US 152845**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.02.2016**

73 Titular/es:

**THE MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF  
NEW YORK UNIVERSITY (100.0%)  
One Gustave Levy Place  
New York NY 10029-4574, US**

72 Inventor/es:

**GARCIA-SASTRE, ADOLFO y  
PALESE, PETER**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 558 138 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

Sistemas de expresión de ARN del virus recombinante de la enfermedad de Newcastle y vacunas

### 5 **1. INTRODUCCIÓN**

**[0001]** La presente invención se refiere a moldes de ARN del virus recombinante de la enfermedad de Newcastle que pueden usarse para expresar productos de genes heterólogos en sistemas de células huésped apropiados y/o para construir virus recombinantes que expresan, empaquetan y/o presentan el producto de gen heterólogo. Los productos de expresión y virus quiméricos pueden usarse ventajosamente en formulaciones de vacuna. La presente invención también se refiere a virus recombinantes de la enfermedad de Newcastle genéticamente manipulados que contienen modificaciones y/o mutaciones que hacen al virus recombinante adecuado para su uso en formulaciones de vacuna, tales como un fenotipo atenuado o inmunogenicidad potenciada.

**[0002]** La presente invención se refiere a virus recombinantes de la enfermedad de Newcastle que inducen interferón y vías relacionadas. La presente invención se refiere al uso de los virus recombinantes de la enfermedad de Newcastle y vectores virales contra una amplia gama de patógenos y/o antígenos, que incluyen antígenos específicos de tumor. La invención se demuestra a modo de ejemplos en los que se construyeron moldes de ARN del virus recombinante de la enfermedad de Newcastle que contienen secuencias codificantes de genes heterólogos en la polaridad negativa. La invención se refiere además a la construcción de moldes de ARN del virus recombinante de la enfermedad de Newcastle que contienen secuencias codificantes de genes heterólogos en la polaridad positiva. Tales secuencias de genes heterólogos incluyen secuencias derivadas de un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

### 25 **2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

**[0003]** Se han manipulado genéticamente varios virus de ADN para dirigir la expresión de proteínas heterólogas en sistemas de células huésped (por ejemplo, virus de la variolovacuna, baculovirus, etc.). Recientemente se han hecho avances similares con virus de ARN de hebra positiva (por ejemplo, virus de la poliomielitis). Se cree que los productos de expresión de estas construcciones, es decir, el producto de gen heterólogo o el virus quimérico que expresa el producto de gen heterólogo, son posiblemente útiles en formulaciones de vacuna (tanto vacunas de subunidad como de virus completo). Un inconveniente al uso de virus tales como la variolovacuna para construir virus recombinantes o quiméricos para su uso en vacunas es la falta de variación en sus principales epítopes. Esta falta de variabilidad en las cepas virales limitan el uso repetido de la variolovacuna quimérica, porque múltiples vacunaciones generarán resistencia del huésped a la cepa de manera que el virus inoculado no pueda infectar al huésped. Por tanto, la inoculación de un individuo resistente con variolovacuna no inducirá estimulación inmunitaria.

**[0004]** Por el contrario, los virus de ARN de hebra negativa serían candidatos atractivos para construir virus quiméricos para su uso en vacunas. Se desea el virus de ARN de hebra negativa, gripe, por ejemplo, debido a que su amplia variabilidad genética permite la construcción de un amplio repertorio de formulaciones de vacuna que estimulan la inmunidad sin riesgo de desarrollar una tolerancia. Recientemente se logró la construcción de partículas de ARN recombinantes infecciosas o de hebra negativa quiméricas con el virus de la gripe (patente de EE.UU. N° 5.166.057 a Palese et al.).

#### 45 **2.1. EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

**[0005]** Las familias de virus que contienen ARN monocatenario envuelto del genoma de sentido negativo se clasifican en grupos que tienen genomas no segmentados (Paramyxoviridae, Rhabdoviridae) o aquellos que tienen genomas segmentados (Orthomyxoviridae, Bunyaviridae y Arenaviridae). La familia paramyxoviridae, descrita en detalle más adelante, y usada en los ejemplos en el presente documento, contiene los virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus paragripal, virus de Sendai, virus simio 5 y virus de las paperas.

**[0006]** El virus de la enfermedad de Newcastle es un virus envuelto que contienen un genoma de ADN de sentido negativo no segmentado monocatenario lineal. El ARN genómico contiene genoma de ARN de sentido negativo, no segmentado, monocatenario lineal. El ARN genómico contiene genes en el orden de 3'-NP-P-M-F-HN-L, descritos en más detalle más adelante. El ARN genómico también contiene una secuencia conductora en el extremo 3'.

**[0007]** Los elementos estructurales del virión incluyen la envuelta del virus que es una bicapa de lípidos derivada de la membrana plasmática celular. La glicoproteína, hemaglutinina-neuraminidasa (HN), sobresale de la envuelta permitiendo que el virus contenga tanto actividades de hemaglutinina como de neuraminidasa. La glicoproteína de fusión (F), que también interacciona con la membrana viral, se produce primero como un precursor inactivo, luego se escinde postraduccionalmente para producir dos polipéptidos enlazados por disulfuro. La proteína F activa participa en la penetración de NDV en células huésped facilitando la fusión de la envuelta viral con la membrana plasmática de la célula huésped. La proteína de la matriz (M) participa con ensamblaje viral e interacciona tanto con la membrana viral como con las nucleoproteínas de la cápside.

10 **[0008]** La principal subunidad de proteína de la nucleocápside es la nucleoproteína de la cápside (NP) que confiere simetría helicoidal sobre la cápside. En asociación con la nucleocápside están las proteínas P y L. Se cree que la fosfoproteína (P), que se somete a fosforilación, desempeña una función reguladora en la transcripción, y también puede participar en la metilación, fosforilación y poliadenilación. Se requiere el gen L, que codifica una polimerasa de ARN dependiente de ARN, para la síntesis de ARN viral junto con la proteína P. La proteína L, que  
15 capta casi la mitad de la capacidad codificante del genoma viral, es la mayor de las proteínas virales, y desempeña una función importante en tanto la transcripción como la replicación.

**[0009]** La replicación de todos los virus de ARN de la hebra negativa, que incluyen NDV, se complica por la ausencia de maquinaria celular requerida para replicar el ARN. Adicionalmente, el genoma de hebra negativa puede no traducirse directamente en proteína, sino que debe primero transcribirse en una copia de hebra positiva (ARNm). Por tanto, tras la entrada en una célula huésped, el ARN genómico solo no puede sintetizar la polimerasa de ARN dependiente de ARN requerida. Las proteínas L, P y NP deben entrar en la célula junto con el genoma en la infección.

25 **[0010]** Se supone que la mayoría o todas las proteínas virales que transcriben ARNm de NDV también llevan a cabo su replicación. El mecanismo que regula los usos alternativos (es decir, transcripción o replicación) del mismo complemento de las proteínas no se ha identificado claramente, pero parece que implica la abundancia de formas libres de una o más de las nucleoproteínas de la cápside, en particular, NP. Directamente tras la penetración del virus, la transcripción se inicia por la proteína L usando el ARN de sentido negativo en la nucleocápside como molde.  
30 La síntesis de ARN viral se regula de forma que produzca ARNm monocistrónicos durante la transcripción.

**[0011]** Tras la transcripción, la replicación del genoma del virus es el segundo acontecimiento esencial en la infección por virus de ARN de la hebra negativa. Al igual que con otros virus de ARN de hebra negativa, la replicación del genoma del virus en el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) está mediada por proteínas específicas de virus. Los primeros productos de la síntesis replicativa de ARN son copias complementarias (es decir, polaridad más) del ARN del genoma de NDV (ARNc). Estas copias de hebra más (anti-genomas) se diferencian de los transcritos de ARN de hebra más en la estructura de sus extremos. A diferencia de los transcritos de ARNm, los ARNc anti-genómicos no están tapados y metilados en los extremos 5', y no están truncados y poliadenilados en los extremos 3'. Los ARNc son co-terminales con sus moldes de hebra negativa y contienen toda la información  
40 genética en cada segmento de ARN genómico en la forma complementaria. Los ARNc sirven de moldes para la síntesis de genomas virales de hebra negativa de NDV (ARNv).

**[0012]** Tanto los genomas de hebra negativa de NDV (ARNv) como los antigenomas (ARNc) están encapsidados por nucleoproteínas de la cápside; las únicas especies de ARN sin encapsidar son ARNm de virus.  
45 Para el NDV, el citoplasma es el sitio de replicación de ARN de virus, así como es el sitio para la transcripción. El ensamblaje de los componentes virales parece tener lugar en la membrana plasmática de la célula huésped y se libera virus maduro por gemación.

## 2.2. MANIPULACIÓN POR INGENIERÍA DE VIRUS DE ARN DE HEBRA NEGATIVA

50

**[0013]** Se han estudiado ampliamente las polimerasas de ARN dirigidas a ARN de virus animales con respecto a muchos aspectos de la estructura de proteína y condiciones de reacción. Sin embargo, los elementos del ARN de molde que promueven la óptima expresión por la polimerasa solo podrían ser estudiados por inferencia usando secuencias de ARN viral existentes. Este análisis de promotores es de interés ya que es desconocido cómo  
55 una polimerasa viral reconoce ARN virales específicos de entre los muchos ARN codificados por huésped encontrados en una célula infectada.

**[0014]** Los virus de animales que contienen ARN de genoma de sentido más pueden replicarse cuando el ARN derivado de plásmido se introduce en células por transfección (por ejemplo, Racaniello et al., 1981, Science

214:916-919; Levis, et al., 1986, Cell 44: 137-145). En el caso del virus de la poliomielitis, la polimerasa purificada replicará un ARN del genoma en reacciones *in vitro* y cuando esta preparación de ARN de sentido más se transfecta en células es infeccioso (Kaplan, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8424-8428). Sin embargo, los elementos de molde que sirven de promotor de la transcripción para la polimerasa codificada por el virus de la poliomielitis son desconocidos, ya que incluso pueden copiarse homopolímeros de ARN (Ward, et al., 1988, J. Virol. 62: 558-562). También se han usado transcritos de SP6 para producir ARN interferentes defectuosos en el modelo (DI) para el genoma viral de Sindbis. Cuando el ARN se introduce en células infectadas, se replica y empaqueta. Se mostró que las secuencias de ARN que fueron responsables de tanto el reconocimiento por la polimerasa viral de Sindbis como el empaquetamiento del genoma en partículas de virus estaban dentro de 162 nucleótidos (nt) del extremo 5' y 19 nt del extremo 3' del genoma (Levis, et al., 1986, Cell 44: 137-145). En el caso del virus del mosaico del bromo (BMV), un virus de planta de ARN de hebra positiva, se han usado transcritos de SP6 para identificar un promotor como un extremo 3' tipo ARNt de 134 nt (Dreher, y Hall, 1988, J. Mol. Biol. 201: 31-40). Se mostró que el reconocimiento y la síntesis de polimerasas eran dependientes de tanto la secuencia como las características estructurales secundarias (Dreher, et al., 1984, Nature 311: 171-175).

15 **[0015]** Los virus de ARN de sentido negativo han sido resistentes al estudio de los requisitos de secuencia de la replicasa. La polimerasa purificada del virus de la estomatitis vesicular solo es activa en la transcripción cuando los complejos de ribonucleoproteína derivados de virus (RNP) están incluidos como molde (De y Banerjee, 1985, Biochem. Biophys. Res. Commun. 126: 40-49; Emerson y Yu, 1975, J. Virol. 15: 1348-1356; Naito y Ishihama, 1976, J. Biol. Chem. 251: 4307-4314). Con respecto al virus de la gripe, se informó que el ARN desnudo purificado del virus se usó para reconstituir RNP. La nucleocápside viral y las proteína de polimerasa se purificaron en gel y se renaturalizaron en el ARN viral usando tioredoxina (Szewczyk, et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7907-7911). Sin embargo, estos autores no mostraron que la actividad de la preparación fuera específica para el ARN viral de la gripe, ni analizaron las señales que promueven la transcripción.

25 **[0016]** Solo recientemente ha sido posible recuperar virus de ARN de la hebra negativa que usen un enfoque genético inverso recombinante (patente de EE.UU. N° 5.166.057 a Palese et al.). Aunque este método se aplicó originalmente a manipular por ingeniería genomas del virus de la gripe (Luytjes et al. 1989, Cell 59: 1107-1113; Enami et al. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11563-11567), se ha aplicado satisfactoriamente a una amplia variedad de virus de ARN de hebra negativa segmentados y no segmentados, que incluyen rabia (Schnell et al. 1994, EMBO J. 13:4195-4203); virus respiratorio sincitial (Collins et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9663-9667); y virus de Sendai (Park et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5537-5541; Kato et al., 1996, Genes Cells 1:569-579). Sin embargo, este enfoque tiene que aplicarse ahora a genomas del virus de ARN de la enfermedad de Newcastle.

### 35 **3. RESUMEN DE LA INVENCION**

**[0017]** La presente invención es como se define por las reivindicaciones.

40 **[0018]** Se describen moldes de ARN del virus recombinante de la enfermedad de Newcastle que pueden usarse con polimerasa de ARN dirigida a ARN para expresar productos de genes heterólogos en células huésped apropiadas y/o para rescatar el gen heterólogo en partículas de virus. En una realización, la invención se refiere a virus recombinantes de la enfermedad de Newcastle que inducen interferón y vías relacionadas. La presente invención se refiere a virus recombinantes de la enfermedad de Newcastle que contienen modificaciones que producen fenotipos que hacen al virus recombinante más adecuado para su uso en formulaciones de vacuna, por ejemplo, fenotipos atenuados e inmunogenicidad potenciada. En otra realización, la presente invención se refiere a la manipulación por ingeniería de virus recombinantes de la enfermedad de Newcastle y a vectores virales que contienen genes heterólogos que incluyen genes de otros virus, patógenos, genes celulares, antígenos de tumor, etc.

50 **[0019]** En otra realización, la presente invención se refiere a la manipulación por ingeniería de virus recombinantes de la enfermedad de Newcastle y a vectores virales para el uso como vacunas. La presente invención se refiere a formulaciones de vacuna adecuadas para la administración a seres humanos, además de a usos veterinarios. Las vacunas de la presente invención pueden diseñarse para administración a animales domésticos, que incluyen gatos y perros; animales salvajes, que incluyen zorros y mapaches; ganado y aves de corral, que incluyen caballos, ganado vacuno, ovejas, pavos y pollos.

**[0020]** En otra realización más, la invención se refiere a virus y vectores virales recombinantes de la enfermedad de Newcastle que se manipulan para codificar genes virales mutantes de la enfermedad de Newcastle o

para codificar combinaciones de genes de diferentes cepas del virus de la enfermedad de Newcastle. Los moldes de ARN de la presente se preparan por transcripción de secuencias de ADN apropiadas con una polimerasa de ARN dirigida a ADN. Los moldes de ARN resultantes son de polaridad negativa y contienen secuencias terminales apropiadas que permiten que el aparato de síntesis de ARN viral reconozca el molde. Alternativamente, también pueden usarse moldes de ARN de polaridad positiva que contienen secuencias terminales apropiadas que permiten que el aparato de síntesis de ARN viral reconozca el molde. La expresión de moldes de ARN de polaridad positiva puede lograrse por transfección de plásmidos que tienen promotores que son reconocidos por la polimerasa de ARN dependiente de ADN. Por ejemplo, el ADN de plásmido que codifica moldes de ARN positivos bajo el control de un promotor T7 puede usarse en combinación con el sistema T7 del virus de la variolovacuna.

10

**[0021]** Pueden construirse ARNm bicistrónicos para permitir la iniciación interna de la traducción de secuencias virales y permitir la expresión de secuencias codificantes de proteína extrañas del sitio de iniciación terminal regular, o viceversa. Alternativamente, una proteína extraña puede expresarse a partir de la unidad transcripcional interna en la que la unidad transcripcional tiene un sitio de iniciación y sitio de poliadenilación. En otra realización, el gen extraño se inserta en un gen de NDV de forma que la proteína expresada resultante sea una proteína de fusión.

15

**[0022]** Los moldes de ARN viral mutante recombinante de la enfermedad de Newcastle de la presente invención pueden usarse para transfectar líneas celulares transformadas que expresan la polimerasa de ARN dependiente de ARN y permitir la complementación. Alternativamente, puede usarse un plásmido que expresa un promotor apropiado para la transfección de ARN específico de virus (quimérico). La complementación también puede lograrse con el uso de un virus auxiliar que proporciona la polimerasa de ARN dependiente de ARN. Adicionalmente, también se describe un sistema de replicación dependiente de no virus para el virus de la enfermedad de Newcastle. El subconjunto mínimo de las proteínas del virus de la enfermedad de Newcastle necesario para la replicación y expresión específica del virus son las tres proteínas, L, P y NP, que pueden expresarse a partir de plásmidos por un sistema de virus de la variolovacuna T7. En otra realización más, cuando los plásmidos que codifican la copia antígenómica del genoma de NDV se usan para suministrar el genoma viral, el subconjunto mínimo de las proteínas del virus de la enfermedad de Newcastle necesarias para la replicación y expresión específica del virus son las proteínas L y P. Cuando la copia antígenómica del genoma de NDV se transcribe, la proteína polimerasa NP es la primera proteína transcrita, así no es necesario proporcionar adicionalmente la NP polimerasa en trans.

20

25

30

**[0023]** Los productos de expresión y/o viriones quiméricos obtenidos pueden utilizarse ventajosamente en formulaciones de vacuna. Los productos de expresión y viriones quiméricos de la presente invención pueden manipularse para crear vacunas contra una amplia variedad de patógenos, que incluyen antígenos virales, antígenos de tumor y auto-antígenos que participan en trastornos autoinmunitarios. En particular, los viriones quiméricos de la presente invención pueden manipularse para crear vacunas anti-VIH, en las que un polipéptido inmunogénico de gp160, y/o de proteínas internas del VIH, se manipula en la proteína glicoproteína HN para construir una vacuna que es capaz de provocar tanto respuestas inmunitarias humorales como celulares del vertebrado. El uso de virus recombinante de la enfermedad de Newcastle para este fin es especialmente atractivo, ya que el virus de la enfermedad de Newcastle no es patógeno en seres humanos. El uso de virus recombinante de la enfermedad de Newcastle para administrar antígenos de tumor es particularmente atractivo, dadas las propiedades antineoplásicas e inmunopotenciadoras conocidas del virus.

35

40

### 45 3.1. DEFINICIONES

**[0024]** Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tendrán los significados indicados:

ARNc = ARN antígenómico

50

VIH = virus de la inmunodeficiencia humana

L = proteína grande

55 M = proteína de la matriz (líneas dentro de la envuelta)

MDCK = células de riñón canino de Madin Darby

MDBK = células de riñón bovino de Madin Darby

moi = multiplicidad de infección

NA = neuraminidasa (proteína de la envuelta)

5

NDV = virus de la enfermedad de Newcastle

NP = nucleoproteína (asociada a ARN y requerida para la actividad de polimerasa)

10 NS = proteína no estructural (función desconocida)

nt = nucleótido

PA, PB 1, PB2 = componentes de polimerasa de ARN dirigida a ARN

15

RNP = ribonucleoproteína

RNPr = RNP recombinante

20 ARNV = ARN de virus genómico

WSN = virus A/WSN/33 de la gripe

25 virus WSN-HK: virus de reordenamiento que contienen siete genes del virus WSN y el gene NA del virus A/HK/8/68 de la gripe

#### **4. DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

##### **[0025]**

30

FIG. 1. Representación esquemática del minigenoma de NDV. La ilustración superior representa el plásmido PNDVCAT que incluye el promotor T7; la secuencia del extremo 5' (extremo 5' de ARN genómico, 191 nt); los nucleótidos insertados (CTTAA); 667 nt de ORF de CAT; la secuencia del extremo 3' (extremo 3' de ARN genómico, 121 nt), los sitios de Bbs1 y de nucleasa. La ilustración inferior representa el ARN de NDV-CAT quimérico resultante de la transcripción *in vitro*. Como resultado de la amplificación y transcripción basada en NDV del minigenoma quimérico de NDV-CAT, la actividad de CAT se detecta en las células transfectadas.

35

FIG. 2A-C. Representación esquemática de los vectores de expresión de PTMI.

40 PTM1-NP codifica la proteína NP de NDV.

PTM1-P codifica la proteína P de NDV.

PTM1-L codifica la proteína L de NDV.

45

FIG. 3. Secuencia de ARN de las regiones terminales no codificantes 5' y 3' de NDV (sentido más). Las secuencias 5' para el gen CAT representan 121 nt de la región terminal no codificante 5' del genoma de sentido más de NDV que comprende 65 nt de la secuencia conductora (en negrita) seguido de 56 nt de la UTR del gen NP. Las secuencias 3' para el gen CAT representan nucleótidos insertados cuuaa (en minúscula) y 191 nt de la región terminal no codificante del genoma de sentido más de NDV que comprende 127 nt de la UTR del gen L seguido de 64 nt de la región remolque (en negrita).

50

FIG. 4A-B Representación esquemática de una estructura de clones recombinantes de NDV. FIG 4B, representación de NDV infeccioso que expresa Env y Gag del VIH. Panel superior, Env y Gag del VIH están entre los genes M y L. Panel inferior, Env y Gag del VIH son 3' con respecto al gen NP.

55

FIG. 5 Representación esquemática de los extremos 3' y 5' de NDV como se alinean con la secuencia de Kurilla et al. 1985 Virology 145:203-212 (extremos 3') y Yusoff et al. 1987 Nucleic Acids Research 15:3961-3976 (extremos 5')

- FIG. 6 Método de genética inversa basada en plásmido para la expresión basada en NDV de un gen extraño. Las células se infectan con un virus recombinante de la variolovacuna que expresa la polimerasa T7. Además, las células se transfectan con 1) ADN de plásmido que codifican las proteínas L, NP y P de NDV bajo el control transcripcional de un promotor T7 (pTM1-L, pTM1-NP y pTM1-P, respectivamente) y 2) un ADN de plásmido que codifica un minigenoma de NDV-CAT quimérico bajo el control transcripcional de un promotor T7 (pT7-NDV-CAT-RB). El extremo 3' apropiado del minigenoma de NDV-CAT se logra basándose en la escisión facilitada por una secuencia de ribozima (RB). La amplificación y transcripción del minigenoma quimérico de NDV-CAT produce actividad de CAT detectable en las células transfectadas. Las regiones no codificantes en los extremos 3' y 5' del minigenoma de NDV-CAT se representan como recuadros negros.
- 10
- FIG. 7 Rescate de NDV de ADN sintético. Las células se infectan con un virus recombinante de la variolovacuna que expresa la polimerasa T7. Además, las células se transfectan con 1) ADN de plásmido que codifican las proteínas L, NP y P de NDV bajo el control transcripcional de un promotor T7 (pTM1-L, pTM1-NP y pTM1-P, respectivamente) y 2) un ADN de plásmido que codifica el antígenoma de NDV bajo el control transcripcional de un promotor T7 (pT7-NDV+-RB). El extremo 3' apropiado del antígenoma de NDV se logra basándose en la escisión facilitada mediante una secuencia de ribozima (RB). La amplificación y transcripción del antígenoma de NDV produce el rescate de virus NDV infecciosos. Las regiones no codificantes en los extremos 3' y 5' del antígenoma de NDV se representan como recuadros negros.
- 15
- FIG. 8 Expresión basada en NDV de un gen extraño insertado como una unidad transcripcional interna en el antígenoma de NDV. Las células se infectan con un virus recombinante de la variolovacuna que expresa la polimerasa T7. Además, las células se transfectan con 1) ADN de plásmido que codifican las proteínas L, NP y P de NDV bajo el control transcripcional de un promotor T7 (pTM1-L, pTM1-NP y pTM1-P, respectivamente) y 2) un ADN de plásmido que codifica un antígenoma quimérico de NDV-CAT bajo el control transcripcional de un promotor T7 (pT7-NDV-CAT-RB). En el antígenoma quimérico de NDV-CAT, el marco de lectura abierto de CAT sustituye el marco de lectura abierto de HN que existe de forma natural del antígenoma de NDV no mutante. El extremo 3' apropiado del antígenoma quimérico de NDV-CAT se logra basándose en la escisión facilitada mediante una secuencia de ribozima (RB). La amplificación y transcripción del antígenoma quimérico de NDV-CAT produce actividad de CAT detectable en las células transfectadas. Las regiones no codificantes en los extremos 3' y 5' del antígenoma quimérico de NDV-CAT se representan como recuadros negros.
- 20
- 25
- 30

## 5. DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- [0026]** La presente invención se refiere a virus y vectores virales de la enfermedad de Newcastle genéticamente manipulados que expresan genes heterólogos o genes virales mutados de la enfermedad de Newcastle o una combinación de genes virales derivados de diferentes cepas de virus de la enfermedad de Newcastle. La invención se refiere a la construcción y uso de moldes de ARN viral recombinante de NDV de la hebra negativa que pueden usarse con polimerasa de ARN dirigida a ARN viral para expresar productos de genes heterólogos en células huésped apropiadas y/o para rescatar el gen heterólogo en partículas de virus. En una realización específica de la invención, el producto de gen heterólogo es un péptido o proteína derivada del genoma de un virus de la inmunodeficiencia humana. Los moldes de ARN de la presente invención pueden prepararse tanto *in vitro* como *in vivo* por transcripción de secuencias de ADN apropiadas usando una polimerasa de ARN dirigida a ADN tal como el bacteriófago T7, T3, la polimerasa SP6 o una polimerasa de eucariota tal como la polimerasa I.
- 35
- 40
- [0027]** Los moldes de ARN recombinante pueden usarse para transfectar líneas celulares continuas/transfectadas que expresan las proteínas polimerasas de ARN dirigidas a ARN permitiendo la complementación, como se demuestra a modo de ejemplos de trabajo en los que los transcritos de ARN de ADN clonado que contiene la región codificante -- en orientación de sentido negativo -- del gen cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), flanqueado por los nucleótidos del extremo 5' y del extremo 3' de NDV-CL (cepa California/11914/cepa tipo 1944) (Meindl et al., 1974 *Virology* 58: 457-463). Los ARN se transfectaron en células que expresaban las proteínas polimerasa de NDV. En una realización preferida se usa un sistema de replicación dependiente de no virus para recuperar NDV quimérico, en el que el ADN de plásmido que codifica el genoma de NDV o antígenoma se coexpresa con ADN de plásmido que codifica el subconjunto mínimo de proteínas del virus de la enfermedad de Newcastle necesario para la replicación y expresión específica del virus, como se demuestra a modo de ejemplo de trabajo como se describe más adelante.
- 45
- 50
- 55

- [0028]** La capacidad para reconstituir NDV *in vivo* permite el diseño de novedosos virus NDV quiméricos que expresan genes extraños o que expresan genes de NDV mutantes. La capacidad para reconstituir NDV *in vivo* también permite el diseño de novedosos NDV quiméricos que expresan genes de diferentes cepas de NDV. Una

forma de lograr este objetivo implica modificar los genes de NDV existentes. Por ejemplo, el gen HN puede modificarse para contener secuencias extrañas en sus dominios externos. Si la secuencia heteróloga son epítopes o antígenos de patógenos, estos virus quiméricos pueden usarse para inducir una respuesta inmunitaria protectora contra el agente de enfermedad del que se derivan estos determinantes.

5

**[0029]** Según la presente invención, se construye un ARN quimérico en el que una secuencia codificante derivada de la región codificante de gp160 del virus de la inmunodeficiencia humana se inserta en la secuencia codificante HN de NDV, y el virus quimérico se produce de la transfección de este segmento de ARN quimérico en una célula huésped infectada con NDV no mutante. Además, un virus quimérico tal debe ser capaz de provocar tanto una respuesta inmunitaria humoral como celular del vertebrado. La presente invención se refiere además a la inducción de interferón y vías relacionadas por virus NDV recombinantes o quiméricos.

10

**[0030]** La presente invención se refiere al uso de vectores virales y virus quiméricos de la invención para formular vacunas contra una amplia variedad de virus y/o antígenos que incluyen antígenos de tumor. Los vectores virales y virus quiméricos de la presente invención pueden usarse para modular el sistema inmunitario de un sujeto estimulando una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria celular o estimulando la tolerancia a un antígeno. Como se usa en el presente documento, un sujeto significa: seres humanos, primates, caballos, vacas, ovejas, cerdos, cabras, perros, gatos, especies aviares y roedores. Cuando se administran antígenos de tumor, la invención puede usarse para tratar sujetos que tienen enfermedad que responden a rechazo mediado por inmunidad, tal como tumores no sólidos o tumores sólidos de pequeño tamaño. También se contempla que la administración de antígenos de tumor por los vectores virales y virus quiméricos descrita en el presente documento sea útil para el tratamiento posterior a la eliminación de grandes tumores sólidos. La invención también puede usarse para tratar sujetos que se sospecha que tienen cáncer.

15

20

25

**[0031]** La invención puede dividirse en las siguientes etapas únicamente con el fin de descripción y no a modo de limitación: (a) construcción de moldes de ARN recombinante; (b) expresión de productos de genes heterólogos usando los moldes de ARN recombinante; y (c) rescate del gen heterólogo en partículas de virus recombinante. Para claridad de discusión, la invención se describe en los ejemplos de trabajo usando NDV-CL (cepa de California/11914/cepa similar a 1944), sin embargo puede utilizarse cualquier cepa de NDV.

30

### **5.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS MOLDES DE ARN RECOMBINANTE**

**[0032]** Una realización específica de la presente invención es la identificación por los solicitantes de la correcta secuencia de nucleótidos de los extremos 5' y 3' de los ARN de genoma de sentido negativo de NDV. La secuencia de nucleótidos de los extremos 5' y 3' del ARN de genoma de sentido negativo de NDV de la presente invención se diferencia significativamente de la secuencia de extremos 3' de NDV previamente desvelada como se muestra en la Figura 5. La identificación de la correcta secuencia de nucleótidos de los extremos 5' y 3' de NDV permite por primera vez la manipulación por ingeniería de moldes de ARN recombinante de NDV, la expresión de los moldes de ARN recombinante y el rescate de partículas de NDV recombinante. La presente invención engloba no solo los extremos 5' y 3' que tienen la secuencia de nucleótidos como se muestra en la Figura 5, sino que también engloba cualquier modificación o mutación a los extremos o cualquier fragmento de los mismos que todavía retienen la función de los extremos no mutantes, es decir, las señales requeridas para que el aparato de síntesis de ARN viral reconozca el molde.

35

40

45

**[0033]** Las secuencias codificantes de genes heterólogos flanqueadas por el complemento del sitio de unión/promotor de polimerasa viral, por ejemplo, el complemento del extremo 3' del virus NDV de la presente invención, o los complementos de tanto los extremos 3' como 5' del virus NDV, pueden construirse usando técnicas conocidas en la técnica. Los moldes de ARN resultantes pueden ser de polaridad negativa y contener secuencias terminales apropiadas que permiten que el aparato de síntesis de ARN viral reconozca el molde. Alternativamente, también pueden usarse moldes de ARN de polaridad positiva que contienen secuencias terminales apropiadas que permiten que el aparato de síntesis de ARN viral reconozca el molde. Las moléculas de ADN recombinantes que contienen estas secuencias híbridas pueden clonarse y transcribirse por una polimerasa de ARN dirigida a ADN, tal como el bacteriófago T7, T3, la polimerasa SP6 o polimerasa de eucariota tal como la polimerasa I y similares, para producir los moldes de ARN recombinante *in vitro* o *in vivo* que poseen las secuencias virales apropiadas que permiten el reconocimiento y la actividad de polimerasa viral.

50

55

**[0034]** En otra realización más, prácticamente cualquier secuencia heteróloga puede construirse en los virus quiméricos de la presente invención, que incluyen, pero no se limitan a, antígenos, tales como 1) antígenos que son característicos de un patógeno; 2) antígenos que son característicos de enfermedad autoinmunitaria; 3) antígenos

que son característicos de un alérgeno; y 4) antígenos que son característicos de un tumor. Por ejemplo, secuencias de genes heterólogos que pueden manipularse en los virus quiméricos de la invención incluyen, pero no se limitan a, epítopes del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tales como gp160; antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg); las glicoproteínas del virus del herpes (por ejemplo, gD, gE); VP1 del virus de la poliomielitis; y 5 determinantes antigénicos de patógenos no virales tales como bacterias y parásitos, por solo nombrar algunos.

10 **[0035]** Los antígenos que son característicos de enfermedad autoinmunitaria normalmente se derivarán de la superficie celular, citoplasma, núcleo, mitocondrias y similares de tejidos de mamífero, que incluyen antígenos característicos de diabetes mellitus, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, anemia

15 **[0036]** Los antígenos que son alérgenos son generalmente proteínas o glicoproteínas, que incluyen antígenos derivados del polen, polvo, mohos, esporas, caspa, insectos y alimentos.

20 **[0037]** Los antígenos que son característicos de antígenos de tumor normalmente se derivarán de la superficie celular, citoplasma, núcleo, orgánulos y similares de células de tejido tumoral. Ejemplos incluyen antígenos característicos de proteínas tumorales que incluyen proteínas codificadas por oncogenes mutados; proteínas virales asociadas a tumores; y glicoproteínas. Los tumores incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de los tipos de cáncer: labio, nasofaringe, faringe y cavidad bucal, esófago, estómago, colon, recto, hígado, vesícula biliar, páncreas, laringe, pulmón y bronquio, melanoma de piel, mama, cuello uterino, ovario, vejiga, riñón, útero, cerebro y otras partes del sistema nervioso, tiroides, próstata, testículos, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple y leucemia.

25 **[0038]** En una realización específica de la invención, las secuencias heterólogas se derivan del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), preferentemente virus de la inmunodeficiencia humana-1 o virus de la inmunodeficiencia humana-2. En otra realización de la invención, las secuencias codificantes heterólogas pueden insertarse dentro de una secuencia codificante del gen de NDV de forma que se exprese un producto génico quimérico que contiene la secuencia de péptidos heteróloga dentro de la proteína viral de NDV. En una realización 30 tal de la invención, las secuencias heterólogas también pueden derivarse del genoma de un virus de la inmunodeficiencia humana, preferentemente del virus de la inmunodeficiencia humana-1 o virus de la inmunodeficiencia humana-2.

35 **[0039]** En casos en los que las secuencias heterólogas se deriven del VIH, tales secuencias pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias derivadas del gen env (es decir, secuencias que codifican toda o parte de gp160, gp120 y/o gp41), el gen pol (es decir, secuencias que codifican toda o parte de la transcriptasa inversa, endonucleasa, proteasa y/o integrasa), el gen gag (es decir, secuencias que codifican toda o parte de p7, p6, p55, p17/18, p24/25) tat, rev, nef, vif, vpu, vpr y/o vpx.

40 **[0040]** En otra realización más, las secuencias del gen heterólogo que pueden manipularse en los virus quiméricos incluyen aquellas que codifican proteínas con actividades inmunopotenciadoras. Ejemplos de proteínas inmunopotenciadoras incluyen, pero no se limitan a, citocinas, interferón tipo 1, interferón gamma, factores estimulantes de colonias, interleucina -1, -2, -4, -5, -6, -12.

45 **[0041]** Un enfoque para construir estas moléculas híbridas es insertar la secuencia codificante heteróloga en un complemento de ADN de un gen de NDV de manera que la secuencia heteróloga esté flanqueada por las secuencias virales requeridas para la actividad de polimerasa viral; es decir, el sitio de unión/promotor de la polimerasa viral, denominado en lo sucesivo el sitio de unión de la polimerasa viral, y un sitio de poliadenilación. En una realización preferida, la secuencia codificante heteróloga está flanqueada por las secuencias virales que 50 comprenden los promotores de la replicación de los extremos 5' y 3', las secuencias de inicio del gen y de terminación del gen, y las señales de empaquetamiento que se encuentran en los extremos 5' y/o 3'. En un enfoque alternativo, los oligonucleótidos que codifican el sitio de unión de la polimerasa viral, por ejemplo, el complemento del extremo 3' o ambos extremos de los segmentos genómicos del virus pueden ligarse a la secuencia codificante heteróloga para construir la molécula híbrida. La colocación de un gen extraño o segmento de un gen extraño dentro 55 de una secuencia diana se indicó previamente por la presencia de sitios de enzimas de restricción apropiados dentro de la secuencia diana. Sin embargo, los recientes avances en la biología molecular han reducido este problema enormemente. Los sitios de enzimas de restricción pueden colocarse fácilmente en cualquier parte dentro de una secuencia diana mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio (por ejemplo, véase, por ejemplo, las técnicas descritas por Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:488). Las variaciones en la tecnología de la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR), descritas abajo, también permiten la inserción de secuencias específicas (es decir, sitios de enzimas de restricción) y permiten la fácil construcción de moléculas híbridas. Alternativamente, las reacciones de PCR podrían usarse para preparar moldes recombinantes sin la necesidad de clonación. Por ejemplo, podrían usarse reacciones de PCR para preparar moléculas de ADN bicatenario que contienen un promotor de polimerasa de ARN dirigida a ADN (por ejemplo, bacteriófago T3, T7 o SP6) y la secuencia híbrida que contiene el gen heterólogo y el sitio de unión de polimerasa de NDV. Los moldes de ARN podrían entonces transcribirse directamente a partir de este ADN recombinante. En otra realización más, los moldes de ARN recombinantes pueden prepararse ligando ARN que especifican la polaridad negativa del gen heterólogo y el sitio de unión de la polimerasa viral usando una ligasa de ARN. Los requisitos de secuencia para la actividad de polimerasa viral y construcciones que pueden usarse según la invención se describen en las subsecciones a continuación.

### **5.1.1. INSERCIÓN DE LA SECUENCIA DEL GEN HETERÓLOGO EN LOS GENES HN, P, NP, M, F, L**

**[0042]** Los segmentos génicos que codifican las proteínas HN, P, NP, M, F o L pueden usarse para la inserción de productos de genes heterólogos. La inserción de una secuencia de gen extraño en cualquiera de estos segmentos podría llevarse a cabo por cualquiera de una sustitución completa de la región codificante viral con el gen extraño o por una sustitución parcial. La sustitución completa se llevaría a cabo probablemente mejor mediante el uso de mutagénesis dirigida por PCR. Brevemente, el cebador A de PCR contendría, del extremo 5' a 3': un sitio de enzima de restricción único, tal como un sitio de enzima de restricción de clase IIS (es decir, una enzima "de cambio"; que reconoce una secuencia específica pero escinde el ADN tanto en la dirección 5' como en la dirección 3' de esa secuencia); un estiramiento de nucleótidos complementario a una región del gen de NDV; y un estiramiento de nucleótidos complementario a la porción codificante del extremo carboxi del producto de gen extraño. El cebador de PCR contendría del extremo 5' a 3': un sitio de enzima de restricción único; un estiramiento de nucleótidos complementario a un gen de NDV; y un estiramiento de nucleótidos correspondiente a la porción codificante de 5' del gen extraño. Después de una reacción de PCR usando estos cebadores con una copia clonada del gen extraño, el producto puede escindirse y clonarse usando los sitios de restricción únicos. La digestión con la enzima de clase IIS y la transcripción con la polimerasa de fago purificada generaría una molécula de ARN que contiene los extremos sin traducir exactos del gen de NDV con una inserción de gen extraño. En una realización alternativa, las reacciones cebadas por PCR podrían usarse para preparar ADN bicatenario que contiene la secuencia promotora del bacteriófago, y la secuencia híbrida de genes de manera que los moldes de ARN puedan transcribirse directamente sin clonación.

### **5.1.2. INSERCIÓN DE LA SECUENCIA DEL GEN HETERÓLOGO EN EL GEN HN**

**[0043]** Las actividades de hemaglutinina y neuraminidasa de NDV están codificadas por un único gen, HN. La proteína HN es una glicoproteína de superficie importante del virus. Para una variedad de virus, tales como la gripe, las proteínas hemaglutinina y neuraminidasa han demostrado contener varios sitios antigénicos. Por consiguiente, esta proteína es una posible diana para la respuesta inmunitaria humoral después de infección. Por tanto, la sustitución de sitios antigénicos dentro de HN con una porción de una proteína extraña puede proporcionar una fuerte respuesta humoral contra este péptido extraño. Si una secuencia se inserta dentro de la molécula de HN y se expresa sobre la superficie exterior de HN será inmunogénica. Por ejemplo, un péptido derivado de gp 160 de VIH podría sustituir un sitio antigénico de la proteína HN, produciendo la provocación de tanto una respuesta inmunitaria humoral. En un enfoque diferente, la secuencia de péptidos extraña puede insertarse dentro del sitio antigénico sin eliminar ninguna secuencia viral. Los productos de expresión de tales construcciones pueden ser útiles en vacunas contra el antígeno extraño, y pueden de hecho eludir un problema tratado anteriormente, aquel de la propagación del virus recombinante en el huésped vacunado. Una molécula de HN intacta con una sustitución solo en sitios antigénicos puede permitir la función de HN y así permitir la construcción de un virus viable. Por tanto, este virus puede cultivarse sin la necesidad de funciones auxiliares adicionales. El virus también puede atenuarse de otras formas para evitar cualquier peligro de escape accidental.

**[0044]** Pueden prepararse otras construcciones híbridas para expresar proteínas sobre la superficie celular o permitir que sean liberadas de la célula. Como una glicoproteína de superficie, HN tiene una secuencia señal escindible del extremo amino necesaria para transportar a la superficie celular, y una secuencia del extremo carboxi necesaria para el anclaje a la membrana. Con el fin de expresar una proteína extraña intacta sobre la superficie celular puede ser necesario usar estas señales de HN para crear una proteína híbrida. En este caso, la proteína de fusión puede expresarse como una proteína de fusión separada a partir de un promotor interno adicional. Alternativamente, si solo las señales de transporte están presentes y el dominio de anclaje a membrana está ausente, la proteína puede secretarse fuera de la célula.

### 5.1.3. CONSTRUCCIÓN DE ARN BICISTRÓNICO Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

[0045] Podría construirse ARNm bicistrónico para permitir la iniciación interna de la traducción de secuencias virales y permitir la expresión de secuencias codificantes de proteína extraña del sitio de iniciación terminal regular.

5 Alternativamente, puede construirse una secuencia de ARNm bicistrónico en la que la secuencia viral se traduce a partir del marco de lectura abierto terminal regular, mientras que la secuencia extraña se inicia a partir de un sitio interno. Pueden utilizarse ciertas secuencias del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Las secuencias IRES que se eligen deben ser lo suficientemente cortas para interferir con las limitaciones del empaquetamiento del virus de la enfermedad de Newcastle. Así, es preferible que la IRES elegida para un enfoque bicistrónico tal no sea superior a 500 nucleótidos de longitud, prefiriéndose menos de 250 nucleótidos. Además, es preferible que la IRES utilizada no comparta secuencia u homología estructural con elementos picornavirales. Elementos de IRES preferidos incluyen, pero no se limitan a, la IRES de BiP de mamífero y la IRES del virus de la hepatitis C.

[0046] Alternativamente, una proteína extraña puede expresarse a partir de una nueva unidad transcripcional interna en la que la unidad transcripcional tiene un sitio de iniciación y sitio de poliadenilación. En otra realización, el gen extraño se inserta en un gen de NDV de forma que la proteína expresada resultante sea una proteína de fusión.

### 5.2. EXPRESIÓN DE PRODUCTOS DE GENES HETERÓLOGOS USANDO MOLDE DE ARN RECOMBINANTE

20 [0047] Los moldes recombinantes preparados como se ha descrito anteriormente pueden usarse en una variedad de formas para expresar los productos de genes heterólogos en células huésped apropiadas o para crear virus quiméricos que expresan los productos de genes heterólogos. En una realización, el molde recombinante puede usarse para transfectar células huésped apropiadas, puede dirigir la expresión del producto de gen heterólogo a altos niveles. Los sistemas de células huésped que proporcionan altos niveles de expresión incluyen líneas celulares continuas que suministran funciones virales tales como líneas celulares superinfectadas con NDV, líneas celulares manipuladas por ingeniería para complementar funciones de NDV, etc.

[0048] En una realización alternativa de la invención, los moldes recombinantes pueden usarse para transfectar líneas celulares que expresan una proteína polimerasa viral con el fin de lograr la expresión del producto de gen heterólogo. Para este fin, líneas celulares transformadas que expresan una proteína polimerasa tales como la proteína L pueden utilizarse como células huésped apropiadas. Las células huésped pueden manipularse similarmente por ingeniería para proporcionar otras funciones virales o funciones adicionales tales como NP o HN.

[0049] En otra realización, un virus auxiliar puede proporcionar la proteína polimerasa de ARN utilizada por las células con el fin de lograr la expresión del producto de gen heterólogo.

[0050] En otra realización más, las células pueden transfectarse con vectores que codifican proteínas virales tales como las proteínas NP, P y L. Ejemplos de tales vectores se ilustran en la FIG 2A-2C.

### 40 5.3. PREPARACIÓN DE VIRUS QUIMÉRICO DE ARN DE HEBRA NEGATIVA

[0051] Con el fin de preparar virus quiméricos, ARN, ADNc del virus NDV modificado, o ARN que codifica el genoma de NDV y/o proteínas extrañas en el sentido más o menos, pueden usarse para transfectar células que proporcionan proteínas virales y funciones requeridas para la replicación y rescate o también se infectan con un virus de NDV "original". En un enfoque alternativo, los plásmidos que codifican el ARN de NDS genómico o antígenómico, tanto no mutantes como modificados, pueden co-transfectarse en células huésped con plásmidos que codifican proteínas polimerasas virales, por ejemplo, NP, P o L. En otra realización, los plásmidos que codifican el ARN de NDV antígenómico pueden co-transfectarse con plásmidos que codifican proteínas polimerasas P y L virales, ya que la proteína polimerasa NP es la primera proteína transcrita por la copia antígenómica del genoma de NDV, no es necesario proporcionar adicionalmente la polimerasa NP en trans.

[0052] En una realización de la presente invención puede utilizarse la técnica de genética inversa para manipular por ingeniería el virus de ARN de hebra negativa quimérica, esta técnica implica la preparación de ARN virales recombinantes sintéticos que contienen las regiones no codificantes del ARN de virus de la hebra negativa que son esenciales para el reconocimiento por polimerasas virales y para empaquetar señales necesarias para generar un virión maduro. Los ADN y ARN de plásmido recombinantes sintéticos pueden replicarse y rescatarse en partículas de virus infecciosas de virus por cualquier número de técnicas conocidos en la técnica, como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.166.057 concedida el 24 de noviembre de 1992; en la patente de EE.UU. N° 5.854.037 concedida el 29 de diciembre de 1998; en la publicación de patente europea EP 0702085A1, publicada el 20 de

febrero de 1996; en la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 09/152.845; en las publicaciones de patente internacional PCT WO97/12032 publicada el 3 de abril de 1997; WO96/34625 publicada el 7 de noviembre de 1996; en la publicación de patente europea EP-A780475; documentos WO 99/02657 publicado el 21 de enero de 1999; WO 98/53078 publicado el 26 de noviembre de 1998; WO 98/02530 publicado el 22 de enero de 1998; WO 99/15672 publicado el 1 de abril de 1999; WO 98/13501 publicado el 2 de abril de 1998; WO 97/06270 publicado el 20 de febrero de 1997; y EPO 780 47SA1 publicado el 25 de junio de 1997.

**[0053]** Hay varios enfoques diferentes que pueden usarse para aplicar el enfoque de genética inversa para rescatar virus de ARN de hebra negativa. Primero, los ARN recombinantes se sintetizan a partir de un molde de ADN recombinante y se reconstituyen *in vitro* con complejo de polimerasa viral purificado para formar ribonucleoproteínas recombinantes (RNP) que pueden usarse para transfectar células. En otro enfoque, se logra una transfección más eficaz si las proteínas polimerasas virales están presentes durante la transcripción de los ARN sintéticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Con este enfoque, los ARN sintéticos pueden transcribirse a partir de plásmidos de ADNc que tanto se co-transcriben *in vitro* con plásmidos de ADNc que codifican las proteínas polimerasas, como se transcriben *in vivo* en presencia de proteínas polimerasas, es decir, en células que expresan transitoria o constitutivamente las proteínas polimerasas.

**[0054]** En una realización alternativa puede usarse una combinación de técnicas de genética inversa y técnicas de reordenantes para manipular por ingeniería virus atenuados que tienen los epítopes deseados en virus de ARN segmentados. Por ejemplo, un virus atenuado (generado por selección natural, mutagénesis o por técnicas de genética inversa) y una cepa que lleva el epítope de vacuna deseado (generado por selección natural, mutagénesis o por técnicas de genética inversa) puede co-infectarse en huéspedes que permiten el reordenamiento de genomas segmentados. Entonces pueden seleccionarse reordenantes que muestran tanto el fenotipo atenuado como el epítope deseado.

**[0055]** Tras el reordenamiento, los virus novedosos pueden aislarse e identificarse sus genomas mediante análisis de hibridación. En enfoques adicionales descritos en el presente documento, la producción de virus quiméricos infecciosos puede replicarse en sistemas de célula huésped que expresan una proteína polimerasa viral de NDV (por ejemplo, en sistemas de expresión de virus/célula huésped; líneas celulares transformadas manipuladas por ingeniería para expresar una proteína polimerasa, etc.), de manera que se rescaten virus quiméricos infecciosos. En este caso no necesitan utilizarse virus auxiliares ya que esta función se proporciona por las proteínas polimerasas virales expresadas.

**[0056]** Según la presente invención, puede usarse cualquier técnica conocida para aquellos expertos en la materia para lograr la replicación y el rescate de virus quiméricos. Un enfoque implica suministrar proteínas virales y funciones requeridas para la replicación *in vitro* antes de transfectar células huésped. En una realización tal pueden suministrarse proteínas virales en forma de virus no mutante, virus auxiliar, proteínas virales purificadas o proteínas virales recombinantemente expresadas. Las proteínas virales pueden suministrarse antes, durante o después de la transcripción de los ADNc o ARN sintéticos que codifican el virus quimérico. La mezcla entera puede usarse para transfectar células huésped. En otro enfoque, proteínas virales y funciones requeridas para la replicación pueden suministrarse antes de o durante la transcripción de los ADNc o ARN sintéticos que codifican el virus quimérico. En una realización tal, proteínas virales y funciones requeridas para la replicación se suministran en forma de virus no mutantes, virus auxiliares, extractos virales, ADNc o ARN sintéticos que expresan las proteínas virales se introducen en la célula huésped mediante infección o transfección. Esta infección/transfección tiene lugar antes de o simultáneamente con la introducción de los ADNc o ARN sintéticos que codifican el virus quimérico.

**[0057]** En un enfoque particularmente deseable, las células manipuladas por ingeniería para expresar todos los genes virales de NDV pueden producir la producción de virus quiméricos infecciosos que contienen el genotipo deseado; eliminándose así la necesidad de un sistema de selección. Teóricamente, puede sustituirse uno cualquiera de los seis genes o parte de uno cualquiera de los seis genes de NDV con una secuencia extraña. Sin embargo, una parte necesaria de esta ecuación es la capacidad para propagar el virus defectuoso (defectuoso debido a que un producto génico viral normal falta o se ha alteado). Existen varios enfoques posibles para evitar este problema. En un enfoque, un virus que tienen una proteína mutante puede cultivarse en líneas celulares que se construyen para expresar constitutivamente la versión no mutante de la misma proteína. De esta forma, la línea celular complementa la mutación en el virus. Pueden usarse técnicas similares para construir líneas celulares transformadas que expresan constitutivamente cualquiera de los genes de NDV. Estas líneas celulares que se preparan para expresar la proteína viral pueden usarse para complementar el defecto en el virus recombinante y así propagarlo. Alternativamente, pueden estar disponibles ciertos sistemas de intervalo de huéspedes naturales para propagar el virus recombinante.

5 **[0058]** En otra realización más, proteínas virales y funciones requeridas para la replicación pueden suministrarse como material genético en forma de ADN o ARN sintéticos de manera que se co-transcriban con los ADN o ARN sintéticos que codifican el virus quimérico. En un enfoque particularmente deseable, los plásmidos que expresan el virus quimérico y la polimerasa viral y/u otras funciones virales se co-transfectan en células huésped, como se describe en los ejemplos, véase la Sección 11, arriba.

10 **[0059]** Otro enfoque para propagar el virus recombinante puede implicar el co-cultivo con virus no mutantes. Esto podría hacerse tomando simplemente virus recombinante y co-infectando las células con este y otros virus no mutantes (preferentemente una cepa de vacuna). Los virus no mutantes deben complementar el producto génico de virus defectuoso y permitir el crecimiento de tanto el virus no mutante como recombinante. Alternativamente, puede usarse un virus auxiliar para soportar la propagación del virus recombinante.

15 **[0060]** En otro enfoque, moldes sintéticos pueden replicarse en células co-infectadas con virus recombinantes que expresan la proteína polimerasa del virus NDV. En realidad, este método puede usarse para rescatar virus infecciosos recombinantes según la invención. Para este fin, la proteína polimerasa de NDV puede expresarse en cualquier vector de expresión/sistema de célula huésped, que incluye, pero no se limita a, vectores de expresión virales (por ejemplo, virus de la variolovacuna, adenovirus, baculovirus, etc.) o líneas celulares que expresan una proteína polimerasa (por ejemplo, véase Krystal et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2709-2713). Además, la infección de células huésped que expresan las seis proteínas de NDV puede producir la producción de partículas de virus quiméricas infecciosas. Este sistema eliminaría la necesidad de un sistema de selección, ya que todos los virus recombinante producidos serían del genotipo deseado. Debe observarse que puede ser posible construir un virus recombinante sin alterar la viabilidad del virus. Estos virus alterados serían entonces competentes en el crecimiento y no necesitarían funciones de auxiliares para replicarse.

25 **5.4. FORMULACIONES DE VACUNA QUE USAN LOS VIRUS QUIMÉRICOS**

30 **[0061]** La invención engloba formulaciones de vacuna que comprenden los virus de ARN de hebra negativa manipulados por ingeniería de la presente invención. La invención engloba el uso de virus NDV recombinantes que se han modificado en formulaciones de vacuna para conferir protección L contra infección por el NDV. En otra realización más, los virus NDV recombinantes de la presente invención pueden usarse como vehículo para expresar epítopes extraños que inducen una respuesta protectora a cualquiera de una variedad de patógenos.

35 **[0062]** La invención engloba formulaciones de vacuna que van a administrarse a seres humanos y animales. En particular, la invención engloba formulaciones de vacuna que van a administrarse a animales domésticos, que incluyen perros y gatos; animales salvajes, que incluyen zorros y mapaches; y ganado, que incluye ganado vacuno, caballos, y cerdos, ovejas y cabras; y aves de corral, que incluyen pollo y pavo.

40 **[0063]** La invención engloba formulaciones de vacuna que son útiles contra los agentes causantes de la enfermedad aviar que incluyen NDV, virus de la enfermedad de Marek (MDV), virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV), virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la bursitis infecciosa, virus de la anemia del pollo (CAV), virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILV), virus de la leucosis aviar (ALV), virus de la reticuloendoteliosis (RV) y virus de la gripe aviar.

45 **[0064]** En otra realización, la invención engloba formulaciones de vacuna que son útiles contra los agentes causantes de la enfermedad doméstica que incluyen virus de la rabia, virus de la leucemia felina (FLV) y virus del moquillo canino. En otra realización más, la invención engloba formulaciones de vacuna que son útiles para proteger ganado contra el virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus de la peste bovina, virus de la viruela porcina, y además, para proteger animales salvajes contra el virus de la rabia.

50 **[0065]** Los virus atenuados generados por el enfoque genético inverso pueden usarse en las formulaciones de vacuna y farmacéuticas descritas en el presente documento. También pueden usarse técnicas de genética inversa para manipular por ingeniería mutaciones adicionales a otros genes virales importantes para la producción de vacunas -- es decir, los epítopes de variantes de cepas de vacuna útiles pueden manipularse en el virus atenuado. 55 Alternativamente, pueden manipularse epítopes completamente extraños, que incluyen antígenos derivados de otros patógenos virales o no virales en la cepa atenuada. Por ejemplo, antígenos de virus no relacionados tales como antígenos parásitos del VIH (gp160, gp120, gp41) (por ejemplo, malaria), antígenos bacterianos o fúngicos o antígenos de tumor pueden manipularse en la cepa atenuada. Alternativamente, los epítopes que alteran el tropismo del virus pueden manipularse en los virus atenuados quiméricos de la invención.

**[0066]** Puede construirse prácticamente cualquier secuencia de gen heterólogo en los virus quiméricos de la invención para su uso en vacunas. Preferentemente, los epítopes que inducen una respuesta inmunitaria protectora a cualquiera de una variedad de patógenos, o antígenos que se unen a anticuerpos neutralizantes, pueden expresarse por o como parte de los virus quiméricos. Por ejemplo, secuencias de genes heterólogos que pueden construirse en los virus quiméricos de la invención incluyen, pero no se limitan a, glicoproteínas de la gripe, en particular, hemaglutinina H5, H7, epítopes virales de la enfermedad de Marek; epítopes del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV), virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la anemia de pollo (CAV), virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILV), virus de la leucosis aviar (ALV), virus de la reticuloendoteliosis (RV), virus de la gripe aviar (AIV), virus de la rabia, virus de la leucemia felina, virus del moquillo canino, virus de la estomatitis vesicular, virus de la peste bovina y virus de la viruela porcina (véase Fields et al. (ed.), 1991, *Fundamental Virology*, Segunda Edición, Raven Press, New York).

**[0067]** En otra realización más, las secuencias de gen heterólogo que pueden manipularse en los virus quiméricos incluyen aquellas que codifican proteínas con actividades inmunopotenciadoras. Ejemplos de proteínas inmunopotenciadoras incluyen, pero no se limitan a, citocinas, interferón tipo 1, interferón gamma, factores estimulantes de colonias, interleucina -1, -2, -4, -5, -6, -12.

**[0068]** Además, las secuencias de gen heterólogo que pueden construirse en los virus quiméricos de la invención para su uso en vacunas incluyen, pero no se limitan a, secuencias derivadas de un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), preferentemente tipo 1 o tipo 2. En una realización preferida, un péptido inmunogénico derivado del VIH que puede ser la fuente de un antígeno puede construirse en un NDV quimérico que puede entonces usarse para provocar una respuesta inmunitaria del vertebrado. Tales péptidos derivados del VIH pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias derivada del gen env (es decir, secuencias que codifican todo o parte de gp160, gp120 y/o gp41), el gen pol (es decir, secuencias que codifican toda o parte de la transcriptasa inversa, endonucleasa, proteasa y/o integrasa), el gen gag (es decir, secuencias que codifican todo o parte de p7, p6, p55, p17/18, p24/25), tat, rev, nef, vif, vpu, vpr y/o vpx.

**[0069]** Otras secuencias heterólogas pueden derivarse del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg); antígenos de superficie del virus de la hepatitis A o C, las glicoproteínas del virus de Epstein Barr; las glicoproteínas del virus del papiloma humano; las glicoproteínas del virus respiratorio sincitial, virus paragripal, virus de Sendai, virus simio 5 o virus de las paperas; las glicoproteínas del virus de la gripe; las glicoproteínas de virus del herpes (por ejemplo, gD, gE); VP1 del virus de la poliomielitis; determinantes antigénicos de patógenos no virales tales como bacterias y parásitos, por nombrar algunos. En otra realización pueden expresarse todos o porciones de genes de inmunoglobulina. Por ejemplo, pueden construirse regiones variables de inmunoglobulinas antiidiotípicas que imitan tales epítopes en los virus quiméricos de la invención.

**[0070]** Otras secuencias heterólogas pueden derivarse de antígenos de tumor, y usarse los virus quiméricos resultantes para generar una respuesta inmunitaria contra las células tumorales que conducen a la regresión del tumor *in vivo*. Estas vacunas pueden usarse en combinación con otras pautas terapéuticas, que incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia, radioterapia, cirugía, trasplante de médula ósea, etc., para el tratamiento de tumores. Según la presente invención, los virus recombinantes pueden manipularse para expresar antígenos asociados a tumor (TAA), que incluyen, pero no se limitan a, antígenos de tumor humanos reconocidos por linfocitos T (Robbins y Kawakami, 1996, *Curr. Opin. Immunol.* 8:628-635), proteínas de linaje melanocito, que incluyen gp100, MART-1/MelanA, TRP-1 (gp75), tirosinasa; antígenos ampliamente compartidos específicos de tumor, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-1, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, p15; antígenos mutados específicos de tumor,  $\beta$ -catenina, MUM-1, CDK4; antígenos no melanoma para carcinoma de mama, ovario, cervical y pancreático, HER-2/neu, virus del papiloma humano-E6, -E7, MUC-1.

**[0071]** Puede formularse tanto una vacuna viral recombinante viva como una vacuna viral recombinante inactivada. Puede preferirse una vacuna viva debido a que la multiplicación en el huésped conduce a un estímulo prolongado de tipo y magnitud similar al que se produce en infecciones naturales y, por tanto, confiere inmunidad sustancial de larga duración. La producción de tales formulaciones de vacuna recombinantes de virus vivo puede llevarse a cabo usando métodos convencionales que implican propagación del virus en cultivo celular o en el alantoides del embrión de pollito, seguido de purificación. Adicionalmente, se ha demostrado que NDV es no patógeno en seres humanos, este virus es altamente apto para uso como vacuna viva.

**[0072]** A este respecto, el uso de NDV genéticamente manipulados (vectores) para fines de vacuna puede desear la presencia de características de atenuación en estas cepas. La introducción de mutaciones apropiadas (por

ejemplo, deleciones) en los moldes usados para la transfección puede proporcionar los virus novedosos con características de atenuación. Por ejemplo, pueden hacerse mutaciones de aminoácidos específicas que están asociadas a sensibilidad a la temperatura o adaptación al frío en mutaciones de deleción. Estas mutaciones deben ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas a mutantes sensibles al frío o a la temperatura y las frecuencias de inversión deben ser extremadamente bajas.

**[0073]** Alternativamente, pueden construirse virus quiméricos con características “suicidas”. Tales virus pasarían a través de solo una o algunas rondas de replicación dentro del huésped. Cuando se usa como vacuna, el virus recombinante pasaría a través de ciclo(s) de replicación limitados e induciría un nivel de respuesta inmunitaria suficiente, pero no iría adicionalmente en el huésped humano y produciría enfermedad. Virus recombinantes que carecen de uno o más de los genes de NDV o que poseen genes de NDV mutados no sería capaces de someterse a rondas de replicación sucesivas. Pueden producirse virus defectuosos en líneas celulares que expresan permanentemente un gen (genes) tal. Los virus que carecen de un gen (genes) esencial(es) se replicarán en estas líneas celulares, pero cuando se administren al huésped humano no serán capaces de completar una ronda de replicación. Tales preparaciones pueden transcribir y traducir – en este ciclo fallido -- un número suficiente de genes para inducir una respuesta inmunitaria. Alternativamente, podrían administrarse mayores cantidades de las cepas, de manera que estas preparaciones sirvieran de vacunas de virus inactivados (muertos). Para las vacunas inactivadas se prefiere que el producto de gen heterólogo se exprese como un componente viral, de manera que el producto génico esté asociado al virión. La ventaja de tales preparaciones es que contienen proteínas nativas y no experimentan inactivación mediante tratamiento con formalina u otros agentes usados en la fabricación de las vacunas de virus muertos. Alternativamente, el NDV mutado preparado a partir del ADNc puede ser altamente atenuado de manera que se replique solo durante algunas rondas.

**[0074]** En otra realización de este aspecto de la invención, las formulaciones de vacuna inactivada pueden prepararse usando técnicas convencionales para “destruir” los virus quiméricos. Las vacunas inactivadas están “muertas” en el sentido de que su infectividad ha sido destruida. Idealmente, la infectividad del virus se destruye sin afectar su inmunogenicidad. Con el fin de preparar vacunas inactivadas, el virus quimérico puede cultivarse en cultivo celular o en el alantoides del embrión de pollito, purificarse por ultracentrifugación zonal, inactivarse por formaldehído o  $\beta$ -propiolactona, y reunirse. La vacuna resultante se inocular normalmente intramuscularmente.

**[0075]** Los virus inactivados pueden formularse con un adyuvante adecuado con el fin de potenciar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes pueden incluir, pero no se limitan a, geles minerales, por ejemplo, hidróxido de aluminio; sustancias tensioactivas tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones; péptidos; emulsiones de aceite; y adyuvantes humanos posiblemente útiles tales como BCG y *Corynebacterium parvum*.

**[0076]** Pueden usarse muchos métodos de introducción de las formulaciones de vacuna descritas anteriormente, éstos incluyen, pero no se limitan a, vías oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea e intranasal. Puede ser preferible introducir la formulación de vacuna del virus quimérico mediante la vía natural de infección del patógeno para la que se diseña la vacuna.

## 6. EJEMPLO: EXPRESIÓN Y EMPAQUETAMIENTO DE UN GEN EXTRAÑO POR NDV RECOMBINANTE

**[0077]** Se describe la expresión del gen cloranfenicol transferasa (CAT) usando el minigenoma de NDV. Se preparó el minigenoma de NDV usando pNDVCAT, un plásmido recombinante que contiene el gen CAT. El plásmido pNDVCAT es un plásmido pUC19 que contiene en secuencia: el promotor T7; el extremo 5' del ARN genómico de NDV que comprende 191 nucleótidos de la secuencia de ARN de NDV no codificante; 5 nucleótidos insertados (3'CTTAA); la secuencia codificante completa del gen cloranfenicol transferasa (CAT) en el orden invertido y complementado, el extremo 3' de la secuencia de ARN genómico de NDV que comprende 121 nucleótidos de la secuencia de ARN de NDV no codificante; un sitio de clonación BbsI y varios sitios de restricción que permiten la transcripción no iniciada del molde. El pNDVCAT puede transcribirse usando la polimerasa T7 para crear un ARN con secuencias flanqueantes sentido virales de enfermedad de Newcastle alrededor de un gen CAT en orientación inversa.

**[0078]** La longitud de un ARN de paramyxovirus puede ser un factor importante que determina el nivel de replicación de ARN, siendo la replicación del genoma la más eficaz cuando el número total de nucleótidos es un múltiplo de seis. Para NDV, la cuestión de si esta regla de seis es crítica para la replicación se examinó generando mini-replicones de CAT de longitudes variables, que se diferencian en uno a cinco nucleótidos. Solo una construcción cuyo genoma fue divisible por seis fue capaz de inducir alta actividad de CAT.

## **6.1. CONSTRUCCIÓN DEL MINIGENOMA DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

**[0079]** Con el fin de construir un minigenoma de NDV, como se describe arriba, se usó la siguiente estrategia. Se obtuvo la secuencia del extremo 5' de ARN de NDV genómico por RACE (Gibco, BRL) usando técnicas convencionales en la materia. El molde para la reacción de RACE fue ARN genómico que se purificó a partir de viriones de NDV (NDV-CL: California /11914/similar a 1944). Como se ilustra en la Figura 3, esta secuencia terminal comprendió 64 nucleótidos de una secuencia remolque más 127 nucleótidos de la región sin traducir del gen L. Localizada adyacente a la secuencia de 191 nucleótidos virales se insertó una secuencia de 5 nucleótidos (3'CCTTAA). Un gen CAT comprendió 667 nucleótidos del marco de lectura abierto de CAT que se colocó entre las regiones no codificantes virales del extremo 5' y 3'. Con el fin de obtener la región del extremo 3' de la secuencia de NDV se usó RT-PCR. El molde para la reacción de RT-PCR fue ARN genómico de NDV poliadenilado *in vitro*. Como se ilustra en la Figura 3, la región del extremo 3' de 121 nucleótidos comprendió 56 nucleótidos de la región sin traducir del gen NP más 65 nucleótidos de una secuencia conductora. La construcción resultante del minigenoma de NDV se muestra en la FIG. 1. Las secuencias de nucleótidos de la región terminal no codificante 3' y 5' se muestran en la FIG. 3

## **6.2. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN NP, P Y L DE NDV**

**[0080]** Como se describe en la Sección 5, la transcripción o replicación de un genoma de ARN de hebra negativa requiere que varios componentes de proteína sean traídos con el virus, que incluye la proteína L, proteína P y proteína NP. Con el fin de facilitar la expresión del minigenoma de NDV, los genes que codifican cada una de las proteínas L, P y NP se clonaron en vectores de expresión pTM1 como se ilustra en la FIG. 2A-C. Los vectores de expresión pTM1 comprenden un promotor T7, varios sitios de clonación para la inserción del gen de interés (L, P o NP), un terminador T7, un origen de replicación pUC19 y un gen de resistencia a ampicilina. Con el fin de construir los plásmidos de expresión, el ADN de longitud completa de nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P) y polimerasa (L) de NDV se obtuvo por amplificación por RT-PCR. Estos ADN se clonaron en el vector de expresión de la polimerasa T7 pTM1, respectivamente (FIG. 2A-C).

## **6.3. TRANSCRIPCIÓN DE ARN DEL MINIGENOMA DE NDV**

**[0081]** La transcripción de ARN del plásmido del minigen de NDV se realizó con el kit Ribomax (Promega) como se ha especificado por los manuscritos. Con el fin de permitir la transcripción de iniciación, se digirió 1 µg de plásmido del minigenoma de NDV (pNDVCAT) con Bbs I. El plásmido linealizado se usó entonces como molde de la reacción de transcripción (durante 2 horas a 37 °C). Con el fin de eliminar el molde de ADN, la mezcla de reacción resultante se trató con DNasa libre de RNasa (durante 15 min a 37 °C) y se purificó por extracción con fenol-cloroformo, seguido de precipitación con etanol.

## **6.4. TRANSFECCIONES DE CÉLULAS**

**[0082]** Se cultivaron células Cos-1 o células 293T sobre placas de 35 mm y se infectaron con el virus auxiliar rW T7 a una multiplicidad de infección (moi) de aproximadamente 1 durante 1 hora antes de la transfección. Las células se transfectaron entonces con los vectores de expresión que codificaban las proteínas NP, P y L de NDV. Específicamente, las transfecciones se realizaron con DOTAP (Boehringer Mannheim). Tras la infección por el virus auxiliar, las células se transfectaron con pTM1-NP (1 µg), pTM1-P (1 µg) y pTM1-L (0,1 µg) durante 4 horas. Las transfecciones de control, que carecían de la proteína L, se realizaron en un conjunto en paralelo de células con pTM1-NP (1 µg), pTM1-P (1 µg) y pTM1-L vacío (0 µg). Después del periodo de incubación de 4 horas, las células se sometieron a transfección de ARN con 0,5 µg del ARN quimérico (-) de NDV-CAT (véase FIG. 1). Tras la transfección de ARN, se dejó que las células se incubaran durante 18 horas. Los lisados celulares se recogieron posteriormente para el ensayo de CAT.

## **6.5. ENSAYOS DE CAT**

**[0083]** Se hicieron ensayos de CAT según procedimientos convencionales, adaptados de German et al., 1982, Mol. Cell. Biol. 2: 1044-1051. Los ensayos contuvieron 10 µl de <sup>14</sup>C-cloranfenicol (0,5 µCi; 8,3 nM; NEN), 20 µl de acetil-CoA 40 mM (Boehringer) y 50 µl de extractos celulares en tampón Tris 0,25 M (pH 7,5). Los tiempos de incubación fueron 16-18 horas.

## **6.6. RESULTADOS**

[0084] En cada línea celular transfectada con los vectores de expresión NP, P, L, y el ARN quimérico de NDV-CAT, se obtuvieron altos niveles de expresión de CAT 18 horas después de la infección. Además, las células transfectadas de control que carecían de la proteína L no expresaron CAT.

## 5 **7. RESCATE DE VIRUS NDV INFECCIOSOS USANDO ARN DERIVADO DE ADN RECOMBINANTE ESPECÍFICO**

[0085] Los experimentos descritos en las siguientes subsecciones demuestran el rescate de NDV infeccioso usando ARN que se deriva de ADN recombinantes específicos. Los ARN correspondientes al ARN de NDV-CAT quimérico pueden usarse para mostrar que los 191 nucleótidos del extremo 5' y los 121 nucleótidos de los nucleótidos del extremo 3' de los ARN virales contienen todas las señales necesarias para la transcripción, replicación y empaquetamiento de ARN de NDV modelo. Los ARN que contienen todas las unidades transcripcionales de los genomas de NDV pueden expresarse a partir de plásmidos transfectados. Así, esta tecnología permite la manipulación por ingeniería de virus NDV infecciosos usando clones de ADNc y mutagénesis específica de sitio de sus genomas. Además, esta tecnología puede permitir la construcción de virus NDV quiméricos infecciosos que pueden usarse como vectores eficaces para la expresión génica en cultivo de tejido, animales o ser humano.

## 8. **EJEMPLO: VIRUS RECOMBINANTE DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE QUE CONTIENE UN EPÍTOPE DE ANTÍGENO DEL VIH gp160 INSERTADO EN EL GENOMA DE NDV**

[0086] En el ejemplo presentado en el presente documento, se construye un NDV quimérico para expresar un antígeno heterólogo derivado de gp160 del VIH. Los experimentos descritos en las subsecciones a continuación demuestran el uso de un molde de ARN recombinante para generar un NDV quimérico que expresa un péptido derivado de gp160 del VIH dentro del genoma de NDV y, además, este NDV quimérico se usa para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular del vertebrado.

### 8.1. **CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDO**

[0087] Pueden construirse clones de ADNc de NDV recombinantes que expresan proteínas gp160 del VIH de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 4, las proteínas Env y Gag del VIH pueden insertarse en el NDV en varias localizaciones. En un ejemplo, las proteínas Env y Gag se insertan entre los genes M y L. En un ejemplo diferente, las proteínas Env y Gag se insertan 3' para el gen NP (entre la secuencia conductora y NP). Alternativamente, estas proteínas del VIH se incorporarán entre las proteínas de la envuelta de NDV (HN y F) en el extremo 3'. Estas proteínas también pueden insertarse en o entre cualquiera de los genes de NDV.

### 8.2. **GENERACIÓN DE VIRUS QUIMÉRICO INFECCIOSO**

[0088] La transfección de ARN derivada de plásmido que comprende un genoma de NDV recombinante puede transfectarse en células tales como, por ejemplo, COS, 293 MDBK y la selección de virus quimérico infeccioso puede hacerse como se ha descrito previamente. Véase la patente de EE.UU. Nº 5.166.057. El ARN resultante puede transfectarse en células infectadas con virus no mutante usando procedimientos de protocolo de transfección estándar. Tras la transfección, el sobrenadante puede recogerse y usarse a diferentes diluciones para infectar células frescas en presencia de antisuero de NDV. El sobrenadante también puede usarse para ensayos en placa en presencia del mismo antisuero. Los virus rescatados pueden entonces purificarse y caracterizarse, y usarse, por ejemplo, en la producción de anticuerpos.

### 8.3. **INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN Y ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN DE VIRUS**

[0089] Se realizan ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HI) como se ha descrito previamente (Palmer, D.F. et al., 1975, Immunol. Ser. 6:51-52). Se preparan anticuerpos monoclonales (2G9, 4B2, 2F1O, 25-5) mediante procedimientos convencionales con un anticuerpo monoclonal anti-gp120 humano. Se trata líquido ascítico que contiene anticuerpos monoclonales con enzima destructora de receptor como se ha descrito previamente (Palmer, D.F. et al., 1975, Immunol. Ser. 6:51-52).

[0090] Para el ensayo de neutralización de virus, células en placas de 30 mm de diámetro se infectan con virus. Después de una adsorción de 1 h, se añade superposición de agar que contiene anticuerpo a diferentes diluciones. La monocapa de células se tiñe entonces con 0,1 % de cristal violeta 72 h después de la infección.

**8.4. INMUNIZACIÓN**

**[0091]** Se infectan ratones BALB/c de 6 semanas de edad tanto mediante la vía de aerosol con el virus, como se inmunizan intraperitonealmente (i.p.) con 10 µg de virus purificado. Para todas las inmunizaciones por refuerzo, se administran i.p 10 µg de virus purificado. Los sueros se recogen 7 días después de cada inmunización.

**8.5. RADIOINMUNOENSAYO**

**[0092]** El radioinmunoensayo se realiza como se ha descrito previamente (Zaghouani, H. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5645-6549). Brevemente, se recubren placas de microtitulación con 5 µg/ml de conjugado de péptido-BSA, saturado con 2 % de BSA en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incuban con diversa dilución de suero. Los anticuerpos unidos se revelaron usando anticuerpo monoclonal anti-kappa de ratón marcado con <sup>125</sup>I.

**15 8.6. RADIOINMUNOPRECIPITACIÓN**

**[0093]** La línea de linfocitos T humana H9 se infecta agudamente con el VIH. Cuatro días después de la infección, se marcan  $5 \times 10^7$  células infectadas con <sup>35</sup>S-cisteína, <sup>35</sup>S-metionina y <sup>3</sup>H-isoleucina a  $2 \times 10^6$ /ml en medio que contenía 100 µCi de cada isótopo por ml. Después de 20 h de marcado metabólico, los viriones radiactivos se sedimentan por centrifugación durante 1 h a 45.000 rpm. El sedimento se resuspende entonces en 1,0 ml de tampón de lisis que contiene 1 % de Triton X-100 y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM (PMSF). Se incuban aproximadamente 20 µl de sueros o 0,5 µg de anticuerpo monoclonal (en 20 µl de PBS) y 175 µl de lisado de virión durante la noche a 4 °C en 0,5 ml de tampón de inmunoprecipitación que contenía 0,5 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), 1 mg/ml de BSA, 2 % de Triton X-100 y fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4). Los complejos de antígeno-anticuerpo se unen a perlas de proteína A-Sepharose y se analizan por electroforesis sobre 10 % de gel de SDS-poliacrilamida.

**8.7. ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN DEL VIH-1**

**[0094]** El ensayo de neutralización *in vitro* se realiza como se ha descrito previamente (Nara, P.L. et al., 1987, AIDS Res. Hum. Retroviruses 3:283-302). Brevemente, se incuban diluciones sucesivas dobles de suero inactivado por calor durante 1 h a temperatura ambiente con 150-200 unidades formadoras de sincitios del virus VIH producidas en células H9. La mezcla de virus/suero se incuba durante 1 h a 37 °C con 50.000 células CEMss tratadas con DEAE-dextrano (adheridas a placas de microplaca usando poli-L-lisina), o 50.000 células H9 en suspensión. Después de la adsorción de virus, el virus sin unir se elimina y se añaden 200 µl de medio a cada pocillo. Cuatro días después de la infección, se eliminan 50 µl de medio de sobrenadante para la cuantificación de la proteína p24<sup>gag</sup> viral (Coulter Source, Inc.). El número total de sincitios en células CEMss se cuenta cinco días después de la infección. Los títulos de neutralización se calculan comparando con pocillos de control de virus solo, y se expresan como el recíproco de la mayor dilución de suero que redujo los números de sincitios más del 50 % o inhibió la síntesis de p24 más del 50 %.

**8.8. INDUCCIÓN DE RESPUESTA DE CTL**

**[0095]** Se inmunizan ratones BALB/c con 0,2 ml de suspensión viral que contenía  $10^7$  UFP de virus NDV quimérico. 7 días después, las células del bazo se obtienen y se re-estimulan *in vitro* durante 5 días con células del bazo irradiadas, solas o recubiertas con péptidos inmunogénicos, en presencia de 10 % de concanavalina A en el sobrenadante como se ha descrito previamente (Zaghouani, H. et al., 1992, J. Immunol. 148:3604-3609).

**8.9. ENSAYO DE CITÓLISIS**

**[0096]** Las células diana recubiertas con péptidos se marcan con  $\text{Na}^{51}\text{Cr}_4$  (100 µCi/ $10^6$  células) durante 1 h a 37 °C. Después de lavarse dos veces, las células se transfieren a placas de 96 pocillos con fondo en V, se añaden las células efectoras y se incuban a 37 °C en 7 % de CO<sub>2</sub>. Cuatro horas después, el sobrenadante se recoge y se cuenta. La máxima liberación de cromo se determina incubando las células con 1 % de detergente Nonidet P40. El porcentaje de lisis específica se calcula según la siguiente fórmula: [(cpm de muestras - cpm de liberación espontánea)/(cpm de la máxima liberación - cpm de la liberación espontánea)] x 100.

**9. EXPRESIÓN INTRACELULAR DE ARN DE NDV-CAT QUIMÉRICO**

**[0097]** Con el fin de aumentar la eficiencia de expresión de minigenomas de NDV, se construyó un plásmido (pT7-NDV-CAT-RB) para la expresión intracelular de ARN de NDV-CAT. Esto se logró insertando una ribozima derivada del virus de la hepatitis delta directamente después del extremo de la región no codificante 3' del ARN de NDV-CAT. La cotransfección de pTM1-NP, pTM1-P, pTM1-L y pT7-NDV-CAT-RT en células 293, 293T, COS1, CV1, 5 o fibroblasto de embrión de pollo (CEF) que se infectaron previamente con rVV-T7 o con virus de la variolovacuna de Ankara modificado que expresa la polimerasa T7 (MVA-T7) produjo altos niveles de actividad de CAT (Fig. 6). La actividad de CAT fue aproximadamente 100 a 1.000 veces superior a la lograda por la transfección de ARN directa del ARN de NDV-CAT.

#### 10 **10. RESCATE DE VIRUS NDV INFECCIOSO USANDO ADN RECOMBINANTE ESPECÍFICO DERIVADO DE ADN**

**[0098]** Con el fin de lograr el rescate de virus recombinante de un sistema derivado de plásmido dependiente de no virus, se ensambló un plásmido que permitía la expresión intracelular del antigenoma de longitud completa de NDV. El ADNc de NDV se purificó por RT-PCR en varios trozos a partir de ARN purificado de una cepa similar a 15 California de NDV (NDV-CL) (Meindl et al., 1974 *Virology* 58:457-463). Los trozos de ADNc se ligaron y se ensamblaron en un plásmido con promotor T7 y secuencias flanqueantes de ribozima, produciendo el plásmido pT7-NDV+RB. Se introdujo una mutación silenciosa que crea un nuevo sitio de restricción XmaI en el marco de lectura abierto L de pT7-NDV+RB. Las monocapas de células CEF en placas de 10 cm se infectaron con MVA-T7 a una multiplicidad de infección de aproximadamente 0,1. Una hora después, las células se transfectaron (lipofectaron) con 20 2,4 µg de pTM1-NP, 1,2 µg de pTM1-P, 1,2 µg de pTM1-L y 1,5 µg de pT7-NDV+RB. Después de 8 h de incubación a 37 °C, se añadió medio fresco. 20 h después de la transfección se añadió inhibidor del virus de la variolovacuna araC a una concentración final de 60 µg/ml. Dos días después de la transfección se añadió medio fresco que contenía 100 µg/ml de araC. El sobrenadante de células transfectadas en el día 4 después de la transfección se usó para inocular la cámara alantoidea de huevos de pollo embrionados de 10 días de edad. Después de dos días de 25 incubación a 37 °C, se recogió el líquido alantoideo y se encontró que era positivo para la presencia de virus NDV-CAT por hemaglutinación. El análisis del ARN aislado del virus rescatado confirmó la presencia del sitio XmaI recientemente insertado, confirmando que el virus se derivó del ADNc de plásmido clonado. Una representación esquemática del protocolo del procedimiento de rescate se muestra en la Fig. 7.

#### 30 **11. EXPRESIÓN DE UN GEN EXTRAÑO DE UN CISTRON INTERNO DE UN GENOMA DE NDV QUIMÉRICO**

**[0099]** Se construyó el plásmido pT7-NDV+CAT/RN-RB sustituyendo el marco de lectura abierto de HN en NDV-CL ADNc con el marco de lectura abierto de CAT. Se añadieron nucleótidos extra adicionales en las regiones no codificantes para permitir una longitud de nucleótido total del ARN de NDV quimérico resultante que fue divisible 35 por seis. La cotransfección de pT7-NDV+CAT/HN-RB junto con pTM1-NP, pTM1-P y pTM1-L en monocapas de CEF que se infectaron previamente con virus MVA-T7 produjo actividad de CAT como se mide en el día 2 después de la transfección (Fig. 8). Estos resultados demuestran que es posible usar NDV como vector para la expresión de genes extraños clonados como unidades transcripcionales en el genoma de NDV.

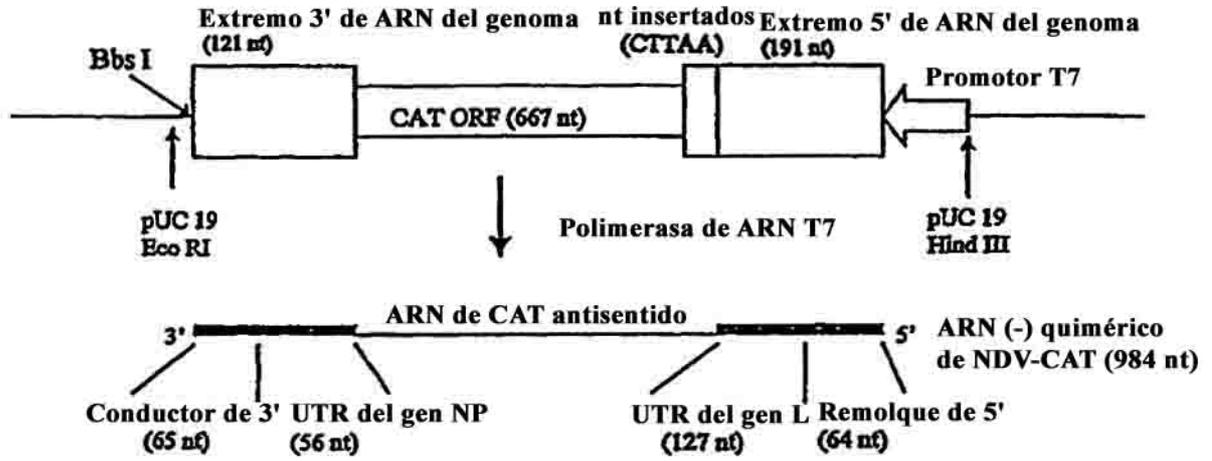
40

**REIVINDICACIONES**

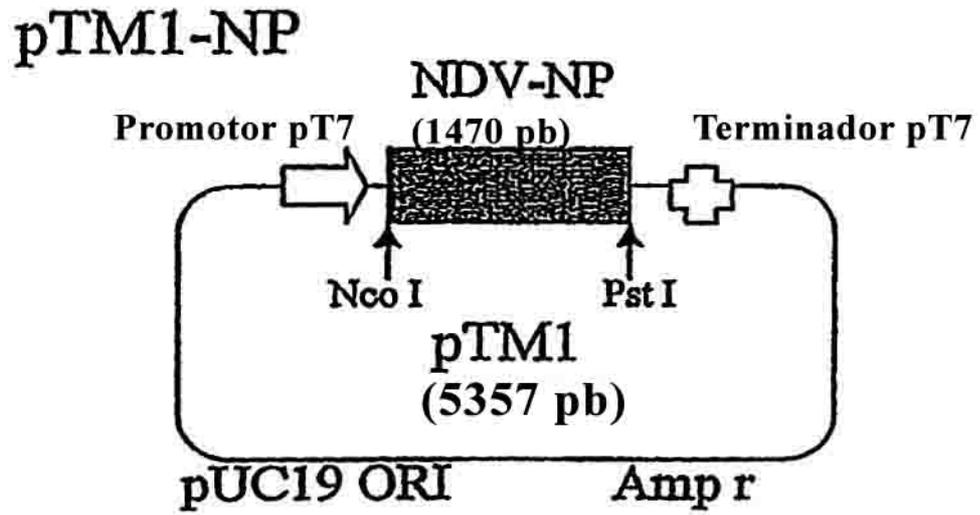
1. Una molécula de ARN recombinante que comprende una secuencia de ARN heterólogo flanqueada por las regiones no codificantes 3' y 5' de un genoma de ARN del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV),  
5 conteniendo dichas regiones un sitio de unión específico para una polimerasa de ARN de un virus de la enfermedad de Newcastle y señales requeridas para la replicación y transcripción mediadas por NDV, en la que la secuencia de ARN heterólogo es heterólogo para dicho genoma de ARN de NDV.
2. Una molécula de ARN recombinante según la reivindicación 1, que es una molécula híbrida en la que  
10 las regiones no codificantes 3' y 5' se ligan a la secuencia de ARN heterólogo.
3. Una molécula de ARN recombinante según la reivindicación 1, en la que la secuencia de ARN heterólogo se inserta dentro de una secuencia codificante de un gen de NDV, de forma que cuando se expresa un producto génico quimérico, el producto génico quimérico contiene la secuencia de péptidos heterólogos dentro de la  
15 proteína viral de NDV.
4. Una molécula de ARN recombinante según la reivindicación 1, en la que la secuencia de ARN heterólogo sustituye completamente o parcialmente la región codificante viral de un gen de NDV.
- 20 5. Una molécula de ARN recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en la que la secuencia de ARN heterólogo se inserta dentro de la secuencia codificante del gen HN, P, NP, M, F o L.
6. Una molécula de ARN recombinante según la reivindicación 5, en la que la secuencia de ARN heterólogo se inserta dentro de la secuencia codificante del gen HN o F.  
25
7. Una molécula de ARN recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la secuencia heteróloga es un gen de otro virus, un gen de un patógeno, un gen celular o un antígeno tal como un antígeno que es característico de un patógeno, una enfermedad autoinmunitaria, un alérgeno o un tumor.
- 30 8. Una molécula de ARN recombinante según la reivindicación 7, en la que la secuencia heteróloga es un antígeno que es característico de una enfermedad autoinmunitaria o un tumor.
9. Una molécula de ARN recombinante según la reivindicación 7, en la que la secuencia heteróloga es una glicoproteína, preferentemente una glicoproteína de la gripe o una glicoproteína del virus del herpes, virus de  
35 Epstein, virus del papiloma humano o virus respiratorio sincitial.
10. La molécula de ARN recombinante según la reivindicación 7, en la que dicho gen de otro virus se deriva del virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la gripe, virus respiratorio sincitial, virus de la enfermedad de Marek, virus de la enfermedad infecciosa de la bursa, virus de la bronquitis infecciosa, virus de la bursitis infecciosa, virus de la anemia del pollo, virus de la laringotraqueítis infecciosa, virus de la leucosis aviar, virus de la reticuloendoteliosis, virus de la gripe aviar, virus de la rabia, virus del moquillo felino, virus de la estomatitis vesicular, virus de la peste bovina o virus de la viruela porcina.
11. Una molécula de ARN recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la  
45 molécula de ARN recombinante tiene polaridad negativa.
12. Una molécula de ARN recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la molécula de ARN recombinante tiene polaridad positiva.
- 50 13. Una célula recombinante que comprende secuencias de nucleótidos que codifican una molécula de ARN recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y proteínas de polimerasa P y L de ARN de NDV.
14. Un virus de ARN quimérico de hebra negativa que comprende la molécula de ARN recombinante  
55 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
15. Un método de producción de un virus de ARN de hebra negativa quimérico, que comprende transfectar una célula huésped con secuencias de nucleótidos que codifican la molécula de ARN recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y las funciones virales requeridas para la replicación y transcripción, y

recuperar el virus quimérico del cultivo.

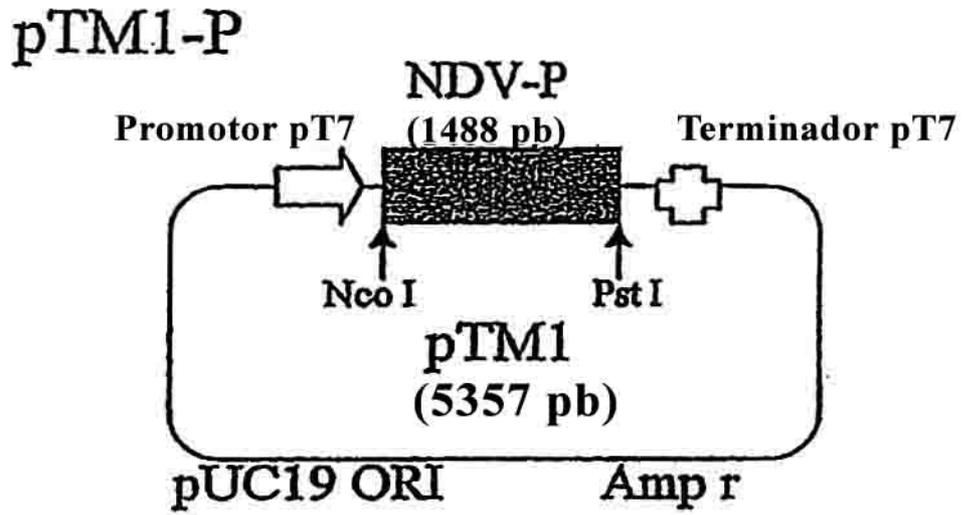
16. Una formulación de vacuna que comprende un virus de ARN de hebra negativa quimérico genéticamente manipulado según la reivindicación 14, codificando el genoma un epítoto heterólogo.
- 5
17. La formulación de vacuna de la reivindicación 16, en la que el epítoto heterólogo es una proteína inmunopotenciadora.
18. La formulación de vacuna de la reivindicación 16 o la reivindicación 17 para su uso como un medicamento.
- 10
19. Una molécula de ADN que codifica la molécula de ARN recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 15
20. Un virus de ARN de hebra negativa quimérico generado por el enfoque genético inverso, comprendiendo dicho virus una molécula de ARN recombinante que comprende una secuencia de ARN flanqueada por las regiones no codificantes 3' y 5' de un genoma de NDV, conteniendo dichas regiones un sitio de unión específico para una polimerasa de ARN de un NDV y señales requeridas para la replicación y transcripción mediadas por NDV.
- 20
21. Una molécula de ADN que codifica una molécula de ARN recombinante que comprende una secuencia de ARN flanqueada por las regiones no codificantes 3' y 5' de un genoma de NDV, conteniendo dichas regiones un sitio de unión específico para una polimerasa de ARN de un NDV y señales requeridas para la replicación y transcripción mediadas por NDV.
- 25
22. Un método de producción de una molécula de ARN recombinante, que comprende transfectar una célula huésped con la molécula de ADN de la reivindicación 21 y las funciones virales requeridas para la replicación y transcripción, y recuperar la molécula de ARN recombinante del cultivo.



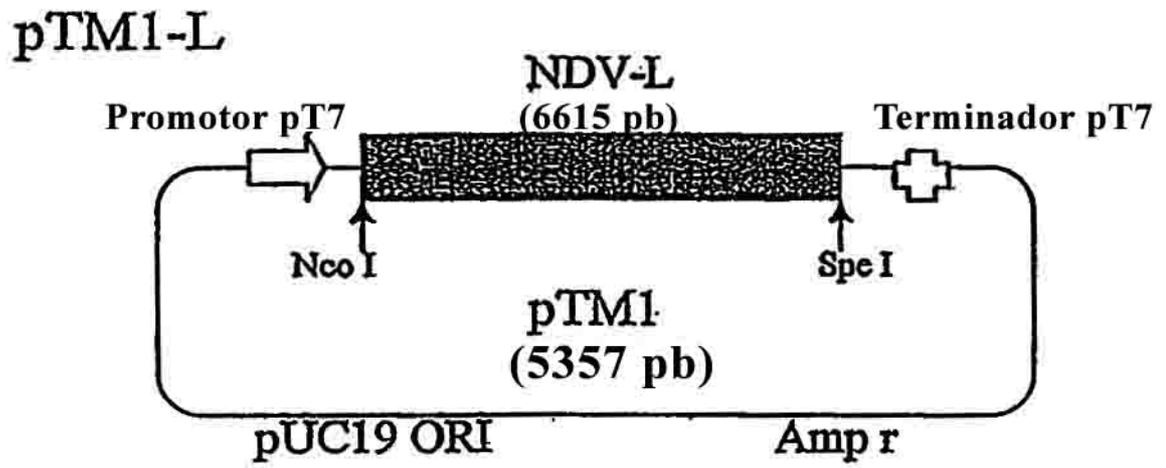
**FIG. 1**



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



**FIG. 2C**

5' ACCAAACAGAGAAUCCGUAAGGUACGUUAAAAGCGAAGGAGCAAUUGAAGUCGCACGGG  
UAGAAGGUGUGAAUUCGAGUGCGAGCCCGAAGCACAAACUCGAGAAAGCCUUCUACCAAC-  
-----gen CAT (667 nt)-----cuuaa  
CGACAAUCACAUAUUAUAGGCUCUUUUUCUGGCCAAUUGUAUCCUUGUUGAUUUAAUCAUA  
CUAUGUUAGAAAAAGUUGAACUCGACUCUUAGGACUCGAACUCGAAUCUCAAUAAAUGU  
CUUAGAAAAAGAUUGCGCACAGUUUUUCUUGAGUGUAGUCUUGUCAUUCACCAAUCUUUGU  
UUGGU-3'

**FIG. 3**

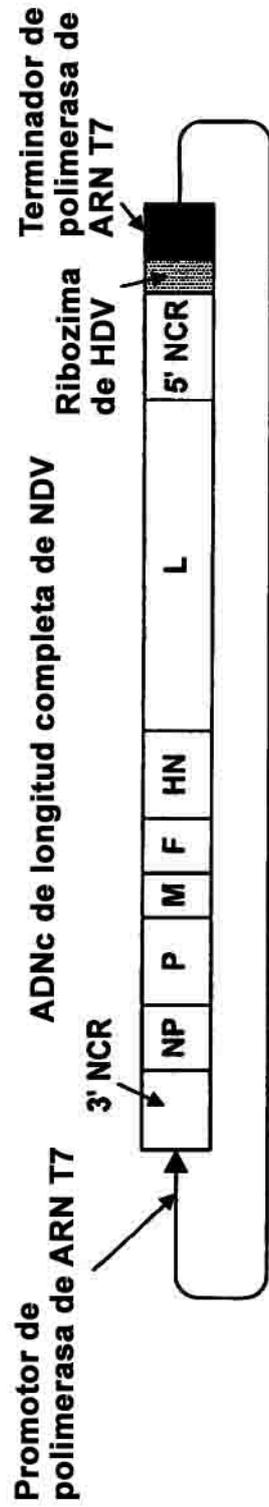
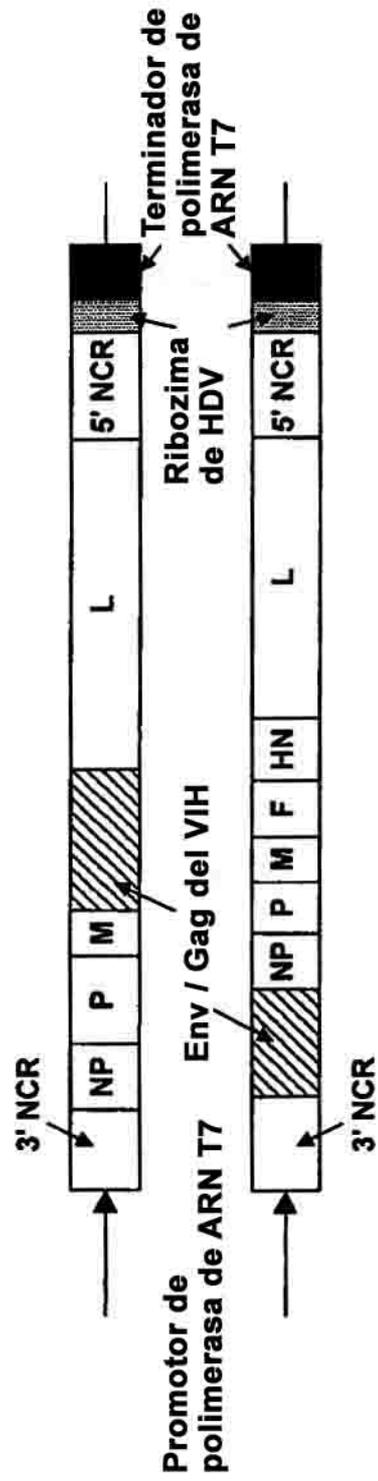


FIG. 4A



**FIG. 4B**

```

1   TGGTTTGTCTCTTAGGCATTCCATGCAATTTTTCGCTTCCTCGTTAACTT   50
1   TGGTTTGTCTCTTAGGCATTCAATGCTATTTTCCGCTTCCTCGTTAACTT   50
    *****
51  CAGCGTGCCCATCTTCCACACTTAGAGCTCACGCTCGGGCTTCGTGTTG    100
51  CAACGTGCCCATCTTCCACACTTAGAGCTCACGCTCGGGCTTCGTGTTG    100
    ** *****
101 AGCTCTTTCGGAAGAtGGTTG      121
101 AGCTCTTTCGGAAGACGGTTG     121
    *****

```

extremo 5'

```

1   ACCAAACAAAGATTTGGTGAATGACAAGACTACACTCAAGAATAACTGTG   50

51  cgcaatctttttctAAGACATTTATTTGAGTTCGAGTTCGAGTCCTAAGG   100
    nnnnnnAAGACATTTATTTGAGTTCGAATTCGAGCTCTAAGG
    *****
101 AGTCGGAGTTCAACTTTTTTCTAACATAGTATGATTAAATCAACAAGGAT   150
    AGTCGGAGTTCAATTTTTTCTAACATAGTATAATTAAATCACCAAGGAT
    *****
151 ACAATTGGCCAGAAAAGGAGCCTATTAATATGTGATTGTCG      191
    ACAATTGGCCAGAAAAGGAGCCTATTAATATGTGATTTTCG
    *****

```

**FIG. 5**

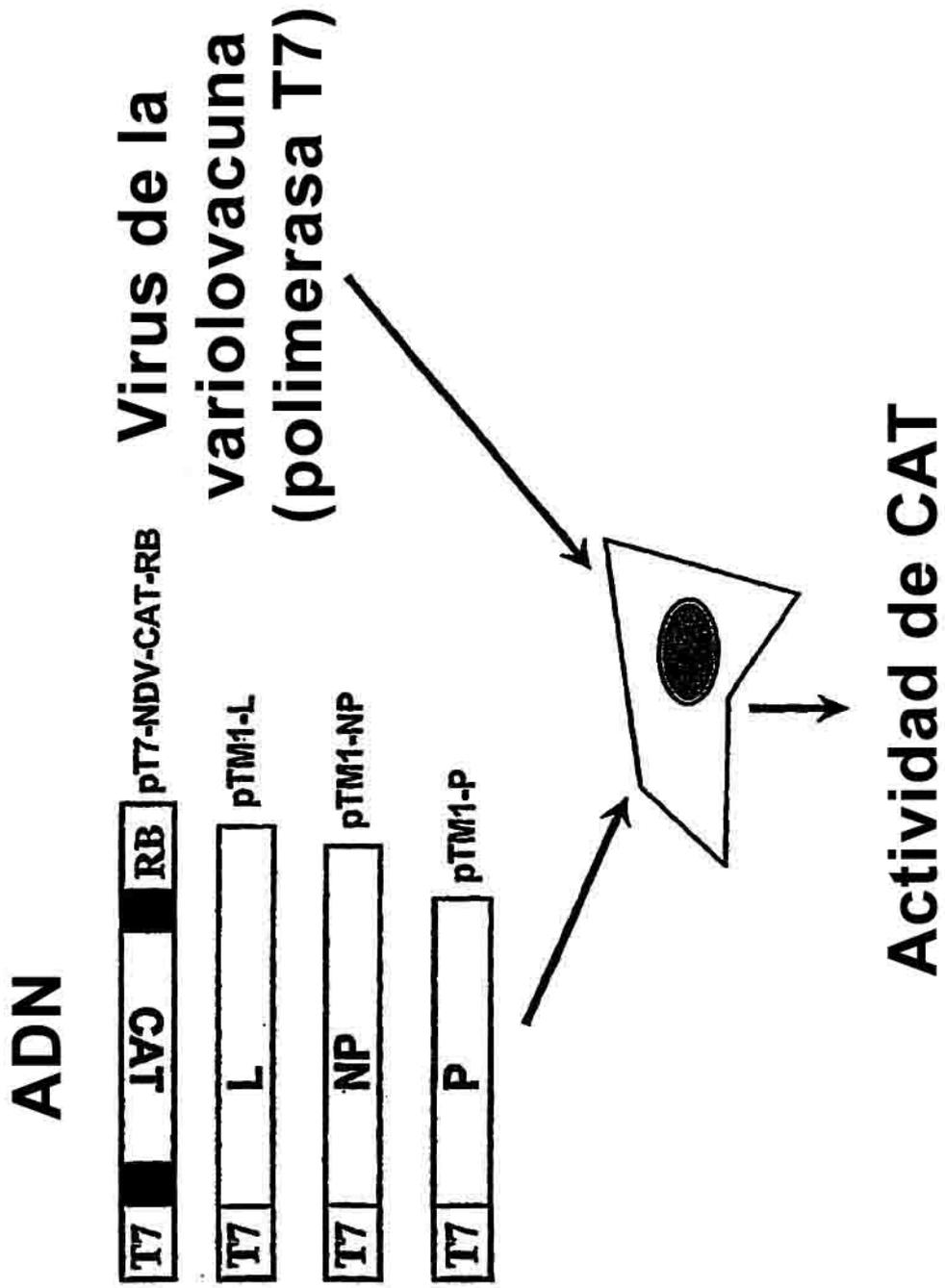
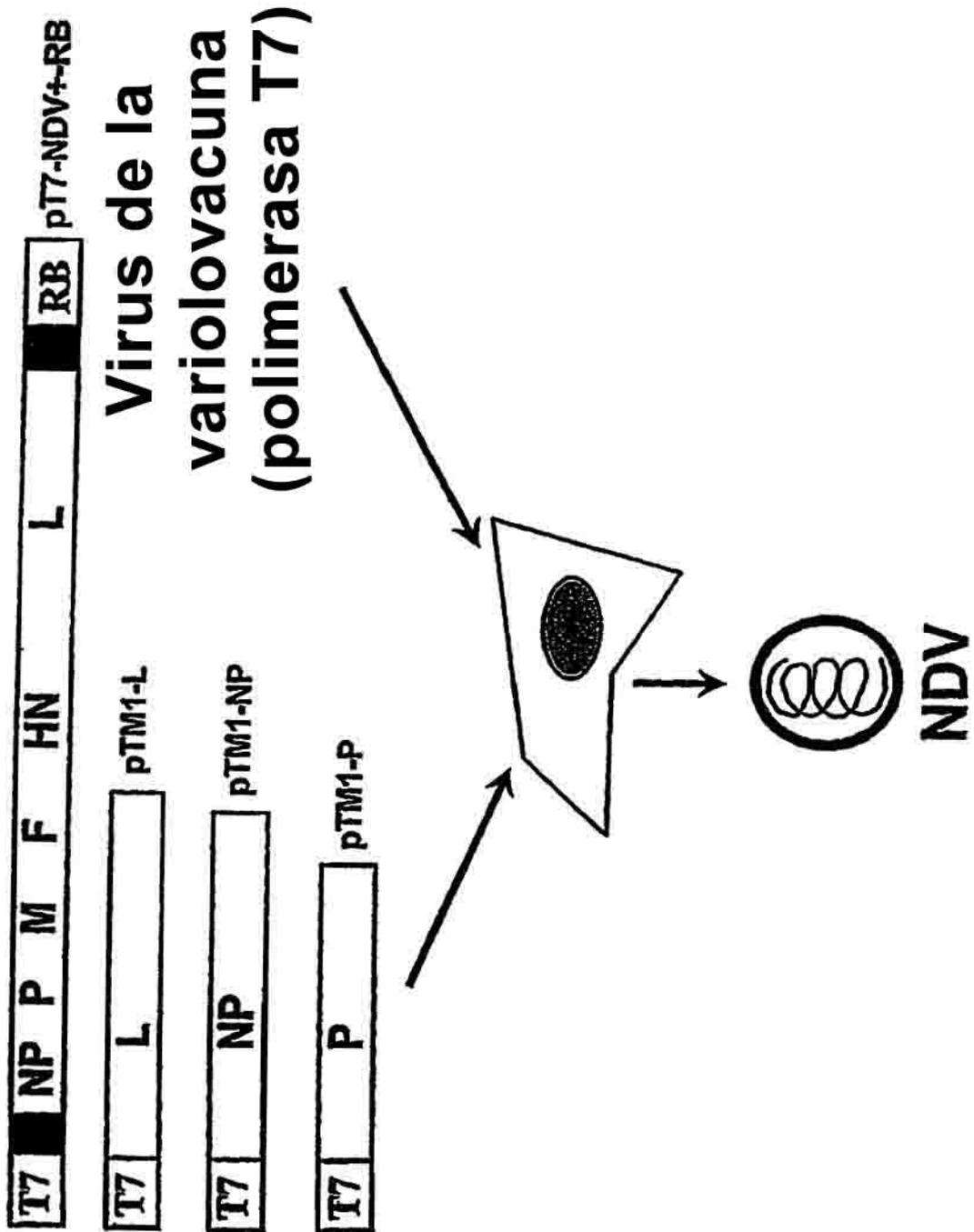
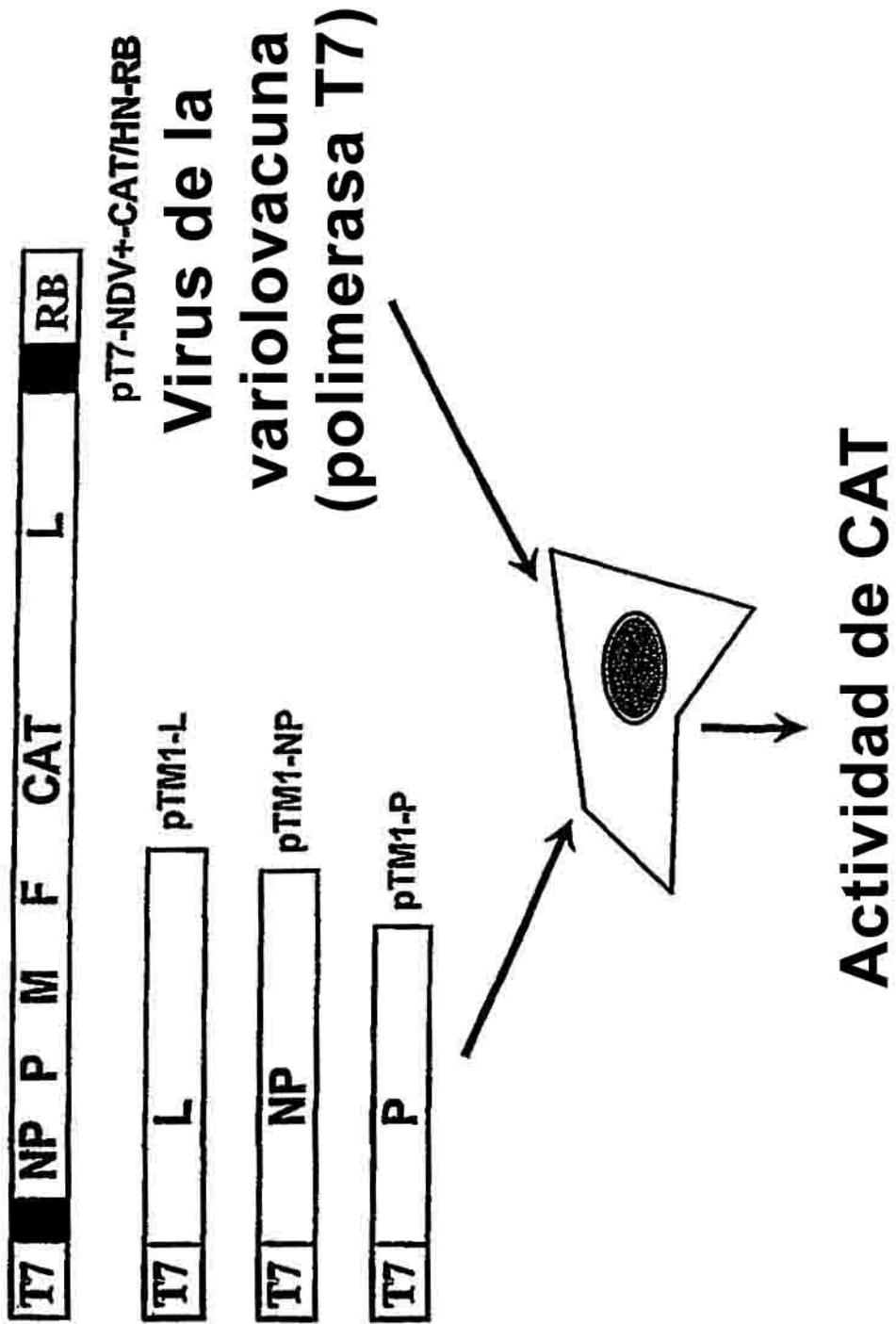


FIG. 6



**FIG. 7**



**FIG. 8**