

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 968**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C07K 14/175 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2011 PCT/NL2011/050631**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO12039607**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2011 E 11760878 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2618839**

54 Título: **Métodos para producir partículas de replicón de bunyavirus**

30 Prioridad:

29.03.2011 US 201161468597 P
20.09.2010 EP 10177709

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.09.2018

73 Titular/es:

STICHTING WAGENINGEN RESEARCH (100.0%)
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB Wageningen, NL

72 Inventor/es:

KORTEKAAS, JEROEN, ALEXANDER y
MOORMANN, ROBERTUS, JACOBUS, MARIA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 679 968 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

Métodos para producir partículas de replicón de bunyavirus

Campo: La invención se refiere al campo de los virus recombinantes. Más específicamente, la invención se refiere a métodos para generar partículas recombinantes de bunyavirus que son incapaces de propagación autónoma. Las partículas de bunyavirus resultantes se pueden utilizar como una vacuna para proteger a un mamífero contra una enfermedad infecciosa mediada por bunyavirus, y se puede utilizar como vector para la transducción de un gen exógeno.

La familia Bunyaviridae se divide en cinco géneros, de los cuales cuatro (Orthobunyavirus, Nairovirus, Phlebovirus y Hantavirus) incluyen numerosas especies de virus que son capaces de provocar una enfermedad grave tanto en animales como en humanos. Ejemplos bien conocidos son hantaanvirus (HTNV, género Hantavirus), virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHFV, género Nairovirus) y virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV, género Phlebovirus).

En el campo veterinario, el RVFV es uno de los bunyavirus más temidos. La transmisión del RVFV entre rumiantes ocurre por la picadura de mosquitos infectados, mientras que se considera que la infección en humanos ocurre predominantemente a través de aerosoles liberados de productos de animales contaminados. Las tasas de mortalidad en rumiantes adultos varían desde 10 hasta 20%. Las tasas de mortalidad en animales aún no nacidos y jóvenes pueden ser más dramáticas, acercándose al 100%. Aunque la tasa de mortalidad humana históricamente se estima en aproximadamente el 2%, se reportaron tasas de mortalidad considerablemente más altas después de brotes recientes. Aunque el virus se limita actualmente al continente africano y la Península Arábiga, los mosquitos que transmiten el RVFV no están restringidos a estas áreas. Esto explica la creciente preocupación por las incursiones del RVFV en otras partes del mundo, que incluyen Europa, Asia y las Américas.

Los miembros de la familia de Bunyavirus contienen un genoma de ARN de tres segmentos, que está compuesto por un segmento grande (L), medio (M) y pequeño (S). Todos los miembros de la familia producen la proteína nucleocápsida (N) estructural a partir del segmento del genoma S, la proteína polimerasa vírica del segmento del genoma L y las glucoproteínas estructurales G1 y G2 del segmento del genoma M. Las proteínas no estructurales están codificadas por los segmentos S (denominados NSs) y M (denominados NSm) de los Phlebovirus y Orthobunyavirus. Curiosamente, el segmento M de los nairovirus codifica diversas proteínas estructurales y no estructurales y síntesis de glucoproteínas y el procesamiento de estos virus es bastante distinto de otros miembros de la familia Bunyaviridae. Sin embargo, el experto es sin duda capaz de aplicar las enseñanzas de la presente invención para la generación de partículas de replicón de nairovirus.

El segmento M del RVFV codifica las glucoproteínas estructurales G2 (denominadas en general como Gn) y G1 (denominadas en general como Gc) y por lo menos dos proteínas no estructurales, que se denominan colectivamente NSm. El segmento M codifica un solo ARNm con múltiples sitios de iniciación de traducción. Los productos de traducción son Gn, Gc y por lo menos dos proteínas NSm. Los segmentos genómicos víricos contienen regiones no traducidas (UTR) en ambos extremos 3' y 5' que sirven como promotores para la replicación del segmento y para la transcripción de los marcos de lectura codificados.

El reciente establecimiento de un sistema de genética inversa para el RVFV ha proporcionado nuevos conocimientos importantes sobre su biología. Unos años después del primer rescate exitoso del RVFV completo del ADNc clonado, Habjan et al. describieron el empaque de un minigenoma indicador en partículas similares a virus (VLP) (Habjan et al. 2009. *Virology* 385, 400-408). Las VLP se produjeron por expresión transitoria de las proteínas NSm, Gn, Gc, N y L en presencia de un minigenoma indicador. Las proteínas N y L indujeron la expresión de una proteína indicadora desde el minigenoma replicado y las glucoproteínas estructurales empaclaron posteriormente el minigenoma en las VLP. Se mostró que estas VLP transportan el minigenoma indicador a las células receptoras. Aunque se observó la transcripción primaria en estas células, la replicación del minigenoma dependía de la producción de las proteínas N y L desde los plásmidos transfectados. Las células que solo se infectan con las VLP y que no se cotransfectan con construcciones que expresan proteínas N y L, muestran una expresión limitada de proteína vírica. El genoma vírico no se replica y no existe amplificación del genoma en estas células. Por lo tanto, solo se produce la transcripción primaria del genoma vírico en estas células.

Aunque los RVFV, HTNV y CCHFV provocan enfermedades graves con alta mortalidad en los humanos, no existen vacunas disponibles para la prevención de estas enfermedades en humanos, y no se registran agentes antivíricos para el tratamiento posterior a exposición. El desarrollo de dichas herramientas de control se ve severamente complicado por el hecho de que estos virus se deben manejar bajo una alta contención de bioseguridad. El RVFV también provoca una enfermedad grave con alta mortalidad en el ganado. Las vacunas efectivas, pero no seguras, están registradas para uso fuera del continente africano.

Por lo tanto, subsiste una necesidad urgente de desarrollar métodos y medios para la producción segura y eficiente de partículas de bunyavirus.

La presente invención divulga partículas de replicón de bunyavirus que no se propagan que son capaces de replicación autónoma del genoma. Las partículas de replicón de bunyavirus (BRP) se produjeron mediante transcomplementación

- de las glucoproteínas estructurales G1 (G1 del RVFV se conoce como Gc) y G2 (G2 del RVFV se conoce como Gn) tanto en presencia como en ausencia de regiones de codificación de NSm. Las BRP se produjeron hasta títulos de 10E7 partículas infecciosas/ml. Las partículas resultantes se pueden utilizar para estudiar todos los aspectos del ciclo de vida vírico fuera de las instalaciones de contención de bioseguridad tanto in vitro como in vivo. Adicionalmente, las partículas se pueden utilizar en pruebas de neutralización de virus que se pueden realizar fuera de las instalaciones de contención de bioseguridad y los antígenos producidos se pueden utilizar para ELISA y otras pruebas serológicas. Más aún, los métodos descritos en este documento facilitarán el desarrollo de productos terapéuticos y vacunas que combinen óptimamente la seguridad de las vacunas inactivadas con la eficacia de las vacunas atenuadas vivas. Los métodos también se pueden aplicar para el establecimiento de sistemas novedosos de suministro de genes.
- 5 En un primer aspecto, la invención proporciona un método para generar una BRP que no se puede propagar recombinante, el método comprende: A) proporcionar una célula eucariota con medio de crecimiento; B1) proporcionar la célula eucariota con suficiente polimerasa de ARN dependiente de ADN, por ejemplo, polimerasa T7; B2) proporcionar la célula eucariota con suficiente proteína (NSm)GnGc de bunyavirus; B3) proporcionar la célula eucariota con un vector que comprende una copia de ADN (ADNc) de un segmento del genoma L de bunyavirus que se flanquea en el extremo 5' por un promotor T7, y en el extremo 3' con ADNc que codifica una secuencia de ribozimas; B4) proporcionar la célula eucariota con un vector que comprende un ADNc de un segmento del genoma S de bunyavirus o parte de un segmento del genoma S de bunyavirus que por lo menos comprende el gen N y las URT 3' y 5', que se flanquean en el extremo 5' por un promotor T7 y en el extremo 3' con ADNc que codifica una secuencia de ribozimas; y, opcionalmente, B5) proporcionar la célula eucariota con un vector que comprende un ADNc de un segmento del genoma M de bunyavirus del cual se ha inactivado funcionalmente la región de codificación de GnGc, el ADNc que codifica el segmento del genoma entre las URT 3' y 5' se flanquea en el extremo 5' por un promotor T7 y en el extremo 3' con ADNc que codifica una secuencia de ribozimas; C) generar una partícula de replicón de bunyavirus recombinante que se puede aislar del medio de crecimiento; en el que la secuencia de las etapas de B1, B2, B3, B4 y B5 es aleatoria y todo o parte de estas etapas se puede realizar de forma simultánea.
- 10 15 20 25 Los ADN de los segmentos de los genomas L, S y M de bunyavirus están presentes en el vector en la orientación de sentido genómico o en la orientación de sentido antígenómico. Cuando los ADN de los segmentos de los genomas L, S y M de bunyavirus están presentes en el vector en la orientación de sentido genómico, se prefiere que las células se proporcionen con plásmidos que produzcan las proteínas N y L.
- 30 Los ADNc de los segmentos del genoma de bunyavirus en un método para generar una partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la invención se flanquean en el extremo 5' mediante una secuencia promotora para una polimerasa de ARN dependiente de ADN. Dicha secuencia promotora para una polimerasa de ARN dependiente de ADN se selecciona de cualesquier secuencias promotoras conocidas de polimerasas de ARN dependiente de ADN tales como, pero no limitadas a, la secuencia promotora de una polimerasa I de ARN eucariota tal como, por ejemplo, un promotor para polimerasa I de ARN de murino, SP6, T3 y T7. Por ejemplo, un método de acuerdo con la invención en el que una célula eucariota se proporciona con suficiente polimerasa T3 y en la que los segmentos genómicos de Bunyavirus se flanquean por una secuencia promotora T3 o un método de acuerdo con la invención en el que una célula eucariota se proporciona con suficiente polimerasa SP6 y en el que el ADNc que codifica segmentos genómicos de Bunyavirus se flanquean por una secuencia promotora SP6, también se proporcionan por la invención. T7 es una polimerasa de ARN dependiente de ADN preferida. Aunque la descripción y las reivindicaciones se refieren a polimerasa T7, se debe entender que la invención no se limita a polimerasa T7 sino que incluye otra polimerasa de ARN dependiente de ADN tal como, por ejemplo, polimerasa T3 y polimerasa SP6. Una secuencia promotora preferida para una polimerasa T7 es TAATACGACTCACTATAG.
- 35 40 45 50 El ADN copia de segmentos genómicos de Bunyavirus o fragmentos de los mismos se flanquea en los extremos 3' por un ADNc que codifica una secuencia de ribozimas que media la formación del extremo 3' del ARN mediante autodivisión del ARN naciente. Una secuencia de ribozimas preferida es una secuencia de ribozimas del virus delta de hepatitis (HDV). Una secuencia de terminación que media la terminación de la polimerasa de ARN dependiente de ADN puede adicionalmente estar presente distal al ADNc que codifica la secuencia de ribozimas. En una realización preferida, la polimerasa de ARN dependiente de ADN es polimerasa T7 y la secuencia de terminación es una secuencia de terminación de transcripción de T7. Las secuencias promotoras para polimerasas de ARN dependiente de ADN, tal como polimerasa T7, y secuencias de terminación tal como una secuencia de terminación de transcripción T7, son conocidas por el experto.
- 55 El término "partícula de replicón de bunyavirus recombinante" se refiere a una partícula de bunyavirus que comprende por lo menos un segmento del genoma L de bunyavirus y (por lo menos) una parte de un segmento del genoma S de bunyavirus que comprende el gen N y las URT 3' y 5'. Estos segmentos genómicos codifican las proteínas que se requieren para la transcripción y la replicación de estos segmentos genómicos víricos en una célula infectada, lo que da como resultado la replicación y, por lo tanto, la amplificación de los segmentos de los genomas L y S en una célula infectada. Las células que se infectan con una partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la invención expresan altos niveles de por lo menos las proteínas L y N de bunyavirus.
- 60 El término "segmento del genoma L" se refiere a un segmento del genoma L sustancialmente completo. El término "sustancialmente completo" se utiliza para indicar que el segmento del genoma L comprende elementos que actúan en cis que median la replicación del segmento del genoma L y que median la expresión funcional del gen L. El término

“sustancialmente completo” indica que las secuencias que no están implicadas en la replicación del segmento del genoma L o en la expresión funcional del gen L se pueden eliminar o sustituir. El término “expresión funcional” se refiere a la expresión de una proteína L, una polimerasa de ARN dependiente de ARN vírico, que es capaz de mediar en la replicación y la transcripción de un segmento del genoma de bunyavirus o minigenoma de bunyavirus. El término “minigenoma” se refiere a una molécula de ARN que comprende las regiones 5' y 3' de un segmento del genoma de bunyavirus que funciona en la replicación del segmento, pero que carece de por lo menos una región de codificación de bunyavirus presente en el segmento del genoma de tipo silvestre. Un minigenoma puede comprender adicionalmente un gen exógeno tal como, pero no limitado a, un gen marcador tal como una proteína fluorescente, beta-glucuronidasa y beta-galactosidasa. El término “segmento del genoma L a partir del cual se ha inactivado funcionalmente la región de codificación L” se refiere a un segmento del genoma L, que comprende las UTR 3' y 5' del segmento del genoma L.

El término “segmento del genoma S que comprende el gen N” se refiere a un segmento del genoma S, que comprende las regiones no traducidas de ambos extremos 3' y 5' del segmento del genoma S y por lo menos las secuencias de nucleótidos para la expresión de la proteína N, tal como secuencias de nucleótidos para la transcripción del gen N y traducción de la transcripción del gen N. El término “segmento del genoma S a partir del cual se han inactivado funcionalmente las regiones NS y N” se refiere a un segmento del genoma S, que comprende las UTR 3' y 5' y la región intergénica no traducida del segmento del genoma S.

El término “segmento del genoma M a partir del cual se ha inactivado funcionalmente la región de codificación de GnGc” se refiere a un segmento del genoma M, que comprende las regiones no traducidas de ambos extremos 3' y 5' del segmento del genoma M.

Los segmentos del genoma L, S y M de bunyavirus se clonan preferiblemente en vectores de expresión eucarióticos estándar, por lo que los segmentos del genoma se flanquean por un promotor de polimerasa de ARN dependiente de ADN, preferiblemente un promotor T7 y una secuencia de ribozimas de HDV. Los vectores adecuados comprenden pBluescript (Stratagene), plásmidos pUC tales como preferiblemente pUC57 (Genscript), y vectores de medio y bajo número de copias tales como pBR322 y derivados de los mismos (Mobictec, Alemania), pACYC184 (Chang and Cohen, 1978) y pCC1 (Epicenter Biotechnologies, Madison, WI). Algunos segmentos del genoma de Bunyavirus, especialmente los segmentos del genoma L, son más estables cuando se clonan en vectores de medio o bajo número de copias, preferiblemente pCC1.

El término funcionalmente inactivado se refiere a un gen cuya actividad del ARN o proteína codificada es menor del 10% bajo las mismas condiciones de la actividad del ARN o proteína codificada de un gen que no está funcionalmente inactivado, más preferido menos del 5%, más preferido menos del 2%, más preferido menos del 1%. El término “funcionalmente inactivado” indica aún más preferiblemente un gen que no se expresa porque no está transcrito o traducido, o un gen del cual la proteína codificada no está activa, por ejemplo, mediante la alteración o supresión de uno o más nucleótidos dentro de la región de codificación del gen. El término “gen funcionalmente inactivado” preferiblemente es un gen del que se han eliminado parte o la totalidad de las secuencias de codificación.

El orden en el que una célula eucariota se proporciona con suficiente polimerasa T7, suficiente proteína (NSm)GnGc de bunyavirus, un segmento del genoma L de bunyavirus, un segmento del genoma S de bunyavirus que comprende por lo menos el gen N y, opcionalmente, un segmento del genoma M de bunyavirus del cual se ha inactivado funcionalmente la región de codificación de (NSm)GnGc, es aleatorio. Todo o parte de estas etapas se puede realizar posterior una a la otra, o de forma simultánea. Será claro para el experto que el segmento del genoma L de bunyavirus y/o un segmento del genoma S de bunyavirus puede comprender una supresión funcional del gen L y/o gen N, respectivamente, cuando la célula se proporciona con enzima de polimerasa de ARN que se codifica por un segmento del genoma L de bunyavirus y/o una proteína N que se codifica por un segmento del genoma S de bunyavirus.

Por razones prácticas, se prefiere que primero se proporcione una célula eucariota con un segmento del genoma L de bunyavirus, un segmento del genoma S de bunyavirus que comprende el gen N y, opcionalmente, un segmento del genoma M de bunyavirus del cual se ha inactivado funcionalmente la región de codificación de (NSm)GnGc, la estirpe celular resultante que alberga un segmento del genoma L de bunyavirus, un segmento del genoma S de bunyavirus que comprende el gen N y, opcionalmente, un segmento del genoma M de bunyavirus del cual se ha inactivado funcionalmente la región de codificación de (NSm)GnGc, posteriormente se proporciona con suficiente proteína (NSm)GnGc de bunyavirus para mediar el empaque eficiente de los segmentos del genoma de bunyavirus en las BRP.

Alternativamente, una estirpe celular primero se proporciona con suficiente polimerasa T7 y suficiente proteína (NSm)GnGc de bunyavirus mediante infección o transfección de una construcción que codifica estas proteínas, seguido por la provisión de la célula con un segmento del genoma L de bunyavirus, un segmento del genoma S de bunyavirus que comprende el gen N y, opcionalmente, un segmento del genoma M de bunyavirus del cual se ha inactivado funcionalmente la región de codificación de (NSm)GnGc.

El término “suficiente polimerasa T7” se refiere a la cantidad de polimerasa T7 que se proporciona a una célula eucariota que es suficiente para mediar la transcripción eficiente de moléculas de ADNc que codifican el segmento del genoma L de bunyavirus y el segmento completo del genoma S o la parte de un segmento del genoma S de bunyavirus que por lo menos comprende el gen N, que se flanquean por una secuencia de los promotores T7 y ADNc que codifica una ribozima de HDV. Se encontró que fue ineficiente el rescate de un bunyavirus al proporcionar una célula eucariota

que expresa de forma estable la polimerasa de ARN T7 bajo el control de un promotor de citomegalovirus tal como, por ejemplo, la estirpe celular BSR T7/5 (Buchholz et al. 1999. J. Virol. 73: 251-259) con uno o más vectores que comprenden un segmento del genoma L de bunyavirus, un segmento del genoma M de bunyavirus, y/o un segmento del genoma S de bunyavirus, o partes funcionales de uno o más de los segmentos del genoma de bunyavirus.

- 5 Se obtuvo una eficiencia de rescate reproducible y mejorada cuando las células eucariotas estaban recién infectadas o transfectadas con un vector de expresión que codifica la polimerasa T7.

Por lo tanto, en un método preferido de acuerdo con la invención, la célula eucariota se proporciona con suficiente polimerasa T7 al transfectar o infectar recientemente la célula eucariota con un vector de expresión que codifica la polimerasa T7.

- 10 En una realización, el vector de expresión es un plásmido que codifica la polimerasa T7. Los plásmidos adecuados son, por ejemplo, pCAGGS, y ADNpc. En una realización preferida, el vector de expresión es un virus recombinante o vector vírico que codifica la polimerasa T7. Un virus o vector vírico adecuado es, por ejemplo, un vector retrovírico defectuoso de replicación tal como un vector lentivírico, por ejemplo, un vector basado en VIH o un vector basado en EIAV, o un vector basado en MMLV defectuoso de replicación. Se proporciona un virus o vector vírico adicional adecuado mediante un vector adenovírico con replicación defectuosa y un vector baculovírico. Un virus o vector vírico preferido es un poxvirus defectuoso en replicación tal como, por ejemplo, un virus a base de vaccinia. En un método aún más preferido de acuerdo con la invención, la célula eucariota se proporciona con suficiente polimerasa T7 al infectar la célula eucariota con un vector de expresión a base del virus de la viruela aviar (FPV) que codifica la polimerasa T7. El FPV puede ser competente en replicación o de replicación defectuosa.

- 20 Sin estar limitados por la teoría, una razón para la eficiencia de rescate mejorada y reproducible al utilizar un vector de expresión a base de FPV es que el nivel de polimerasa T7 es suficientemente alto para permitir la transcripción eficiente de los segmentos del genoma de ADNc de bunyavirus. Una razón adicional podría ser que los FPV producen su propia enzima de protección. La protección de las transcripciones T7 podría estabilizar el ARN bunyavírico que se produce a partir del ADNc, protegiendo al ARN de la degradación.

- 25 Una ventaja adicional de un FPV es que pertenece al género Avipoxvirus y es capaz de propagarse en células aviares. En células no aviares tales como, por ejemplo, células de mamífero, la replicación del FPV es abortiva sin evidencia de producción de virus infeccioso. Por lo tanto, cuando la célula eucariota es una célula eucariota no aviar, se utiliza preferiblemente un vector de expresión basado en FPV competente en replicación o un vector de expresión basado en FPV deficiente en replicación para un método de la invención. Cuando la célula eucariota es una célula eucariota aviar, se prefiere que se utilice un vector de expresión basado en FPV deficiente en replicación para un método de la invención.

El término "proporcionar proteína (NSm)GnGc" indica que por lo menos se proporcionan las proteínas Gn y Gc de bunyavirus. Adicionalmente a la proteína Gn y Gc, también se puede proporcionar una o más proteínas NSm.

- 35 El término "suficiente proteína (NSm)GnGc de bunyavirus" se refiere a la cantidad de proteínas (NSm)GnGc que se proporciona a una célula eucariota que es suficiente para mediar el empaque eficiente de los segmentos del genoma de bunyavirus en una partícula de replicación de bunyavirus recombinante. Se puede proporcionar una célula con suficientes proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus al transfectar o infectar la célula con un vector que media la expresión de las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus. Si un segmento del genoma M de bunyavirus del cual se ha inactivado funcionalmente la región de codificación de (NSm)GnGc, está presente en la célula eucariota, se prefiere que no exista superposición de secuencia entre la secuencia de codificación de proteína (NSm)GnGc de bunyavirus en la célula eucariota y el segmento del genoma M de bunyavirus para evitar la generación de un empaque de bunyavirus competente.

- 45 Preferiblemente se proporciona una célula eucariota con suficientes proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus al transfectar la célula eucariota con un plásmido de expresión que codifica las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus. Dicho plásmido de expresión preferiblemente comprende una región promotora que comprende secuencias reguladoras que controlan la expresión de las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus. Se conocen en la técnica secuencias promotoras adecuadas, que incluyen, pero no se limitan a, las secuencias promotoras de un virus tal como citomegalovirus (CMV), o una región promotora de un gen de mantenimiento tal como beta-actina, por ejemplo, un promotor de actina de pollo. Si la introducción de dicho vector(es) de expresión da como resultado la muerte de células que producen altos niveles de proteínas debido a su toxicidad, la dilución en el punto final produce clones que expresan niveles tolerables de estas proteínas. Se encontró que las células seleccionadas eran tolerables para niveles de expresión más altos proporcionados por la (re)introducción posterior de vectores de expresión que producen (NSm)GnGc.

- 55 La invención proporciona adicionalmente una estirpe celular de replicación eucariota que expresa proteínas (NSm)GnGc y que comprende el segmento del genoma L de bunyavirus y el segmento del genoma S de bunyavirus o por lo menos parte de un segmento del genoma S de bunyavirus que comprende el gen N y las URT 3' y 5'. Se encontró que los niveles bajos de (NSm)GnGc fueron suficientes para evitar la pérdida de los segmentos del genoma de bunyavirus a partir de las células. Sin estar limitado por la teoría, la expresión de las proteínas (NSm)GnGc, aunque a bajos niveles, permite la producción de BRPs cuyas células se reinfectan de forma continua. Para producir las BRP, la estirpe celular

de replicación eucariota se proporciona con suficiente proteína (NSm)GnGc de bunyavirus mediante introducción repetitiva de un vector que proporciona proteína (NSm)GnGc de bunyavirus.

5 En una realización más preferida, la célula eucariota en un método de acuerdo con la invención se proporciona con proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus al infectar la célula eucariota con un vector vírico que transduce las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus. En una realización, dicho vector vírico es un vector con base en adenovirus, un vector con base en retrovirus o un vector con base en herpesvirus. Un vector vírico preferido que transduce las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus es un vector con base en paramixovirus. Un paramixovirus preferido es del género Avulavirus, que incluye paramixovirus aviar. Un paramixovirus aviar preferido es el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). Un NDV preferido comprende un clon de ADNc recombinante de la cepa LaSota de NDV, denominada NDFL (Peeters et al. 1999. J. Virol. 73: 5001-5009), en el que un gen GnGc optimizado por codón se flanquea al introducir nuevamente secuencias de inicio y detención de transcripción (Kortekaas et al. 2010. Vaccine 28: 4394-4401). Un NDV preferido adicional es un vector derivado de una cepa virulenta recombinante tal como, por ejemplo, GB Texas, Italien, Milano y Herts '33/56, que transduce proteínas (NSm)GnGc. El vector preferiblemente es un NDV no replicativo o que no se propaga. Un vector preferido comprende un genoma de una cepa de NDV virulenta recombinante con una supresión en el gen que codifica la proteína HN. El vector vírico se produce en una estirpe celular que transcomplementa la proteína HN.

20 En una realización preferida adicional, se proporciona la célula eucariota con proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus al infectar la célula eucariota con un vector vírico recombinante que transduce las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus, seguido por selección de una célula en la que el vector vírico recombinante se presenta de forma persistente sin provocar efecto citopatogénico manifiesto. Las proteínas codificadas por el virus tales como, por ejemplo, proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus, se expresan durante la infección persistente. Se descubrió que una célula infectada persistentemente tolera mayores niveles de expresión de las proteínas GnGc de bunyavirus, en comparación con una célula que se transforma de manera estable con un vector de expresión que expresa las proteínas GnGc de bunyavirus.

25 Un vector vírico preferido para generar una célula persistentemente infectada se basa en un herpesvirus, por ejemplo, un virus herpes simplex, virus Epstein-Bar o virus de varicela zóster, en un retrovirus tal como, por ejemplo, VIH, EIAV o MMLV, o en un paramixovirus, por ejemplo, un Avulavirus, que incluye paramixovirus aviar. Un paramixovirus aviar preferido es el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). Un NDV preferido comprende un clon de ADNc recombinante de la cepa LaSota de NDV, denominada NDFL (Peeters et al. 1999. J. Virol. 73: 5001-5009), en el que un gen GnGc optimizado por codón se flanquea al introducir nuevamente secuencias de inicio y detención de transcripción (Kortekaas et al. 2010. Vaccine 28: 4394-4401).

35 Una célula eucariota puede expresar de forma transitoria o estable proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus. Se encontró inicialmente que no se puede obtener una célula eucariota que se transforma establemente con un plásmido de expresión que media altos niveles de expresión de proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus. Esto se puede explicar en parte por nuestra observación de que los altos niveles constitutivos de expresión de GnGc podrían no ser tolerados en células eucariotas. Sin embargo, se toleró la expresión de un virus que persistentemente infectó estas células eucariotas

40 Para permitir la generación de una estirpe celular estable, preferiblemente se proporciona una célula eucariota con proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus al transfectar o infectar la célula eucariota con un vector de expresión que proporciona expresión condicional de las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus. El término "expresión condicional" es conocido por el experto y se refiere a una expresión controlada de una proteína, que no se expresa, o solo se expresa en bajo nivel bajo una primera condición, pero de la cual la expresión se incrementa en una segunda condición.

45 En un sistema de expresión condicional preferido, la expresión de las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus depende de la presencia de un inductor o la ausencia de un inhibidor. Actualmente se encuentran disponibles diversos sistemas de expresión génica inducible que se pueden utilizar para controlar la expresión de proteínas (NSm)GnGc. Los sistemas de expresión Tet-On y Tet-Off (por ejemplo, Tet-On® y Tet-Off® Advanced Inducible Gene Expression Systems, Clontech) se pueden utilizar para la expresión inducible de un gen de interés. En estos sistemas, la expresión del activador transcripcional (tTA) se regula por la presencia (Tet-On) o ausencia (Tet-Off) de tetraciclina (TC) o un derivado de tetraciclina tal como doxiciclina (dox). El tTA está compuesto por la proteína represora de Escherichia coli Tet (TetR) y el dominio de transactivación del virus Herpes simplex VP16. El tTA regula la transcripción de un gen de interés bajo el control de un elemento sensible a tetraciclina (TRE) que consiste en la secuencia de ADN del operador Tet (TetO) y una secuencia promotora, por ejemplo, el promotor del citomegalovirus humano (hCMV) (Baron, U. Bujard, H. Methods Enzymol 327, 401-421 (2000)). Un gen que codifica (NSm)GnGc de bunyavirus se coloca corriente abajo del elemento sensible a tetraciclina.

55 En el sistema Tet-Off, el tTA se une a TRE en ausencia de TC o dox (Gossen, M. and Bujard, H. Proc Natl Acad Sci USA 89, 5547-5551 (1992)) y la transcripción de proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus se activa, mientras que tTA no puede unirse a TRE en presencia de TC o dox y se inhibe la expresión. Por el contrario, el sistema Tet-On utiliza un tTA inverso (rtTA) que solo puede unir el TRE en presencia de dox (Gossen, M. et al. Science 268, 1766-1769 (1995)). Se inhibe la transcripción de las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus en ausencia de TC o dox y se activa en presencia de TC o dox.

En otra realización, la expresión condicional se ejecuta utilizando un sistema de expresión génica inducible por hormonas tal como, por ejemplo, un sistema de expresión génica inducible por ecdisona (por ejemplo, RheoSwitch®, New England Biolabs) (Christopherson, K.S. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 6314-6318 (1992)). La ecdisona es una hormona esteroide de insectos. En células que expresan el receptor de ecdisona, se forma un heterodímero que consiste en el receptor de ecdisona (Ecr) y el receptor X retinoide (RXR) en presencia de un agonista de ecdisona. Se puede seleccionar un agonista de ecdisona, uno de sus análogos, como muristerona A y ponasterona A, y un agonista de ecdisona no esteroide. En presencia de un agonista, Ecr y RXR interactúan y se unen a un elemento de respuesta de ecdisona que está presente en un casete de expresión. La transcripción de una proteína que se coloca en un casete de expresión corriente abajo del elemento de respuesta de ecdisona se induce de este modo al exponer la célula a un agonista de ecdisona.

Será claro para el experto que se puede obtener una estirpe celular eucariota que exprese suficientes proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus al transfectar o infectar la célula eucariota con un vector que media la expresión condicional de las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus. Dicho vector preferiblemente es un vector vírico, por ejemplo, derivado de un paramixovirus tal como el virus de la enfermedad de Newcastle, o, más preferiblemente, una molécula de ADN extracromosómico que es capaz de replicarse independientemente del ADN cromosómico tal como un plásmido.

En un método preferido de acuerdo con la invención, uno o más de los segmentos del genoma L de bunyavirus, el segmento del genoma S, y/o, cuando está presente, el segmento del genoma M comprende un gen exógeno. Dicho gen exógeno preferiblemente se deriva de un organismo que es un transmisor de una enfermedad infecciosa. Dicho organismo preferiblemente se selecciona de adenovirus, virus de la peste equina africana, virus de la peste porcina africana, virus de la lengua azul, virus de la enfermedad de la frontera, virus de la enfermedad de Borna, virus diarreico vírico bovino, virus sincicial respiratorio bovino, virus de la fiebre del valle de Cache, virus Chikungunya, Chrysomya bezziana, peste porcina clásica, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la enfermedad ovina de Nairobi, Cochlomyia hominivorax, coronavirus, citomegalovirus, virus del dengue, virus de la encefalitis equina oriental, virus del Ébola, virus de la encefalomielitosis equina, virus de la encefalocis equina, virus de la fiebre aftosa, virus de la viruela de cabra, virus Hantaan, virus Hendra, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis E, virus del herpes simplex, virus de influenza aviar altamente patógena, virus de inmunodeficiencia humana, virus de parainfluenza humana, virus de la influenza, virus de la encefalitis japonesa, herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi, virus Lassa, virus Lujo, virus Marburg, virus Marsilia, virus del sarampión, virus de la viruela del mono, virus de las paperas, virus Nipah, virus del papiloma, virus Papova, peste de pequeños rumiantes, virus de la polio, poliomavirus, virus de la rabia, virus sincicial respiratorio, rinovirus, virus de la peste bovina, rotavirus, virus de la rubéola, virus de los flebotomos de Nápoles, virus de los flebotomos de Sicilia, coronavirus SARS, virus de la viruela ovina, virus de la inmunodeficiencia simia, virus de la viruela, virus de encefalitis de San Luis, virus Toscana, virus varicela-zoster, virus del Nilo occidental, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la fiebre amarilla, Bacillus anthracis, Bordetella pertussis, Brucella spp., Campylobacter jejuni, Chlamydia trachomatis, Clostridium botulinum, Coxiella burnettii, Francisella tularensis, estreptococcus del Grupo B, Legionella pneumophila, Leptospira spp., Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium ulcerans, Neisseria meningitidis, Salmonella, Shigella spp., Trypanosoma cruzi, Vibrio cholerae, Yersinia pestis, Mycoplasma mycoides, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale, Plasmodium ssp., Plasmodium vivax, Taenia solium, Taenia spp., Trypanosoma brucei. Dicho organismo también puede ser un bunyavirus que es el mismo o diferente del bunyavirus del cual se derivan las proteínas (NSm)GnGc. Dicho gen exógeno preferiblemente se deriva de un virus de influenza y preferiblemente comprende una proteína de hemaglutinina y/o una proteína neuramidasa.

En un método preferido adicional de acuerdo con la invención, un gen exógeno está presente sobre un minigenoma de M, L o S. El término "minigenoma" se refiere a una molécula de ARN que por lo menos comprende las regiones 5' y 3' de un segmento del genoma M, L y/o S de bunyavirus que funciona en la replicación y transcripción del segmento genómico. Las regiones 5' y 3' de un segmento del genoma M, L y/o S de bunyavirus comprenden regiones no traducidas parcialmente complementarias (UTRs) que flanquean la región de codificación de cada segmento. Los nucleótidos 8 terminales de estas UTR se conservan entre los tres segmentos, mientras que las secuencias restantes de las regiones son únicas. Las UTR dirigen replicación y transcripción de ARN vírico y median la encapsidación de ARN vírico en complejos de ribonucleoproteínas. Un minigenoma preferiblemente está presente adicionalmente a un segmento del genoma L de bunyavirus y un segmento del genoma S por lo menos que comprende el gen N. Adicionalmente, está opcionalmente presente un segmento del genoma M del cual se ha inactivado funcionalmente la región de codificación de GnGc.

Cuando está presente, el gen exógeno preferiblemente se posiciona en un casete de expresión que media la expresión del ARN y/o producto de proteína del gen exógeno. Se prefiere adicionalmente que dicho casete de expresión medie la expresión específica a células o a tejidos del ARN y/o el producto de proteína del gen exógeno.

La célula eucariota en un método de la invención es preferiblemente una célula que se puede infectar y/o transfectar fácilmente utilizando métodos estándar conocidos por el experto, tales como, por ejemplo, células de levadura y células de fibroblastos de pollo. Dicha célula eucariota preferiblemente es una célula de insecto o una célula de mamífero. Las células de insecto adecuadas comprenden, por ejemplo, células de ovario de Spodoptera frugiperda tales como Sf9 y Sf21, células Schneider 2 de Drosophila y células C6/36 de Aedes albopictus. Las células de mamífero adecuadas comprenden, por ejemplo, células de riñón de hámster bebe tales como BHK-21, células de riñón embrionario humano

tales como HEK293, células VERO, células MDCK, células CHO, HuH-7, células HeLa, SW13 y PER.C6 (Fallaux, F. J. et al. 1998. Hum Gene Ther 9: 1909-1917). Una célula preferida es BHK-21.

5 Un método de acuerdo con la invención se puede utilizar para generar una partícula de replicón de bunyavirus recombinante a partir de un bunyavirus que es o se conocerá por un experto. Preferiblemente se utiliza un método de acuerdo con la invención para generar una partícula del replicón del virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo recombinante, una partícula del replicón del virus de la enfermedad de la oveja de Nairobi recombinante, una partícula del replicón del virus de Dobrava-Belgrado recombinante, o, aún más preferido, una partícula de replicón del virus recombinante de la fiebre del Valle del Rift.

10 La invención proporciona adicionalmente una partícula de replicón de bunyavirus recombinante, que comprende un segmento del genoma L de bunyavirus, un segmento del genoma S de bunyavirus o parte de un segmento del genoma S de bunyavirus que comprende por lo menos el gen N y, opcionalmente, un segmento del genoma M de bunyavirus del cual se ha inactivado funcionalmente la región de codificación de GnGc. Dicha partícula de replicón de bunyavirus recombinante se puede generar utilizando un método de acuerdo con la invención. Dicha partícula de replicón de bunyavirus preferiblemente se selecciona del género Hantavirus, Nairovirus, Orthobunyavirus, y Phlebovirus, que
15 incluyen numerosas especies de virus capaces de provocar enfermedades graves tanto en animales como en humanos. Ejemplos bien conocidos son hantaanvirus (HTNV) y virus de Dobrava-Belgrado (DOBV) (ambos del género Hantavirus), virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHFV) y virus Dugbe (ambos del género Nairovirus Bunyamwera (Orthobunyavirus), virus Oropouche (Orthobunyavirus), virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV, género Phlebovirus) y miembros adicionales del género Phlebovirus: virus Toscana, virus de los flebótomos de Nápoles, virus
20 Punta Toro, virus Uukuniemi, virus Massilia y fiebre severa con virus del síndrome de trombocitopenia. Bunyavirus preferidos adicionales incluyen, pero no se limitan a, virus del grupo del virus Dera Ghazi Khan, el grupo de virus Hughes, el grupo de virus de la enfermedad ovina de Nairobi, el grupo de virus Qalyub, el grupo de virus Sakhalin y el grupo de virus Thiafora.

25 Se prefiere que uno o más de los segmentos del genoma L de bunyavirus, el segmento del genoma S, y/o, cuando está presente, el segmento del genoma M de partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la invención, comprenda un gen exógeno. Dicho gen exógeno preferiblemente se deriva de un organismo que es un transmisor de una enfermedad infecciosa. Como una alternativa, una partícula de replicón de bunyavirus recombinante preferida de acuerdo con la invención comprende un gen exógeno que está presente sobre un minigenoma de M, L o S.

30 Una partícula de replicón de bunyavirus recombinante preferida de acuerdo con la invención se deriva de un bunyavirus seleccionado del virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la enfermedad de las ovejas de Nairobi, virus de Dobrava-Belgrado y virus de la fiebre del Valle del Rift. Un bunyavirus más preferido es el virus de la fiebre del Valle del Rift.

35 La invención adicionalmente proporciona un método para producir una partícula de replicón de bunyavirus recombinante, el método comprende A) proporcionar una célula eucariota con medio de crecimiento, B) proporcionar la célula eucariota con suficiente (NSm)GnGc de bunyavirus, y C) infectar la célula eucariota con una partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la invención, con el fin de producir una partícula de replicón de bunyavirus. Dicha célula eucariota es preferiblemente una célula que se infecta de forma persistente con un vector vírico que transduce las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus, o una célula estable en la que una construcción de expresión que expresa las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus se integra en el genoma. Dicha construcción de expresión
40 preferiblemente comprende medios para la expresión condicional de las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus.

45 Una partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la invención es segura y se puede utilizar fuera de una contención de bioseguridad. Dicha partícula de replicón de bunyavirus recombinante se puede utilizar, por ejemplo, para cribar y desarrollar agentes antivíricos, por ejemplo, para el desarrollo de un sistema de alto rendimiento para el cribado de bibliotecas de compuestos adecuadas. Dicha partícula de replicón de bunyavirus recombinante también se puede utilizar en pruebas o ensayos que incluyen ensayos de neutralización de virus o pruebas de neutralización de virus (VNT) y ELISA, que incluyen ELISA de virus completo y ensayos de hemaglutinación.

50 Por ejemplo, una VNT clásica requiere el manejo de bunyavirus vivos y, por lo tanto, se debe realizar en instalaciones de contención de bioseguridad apropiadas. Otro inconveniente de la VNT clásica es que se requiere 5-7 días para que se complete el ensayo. Una ventaja del uso de partículas de replicón de bunyavirus, tales como partículas de replicón del RVFV (RRPV), en lugar de bunyavirus vivos, es que la VNT se puede realizar fuera de las instalaciones de biocontención. Una ventaja adicional es que la VNT requiere solo 24-48 horas para completarse.

55 La invención proporciona adicionalmente una partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la invención para uso como un medicamento. Una partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la invención es preferiblemente para uso como un medicamento para mejora de una infección de bunyavirus en un animal, que incluye un humano.

Un medicamento farmacéutico que comprende una partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéutico estable. Un medicamento

de acuerdo con la invención preferiblemente se combina con otras opciones terapéuticas, que incluyen, pero no se limitan a un tratamiento de combinación con ribavirina, y/o derivados de ribavirina tales como tarbavirina.

La invención proporciona adicionalmente una vacuna que comprende una partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la invención. Dicha vacuna preferiblemente comprende un adyuvante. Las sustancias adyuvantes se utilizan para estimular la inmunogenicidad. Ejemplos de adyuvantes inmunológicos comúnmente utilizados son sales de aluminio, complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), polímeros o copolímeros de bloque no iónico, citoquinas (como IL-1, IL-2, IL-7, etc.), saponinas, lípido A de monofosforilo (MPLA), dipéptidos de muramilo, vitamina E, resinas de poliacrilato y emulsiones de aceite. Preferiblemente, el adyuvante es un sulfolipopolisacárido, tal como el adyuvante SLP/S/W descrito en Hilgers et al. *Vaccine* 1994 12: 653-660. Se proporciona un adyuvante preferido adicional mediante un triterpeno, tal como escualeno, y derivados y modificaciones del mismo.

Las partículas de replicón de bunyavirus, por ejemplo, RRP, de acuerdo con la invención son partículas que no se propagan que son capaces de replicación autónoma del genoma. Las partículas de replicón de bunyavirus de acuerdo con la invención contienen tanto el segmento del genoma S como L, o partes funcionales del mismo, pero carecen de un segmento del genoma M de bunyavirus o comprenden un segmento del genoma M de bunyavirus en el cual se ha inactivado funcionalmente la región de codificación de GnGc. La presencia de los segmentos del genoma L y S, que codifican la proteína N y la proteína L, permiten las partículas resultantes de la replicación autónoma del genoma. La ausencia o inactividad de una región de codificación GnGc evita el ensamble y propagación de partículas de virus. Las partículas de replicón se pueden producir en células que suministran GnGc en trans a títulos de hasta 10^7 partículas infecciosas/ml. La replicación del genoma del bunyavirus y/o la expresión de la proteína N y L en un anfitrión podría dar como resultado una respuesta inmunitaria mejorada, en comparación con una respuesta inmunitaria inducida por la vacunación con partículas similares a bunyavirus o subunidades víricas. Por ejemplo, una sola vacunación intramuscular con RRP protege a los ratones contra una dosis de inoculación letal con la cepa 35/74 del RVFV.

Dicha vacuna se puede administrar a un animal, que incluye un humano, mediante cualquier método conocido en la técnica. Dicha vacuna se administra preferiblemente mediante métodos no invasivos, sin aguja, tales como administración oral, intranasal y/o intratraqueal, por ejemplo, mediante inhalación o el uso de aerosoles nasales. Dicha vacuna se administra más preferiblemente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica o similar, preferiblemente, por vía intramuscular.

Una vacuna de acuerdo con la invención se administra en cantidades efectivas de acuerdo con un cronograma que se puede determinar por el tiempo de exposición potencial anticipada a un bunyavirus. De esta forma, el animal tratado, que incluye un humano, puede tener tiempo para desarrollar inmunidad antes de la exposición natural. Un cronograma de tratamiento o régimen de dosificación típico comprende administración parenteral, preferiblemente inyección intramuscular, de una unidad de dosificación, por lo menos aproximadamente 2-8 semanas antes de la exposición potencial. Si es necesario, se administra una segunda unidad de dosificación aproximadamente 2-4 semanas antes de la exposición potencial. La segunda dosificación se puede administrar por el mismo método, o por un método que difiere de la primera unidad de dosificación.

La administración de una vacuna de acuerdo con la invención preferiblemente protege al animal, que incluye un humano, contra una infección posterior mediante el bunyavirus. En una realización preferida, una vacuna de acuerdo con la invención comprende una partícula de replicón del virus recombinante de la fiebre del Valle del Rift que protege al animal, que incluye un humano, contra una infección posterior por el virus de la fiebre del Valle del Rift.

Una ventaja importante de una vacuna de acuerdo con la invención es que el virus no es capaz de propagación autónoma en el animal vacunado. La incapacidad de propagarse desde el sitio inicial de la inoculación, se suma a la seguridad de esta vacuna, tanto para el animal inoculado, el administrador de la vacuna como para el entorno. La incapacidad de provocar viremia en el animal vacunado también previene cualquier preocupación sobre la posible transmisión de esta vacuna por vectores de insectos (véase Moutailler et al. 2010. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10: 681-688). Una vacuna que comprende una partícula de replicón de Bunyavirus que no se propaga de acuerdo con la invención que carece del gen NSs (tal como aquellas reportadas en el Ejemplo 1 y en Kortekaas et al. 2011. *J Virol*. Aceptada para publicación) se consideran de seguridad óptima, debido a la falta de este importante factor de virulencia.

Una ventaja importante adicional de una vacuna de acuerdo con la invención en comparación con vacunas inactivadas o vacunas de subunidades es el hecho de que la presente vacuna no depende de un adyuvante para inducir inmunidad. Adicionalmente, una vacuna de acuerdo con la invención se puede producir con una rentabilidad superior y será superior con respecto a la duración de la inmunidad. Aunque el virus no se propaga, debido a la incapacidad para expresar la proteína GnGc, el genoma vírico se replica en las células infectadas y se expresan las proteínas N y L, lo que da como resultado una inducción fuerte y duradera de una respuesta inmunitaria en un receptor.

Es importante observar que existen preocupaciones sobre la seguridad del MP-12 (Morrill et al. 1991. *Vaccine* 9:35-41, Morrill et al. 1997. *Am J Vet Res* 58:1104-1109, Morrill et al. 1997. 58:1110-1114, Morrill et al. 2011. 204:229-236, Morrill et al. 2011. *J Infect Dis* 204:617-625), el clon 13 (Muller et al., 1995. *Am J Trop Med Hyg.* 53:405-411, Vialat et al. 2000. *J Virol* 74:1538-1543, Dungu et al. 2010. *Vaccine* 28:4581-4587) y R566, un virus reasociado que contiene el segmento S del virus del Clon 13 y virus de la vacuna de los segmentos L y M del virus MP-12 (Flick et al. 2009. *Antiviral Res* 84:101-118).

Se mostró que el virus de la vacuna MP-12 contiene potenciales mutaciones atenuantes en cada uno de los tres segmentos del genoma (Vialat et al. 1997. *Virus Res* 52: 43-50). Sin embargo, los cambios de nucleótidos responsables de la atenuación de este virus no están mapeados. Por lo tanto, es posible que solo un cambio de nucleótido único pueda dar como resultado la reversión a la virulencia. Aunque diversos estudios han demostrado la seguridad de la vacuna MP-12 (véase documentos de Morrill et al. anteriormente indicados), un estudio adicional demostró que la vacuna MP-12 no es segura cuando se administra a ovejas gestantes durante el primer trimestre de gestación (Hunter et al., 2002 *Onderstepoort J Vet Res* 69; 95-98). Debido a que la vacuna R566 contiene los segmentos L y M del virus MP-12, pueden surgir inquietudes similares acerca de la seguridad de esta vacuna.

La muerte de ratones vacunados con el Clon 13 debido a trastornos neurológicos y parálisis se reportó en uno de los primeros artículos sobre el virus del Clon 13 (Vialat et al. 2000. *J Virol* 74: 1538-1543). Este hallazgo sugiere que la seguridad del virus del Clon 13 también se debe estudiar más a fondo en ensayos clínicos que involucren grandes cantidades de animales.

Ninguno de los animales que se vacunaron con una partícula de replicón de Bunyavirus de acuerdo con la invención sufrió complicaciones asociadas con la vacunación.

La invención proporciona adicionalmente un método para estimular una respuesta inmunitaria contra bunyavirus en un animal, que incluye un humano, el método comprende proporcionar al animal una partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la invención. En un método preferido, una partícula de replicón del virus recombinante de la fiebre del Valle del Rift de acuerdo con la invención se proporciona a un animal, que incluye un humano, para estimular una respuesta inmunitaria contra el virus de la fiebre del Valle del Rift.

La invención proporciona adicionalmente el uso de una partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la invención, para estimular una respuesta inmunitaria contra una proteína codificada por el gen exógeno. En una realización, dicho gen exógeno preferiblemente codifica una proteína antigénica que se expresa por un Orthomyxovirus, preferiblemente el virus de influenza A, o una parte o derivado inmunológicamente activo de una proteína que se expresa por un Orthomyxovirus. Los métodos para determinar si una proteína, o una parte o derivado de una proteína, es inmunológicamente activa son conocidos por el experto en la técnica, que incluyen algoritmos que predicen la inmunogenicidad de una proteína tal como un algoritmo de Parker y un algoritmo de Rammensee, como se divulga en Provenzano et al. 2004. *Blood* 104: Abstract 2862) y que incluyen la inyección de la proteína purificada, o una parte o derivado de la proteína en un animal adecuado y que determinan si la proteína, o una parte o derivado de una proteína es capaz de estimular anticuerpos contra la proteína, o una parte o derivado de una proteína.

El término parte inmunológicamente activa indica una parte de una proteína que puede inducir una respuesta inmunitaria celular y/o humoral contra la proteína en un animal, que incluye un humano. El término derivado inmunológicamente activo indica una proteína o parte de una proteína que se modifica, por ejemplo, mediante la adición, supresión o alteración de uno o más aminoácidos y que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria celular y/o humoral contra la proteína en un animal, que incluye un humano. Se prefiere que un derivado inmunológicamente activo tenga una identidad de secuencia de más del 70% en comparación con la proteína original, por ejemplo, la proteína que se expresa por el Orthomyxovirus, preferiblemente un virus de influenza A. La identidad de secuencia se prefiere mayor de 80%, se prefiere mayor de 90%, se prefiere mayor de 95%, se prefiere mayor de 99%, aún más mayor de 100%, con base en la secuencia de aminoácidos de las partes de proteína o proteína. Dicho derivado inmunológicamente activo es, por ejemplo, una proteína que comprende un péptido de señal para la secreción fuera de la célula en la que se produce, una proteína que comprende una secuencia que proporciona una transmembrana tal como un dominio de dirección tipo I, II o III, o una proteína en la que se ha alterado un sitio de división de proteasa para mejorar la vida media de la proteína.

Leyendas de las figuras

Figura 1.

Expresión de la proteína N a partir del segmento del genoma S del RVFV. Las células BSR-T7/5 (A) o células BHK-21 infectadas con FP-T7 (B) se transfectaron con el plásmido pUC57-S, que codifica el segmento del genoma S del RVFV en la orientación de sentido antígenómico. La expresión de la proteína N del RVFV se detectó utilizando un mAb específico a proteína N y anticuerpos IgG anti-ratón conjugados con HRP.

Figura 2.

Producción de partículas del replicón del virus de la fiebre del Valle del Rift (RRP) que contienen tres segmentos del genoma. Las células BHK se infectaron con FP-T7 y posteriormente se transfectaron con un plásmido que codifica el minigenoma M-eGFP (M-eGFP), o en combinación con plásmidos que codifican los segmentos del genoma L y S del RVFV (M-eGFP/L/S), o en combinación con los plásmidos mencionados anteriormente y pCAGGS-NSmGnGc (M-eGFP/L/S + NSmGnGc). El número de células productoras positivas a eGFP, células receptoras o células receptoras previamente transfectadas con pCIneo-RVFV-L y pCAGGS-N de plásmidos auxiliares (+HP) se determinaron mediante citometría de flujo.

Figura 3.

Producción de RRP que contiene dos segmentos de genoma. Las células BHK se infectaron con FP-T7 y posteriormente se transfectaron con un plásmido que codifica el minigenoma S-eGFP (S-eGFP), o en combinación con plásmidos que codifican los segmentos del genoma L del RVFV (S-eGFP/L), o en combinación con los plásmidos mencionados anteriormente y pCAGGSNSmGnGc (S-eGFP/L + NSmGnGc). El número de células productoras positivas a eGFP, células receptoras o células receptoras previamente transfectadas con pCIneo-RVFV-L y pCAGGS-N de plásmidos auxiliares (+HP) se determinaron mediante citometría de flujo.

Figura 4.

Expresión de GnGc en células BHK-GnGc. Detección de la expresión de GnGc en células BHK-21 (control negativo, A) y células BHK-GnGc (B) mediante IPMA utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra las proteínas Gn y Gc y detección de Gc en lisados celulares sobre una transferencia Western (C) utilizando un antisuero peptídico.

Figura 5.

Expresión de eGFP en células BHK-GnGc infectadas persistentemente con NDV-GnGc que mantiene el segmento del genoma L del RVFV y minigenoma S-eGFP en el pasaje 18 celular.

Figura 6.

Producción de RRP mediante células BHK-GnGc después de introducción de pCAGGS-GnGc o pCAGGS-NSmGnGc. A las 16 h después de la transfección, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo. Los títulos de RRP se determinaron sobre células BHK-21 utilizando el método Spearman-Kärber (Kärber 1931. Arch. Exp. Path. Pharmacol 162, 480-483, Spearman 1908 Br. J. Psychol 2, 227-242).

Figura 7.

(A) Secuencia parcial pUC57-L: el plásmido codifica el segmento del genoma de L 35/75 de la cepa del RVFV en orientación de sentido antígenómico.

El ADNc del segmento del genoma L 35/74 de la cepa del RVFV flanqueado por un promotor T7 y el ADNc que codifica una ribozima de HDV fueron sintetizados por GenScript Corporation y clonados en el vector pUC57 utilizando KpnI/HindIII. El promotor T7, la secuencia de ribozimas de HDV y las secuencias del terminador T7, respectivamente, están subrayadas. Las UTR se indican en cursiva, el marco de lectura abierto que codifica la proteína L se indica en negrita.

(B) Secuencia parcial del plásmido pUC57-M: el plásmido codifica el segmento del genoma M 35/74 de la cepa del RVFV en una orientación de sentido antígenómico.

El ADNc que codifica el ARN de sentido antígenómico del segmento del genoma M de la cepa 35/74 del RVFV, flanqueado por un promotor T7 y el ADNc que codifica una ribozima de HDV fue sintetizado por GenScript Corporation y clonado en el vector pUC57 utilizando EcoRI/SalI. El promotor T7, la secuencia de ribozimas de HDV y las secuencias del terminador T7, respectivamente, están subrayadas. Las UTR se indican en cursiva, el marco de lectura abierto que codifica las proteínas NSmGnGc se indica en negrita.

(C) Secuencia parcial del plásmido pUC57-S (-): el plásmido codifica el segmento del genoma s de la cepa 35/74 del RVFV en una orientación de sentido genómico.

El ADNc que codifica el ARN con sentido genómico del segmento del genoma S de la cepa 35/74 del RVFV, flanqueado por un promotor T7 y el ADNc que codifica una ribozima de HDV fue sintetizado por GenScript Corporation y clonado en el vector pUC57 utilizando BamHI/XbaI. El promotor T7, la secuencia de ribozimas de HDV y las secuencias del terminador T7, respectivamente, están subrayadas. Las UTR y la región intergénica se indican en cursiva, los marcos de lectura abiertos que codifican las proteínas N y NS se indican en negrita.

(D) Secuencia parcial del plásmido pUC57-SΔNSs: el plásmido codifica el segmento del genoma S 35/74 de la cepa del RVFV en una orientación de sentido antígenómico con una supresión principal en las NSs.

El ADN sintético se clonó entre XbaI y ApaI de pUC57. El promotor T7, la secuencia de ribozimas de HDV y las secuencias del terminador T7, respectivamente, están subrayadas. Las UTR y la región intergénica se indican en cursiva, el marco de lectura abierto que codifica el N y la parte de codificación del marco de lectura abierto de la proteína NS se indican en negrita.

(E) Secuencia parcial del plásmido pUC57-S: el plásmido codifica el segmento del genoma M 35/74 de la cepa del RVFV en una orientación de sentido antígenómico.

Para construir el ADNc que codifica el segmento del genoma S completo en orientación de sentido antígenómico, la secuencia entre NcoI, EcoRV se aisló de la construcción pUC57-S(-) y se utilizó para reemplazar la secuencia entre NcoI y EcoRV del plásmido pUC57-SΔNSs, produciendo pUC57-S. Las secuencias del promotor T7 y de ribozimas de

HDV y del terminador T7, respectivamente, están subrayadas. Las UTR y la región intergénica se indican en cursiva, los marcos de lectura abiertos que codifican las proteínas N y NSs se indican en negrita.

5 (F) Secuencia parcial del plásmido pUC57-S-eGFP: el plásmido codifica el segmento del genoma M de la cepa 35/74 del RVFV en orientación de sentido antígenómico, en el que el gen NSs se reemplaza por el gen que codifica la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP).

Las secuencias del promotor T7 y ribozimas de HDV y terminadoras T7, respectivamente, están subrayadas. Las UTR y la región intergénica se indican en cursiva, los marcos de lectura abiertos que codifican las proteínas N y eGFP se indican en negrita. La secuencia se clonó entre KpnI y Sall de pUC57. Se subraya una mutación silenciosa C → T.

10 (G) Secuencia parcial del plásmido pUC57-Mv: el plásmido codifica el segmento del genoma M de la cepa 35/74 del RVFV en orientación de sentido genómico, en el que se elimina el ORF de NSmGnGc completo y se introducen los sitios NcoI y XbaI.

Las secuencias del promotor T7 y ribozimas de HDV y terminadoras T7, respectivamente, están subrayadas. Las UTR se indican en cursiva, la secuencia entre las UTR se indica en negrita. Se clonan entre EcoRI y PstI de pUC57.

15 (H) Secuencia parcial del plásmido pUC57-Mv-eGFP: el plásmido codifica el segmento del genoma M de la cepa 35/74 del RVFV en orientación de sentido genómico, en el que se elimina el ORF de NSmGnGc completo y se introduce eGFP entre los sitios NcoI y XbaI. Las secuencias de promotor T7 y de ribozimas de HDV están subrayadas.

20 (I) Secuencia parcial del plásmido pUC57-GnGc: el plásmido codifica una versión optimizada del codón de marco de lectura abierto del segmento del genoma M de la cepa 35/74 del RVFV que comienza en el cuarto codón de metionina. El gen se sintetizó y se clonó entre EcoRI y HindIII. Este gen se utilizó para construir pCIneo-GnGc y pCAGGS-GnGc utilizando EcoRI y NotI (subrayado). El marco de lectura abierto GnGc se indica en negrita.

(J) Los plásmidos pCIneo-NSmGnGc y pCAGGS-NSmGnGc codifican el marco de lectura abierto del segmento del genoma M de la cepa 35/74 del RVFV comenzando en el primer codón de metionina. El gen se amplificó a partir de ADNc 35/74 y se clonó en pCIneo y pCAGGS utilizando EcoRI y NotI (subrayado). El marco de lectura abierto de NSmGnGc se indica en negrita.

25 (K) El plásmido pUC57-N codifica una versión optimizada de codón del marco de lectura abierto N de la cepa 35/74 del RVFV. El gen se introdujo en pCAGGS y pCIneo utilizando EcoRI y NotI (subrayado). El marco de lectura abierto de la proteína N se indica en negrita.

30 (L) El plásmido pCIneo-L contiene el marco de lectura abierto del gen L de la cepa del RVFV 35/75. El gen se introdujo utilizando XhoI y NotI (subrayado). La mutación de transición (T5912C), que da como resultado la sustitución de isoleucina-1971 por treonina también está subrayada. El marco de lectura abierto de la proteína L se indica en negrita.

Figura 8.

35 Las RRP son incapaces de propagación autónoma. Las células BHK se infectaron con RRP a una m.o.i. de 1. Después de dos días, se observó expresión de eGFP en las células infectadas (panel izquierdo). Se incubaron células BHK recientes con el sobrenadante recolectado y se monitorizaron para una expresión de eGFP después de tres días (panel derecho).

Figura 9.

40 Cinética de producción RRP. Las células BHK-Rep se cultivaron en GMEM complementado con suero al 5% y se dejaron no tratadas (-GP) o se transfectaron con pCAGGS-NSmGnGc (+ GP). Los títulos de RRP se determinaron en diferentes puntos de tiempo en células BHK utilizando la expresión de eGFP como el parámetro de lectura. Los títulos se determinaron utilizando el método Spearman-Kärber.

Figura 10.

45 Análisis de transferencia Western de proteínas RRP. El medio de cultivo de células BHK-Rep (-GP) o células BHK-Rep transfectadas con pCAGGS-NSmGnGc (+ GP) se ultracentrifugó a 100 000 xg durante 2 h. Las proteínas presentes en los sedimentos se separaron en 4-12% de geles Bis-Tris NuPAGE y posteriormente se transfirieron a transferencias de nitrocelulosa. Se detectaron proteínas específicas mediante un antisuero de péptido anti-Gn (α -Gn) o anti-Gc (α -Gc) o un mAb específico para la proteína N (α N). Las posiciones de las proteínas NSm, Gn, Gc y N se indican por flechas. Las proteínas estándar de peso molecular se indican a la derecha en kilodaltons.

Figura 11.

50 Infección por PVR de células de mamíferos e insectos. Las células se infectaron con RRP y se determinó la cantidad de células positivas mediante citometría de flujo a 42 (BHK y HEK293T) o 72 horas después de infección (S2 y C6/36). (A) Resultado representativo de citometría de flujo de células de mamíferos e insectos infectadas con RRP. Los recuentos

de células de control no infectadas y células infectadas se representan en gris y verde, respectivamente. (B) Histogramas que muestran los resultados promediados de tres mediciones independientes con D.E.

Figura 12.

5 Eficacia de la vacuna de los RRP. Los ratones no se vacunaron (n=9; simulado) o se vacunaron (n=10) ya sea una vez (1x) o dos veces (2x) por ruta intramuscular (IM) o ruta subcutánea (SC) con 106 DICT50 de RRP. Los ratones se inocularon con una dosis letal conocida de la cepa 35/74 del RVFV a través de la ruta intraperitoneal. Las tasas de mortalidad se determinaron hasta 21 días después de inoculación (d.p.c.).

Figura 13.

10 Reacciones en el lugar de inyección observadas en diferentes momentos después de la vacunación. Puntuación 0: no se observan aberraciones; 1: hinchazón observada; 2: hinchazón redonda de 5 cm de diámetro máximo; 3: gran hinchazón/absceso posibilidad de ruptura. PM, post mortem. Los resultados se representan como promedios (n=6) con DE.

Figura 14.

15 Temperaturas rectales de corderos vacunados y no vacunados (simulados) antes y después de inoculación con RVFV. Las temperaturas corporales rectales (°C) se determinaron diariamente. La fiebre se definió como una temperatura corporal por encima de 41°C (línea interrumpida). Los resultados se representan como promedios (n=6) con DE.

Figura 15.

20 Detección de ARN vírico en muestras de plasma de corderos vacunados y no vacunados obtenidos en diferentes puntos temporales después de infección mediante inoculación con RVFV. La cantidad de muestras positivas difiere en cada punto de tiempo. Los resultados se representan como promedios (n=6) con DE.

Figura 16.

Peso corporal de corderos vacunados una vez con una de las vacunas indicadas. Los resultados se representan como promedios (n=6) con DE.

Figura 17.

25 Análisis bioquímico de muestras de suero. Las concentraciones de ALT, ALP, TP, creatinina y BUN se representan como promedios (n=6) con DE. Los valores de referencia superiores e inferiores se indican mediante líneas discontinuas.

Figura 18.

30 Representación esquemática del método utilizado para crear estirpes celulares de replicón que producen las proteínas sHA₃ y sNA₄. GOI, gen de interés (en este documento, ya sea el gen eGFP, sHA₃ o sNA₄).

Figura 19.

35 Citometría de flujo que demuestra el porcentaje de estirpes celulares de replicón que producen la proteína N en el pasaje 8 celular. La expresión de proteína N depende de la presencia del segmento del genoma S y L, del cual el primero contiene el gen exógeno de interés (GOI). Las células que expresan los segmentos del genoma L y S-eGFP (A); células que expresan L y el segmento S-CD5-HA-GCN4-ST (es decir, S_sHA₃) (B); células que expresan el segmento L y S-CD5-OS-GCN4-NA (es decir, S_sNA₄) (C); células de control que expresan GnGc se representan en (D), (E) y (F).

Figura 20.

40 Se analizaron sHA₃ y sNA₄ purificados en geles de poliacrilamida teñidos con plata (A) y transferencias de Western utilizando Strep-Tacting-HRP para la detección (B). La muestra de control negativo (eGFP) se proporcionó siguiendo el procedimiento de purificación utilizando medio recolectado de células de replicón que expresan eGFP. Las posiciones de las proteínas estándar de peso molecular se indican a la izquierda en kDa.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

45 Células y condiciones de crecimiento.

El Prof. Dr. K. Conzelmann (Max von Pettenkofer-Institut, Múnich, Alemania) proporcionó amablemente BSR-T7/5. Las BHK-GnGc son células BHK-21 que contienen un plásmido integrado al genoma pCIneo-GnGc descrito a continuación.

Las células BSRT7/5 y BHK-GnGc se cultivaron en medio esencial mínimo de Glasgow (GMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) complementado con caldo de cultivo de fosfato de triptosa al 4% (Invitrogen), aminoácidos no esenciales al 1% (Invitrogen), suero fetal bovino al 10% (FBS; Pam Biotech, Aidenbach, Alemania) y penicilina/estreptomicina (Invitrogen) a una concentración de 100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente. Para el mantenimiento de estirpes celulares estables, se utilizó geneticina (G-418; Invitrogen) a una concentración de 1 mg/ml. Las células se cultivaron a 37°C y CO₂ al 5%.

Plásmidos y virus.

Los plásmidos pCIneo-GnGc y pCAGGS-GnGc contienen el marco de lectura abierto (ORF) del segmento M de la cepa 35/74 del RVFV, comenzando en el cuarto codón de metionina (Figura 7I). El plásmido pCAGGS-N contiene el ORF que codifica el gen N (Figura 7K). Las secuencias que codifican N y GnGc se optimizaron con codones para una expresión óptima en células de mamíferos e insectos y se sintetizaron por GenScript Corporation (Piscataway, NJ, EE. UU.). El plásmido pCAGGS-NSmGnGc contiene el ORF auténtico del segmento M que comienza en el primer codón de metionina (Figura 7J). pCIneo-RVfV-L codifica el ORF auténtico que codifica la polimerasa vírica de la cepa 35/74 del RVFV (Figura 7L). Este gen contiene una mutación de transición (T5912C), que da como resultado la sustitución de isoleucina-1971 por treonina. No se estudió el efecto de esta mutación.

La expresión de genes RVFV a partir de plásmidos pCIneo está controlada por un promotor/potenciador temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), mientras que la expresión de genes a partir de plásmidos pGAGGS está controlada por un mejorador inmediato de CMV/promotor de actina β (CAG) (Niwa et al. 1991. *Gene* 108: 193-199). La cepa 35/74 del RVFV se aisló en el Agricultural Research Council-Onderstepoort Veterinary Institute (ARC-OVI) del hígado de una oveja que murió durante un brote del RVFV en la provincia de Free State de Sudáfrica en 1974 (Barnard 1979. *JS Afr Vet Assoc* 50: 155). El virus se pasó cuatro veces en ratones lactantes mediante inyección intracerebral y tres veces en células BHK-21. La amplificación de los segmentos del genoma se realizó mediante RT-PCR en un solo paso con SBS Genetech AMV-RT, TaKaRa Ex Taq HS y los cebadores descritos por Bird et al. (Bird et al. 2007. *J Virol* 81: 2805 - 2816). Los productos de PCR se purificaron con el kit de extracción Qiagen Gel después de separación sobre gel de agarosa y se mezclaron en cantidades iguales apropiadas antes de la secuenciación GS FLX en Inqaba Biotec (Pretoria, Sudáfrica). La secuenciación y el ensamble de la secuencia se realizaron esencialmente como se describe para los genomas del virus ARNs (Potgieter et al. 2009. *J Gen Virol* 90: 1423-1432). Las secuencias de consenso correspondientes a cada segmento del genoma se sintetizaron y se clonaron en pUC57, un vector de clonación estándar de GenScript Corporation (Piscataway, NJ, EE. UU.). pUC57-L (Figura 7A), pUC57-M (Figura 7B) y pUC57-S (Figura 7E) codifican el segmento del genoma L, M y S del RVFV en orientación de sentido antígenómico (es decir, positivo), respectivamente. Estos plásmidos de transcripción contienen cada uno una copia completa de los segmentos de ARN vírico y se flanquean por un promotor T7 y una secuencia de ribozimas del HDV. En pUC57-S-eGFP(-) (Figura 7F), el gen NSs se reemplaza por el gen que codifica la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP). Es de destacar que la transcripción de este plásmido resulta en un minigenoma de S-eGFP en el que el gen de eGFP está en la orientación genómica (es decir, sentido negativo). En el plásmido pUC57-Mv-eGFP(-) (Figura 7H), el ORF completo del segmento M se reemplaza por el gen eGFP. El minigenoma M-eGFP producido a partir de este plásmido también tiene una orientación de sentido genómico.

Se describió previamente un virus de la enfermedad de Newcastle recombinante (NDV) que produce las glucoproteínas estructurales Gn y Gc del RVFV (es decir, NDV-GnGc), de este documento referido como NDV-GnGc (Kortekaas et al. 2010. *Vaccine* 28: 4394 -4401).

Un virus de la viruela aviar recombinante que produce la polimerasa T7, denominado fpEFLT7pol (Das et al. 2000. *J Virol Meth* 89: 119-127), de este documento referido como FP-T7, fue amablemente proporcionado por el Instituto de Salud Animal (IAH, Compton, Reino Unido). Los títulos de virus se determinaron como dosis infectiva de cultivo de tejido al 50% (TCID₅₀) sobre células BHK-21 utilizando el método Spearman-Kärber (Kärber 1931. *Arch. Exp. Path. Pharmacol* 162, 480-483; Spearman 1908 *Br. J. Psychol* 2, 227-242),

Rescate de la cepa recombinante 35/74 del RVFV.

Se sembraron células BSR-T7/5 en placas de 6 pozos y se cotransfectaron con 1 µg de plásmidos pUC57-L, pUC57-M y pUC57-S utilizando reactivo de transfección jetPEI de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Polyplus-transfection SA, Illkirch, Francia). Después de 6 días de incubación, se recolectó el medio. Para la detección del virus infeccioso, las células BHK-21 se incubaron con el sobrenadante recolectado. Cuando se observó un efecto citopático claro, las células se fijaron en paraformaldehído/PBS al 4% durante 40 minutos. Posteriormente, las placas se sumergieron completamente en etanol al 80%/ácido acético al 4% para inactivar el virus y se lavaron con PBS. Los ensayos de monocapa de inmunoperoxidasa (IPMA) se realizaron como se describe a continuación.

Alternativamente, las células BHK-21 se infectaron con FP-T7. Aproximadamente 10E6 células en cada pozo de una placa de seis pozos se inocularon con 1.5 ml de medio de cultivo que contenía 10E5 TCID₅₀ de FP-T7 (multiplicidad de infección [m.o.i.] de 0.1). Después de la incubación con FP-T7 durante 1 hora y recuperación durante otra hora, las células se trataron de manera similar como se describe para las células BSR-T7/5.

Rescate de BRP del RVFV (RRP).

Se sembraron células BHK-21 o BHK-GnGc en placas de 6 pozos y se incubaron con FP-T7 durante 1 hora a 37°C. El medio se refrescó y las células se dejaron recuperar durante 1 h. Para la producción de RRP que contienen tres segmentos de genoma, las células se transfectaron posteriormente con 600 ng de plásmidos pUC57-L, pUC57-S, pUC57-Mv-eGFP(-) y pCAGGS-NSmGnGc. Para la producción de RRP que contienen dos segmentos del genoma, las células se transfectaron con pUC57-L, pUC57-S-eGFP(-) y pCAGGS-NSmGnGc. El medio se refrescó al día siguiente. Alternativamente, cuando se utilizó NDV para proporcionar Gn y Gc, se realizó infección por NDV-GnGc junto con FP-T7. NDV-GnGc se utilizó a una m.o.i. de 0.05. Los sobrenadantes se recolectaron después de 72 h, se depuraron previamente a 5 000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se almacenaron a 4°C hasta uso posterior.

Transferencia Western y NuPAGE

Se realizó NuPAGE y transferencia Western como se describe (Kortekaas et al. 2010. *Vaccine* 28: 2271-2276). Brevemente, las proteínas se diluyeron en tampón de muestra Laemmli 3x (Tris 0.5 M, pH 6.8, SDS al 6% (p/p), glicerol al 26% (v/v), 2-mercaptoetanol al 15% (v/v) y azul de bromofenol al 0.002% (p/p)) y se calentó a 95°C durante 5 minutos, antes de cargar sobre geles Bis-Tris NuPAGE al 4-12%. Las proteínas se transfirieron posteriormente a transferencias de nitrocelulosa. Para visualizar Gc, se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo que se habían generado previamente contra un péptido derivado de Gc (residuos 975-VFERGSLPQTRNDKTF AASK-994), respectivamente (De Boer et al. 2010. *Vaccine* 28: 2330-2339). Los anticuerpos IgG anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Dako, Heverlee, Bélgica) se utilizaron como anticuerpos secundarios. La actividad de la peroxidasa se detectó utilizando los reactivos de detección transferencia Western de Amersham ECL™ (GE Healthcare, Diegem, Bélgica). Para la detección de la proteína N, se utilizó el anticuerpo monoclonal F1D11 (amablemente proporcionado por el Dr. Alejandro Brun, CISA-INIA, Madrid, España) como anticuerpo primario e IgG anti-ratón de conejo (DAKO) como el anticuerpo secundario.

Ensayos de monocapa de inmunoperoxidasa (IPMA).

Los IPMA se realizaron como se describió previamente (deBoer et al. 2010. *Vaccine* 28: 2330-2339). Como el anticuerpo primario, se utilizó un antisuero policlonal que se obtuvo previamente de una oveja que se vacunó con NDFL-GnGc (Kortekaas et al. 2010. *Vaccine* 28: 4394-4401). Para la detección de la proteína N del RVFV, se utilizó mAb F1D11, que se proporcionó amablemente por el Dr. Alejandro Brun (CISA-INIA, España). Como el anticuerpo secundario se utilizó IgG de anti-ratón conjugado con HRP (Dako, Heverlee, Bélgica).

Citometría de flujo.

Para la citometría de flujo, las células de una placa de seis pozos se lavaron con 3 ml de PBS y luego se sometieron a tripsinización con 0.3 ml de tripsina-EDTA al 0.5% (Invitrogen). Después de incubación durante 2-3 minutos a 37°C y resuspensión, las células se diluyeron en 1 ml de medio de cultivo. Las células se sedimentaron por centrifugación, se resuspendieron en 0.5 ml de PBS y se sedimentaron de nuevo. Las células se fijaron al agregar 0.1 ml de PFA al 4% en PBS durante 15-30 minutos y posteriormente se diluyeron en 0.5 ml de PBS. Cada muestra contenía todas las células de un pozo. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta análisis. Todas las mediciones se realizaron en el día de la cosecha de células. La citometría de flujo se realizó utilizando un citómetro de flujo CyAn ADP (Beckman, Woerden, Países Bajos), equipado con un láser de longitud de onda de 488 nm. El análisis de datos se realizó con el software Summit v4.3.

Resultados

Rescate de la cepa 35/74 del RVFV recombinante a partir de ADNc utilizando células BSR-T7/5. La cepa del RVFV recombinante 35/74 (rec35/74) se rescató utilizando tres plásmidos que codifican los tres segmentos de ARN vírico L, M y S en orientación de sentido antígenómico. La transfección de los tres plásmidos en células BSR-T7/5 resultó en un efecto citopático después de 3-4 días. Las células BHK-21 se inocularon con el sobrenadante recolectado. Se obtuvo un título de 10E9 TCID50/ml después de dos pasajes del virus. No se introdujeron mutaciones silenciosas en el genoma de la cepa 35/74 del RVFV recombinante para confirmar el rescate y excluir la contaminación con virus de tipo silvestre no recombinante, ya que ningún virus de tipo silvestre estuvo presente en nuestro laboratorio antes del rescate de rec35/74.

Producción de VLP que contienen un minigenoma indicador utilizando la expresión transitoria de NSmGnGc a partir del plásmido.

Como una primera etapa hacia el establecimiento de un sistema de producción de partículas de replicación del virus de la fiebre del Valle del Rift (RRP), se desarrolló un sistema de minireplicones. Se diseñó un plásmido en el que el gen que codifica eGFP se coloca entre las regiones no traducidas del segmento M (UTR). Este plásmido se denominó pUC57-Mv-eGFP(-) y codifica el minigenoma M-eGFP en la orientación de sentido genómico. Al igual que las construcciones de longitud completa, el ADNc que codifica este minigenoma se flanquea por un promotor de polimerasa T7 y un ADNc que codifica una secuencia de ribozimas del HDV. La transfección de pUC57-Mv-eGFP(-) junto con los plásmidos pUC57-L y pUC57-S dio como resultado la expresión de eGFP en solo unas pocas células (datos no mostrados). En un intento de mejorar la expresión del minigenoma indicador, los dos plásmidos auxiliares pCIneo-RVFV-L y pCAGGS-N se agregaron a la mezcla de transfección. Esto resultó en un ligero aumento en el número de células positivas (datos no mostrados). A pesar del muy bajo número de células positivas a eGFP, se realizó el intento de empacar los segmentos

del genoma en las VLP cotransfectando las células con pCAGGS-NSmGnGc. Si de hecho se produjeron VLP, razonamos que estas VLP podrían contener uno, dos o tres segmentos de genoma. Para poder detectar también las VLP que contienen solo el minigenoma indicador, el sobrenadante no solo se agregó a células BHK-21 no tratadas, sino también a células BHK-21 que se transfectaron previamente con plásmidos auxiliares pCIneo-RVfV-L y pCAGGS-N. Se

5 mostró que muy pocas células BHK-21 que se inocularon con el sobrenadante recolectado expresaron eGFP después de 18-24 horas de incubación y la expresión solo se observó en células que se transfectaron previamente con plásmidos auxiliares (datos no mostrados). Por lo tanto, aunque se produjeron VLP, ninguna de estas VLP aparentemente contenía los tres segmentos del genoma.

Producción de VLP que contienen un minigenoma indicador utilizando NDV para proporcionar Gn y Gc.

10 Aunque previamente pudimos producir grandes cantidades de VLP al expresar GnGc en células de insecto (de Boer et al. 2010 Vaccine 28: 2330-2339), la producción de GnGc a partir de promotores pol-II en células de mamífero fue extremadamente baja en experimentos previos, no produciendo VLP detectables en el sobrenadante del cultivo (resultados no publicados). También reportamos previamente la producción de un NDV recombinante (es decir, NDVfL-GnGc, en este documento referido en adelante como NDV-GnGc) que produce las glucoproteínas GnGc. Curiosamente,

15 la infección de las células BHK-21 con este virus recombinante dio como resultado la producción de cantidades detectables de Gn y Gc en el sobrenadante (Kortekaas et al. 2010 Vaccine 28: 4394-4401). En el presente trabajo, nos preguntamos si NDV-GnGc se podría utilizar para proporcionar las proteínas Gn y Gc para el empaque de los segmentos del genoma RVfV. Las células se transfectaron primero con pUC57-L, pUC57-S y pUC57-Mv-eGFP(-) y se infectaron con NDV-GnGc, 24 horas más tarde. La expresión de eGFP se observó en un pequeño porcentaje de células

20 productoras y en muy pocas células receptoras (datos no mostrados). La expresión de eGFP en células receptoras dependía nuevamente de una transfección previa con los plásmidos auxiliares pCIneo-RVfV-L y pCAGGS-N. Estos experimentos demostraron que pudimos empaquetar un minigenoma indicador en VLP utilizando NDV-GnGc como fuente de las glucoproteínas, pero que no se obtuvieron partículas capaces de replicación autónoma.

25 Rescate mejorado del RVfV de ADNc utilizando un virus de la viruela aviar recombinante como fuente de polimerasa T7 y producción exitosa de RRP.

La recuperación del virus de las células BSR-T7/5 no fue reproducible. Como una alternativa para las células BSR-T7/5, decidimos utilizar un virus recombinante de la viruela aviar que expresa la polimerasa T7 (es decir, FP-T7) (Das et al. 2000. J Virol Methods 89: 119-127). En experimentos en los que se comparó la eficacia de rescate del RVfV utilizando células BSR-T7/5 y células BHK-21 infectadas con FP-T7, el uso de FP-T7 resultó en el rescate del RVfV en 5/5

30 intentos, mientras que el rescate utilizando células BSR-T7/5 no tuvo éxito. Anticipamos que un mayor nivel de expresión de polimerasa T7 por FP-T7 podría dar como resultado niveles de producción más altos de las proteínas N y L de los segmentos del genoma antígenómico (es decir, sentido positivo), lo que facilitaría el inicio de la replicación. Para probar esta hipótesis, el segmento pUC57-S se transfectó en células BSR-T7/5 y en células BHK-21 que se infectaron previamente con FP-T7. La transcripción del plásmido pUC57-S por la polimerasa T7 resulta en un ARN vírico

35 con sentido antígenómico cuyo gen N está en una orientación de sentido. Mientras que la proteína N no se pudo detectar en células BSR-T7/5 transfectadas con pUC57-S (Figura 1A), las células BHK-21 infectadas con FP-T7 que se transfectaron con este plásmido se tiñeron intensamente con anticuerpos anti-N (Figura 1B).

Se procedió a la cotransfección de pUC57-S, pUC57-L y pUC57-Mv-eGFP(-) en células BHK-21 infectadas con FP-T7. Mientras que en experimentos previos utilizando células BSR-T7/5, solo se observaron unas pocas células positivas de eGFP, en estos experimentos, el análisis FACS mostró que el 1.3% de las células eran positivas a eGFP (Figura 2). Se realizó un experimento similar en el que las células se cotransfectaron con pCAGGS-NSmGnGc. En este experimento, el 2.5% de las células fueron positivas para eGFP (Figura 2). Curiosamente, la observación de grupos de células

40 positivas a eGFP sugirió la propagación local de las VLP que contienen el minigenoma indicador (datos no mostrados). Después de tres días, el sobrenadante del cultivo se recolectó y se incubó con células BHK-21 que no se trataron o transfectaron con los plásmidos auxiliares pCIneo-RVfV-L y pCAGGS-N. En las células que se transfectaron con plásmidos auxiliares, el 1.3% fueron positivas para la expresión de eGFP (Figura 2). Más aún, el 0.9% de las células que no se transfectaron previamente con plásmidos auxiliares fueron positivas para la expresión de eGFP, lo que demuestra que tuvimos éxito en la producción de partículas de replicación que contienen los tres segmentos del genoma

45 (Figura 2).

50 Producción de RRP que contienen dos segmentos de genoma.

Para facilitar una mayor optimización del sistema, nuestro objetivo fue producir RRP que contengan solo dos segmentos de genoma. Para este fin, se produjo un minigenoma indicador en el que el gen que codifica el gen NS del segmento S se intercambió por el gen que codifica eGFP (es decir, S-eGFP). El trabajo previo demostró que el gen NSs no es esencial para el crecimiento en cultivo de tejidos (Muller et al. 1995. Am J Trop Med Hyg 53: 405-411) y otros estudios

55 demostraron que un virus que contiene esta supresión es viable (Ikegami et al. 2006. J Virol 80: 2933-2940). La cotransfección del plásmido resultante, pUC57-S-eGFP(-) con pUC57-L dio como resultado la expresión de eGFP en un pequeño porcentaje de células. Sin embargo, cuando se agregó pCAGGS-NSmGnGc a la mezcla de transfección, el 21.5% de las células fueron positivas para eGFP, según se determinó por análisis FACS (Figura 3). La incubación de células BHK-21 con el sobrenadante recolectado resultó en un 4.7% de células positivas cuando no se proporcionaron

plásmidos auxiliares, mientras que el número de células aumentó al 28,7% cuando se incluyeron plásmidos auxiliares (Figura 3).

Producción de estirpes celulares estables BHK-21 que producen glucoproteínas Gn y Gc.

5 Con el objetivo de producir un sistema para la producción continua de RRP, se produjeron estirpes celulares estables que producen constitutivamente las proteínas Gn y Gc. Brevemente, las células BHK-21 se transfectaron con pCIneo-GnGc y se hicieron crecer clones con plásmidos integrados en presencia de geneticina G-418. Se probaron una serie de clones para la expresión de Gn/Gc mediante IPMA. Un antisuero altamente positivo de una oveja infectada naturalmente no reveló ninguna célula positiva a Gn/Gc (datos no mostrados). Sin embargo, se utilizó con éxito un antisuero derivado de una oveja que se vacunó previamente con NDV-GnGc para identificar clones positivos. Uno de los clones mostró claramente el más alto nivel de expresión de Gn y Gc revelado por IPMA, aunque los niveles de expresión parecían bajos (Figura 4). Este clon se probó para la expresión de Gc mediante transferencia de Western de proteínas procedentes de lisados celulares. Utilizando un antisuero policlonal descrito previamente específico para un péptido derivado de Gc, se detectó claramente la expresión de Gc (Figura 4C). Esta estirpe celular se designó BHK-GnGc. Para determinar si las VLP se produjeron por estas células, los sobrenadantes se ultracentrifugaron y las proteínas presentes en los sedimentos recolectados se analizaron mediante transferencia de Western. La proteína Gc no se detectó en las fracciones de sedimentos, lo que sugiere que o bien no se produjeron VLP, o que la producción de glucoproteínas fue demasiado baja para permitir la detección.

El uso de una estirpe celular que mantiene los segmentos RVFV L y S-eGFP es esencial para la producción eficiente de RRP.

20 La producción de PRR por infección de células BHK-21 con FP-T7 y posterior introducción de plásmidos que proporcionan el segmento L, segmento S-eGFP y pCAGGS-NSmGnGc resultó en un máximo de títulos de PRR de 10^3 a 10^4 TCID₅₀/ml (datos no mostrados). Aunque la estirpe celular BHK-GnGc parecía no ser adecuada para la producción constitutiva a gran escala de RRP, fue sorprendente encontrar que la introducción de FP-T7 y la posterior introducción de plásmidos que proporcionan el segmento L, segmento S-eGFP y pCAGGS-NSmGnGc resultaron en grupos de células positivas que eran más grandes tanto en número como en tamaño que aquellas obtenidas con células BHK-21 normales.

Una estirpe celular que mantiene los segmentos RVFV L y S-eGFP podría ser muy valiosa para diversas aplicaciones, que incluyen cribados de alto rendimiento de agentes antivíricos fuera de las instalaciones de contención de bioseguridad. Por lo tanto, nos propusimos producir un cultivo celular del cual cada célula contiene el segmento L y S-eGFP del RVFV. Para este fin, se introdujo el virus FP-T7, seguido de la introducción de los plásmidos que proporcionan el segmento L y el segmento S-eGFP. Para facilitar la propagación del segmento L y S-eGFP, pCAGGS-NSmGnGc se introdujo varias veces después del pasaje de las células. Utilizando este método, se obtuvieron estirpes celulares de células de tipo silvestre BHK-21 así como de BHK-GnGc, de las cuales la mayoría de las células, si no todas, expresaban el indicador eGFP. Sin embargo, mientras que el pasaje repetitivo de las células BHK-21 que expresan eGFP resultó en la pérdida de eGFP, el pasaje de las células BHK-GnGc que expresan eGFP no dio como resultado ninguna pérdida de la expresión de eGFP. Para por lo menos 50 pasajes celulares, la expresión de eGFP en estas células permaneció sin cambios. Cuando no se transfectaron, se encontró que las células BHK-GnGc que contenían los replicones RVFV producían cantidades muy pequeñas de RRP, con un rendimiento máximo de 10^2 TCID₅₀/ml. De manera importante, la introducción de pCAGGS-NSmGnGc o pCAGGS-GnGc en estas células dio como resultado títulos de RRP de $10^{6.8}$ o $10^{6.4}$ TCID₅₀/ml máximo, respectivamente (Figura 5).

Producción eficiente de RRP utilizando NDV-GnGc.

Considerando la producción superior de GnGc por NDV cuando se compara con la expresión del plásmido, probamos si las PVr se podrían producir por infección de las células con NDV-GnGc. Las células BHK-GnGc se coinfectaron con FP-T7 y NDV-GnGc y, después de recuperación, se transfectaron con pUC57-L y pUC57-S-eGFP(-). Después de 72 horas de incubación, se observaron "cometas" extremadamente grandes de células positivas en los matraces (datos no mostrados). Este resultado sugiere que se producen grandes cantidades de RRP cuando se utiliza NDV-GnGc para proporcionar las glucoproteínas. Posteriormente dividimos el cultivo en dos matraces. Uno se dejó sin tratar, el otro nuevamente fue infectado con NDV-GnGc. Los sobrenadantes de estas células se recolectaron después de 48 horas y los títulos de RRP de TCID₅₀ se determinaron sobre células BHK-21. El sobrenadante de las células que se infectaron con NDV-GnGc dos veces, contenía un título de 10^7 TCID₅₀/ml, mientras que el sobrenadante de las células que se infectaron solo una vez contenía un título de $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml. La última estirpe celular se pasó 18 veces, después de lo cual se determinó nuevamente el título de RRP. Sorprendentemente, esto reveló un título de 10^6 TCID₅₀/ml. Adicionalmente, el examen visual de esta estirpe celular mediante microscopía de fluorescencia reveló que la mayoría de las células, si no todas, expresaban eGFP (Figura 6). Este resultado nos llevó a sugerir que las células fueron infectadas persistentemente con NDV-GnGc, proporcionando de esta manera una fuente continua de Gn y Gc. De hecho, el IPMA utilizando un mAb específico para la proteína F de NDV, reveló la presencia del virus en un subconjunto de las células. Sin embargo, es importante señalar que el virus presente en el sobrenadante de estas células demostró ser no infeccioso. Sin embargo, esto se esperaba, dado que las cepas de NDV lentogénicas, tales como la cepa recombinante LaSota utilizada en el trabajo actual, requieren la división de la proteína F mediante proteasas de tipo

tripsina para la infectividad. En conclusión, en virtud de la infección persistente de las células con NDFL-GnGc, las RRP pueden producirse continuamente con títulos de hasta $10^{6.7}$ TCID₅₀/ml.

Para demostrar que las RRP son incapaces de propagación autónoma, las células BHK se infectaron con RRP a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 1. Después de dos días, se observó la expresión de eGFP mediante microscopía de fluorescencia (Figura 8, panel izquierdo). Las células BHK se incubaron con sobrenadante previamente depurado recolectado y después de tres días, las células se monitorizaron para expresión de eGFP. No se observó expresión de eGFP, lo que demuestra que no se produjeron partículas infecciosas de progenie mediante las células BHK infectadas con RRP (Figura 8, panel derecho).

Para establecer la cinética de producción de RRP, las células BHK-rep se transfectaron con pCAGGS-NSmGnGc y el medio de cultivo se recolectó en diferentes momentos después de la transfección. Las RRP se titularon en células BHK utilizando la expresión de eGFP como el parámetro de lectura. Este experimento demostró que ya se obtenía un título cercano a 10^6 TCID₅₀/ml después de 22 h (Figura 9).

Para visualizar las proteínas de RRP, las RRP se sedimentaron por ultracentrifugación. Las proteínas se separaron en geles NuPAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se detectaron utilizando antisueros peptídicos específicos para la proteína Gn y Gc o un anticuerpo monoclonal específico para la proteína N. El análisis del sobrenadante obtenido a partir de células BHK-Rep no transfectadas reveló solo la proteína N (Figura 10). Curiosamente, este resultado sugiere que la proteína N del RVFV se libera de las células, presumiblemente en forma de partículas de núcleo de ribonucleoproteína, que se asemejan a los resultados descritos previamente a partir de estudios sobre CCHFV (Bergeron et al. 2007. J Virol 81: 13271-13276). El análisis del sobrenadante de células BHK-Rep transfectadas con pCAGGS-NSmGnGc (pCAGGS-M) reveló la proteína Gn, la proteína NSm, la proteína Gc y la proteína N (Figura 10).

Ejemplo 2.

Producción de partículas de replicón de bunyavirus (BRP) de la cepa IbAr10200 del virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo

El ADNc que codifica ARN de longitud completa con sentido anti-virus de los segmentos del genoma L (GenBank: AY389508.2), M (GenBank: AF467768. 2) y S (GenBank: U88410.1) de la cepa IbAr10200 del CCHFV se sintetizan y flanquean por un promotor de polimerasa T7 y ADNc que codifica una secuencia de ribozimas del HDV. Una secuencia de terminación de la transcripción T7 está preferiblemente situada corriente abajo del ADNc de la ribozima. Estas secuencias se clonan en vectores pUC57 esencialmente como se ejemplifica en el Ejemplo 1, lo que resulta en pUC57-CCHFV-L, pUC57-CCHFV-M y pUC57-CCHFV-S.

Para facilitar la clonación en pUC57 del ADNc que codifica el segmento del genoma CCHFV L, se introduce un sitio de restricción KpnI inmediatamente corriente arriba de la secuencia promotora T7 e inmediatamente corriente abajo de la secuencia de terminación de la transcripción T7.

Para facilitar la clonación del ADNc que codifica el segmento del genoma M de CCHFV, se introduce un sitio de restricción KpnI inmediatamente corriente arriba de la secuencia promotora T7 y se introduce un sitio de restricción Sall inmediatamente corriente abajo de la secuencia de terminación de la transcripción T7.

Para facilitar la clonación del ADNc que codifica el segmento del genoma S de CCHFV, se introduce un sitio de restricción EcoRI inmediatamente corriente arriba de la secuencia promotora T7 y se introduce un sitio de restricción BamHI inmediatamente corriente abajo de la secuencia de terminación de la transcripción T7.

El marco de lectura abierto completo del segmento del genoma M (M-ORF, nucleótidos 93-5147 de la secuencia GenBank AF467768.2) se introduce corriente abajo del promotor CMV de pCIneo. Las estirpes celulares estables se producen al transfectar pCIneo-M-ORF en células BHK-21 y las células con plásmidos integrados se seleccionan al cultivar en presencia de G-418.

Como alternativa, las células BHK-21 se proporcionan con las proteínas codificadas M-ORF de CCHFV al infectar la célula eucariota con un vector vírico recombinante que transduce la poliproteína codificada por M-ORF de CCHFV, seguido por la selección de una célula en la que el vector vírico recombinante está presente persistentemente sin provocar un efecto citopatogénico manifiesto.

Las células que (condicional o constitutivamente) expresan las proteínas codificadas por M-ORF de CCHFV se infectan con FP-T7 y, después de la recuperación, se transfectan con los plásmidos pUC57-CCHFV-L y pUC57-CCHFV-S. Cuando se requiere para una producción eficiente, una construcción que codifica las glucoproteínas estructurales de CCHFV bajo el control de un promotor de Polimerasa II adecuado (tal como el promotor de CAG en el plásmido pCAGGS) también se transfecta o infecta para proporcionar las glucoproteínas estructurales de CCHFV. Este procedimiento resulta en la producción de partículas de replicón de CCHFV que no contienen un segmento M del genoma de CCHFV.

El promotor T7 que se utiliza tiene la secuencia de nucleótidos: 5'-TAATACGACTCACTATAG-3'

ES 2 679 968 T3

La secuencia de ribozimas del HDV que se utiliza tiene la secuencia de nucleótidos 5'- GGGTCGGCATGGCATCTCC-3'.

La secuencia del terminador T7 que se utiliza tiene la secuencia de nucleótidos: 5-TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG-3'.

5 Ejemplo 3.

Producción de partículas de replicón de bunyavirus (BRP) de la cepa DOBV/Ano-Poroia/Afl9/1999 del virus de Dobrava-Belgrado (DOBV)

10 El ADNc que codifica ARN de longitud completa con sentido anti-virus de los segmentos del genoma L (GenBank: AJ410617.1), M (GenBank: AJ410616.1) y S (GenBank: AJ410615.1) de la cepa de DOBV DOBV/Ano-Poroia/Afl9/1999 se sintetiza y flanquea por un promotor de polimerasa T7 y el ADNc que codifica una secuencia de ribozimas del HDV. Una secuencia de terminación de la transcripción de T7 está presente preferiblemente corriente abajo del ADNc de ribozima introducido. Estas secuencias se clonan en vectores pUC57 esencialmente como se ejemplifica en el Ejemplo 1, lo que resulta en pUC57-DOBV-L, pUC57-DOBV-M y pUC57-DOBV-S.

15 Para facilitar la clonación en pUC57 del ADNc que codifica el segmento del genoma L de DOBV, se introduce un sitio de restricción BamHI inmediatamente corriente arriba de la secuencia promotora T7 e inmediatamente corriente abajo de la secuencia de terminación de la transcripción T7.

Para facilitar la clonación del ADNc que codifica el segmento del genoma M de DOBV, se introduce un sitio de restricción KpnI inmediatamente corriente arriba de la secuencia promotora T7 y se introduce un sitio de restricción Sall inmediatamente corriente abajo de la secuencia de terminación de la transcripción T7.

20 Para facilitar la clonación del ADNc que codifica el segmento del genoma S de DOBV, se introduce un sitio de restricción KpnI inmediatamente corriente arriba de la secuencia promotora T7 y se introduce un sitio de restricción Sall inmediatamente corriente abajo de la secuencia de terminación de la transcripción T7.

25 El marco de lectura abierto completo del segmento del genoma M (MDOBV-ORF, nucleótidos 41-3448 de la secuencia GenBank AJ410616.1) se introduce corriente abajo del promotor CMV de pCIneo. Las estirpes celulares estables se producen al transfectar pCIneo-MDOBV-ORF en células BHK-21 y al seleccionar células con plásmidos integrados al cultivar en presencia de G-418.

Alternativamente, se proporciona la célula eucariota con proteínas codificadas por MDOBV-ORF al infectar la célula eucariota con un vector vírico recombinante que produce las proteínas MDOBV, seguido al seleccionar una célula en la que el vector vírico recombinante está presente persistentemente sin provocar efecto citopatogénico manifiesto.

30 Las células que (condicional o constitutivamente) expresan las proteínas codificadas por MDOBV-ORF se infectan con FPT7 y, después de la recuperación, se transfectan con los plásmidos pUC57-DOBV-L y pUC57-DOBV-S. Cuando se requiere para una producción eficiente, una construcción que codifica las glucoproteínas estructurales DOBV bajo el control de un promotor de Polimerasa-II adecuado (tal como el promotor CAG en el plásmido pCAGGS) también se transfecta o infecta para proporcionar las glucoproteínas estructurales del DOBV. Este procedimiento resulta en la
35 producción de partículas de replicón del DOBV.

El promotor T7 que se utiliza tiene la secuencia de nucleótidos: 5'-TAATACGACTCACTATAG-3'

La secuencia de ribozimas del HDV que se utiliza tiene la secuencia de nucleótidos 5'-GGGTCGGCATGGCATCTCC-3'.

La secuencia del terminador T7 que se utiliza tiene la secuencia de nucleótidos: 5-TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG-3'

40 Ejemplo 4.

Sistema de Tet-Off para la expresión inducible de proteínas NSm, Gn y Gc del RVFV

Las células BHK-21 se transfectan con el plásmido pTet-Off Advanced (Clontech, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Después de la selección con G-418, se seleccionan clones resistentes, obteniéndose una estirpe celular BHK-Tet-Off Advanced.

45 Los marcos de lectura abiertos completos del segmento M de una cepa 35/74 del RVFV (nucleótidos 21-3614) se sintetizan con sitios de restricción flanqueados KpnI (extremo 5') y NotI y Sall (extremo 3') y se clonan en pUC57 utilizando sitios de restricción KpnI y Sall (GenScript Corporation). Los insertos se liberan de los plásmidos pUC57 mediante digestión con KpnI/NotI y se clonan en el vector pTREtight digerido con KpnI/NotI (Clontech).

50 Las células BHK-Tet-Off Advanced se transfectan con pTREtight-NSmGnGc y un marcador lineal que facilita la selección de células transfectadas mediante higromicina o puromicina. Los clones que producen las proteínas de interés se seleccionan al cultivar los clones en ausencia de doxiciclina (DOX).

Después de la selección de clones adecuados, las células se hacen crecer en presencia de DOX y se infectan con FP-T7. Después de la recuperación, las células se transfectan con pUC57-L y pUC57-S-eGFP. Después de la recuperación, el medio de cultivo de las células se reemplaza por medio sin DOX, lo que resulta en la expresión de NSm, Gn y Gc y la formación de partículas de replicón RVFV.

5 Ejemplo 5

Partículas del replicón del RVFV que producen HA multimérico soluble recombinante del virus de la influenza 2009 A (H1N1) de origen porcino pandémico.

10 Se sintetizan Oligo MSC-1 y Oligo MSC-2. La hibridación de Oligo MCS-1 y Oligo MCS-2 da como resultado una molécula de ADN de doble cadena que contiene proyecciones de NcoI y XbaI y sitios de restricción SpeI, XhoI, BglII, NotI adicionales.

Oligo MCS 1: 5'-CATGGACTAGTCTCGAGGCTAGCAGATCTGCGGCCGCT-3'

Oligo MCS 2: 5'-CTAGAGCGGCCGAGATCTGCTAGCCTCGAGACTAGTC-3'

El gen eGFP se elimina de pUC57-S-eGFP (Figura 7F) mediante digestión de NcoI/XbaI y el ligador MCS se liga en este vector, produciendo pUC57-S-MCS.

15 La secuencia enumerada a continuación (Sec. CD5-HA-GCN4-ST) codifica un ectodominio de hemaglutinina soluble optimizado por codones humanos (sHA, aminoácidos 17 a 522) del virus de influenza A/California/04/2009 (H1N1). Esta secuencia se sintetiza en GenScript Corporation. El gen HA está precedido por una secuencia que codifica un péptido de señal CD5 de terminal N y seguido por secuencias que codifican un dominio de trimerización artificial GCN4 de terminal C (GCN4-pII, Harbury et al. 1993. Science 262: 1401-1407) y una estreptavidina-tag (Strep) para la purificación de afinidad. Esta construcción se describe en Bosch et al. 2010. J. Virol. 84: 10366-10374).

20 Para generar un vector que comprende CD5-sHA-GCN4-pII, pUC57-S-MCS se digiere con la secuencia de HA-GCN4-ST digerida con NheI/XbaI y NheI/XbaI se clona en este plásmido, produciendo pUC57-S-HA -GCN4-ST. La secuencia de CD5 se introduce posteriormente al hibridar el siguiente oligo:

25 Oligo CD5-1: 5'-CTAGTATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGCCACCTTGTACCTGCTG
GGGATGCTGGTCGCTTCCGTG-3'

Oligo CD5-2: 5'-CTAGCACGGAAGCGACCAGCATCCCCAGCAGGTACAAGGTGGCCAGCGG
TTGCAGAGACCCCATGGGCATA-3'

El ligador CD5 se liga en pUC57-S-HA-GCN4-ST con SpeI/NheI, produciendo pUC57-S-CD5-HA-GCN4-ST.

30 Las células BHK-GnGc se infectan con FP-T7. Después de la recuperación, las células se transfectan con pUC57-L, pUC57-SCD5-HA-GCN4-ST y pCAGGS-NSmGnGc, esencialmente como se ejemplifica en el Ejemplo 1. Después del pasaje de las células, se repite la transfección. Esta secuencia de eventos se repite hasta que todas las células de la monocapa expresan la proteína CD5-HA-GCN4-ST, como se determina por IPMA. Se determina la cantidad de HA-GCN4-ST en el medio de cultivo de estas células. Para establecer niveles elevados de proteínas NSmGnGc, se introduce nuevamente el plásmido pCAGGS-NSmGnGc en la estirpe celular, produciendo partículas de replicón que
35 contienen el gen S-CD5-HA-GCN4-ST. Las partículas de replicón se utilizan para experimentos de vacunación/inoculación en ratones para establecer la eficacia protectora contra una inoculación letal a H1N1.

Seq. CD5-HA-GCN4-ST

Los nucleótidos 1-69 (subrayados) codifican la secuencia CD5

Los nucleótidos 70-1590 codifican el ectodominio HA

40 Los nucleótidos 1591-1713 (subrayados) codifican el dominio GCN4

Los nucleótidos 1714-1737 codifican la Strep tag

ES 2 679 968 T3

atgcccatggggctctctgcaaccgctggccacctgtacctgctggggatgctggtcgct
M P M G S L Q P L A T L Y L L G M L V A
tccgtgctagcagacaccctgtgcatcggctaccacgccacaacagcaccgacaccgtg
S V L A D T L C I G Y H A N N S T D T V
gacaccgtgctggagaagaacgtgaccgtgacccacagcgtgaacctgctggaggacaag
D T V L E K N V T V T H S V N L L E D K
cacaacggcaagctgtgcaagctgcgcgggcgtggctcactgcacctgggcaagtgcaac
H N G K L C K L R G V A P L H L G K C N
attgctggatggatcctgggaaaccagagtgcgagagcctgagcaccgccagcagctgg
I A G W I L G N P E C E S L S T A S S W
agctacatcgtggagacccccagcagcgacaacggcacctgctacccccggcgacttcac
S Y I V E T P S S D N G T C Y P G D F I
gactacgaggagctgcgcgagcagctgagcagcgtgagcagcttcgagcgcttcgagatc
D Y E E L R E Q L S S V S S F E R F E I
ttccccaagaccagcagctggccaaaccacgacagcaacaagggagtgaccgctgcttgc
F P K T S S W P N H D S N K G V T A A C
ccacagctggagccaagagcttctacaagaacctgatctggctggtgaagaagggcaac
P H A G A K S F Y K N L I W L V K K G N
agctacccaagctgagcaagagctacatcaacgacaagggcaaggaggtgctggtgctg
S Y P K L S K S Y I N D K G K E V L V L
tggggcatccaccacccagcaccagcgcgcgaccagcagagcctgtaccagaacgccgac
W G I H H P S T S A D Q Q S L Y Q N A D
acctacgtgttcgtgggcagcagccgctacagcaagaagttcaagcccagatcgccatc
T Y V F V G S S R Y S K K F K P E I A I
cgcccaaggtgcgcgaccagggggcgcgatgaactactactggacctggtggagccc
R P K V R D Q E G R M N Y Y W T L V E P
ggcgacaagatcacctttgaggctaccggaaacctggtggtgccacgctacgcttttgct
G D K I T F E A T G N L V V P R Y A F A
atggagaggaatgctggcagcggcatcatcatcagcagacacccccgtgcacgactgcaac
M E R N A G S G I I I S D T P V H D C N

accacctgccagaccccccaaggcgccatcaacaccagcctgcccttcagaacatccac
 T T C Q T P K G A I N T S L P F Q N I H
 cccatcaccatcggcaagtgccccaagtacgtgaagagcaccaagctgcgcctggccacc
 P I T I G K C P K Y V K S T K L R L A T
 ggactgaggaacatcccaagcatccagagccgcggcctgtttggagctattgctggattc
 G L R N I P S I Q S R G L F G A I A G F
 attgagggcggctggaccggaatggtggatggatggtacggctaccaccaccagaacgag
 I E G G W T G M V D G W Y G Y H H Q N E
 cagggcagcggctacgccgccgacctgaagagcaccagaacgccatcgacgagatcacc
 Q G S G Y A A D L K S T Q N A I D E I T
 aacaaggtgaacagcgtgatcgagaagatgaacaccagttcaccgccgtgggcaaggag
 N K V N S V I E K M N T Q F T A V G K E
 ttcaaccacctggagaagcgcacatcgagaacctgaacaagaaggtggacgacggcttcctg
 F N H L E K R I E N L N K K V D D G F L
 gacatctggacctacaacgccgagctgctggtgctgctggagaacgagcgcaccctggac
 D I W T Y N A E L L V L L E N E R T L D
 taccacgacagcaacgtgaagaacctgtacgagaaggtgcgagccagctgaagaacaac
 Y H D S N V K N L Y E K V R S Q L K N N
 gccaaaggagatcggcaacggctgcttcgagttctaccacaagtgcgacaacacctgcatg
 A K E I G N G C F E F Y H K C D N T C M
 gagagcgtgaagaacggcacctacgactaccccaagtacagcagggaggccaagctgaac
 E S V K N G T Y D Y P K Y S E E A K L N
 Cgcgaggagatcgacggcgtgaagctcgagtttaattaagcgcacatgaagcagatcgaggac
R E E I D G V K L E L I K R M K Q I E D
aagatcgaagagatcgagttccaagcagaagaagatcgagaacgagatcgcccgcatcaag
K I E E I E S K Q K K I E N E I A R I K
Aagattaagctggtgccgcggcagcctcgagtgaggccaccgcagttcgagaagtga
 K I K L V P R G S L E W S H P Q F E K -

Ejemplo 6

Infección de RRP de células de mamífero e insectos y producción de RRP

- 5 Para determinar si otras células de mamífero e insectos se pueden infectar con RRP, células 293 de riñón embrionario humano (HEK293T), células Drosophila S2 y células Aedes albopictus C6/36 se infectaron con RRP en un m.o.i. de 1. De nota, el m.o.i. se calculó utilizando el título determinado sobre las células BHK. Este experimento demostró que tanto las células de mamífero como las de insectos se pueden infectar fácilmente con RRP, aunque la expresión del gen indicador en células de insecto es considerablemente menor (Figura 11A). La expresión de eGFP en células de mamífero y células de insecto fue óptima a las 42 o 72 horas después de la infección (hpi), respectivamente (Figura 11).
- 10 A continuación, estuvimos interesados en determinar si las células HEK293T se pueden utilizar para la producción de RRP. Con este fin, las células BHK y las células HEK293T se infectaron con RRP a una m.o.i. de 3. Después de tres días, las células se sembraron en una placa de 6 pozos y se transfectaron con pCAGGS-NSmGnGc. El sobrenadante se recolectó después de tres días y los títulos de RRP obtenidos fueron $10E7$ (10^7) o células BHK y $10E6.5$ ($10^{6.5}$) TCID₅₀/ml para células HEK293T. Este resultado demuestra que las células BHK tipo silvestre y las células HEK293T se

pueden utilizar para la producción de RRP al combinar una infección por RRP con una transfección del plásmido pCAGGS-NSmGnGc.

Ejemplo 7.

Uso de RRP en una prueba de neutralización del virus (VNT)

5 La VNT clásica y una VNT novedosa que utiliza RRP en lugar de virus vivos (VNT RaPid) se realizaron con sueros de corderos que se habían infectado previamente experimentalmente con el virus 35/74. Para confirmar la presencia de anticuerpos específicos del RVFV, los sueros se analizaron mediante el recN RVFV ELISA (BDSL, Ayrshire Scotland, Reino Unido) antes del análisis por VNT. La VNT clásica se realizó como se describió previamente (de Boer et al. 2010. Vaccine 28: 2330-2339). Para la VNT RaPid, las diluciones de suero se prepararon en placas de 96 pozos en 50 µl de GMEM suplementado con SFB al 5%, TPB al 4%, MEM NEAA al 1%, pen/estrep al 1%. Se agregó medio de crecimiento que contenía ~200 RRP en un volumen de 50 µl a las diluciones de suero y se incubó durante 1.5 h a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 50 µl de medio de crecimiento que contenía 40,000 células BHK a cada pozo. Las placas se incubaron a 37°C y CO2 al 5%. Después de 36-48 horas, se calculó el título de neutralización utilizando el método Spearman-Kärber (Karber (1931) Arch. Exp Path. Pharmak 162: 480-483; Spearman (1908). Br J Psychol 2: 227-242).

Tabla 1. Comparación del ensayo de VNT clásico con la VNT RaPid. Los sueros de corderos infectados experimentalmente se analizaron mediante recN ELISA (ELISA), VNT clásica y VNT RaPid. Los títulos de neutralización se determinan como ¹⁰log de títulos de punto final 50%.

Cordero No:	VNT clásica	VNT RaPid	ELISA
4308	3.56	3.94	POS
4309	4.09	4.16	POS
4310	0	0	NEG
4311	4.01	4.24	POS
4312	3.71	4.76	POS
4314	3.56	4.46	POS
4315	3.71	4.39	POS
4318	4.16	4.39	POS
4321	0	0	NEG
4324	4.24	4.31	POS
4328	4.01	4.69	POS

Este experimento reveló que el uso de RRP en el llamado VNT RaPid tiene una lectura óptima entre 36 y 48 horas y tiene una sensibilidad igual, si no más alta, que la VNT clásica (Tabla 1).

Ejemplo 8

Vacunación e inoculación de ratones

25 Se alojaron ratones hembra BALB/c (Charles River laboratories, Maastricht, Países Bajos) en grupos de cinco animales en jaulas con filtro superior tipo III y se mantuvieron bajo una contención de bioseguridad de nivel 3. Se vacunaron grupos de 10 ratones por medio de la ruta intramuscular o subcutánea una vez el día 21 o dos veces en los días 0 y 21 con 10E6 TCID50 de RRP en 50 µl de PBS. Un grupo de nueve ratones no se trató (no vacunado). Los pesos corporales de los ratones se monitorizaron semanalmente. El día 42, todos los ratones se expusieron a través de la ruta intraperitoneal con 10E2.7 TCID50 de la cepa 35/74 del RVFV en 0.5 ml de medio de cultivo. Los ratones inoculados se monitorizaron diariamente para signos visuales de enfermedad y mortalidad. Este experimento fue aprobado por el Comité de Ética para Experimentos con Animales del Instituto Veterinario Central de la Universidad y Centro de Investigación de Wageningen.

Para estudiar la eficacia de la vacuna de las RRP, se inmunizaron grupos de 10 ratones con 50 μ l de un inóculo que contenía 10E6 TCID50 RRP, mediante ruta subcutánea o intramuscular, ya sea una o dos veces, con un intervalo de tres semanas. Se agregó un grupo de 9 ratones no vacunados como grupo de control. Los ratones se inocularon el día 42 con una dosis letal conocida de la cepa 35/74 del RVFV. Todos los ratones no vacunados mostraron signos clínicos evidentes y pérdida de peso y ocho de un total de nueve ratones no vacunados sucumbieron a la infección dentro de los cuatro días posteriores a la inoculación. Un ratón sobrevivió durante doce días, pero finalmente murió. El porcentaje de supervivencia en los grupos de ratones vacunados ya sea una o dos veces por vía subcutánea fue del 60% (Figura 12). Por el contrario, el 100% de los ratones vacunados mediante la ruta intramuscular, ya sea una o dos veces, sobrevivieron a la inoculación (Figura 12). Estos ratones no mostraron signos clínicos o pérdida de peso durante todo el experimento. Esto demuestra que una sola vacunación intramuscular con 10E6 RRP puede proteger a los ratones de una dosis letal del RVFV.

Ejemplo 9

Producción de partículas de replicón de bunyavirus de la Fiebre Severa con el HB29 aislado del virus de la trombocitopenia (SFTS).

15 El virus SFTS fue descrito por primera vez por (Yu XJ, et al. Fever with Thrombocytopenia Associated with a Novel Bunyavirus in China. N Engl J Med 2011 Mar 16).

Los ADNc que codifican ARN vírico de longitud completa que corresponden a los segmentos del genoma L (GenBank: HM745930.1), M (GenBank: HM745931.1) y S (GenBank: HM745932.1) del HB29 aislado del virus SFTS se sintetizan y flanquean mediante un promotor de polimerasa T7 y un ADNc que codifica una secuencia de ribozimas del HDV. Una secuencia de terminación de la transcripción T7 preferiblemente se ubica corriente abajo del ADNc de la ribozima. Estas secuencias se clonan en vectores pUC57 esencialmente como se ejemplifica en el Ejemplo 1, lo que resulta en pUC57-SFTS-L, pUC57-SFTS-M y pUC57-SFTS-S.

25 Para facilitar la clonación en pUC57 del ADNc que codifica el segmento del genoma L de SFTS, se introduce un sitio de restricción KpnI inmediatamente corriente arriba de la secuencia promotora T7 e inmediatamente corriente abajo de la secuencia de terminación de la transcripción T7.

Para facilitar la clonación del ADNc que codifica el segmento del genoma M de SFTS, se introduce un sitio de restricción KpnI inmediatamente corriente arriba del promotor T7 e inmediatamente corriente abajo de la secuencia de terminación de la transcripción T7.

30 Para facilitar la clonación del ADNc que codifica el segmento del genoma S de SFTS, se introduce un sitio de restricción KpnI inmediatamente corriente arriba de la secuencia promotora T7 e inmediatamente corriente abajo de la secuencia de terminación de la transcripción T7.

Se desarrolla también una construcción adicional que codifica un segmento de tipo de genoma S de SFTS en el que el gen NSs (nucleótidos 835-1716 de GenBank: HM745932.1) se reemplaza por un gen que codifica una proteína indicadora adecuada (es decir, eGFP o luciferasa). Un plásmido que codifica un segmento del genoma de tipo S en el que el gen NSs se reemplaza por el gen eGFP se denomina pUC57-SFTS-S-eGFP. Similar a la mostrada para RVFV, la introducción de los segmentos del genoma SFTS-L y SFTS-S-eGFP en células adecuadas (por ejemplo, células BHK-21) da como resultado células viables que mantienen estos segmentos del genoma.

40 El marco de lectura abierto completo del segmento del genoma M (M-ORF, nucleótidos 19-3240 de la secuencia de GenBank HM745931.1) se introduce corriente abajo del promotor de CMV de pCIneo. Las estirpes celulares estables se producen al transfectar pCIneo-SFTS-M-ORF en células BHK-21 y las células con plásmidos integrados se seleccionan al cultivar en presencia de G-418.

45 Como alternativa, las células BHK-21 se proporcionan con las proteínas codificadas por SFF-M-ORF al infectar la célula eucariota con un vector vírico recombinante que transduce la poliproteína codificada por SFTS M-ORF- y se selecciona una estirpe celular en la que el vector vírico recombinante está presente persistentemente sin provocar un efecto citopatogénico manifiesto.

50 Las células que expresan las proteínas codificadas por SFTS M-ORF- se infectan con FP-T7 y, después de la recuperación, se transfectan con los plásmidos pUC57-SFTS-L y pUC57-SFTS-S o pUC57-SFTS-S-eGFP. Cuando se requiere para una producción eficiente, una construcción que codifica las glucoproteínas estructurales SFTS bajo el control de un promotor de Polimerasa II adecuado (tal como el promotor CAG en el plásmido pCAGGS) también se transfecta o infecta para proporcionar las glucoproteínas estructurales de SFTS. Este procedimiento da como resultado la producción de partículas de replicón de SFTS del HB29 aislado que no contienen un segmento del genoma M de SFTS.

El promotor T7 que se utiliza tiene la secuencia de nucleótidos: 5'-TAATACGACTCACTATAG-3'

La secuencia de ribozimas del HDV que se utiliza tiene la secuencia de nucleótidos 5'-GGGTCGGCATGGCATCTCC-3'.

La secuencia del terminador T7 que se utiliza tiene la secuencia de nucleótidos: 5-TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTT-3'

Se puede utilizar un método similar para producir partículas de replicón de otros aislados de SFTS.

Ejemplo 10

5 Inmunidad rápida contra RVFV en ovejas después de una única vacuna con la vacuna NSR

Materiales y métodos

Preparación del virus de inoculación

10 El virus RVFV que se utilizó para la inoculación se rescató a partir de ADNc (véase el Ejemplo 1 y Kortekaas et al. 2011. J Virol. Aceptado para publicación). El virus 35/74 recombinante (rec35/74) se tituló en células BHK-21 y el título se determinó como la dosis 50 infecciosa de cultivo tisular (TCID₅₀) utilizando el algoritmo Spearman-Kärber (Ejemplo 1). La secuencia completa de las secuencias del genoma L, M y S del aislado 35/74 se puede encontrar en GenBank bajo los números de acceso JF784386, JF784387 y JF784388, respectivamente.

2.2 Preparación de las vacunas

15 El ectodominio de la proteína Gn (GneS3) se produjo a partir del vector de expresión de insectos pMT/BiP/V5-HisA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). La secuencia que codifica el péptido de señal de Gn auténtico se reemplazó por una secuencia que codifica el péptido de señal BiP, que especifica la secuencia de unión "GLSLG-RSLRSLAEDPH", en la que GLSLG denota el BiP, RSLRSL indica una secuencia del ligador y AEDPH el inicio del ectodominio de Gn. En el plásmido pMT-GneS3, la secuencia de ectodominio Gn se fusionó a una secuencia que codifica un sitio de división de FLAG-tag/enterocinasa (EK) combinado para fácil detección y purificación de la proteína monomérica (DYKDDDDK) y tres Strep tags (WSHPQFEK) separadas por ligadores de glicina (GGGSGGGSGGGS), lo que resulta en la siguiente secuencia:

20 (...YQCHTDPTGDYKDDDDKAGPGWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSSWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSSWSHPQFEK en la que las secuencias resultantes de los sitios de restricción introducidos se indican en negrita. El sitio de división de enteroquinasa se introdujo para permitir la eliminación de la Strep-tag después de la purificación

25 El ectodominio de Gn secretado se purificó a partir del sobrenadante de cultivo celular en virtud de su 3xStreptag de terminal C utilizando Strep-Tactin Sefarosa de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (IBA, Göttingen, Alemania). La proteína GneS3 se eluyó de las perlas lavadas con D-Destiotina 4 mM (IBA) y se concentró utilizando un concentrador Amicon® Ultra-4 con un corte de masa molecular de 30 kDa (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). La proteína, llamada GneS3, se formuló en adyuvante Stimune de agua en aceite (Prionics, Lelystad, Países Bajos) hasta una concentración final de 20 µg/ml.

30 La producción del NDFL-GnGc se reportó previamente (Kortekaas et al. 2010. Vaccine 28: 4394-4401). La vacuna OBP es una vacuna RVFV inactivada disponible comercialmente (Onderstepoort Biological Products [OBP], Onderstepoort, Sudáfrica). Esta vacuna se compró a OBP y se administró de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las dosis administradas y las rutas de vacunación de las cuatro vacunas indicadas se representan en la Tabla 2.

35 Tabla 2. Ruta y dosis de vacunas

Vacuna	Ruta	Dosis	Adyuvante
vacuna OBP	Subcutánea	De acuerdo con el protocolo del fabricante	Gel de hidróxido de aluminio
NDFL-GnGc	Intramuscular	2.10 ⁷ TCID ₅₀	Ninguno
NSR	Intramuscular	10 ⁷ TCID ₅₀	Ninguno
GneS3	Subcutánea	20 µg	Stimune agua en aceite

2.3 Vacunación e inoculación

40 Se compraron treinta corderos de raza europea convencionales de una granja comercial de ovejas en los Países Bajos y se dividieron en cinco grupos. Los corderos fueron vacunados una vez a la edad de seis semanas (día 0), como se muestra en la Tabla 2. El día 19 (días post inoculación [DPC] 0), todos los corderos se inocularon por la ruta intraperitoneal con 10⁵ TCID₅₀ del RVFV rec35/74. Se recolectaron muestras de sangre con EDTA diariamente desde el día 19 (DPC 0) hasta el día 26 (DPC 7) y nuevamente los días 28, 30, 33, 35, 37 y 40 (DPC 9, 11, 14, 15, 17 y 20). Las muestras de suero se recolectaron en los días -7, 0, 7, 14 y diariamente desde el día 19 (día de la inoculación) a 26 (DPC 7) y finalmente en los días 33 (DPC 14) y 40 (DPC 20). Los pesos corporales se determinaron semanalmente, en

DPI -7, -1, 6, 13, 18, 25, 32 y 39. Las temperaturas corporales rectales se determinaron diariamente comenzando el día 17 (dos días antes de la inoculación) hasta el final del experimento.

2.4 ELISA y PCR en tiempo real cuantitativo

5 Se aisló ARN vírico a partir de muestras de plasma utilizando el kit S de tejido de ADN QuickGene (DT-S, Fuji Photo Film Europe GmbH, Dusseldorf, Alemania) con las siguientes modificaciones. La solución de proteinasa K (EDT, kit DT-S, 30 µl) y 3 µl de ácido poliadenílico A (poliA 5 µg/µl, Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) Se agregaron a 250 µl de tampón de lisis (LDT, kit DT-S). De esta mezcla, se agregaron 250 µl a 300 µl de plasma. La mezcla se calentó a 72°C durante 10 min en un bloque calefactor y se almacenó a -20°C hasta un análisis posterior. El aislamiento del ARN se realizó posteriormente utilizando el Workflow QG-Mini80 (Fuji Film). El lisado se mezcló con 350 µl de etanol al 99% antes de cargarlo sobre la columna. Después de tres etapas de lavado con 750 µl de tampón de lavado (WDT, kit DT-S), el ARN se eluyó con 50 µl de tampón de elución (CDT, kit DT-S). El material se almacenó a -70°C hasta un análisis posterior.

15 Se utilizaron muestras de ARN (5 µl) para PCR en tiempo real con transcriptasa inversa Taqman cuantitativa (qRRT-PCR). Se utilizó el Kit HybProbe de Amplificación de ARN LightCycler (Roche, Almere, Países Bajos) y se utilizaron cebadores, sondas y condiciones de ciclización como se describió previamente (Drosten et al. 2002 J Clin Microbiol 40: 2323-2330).

2.5 Química clínica

20 La química clínica se realizó con suero recolectado el día de la inoculación (día de estudio 19, DPC 0) y posteriormente los días 20-25 (DPC 1-6), y en los días 32 (DPC 14) y 38 (DPC 21). El análisis enzimático se realizó utilizando el analizador Spotchem EZ SP-4430 (Menarini Diagnostics, Valkenswaard, Países Bajos) utilizando tiras capaces de detectar fosfatasa alcalina (ALP), alanina transaminasa (ALT), creatinina, glucosa, proteína total y urea.

El día 0, se recolectaron muestras de sangre (n=30) y se utilizaron para definir los límites superior e inferior de los parámetros sanguíneos. Los límites se establecieron en los promedios superiores y promedios inferiores más dos veces sus desviaciones estándar.

2.6 Análisis estadístico

25 Los análisis estadísticos se realizaron con el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni utilizando GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Las diferencias estadísticas con p-valores <0.05 se consideraron significativas.

Resultados

30 Después de la aclimatación durante una semana, todos los corderos se vacunaron como se representa en la Tabla 2. En diferentes puntos de tiempo después de la vacunación, los sitios de inyección se inspeccionaron para detectar posibles reacciones adversas. Estas inspecciones revelaron hinchazón leve a moderada en cuatro y cinco de seis corderos vacunados con la vacuna OBP y GneS3, respectivamente. En los otros grupos, no se observaron reacciones en el sitio de inyección (Figura 13). No se observaron reacciones adversas en el sitio de inyección en corderos vacunados con la vacuna NDV-GnGc o la vacuna NSR.

35 Después de la inoculación, las temperaturas rectales en el grupo de control alcanzaron un máximo de 2 DPC (Figura 14). Las temperaturas rectales máximas y los días totales de fiebre (temperatura corporal rectal $\geq 40.1^\circ\text{C}$) fueron significativamente menores ($p < 0.0001$) en todos los grupos vacunados, en comparación con el grupo control.

40 La aparición de viremia se determinó mediante qRRT-PCR sobre ARN aislado de muestras de plasma. Se detectaron altos niveles de ARN vírico en todos menos en uno de los animales de control no vacunados, alcanzando un máximo en DPC 3 (Figura 15). Los niveles de ARN vírico fueron significativamente menores en todos los grupos vacunados ($p < 0.0001$).

45 Los pesos corporales de los corderos se determinaron semanalmente. Los corderos en el grupo control no vacunado mostraron pérdida de peso en las primeras dos semanas después de inoculación (entre los días 18-25). Se observó cierta pérdida de peso, en un momento posterior (entre los días 25-32), en cinco corderos vacunados con NDV-GnGc y dos corderos vacunados con la vacuna NSR (Figura 16). Las diferencias entre los pesos corporales no fueron estadísticamente significativas.

50 Para investigar la aparición de daño hepático y renal, se realizaron análisis bioquímicos sobre muestras de suero utilizando el analizador de química seca Spotchem EZ. La disfunción hepática se evaluó mediante mediciones secuenciales de concentraciones de fosfatasa alcalina (ALP), alanina transaminasa (ALT) y proteína total (TP) en suero (Figura 17). Se supone que la concentración total de proteínas representa principalmente los niveles de albúmina. En corderos no vacunados, los niveles de ALP y ALT aumentaron claramente en comparación con los corderos vacunados. Sin embargo, la significación estadística ($p < 0.05$) solo se logró al comparar los niveles de ALP en el plasma obtenido de corderos no vacunados (Simulado) y corderos vacunados con NDV-GnGc.

Se midieron las concentraciones de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina para evaluar la función renal. Los niveles de BUN en el suero obtenido de corderos no vacunados fueron claramente superiores en promedio a los niveles detectados en el suero de corderos vacunados (Figura 17).

5 Los niveles de creatinina en suero de corderos no vacunados fueron significativamente mayores en comparación con los niveles detectados en suero de corderos vacunados (vacuna OBP, $p < 0.0005$; GneS3, $p < 0.005$; NSR, $p < 0.005$; NDV-GnGc, $p < 0.05$).

10 Un cordero en el grupo de control vacunado simulado sucumbió a la infección. En este cordero, los niveles de creatinina alcanzaron su máximo en DPC 8 a un nivel de 582 $\mu\text{mol/l}$ y los niveles de BUN alcanzaron un máximo de 30.6 mmol/l . Esto sugiere fuertemente que este cordero murió por insuficiencia renal severa. La insuficiencia hepática se reveló por un pico en la concentración de ALT de 20 U/l.

Conclusiones

15 En este documento demostramos que una vacunación única de ovejas con la vacuna NSR que no se propaga previene la mortalidad y la morbilidad y reduce significativamente la viremia, la fiebre y los signos clínicos resultantes de una inoculación del RVFV. La eficacia de la vacuna NSR no difirió significativamente de las otras vacunas evaluadas en nuestro estudio. La alta inmunogenicidad de la vacuna NSR explica que no se requiere el uso de adyuvantes. La incapacidad de la vacuna NSR para propagarse del animal vacunado proporciona una seguridad óptima.

Ejemplo 11

Partículas de replicón del RVFV que producen NA multimérica soluble recombinante del virus de influenza 2009 A (H1N1) de origen porcino pandémico.

20 La Seq S-CD5-OS-GCN4-NA (véase a continuación) codifica un ectodominio de neuraminidasa soluble optimizado por codón humano (aminoácidos NA 75 a 469) del virus de influenza A/California/04/2009 (H1N1). Esta secuencia se sintetizó en GenScript Corporation. El gen NA está precedido por una secuencia que codifica un péptido de señal CD5 de terminal N que está seguido por secuencias que codifican un OneSTrEP (OS) de terminal N que comprende un motivo de purificación y un motivo de tetramerización (GCN4-pLI; Bosch et al. *Virology* 84: 10366-10374).

25 Para generar un vector que comprende CD5-OS-GCN4-NA, pUC57-S-MCS se digirió la secuencia de OS-GCN4-NA digerida con NheI y XbaI y NheI/XbaI que se clonó en este plásmido, produciendo pUC57-S-GCN4-NA. La secuencia de CD5 se introdujo posteriormente mediante hibridación de los siguientes oligos:

Oligo CD5-3: 5'-

CATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGCCACCTTGTACCTGCTGGGGAT
GCTGGTCGCTTCCGTG-3'

30 Oligo CD5-4: 5'-

CTAGCACGGAAGCGACCAGCATCCCCAGCAGGTACAAGGTGGCCAGCGGTT
GCAGAGACCCCATGGG-3'

El ligador de CD5 se liga en pUC57-S-GCN4-NA digerido con NcoI/NheI, produciendo pUC57-S-CD5-OS-GCN4-NA.

35 Se infectaron células BHK-GnGc con FP-T7. Después de la recuperación, las células se transfectaron con pUC57-L, pUC57-S-CD5-OS-GCN4-NA y pCAGGS-NSmGnGc, esencialmente como se ejemplifica en el Ejemplo 1. Después del pasaje de las células, se repitió la transfección. Esta secuencia de eventos se repitió hasta que todas las células de la monocapa expresaran la proteína CD5-OSGCN4-NA, según lo determinado por IPMA. Se determinó la cantidad de GCN4-NA en el medio de cultivo de estas células. Para establecer altos niveles de proteínas NSmGnGc, se introdujo de nuevo el plásmido pCAGGS-NSmGnGc en la estirpe celular, produciendo partículas de replicón que contienen el gen S-CD5-OS-GCN4-NA. Las partículas de replicón se utilizan para experimentos de vacunación/inoculación en ratones para establecer la eficacia protectora contra una inoculación H1N1 letal.

Seq. S-CD5-OS-GCN4-NA

Los nucleótidos 1-69 (subrayados) codifican la secuencia CD5

Los nucleótidos 73-156 codifican el péptido OneSTrEP (OS)

Los nucleótidos 163-261 codifican el dominio GCN4

45 Los nucleótidos 262-1449 codifican el ectodominio de NA

ES 2 679 968 T3

atgcccattgggggtctctgcaaccgctggccaccttgtacctgctgggggatgctgggtcgt

M P M G S L Q P L A T L Y L L G M L V A

tccgtgctagcgtggagccacccgcagttcgagaaaaggtggaggttccggaggtggatcg

S V L A W S H P Q F E K G G G S G G G S

ggaggtggatcgtggagccacccgcagttcgaaaaaagatctatgaaacaaatcgaagac

G G G S W S H P Q F E K R S M K Q I E D
aagctggaagaaatcctttcgaaactgtaccacatcgaaaacgagctggccaggatcaag
K L E E I L S K L Y H I E N E L A R I K
aaactgctgggcgaaggatccgctgctggacagtcgctcgtgagcgtgaagctggccgga
K L L G E G S A A G Q S V V S V K L A G
aacagcagcctgtgccagtgagcggatgggccatctacagcaaggacaacagcgtgccc
N S S L C P V S G W A I Y S K D N S V R
atcggcagcaagggcgacgtgttcgtgatccgcgagcccttcatcagctgcagcccccctg
I G S K G D V F V I R E P F I S C S P L
gagtgccgcaccttcttctcctgacccagggcgccctgctgaacgacaagcacagcaacggc
E C R T F F L T Q G A L L N D K H S N G
accattaaggaccgcagcccatcacaggacccctgatgagctgccccattggagaggtgcca
T I K D R S P Y R T L M S C P I G E V P
agccatacaacagcaggtttgagagcgtggcttgggtccgccagcgttgccacgatgga
S P Y N S R F E S V A W S A S A C H D G
atcaactggctgaccattggaatcagcggaccagacaacggcgccgtggccgtgctgaag
I N W L T I G I S G P D N G A V A V L K
tacaacggcatcatcaccgacaccatcaagagctggcgcaacaacatcctgcgacccag
Y N G I I T D T I K S W R N N I L R T Q
gagagcagtgccgctgcgtgaacggcagctgcttcaccgtgatgaccgacggccccagc
E S E C A C V N G S C F T V M T D G P S
aacggccaggccagctacaagattttccgcatcgagaagggcaagatcgtgaagagcgtg
N G Q A S Y K I F R I E K G K I V K S V
gagatgaacgcccccaactaccactacgaggagtgcagctgctaccccgcagcagcagag
E M N A P N Y H Y E E C S C Y P D S S E
atcacctgcgtgtgccgcaactggcacggcagcaaccgcccctgggtcagcttcaac
I T C V C R D N W H G S N R P W V S F N
Cagaacctggagtaccagatcggttacatctgctccggaatctttggagacaatcccagg
Q N L E Y Q I G Y I C S G I F G D N P R
ccaaatgacaagaccggcagctgcccaccagtgagcagcaatggagctaaccggcgtgaag
P N D K T G S C G P V S S N G A N G V K
ggcttcagcttcaagtacggcaacggcgtgtggatcggccgcaccaagagcatcagcagc

G F S F K Y G N G V W I G R T K S I S S
 cgcaacggccttcgagatgatctgggaccccaacggctggaccggcaccgacaacaacttc
 R N G F E M I W D P N G W T G T D N N F
 agcatcaagcaggacatcgtgggcatcaacgagtggagcggatacagcggcagctttgtg
 S I K Q D I V G I N E W S G Y S G S F V
 cagcaccagagctgaccggactggactgcatcaggccctgcttctgggtggagctgatc
 Q H P E L T G L D C I R P C F W V E L I
 aggggaagacccaaggagaacaccatctggaccagcggcagcagcattagcttttgcgga
 R G R P K E N T I W T S G S S I S F C G
 gtgaacagcgcacaccgtgggatggagctggccagatggagctgagctgcccttcaccatc
 V N S D T V G W S W P D G A E L P F T I
 gacaagtga
 D K -

Ejemplo 12.

Expresión de proteínas exógenas a partir del genoma de NSR

5 Se produjeron estirpes celulares de replicón que expresan proteína de hemaglutinina soluble trimérica (sHA₃) y proteína de neuraminidasa soluble tetramérica (sNA₄) del virus de influenza H1N1 esencialmente como se describe en el Ejemplo 5 con las modificaciones representadas esquemáticamente en la Figura 18. También se produjo una estirpe celular de replicón que expresa la proteína eGFP junto con estos experimentos.

10 Se utilizó el análisis de citometría de flujo utilizando un anticuerpo específico para la proteína N para determinar el porcentaje de células que contienen ambos segmentos del genoma L y S (S-eGFP, S_sHA₃ o S_sNA₄). La expresión de la proteína N depende de la presencia de ambos segmentos del genoma L y S. La citometría de flujo demostró que el 96% de las células en las que se introdujeron los segmentos del genoma L y S-eGFP eran positivas para la expresión de la proteína N en el pasaje 8 (Figura 19A, los resultados obtenidos del análisis de las células BHK-GnGc de control se representan en la Figura 19D, E y F). El análisis de citometría de flujo de las células que contienen el segmento L y S-CD5-HA-GCN4-ST (es decir, S_sHA₃) demostró que el 98% de las células eran positivas para la expresión de N (Figura 15 19B). El análisis de citometría de flujo de células que contienen el segmento L y S-CD5-OS-GCN4-NA (es decir, S_sNA₄) demostró que el 98.5% de las células eran positivas para la expresión de N (Figura 19C).

Producción de las proteínas sHA₃ y sNA₄ mediante las estirpes celulares de replicón

20 Se recolectó el medio de cultivo celular y se depuró previamente mediante centrifugación lenta. Las proteínas se purificaron a partir del medio de cultivo utilizando columnas de flujo de gravedad Strep-Tactin Sefarosa de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (IBA, Göttingen, Alemania). Las fracciones eluidas se analizaron mediante geles de poliacrilamida teñidos con plata (Figura 20A) y transferencia Western utilizando Strep-Tactin conjugado con peroxidasa de rábano picante (Strep-Tactin-HRP, IBA, Figura 20B).

25 El rendimiento de ambas proteínas se estimó en 1 mg/l de medio de cultivo (ensayo BCA, Pierce, Thermo Scientific, Landsmeer, Países Bajos). Los rendimientos de producción de las proteínas sHA₃ y sNA₄ se determinaron de nuevo después del pasaje 20 celular y se encontraron sin cambios.

La transfección de las estirpes celulares de replicón con el plásmido pCAGGS-NSmGnGc dio como resultado títulos de NSR de 10^{7.3} TCID₅₀/ml de NSR-sHA₃ y 10⁶ TCID₅₀/ml de NSR-sNA₄. Estas partículas se utilizarán como vacunas para el control de la influenza.

REIVINDICACIONES

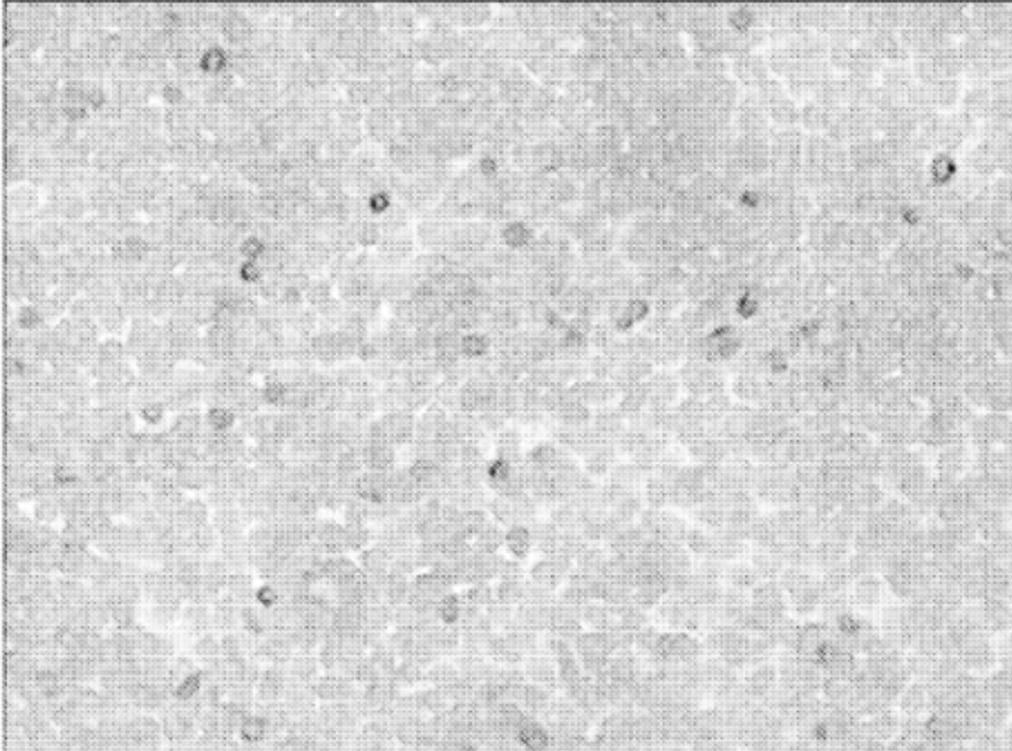
1. Método para generar una partícula de replicón de bunyavirus recombinante, el método comprende:
- A) proporcionar una célula eucariota con medio de crecimiento;
- B1) proporcionar polimerasa T7 en la célula eucariota,
- 5 B2) proporcionar proteínas Gn y Gc de bunyavirus, opcionalmente en combinación con una o más proteínas NSm, denominadas colectivamente (NSm)GnGc, en la célula eucariota;
- B3) proporcionar un vector en la célula eucariota que codifica un segmento del genoma L de bunyavirus, que se flanquea por un promotor T7 y ADNc de una secuencia de ribozimas;
- 10 B4) proporcionar un vector en la célula eucariota que codifica por lo menos parte de un segmento del genoma S de bunyavirus que comprende el gen N y las URT 3' y 5', que se flanquean por un promotor T7 y ADNc de una secuencia de ribozimas;
- B5) con la condición que, si se proporciona un segmento del genoma M de bunyavirus en la célula eucariota, un vector se proporciona en la célula que codifica un segmento del genoma M de bunyavirus del cual la región de codificación de GnGc (i) no se expresa porque no se transcribe o no se traduce, o (ii) codifica una proteína Gn y Gc no activa, que se
- 15 flanquea por un promotor T7 y ADNc de una ribozima;
- C) generar una partícula de replicón de bunyavirus recombinante;
- D) aislar la partícula de replicón de bunyavirus recombinante del medio de crecimiento;
- en la que la secuencia de las etapas B1, B2, B3, B4, B5 es aleatoria y todo o parte de estas etapas se puede realizar de forma simultánea.
- 20 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la polimerasa T7 se proporciona a la célula eucariota al infectar la célula eucariota con un virus de la viruela aviar.
3. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la célula eucariota se proporciona con proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus al infectar la célula eucariota con un paramixovirus recombinante que transduce las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus.
- 25 4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la célula eucariota se proporciona con proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus al infectar la célula eucariota con un paramixovirus recombinante que transduce las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus y seleccionar una célula en la que el paramixovirus recombinante se presenta de forma persistente.
- 30 5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que la célula eucariota se proporciona con proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus al transfectar o infectar la célula eucariota con un vector de expresión que proporciona expresión condicional de las proteínas (NSm)GnGc de bunyavirus.
6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el segmento del genoma L de bunyavirus y/o el segmento del genoma S comprende un gen exógeno.
- 35 7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que un gen exógeno está presente sobre un segmento del minigenoma M, L o S.
8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la célula eucariota es una célula de mamífero, preferiblemente BHK-21.
9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el bunyavirus es el virus de la fiebre del Valle del Rift.
- 40 10. Una partícula de replicón de bunyavirus recombinante, que comprende:
- un segmento del genoma L de bunyavirus
- un segmento del genoma S de bunyavirus o parte de un segmento del genoma S de bunyavirus que comprende por lo menos el gen N y las URT 3' y 5';
- 45 con la condición de que, si está presente un segmento del genoma M de bunyavirus, es un segmento del genoma M de bunyavirus del cual la región de codificación de GnGc (i) no se expresa porque no se transcribe o no se traduce, o (ii) no codifica la proteína Gn y Gc activa.

11. La partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el segmento del genoma L de bunyavirus y/o el segmento del genoma S comprende un gen exógeno.
12. La partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 10 o 11, en la que el bunyavirus es el virus de la fiebre del Valle del Rift.
- 5 13. Método para producir una partícula de replicón de bunyavirus, el método comprende
- A) proporcionar una célula eucariota con medio de crecimiento;
- B) proporcionar proteínas Gn y Gc de bunyavirus, opcionalmente en combinación con una o más proteínas NSm, en la célula eucariota;
- 10 C) infectar la célula eucariota con la partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12.
14. Una partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, para uso como un medicamento.
15. Una vacuna que comprende la partícula de replicón de bunyavirus recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12.

15

Figura 1

A



B

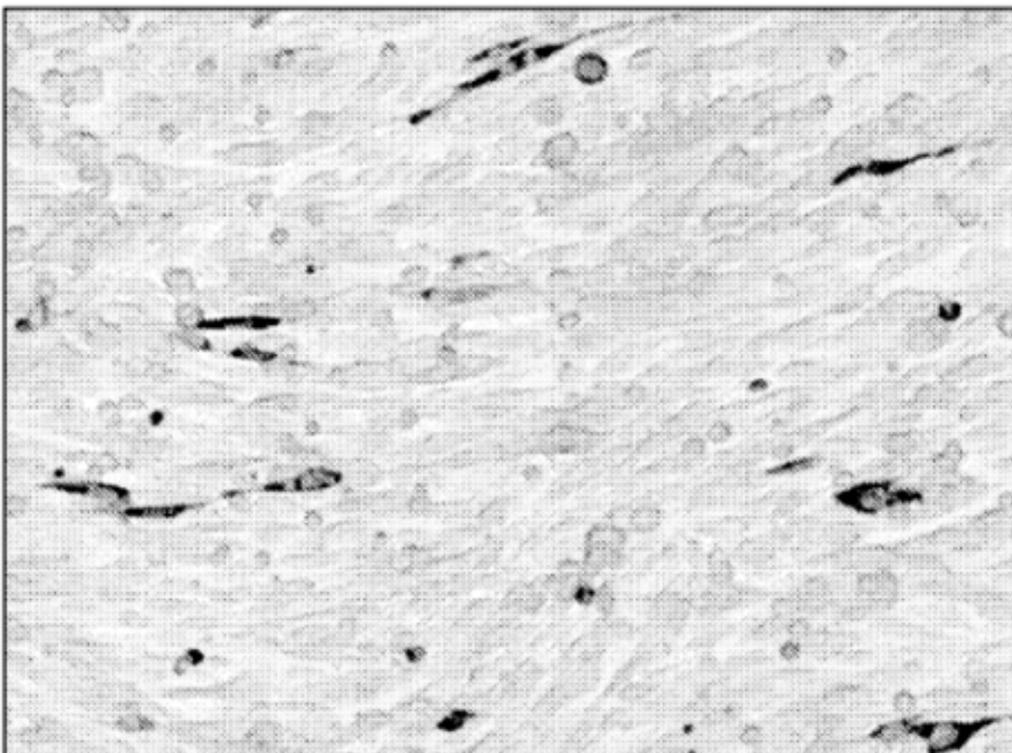


Figura 2

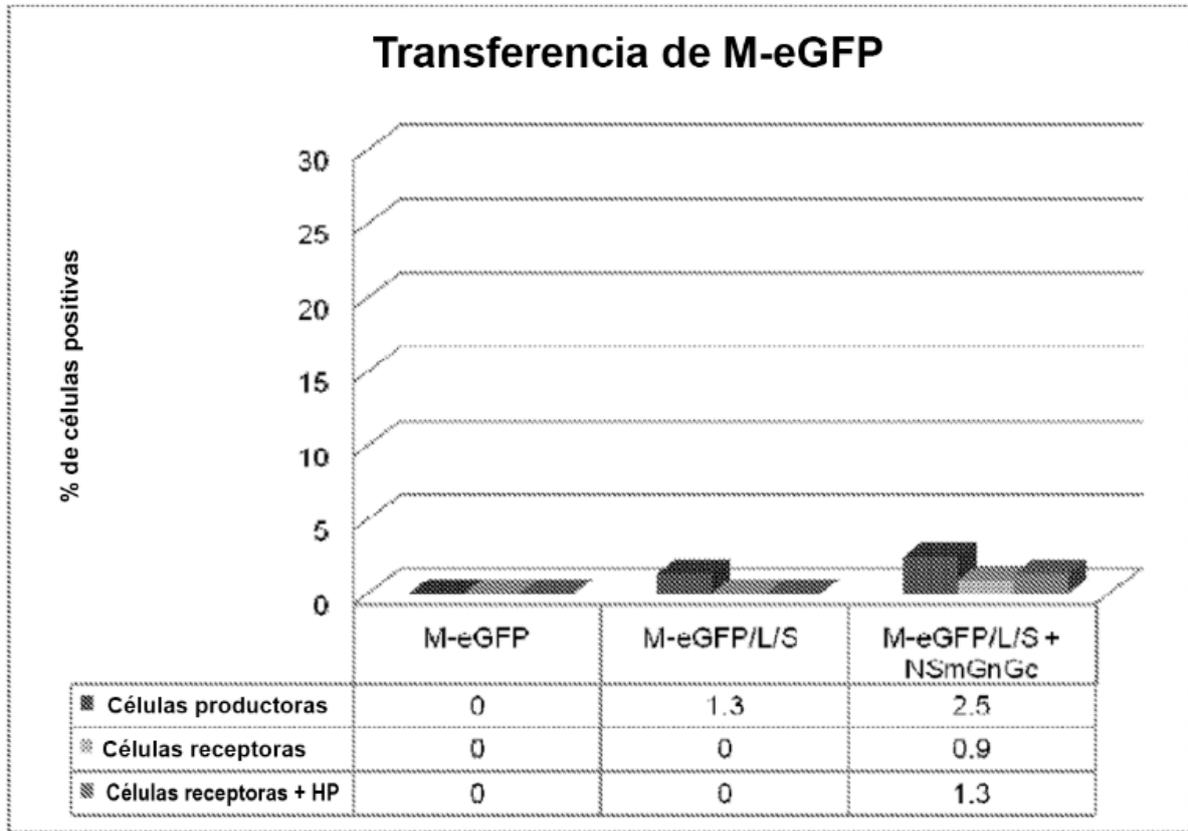


Figura 3

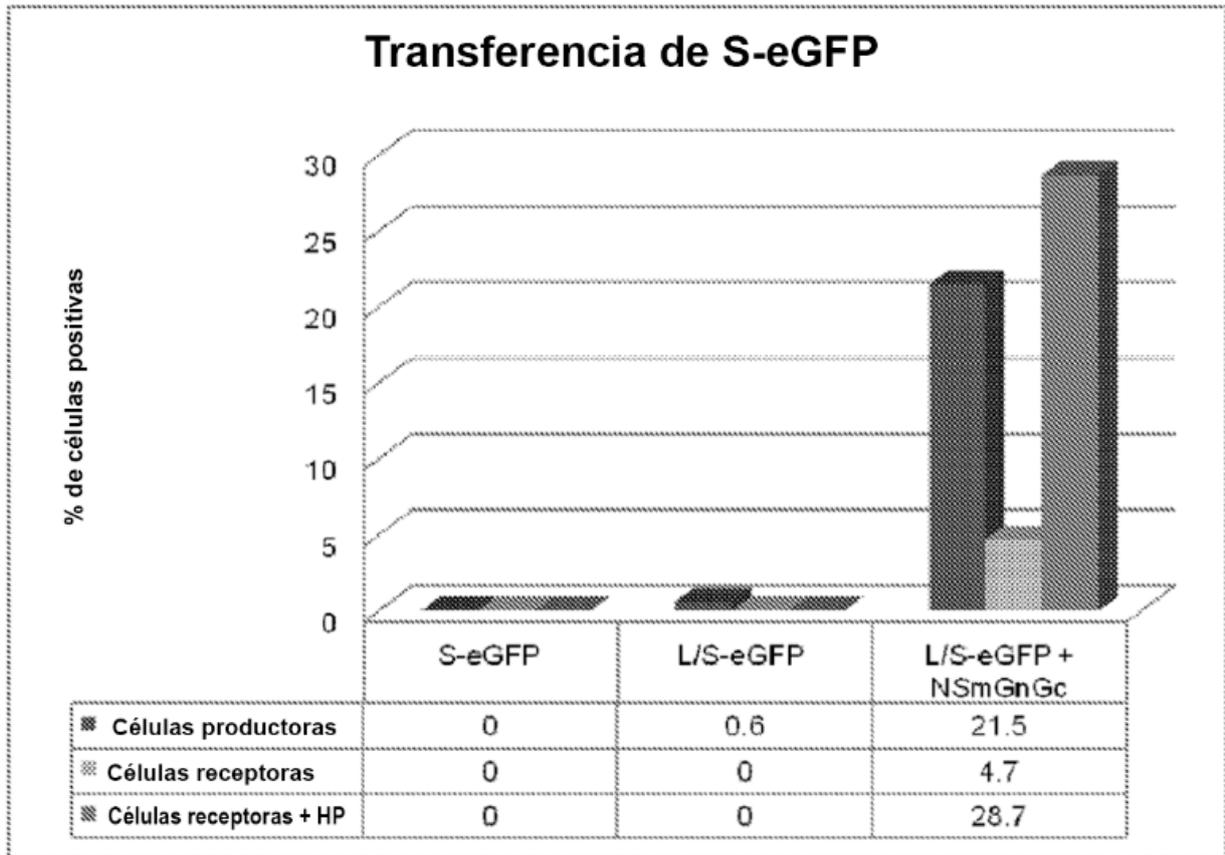


Figura 4

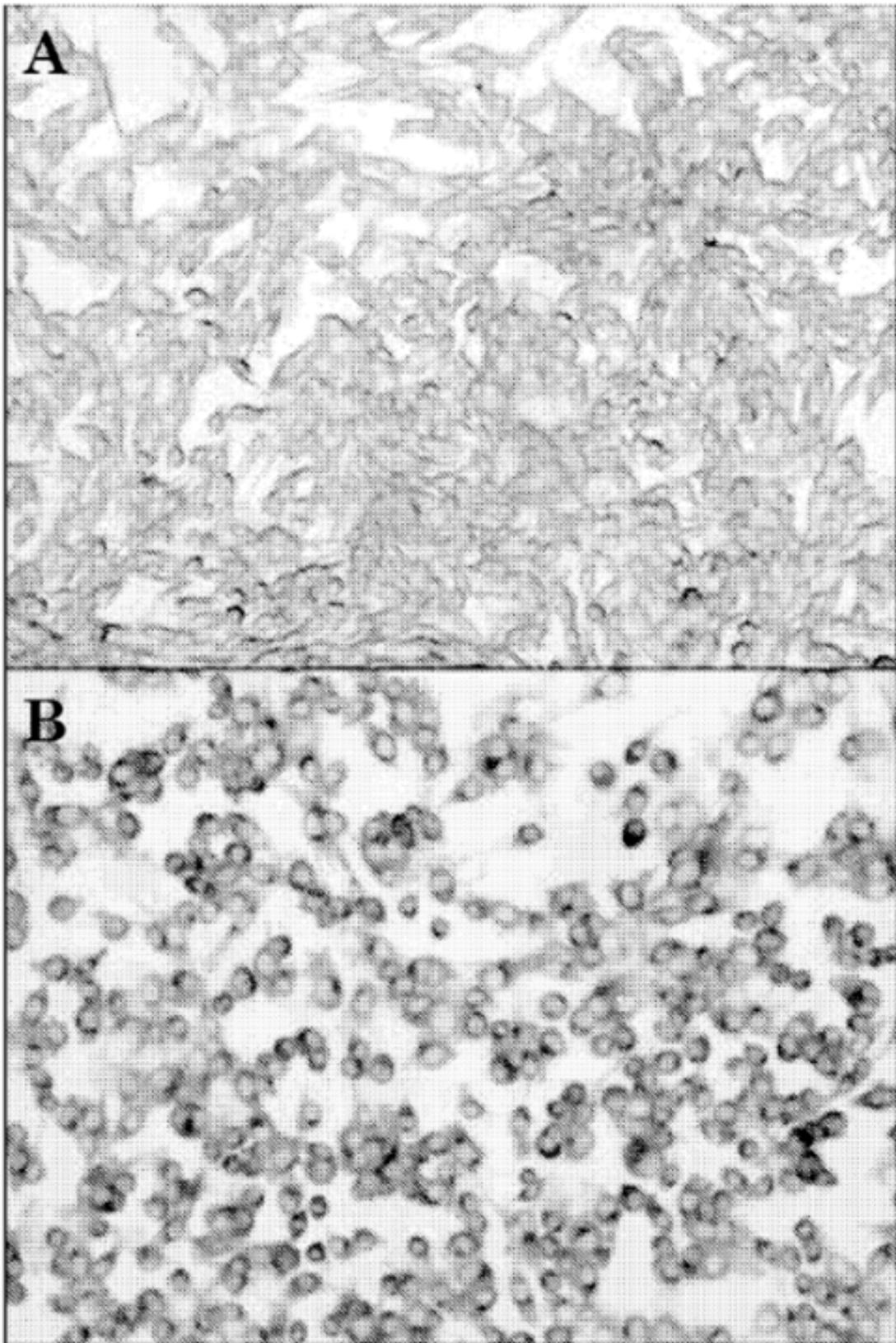


Figura 4 continuación

C

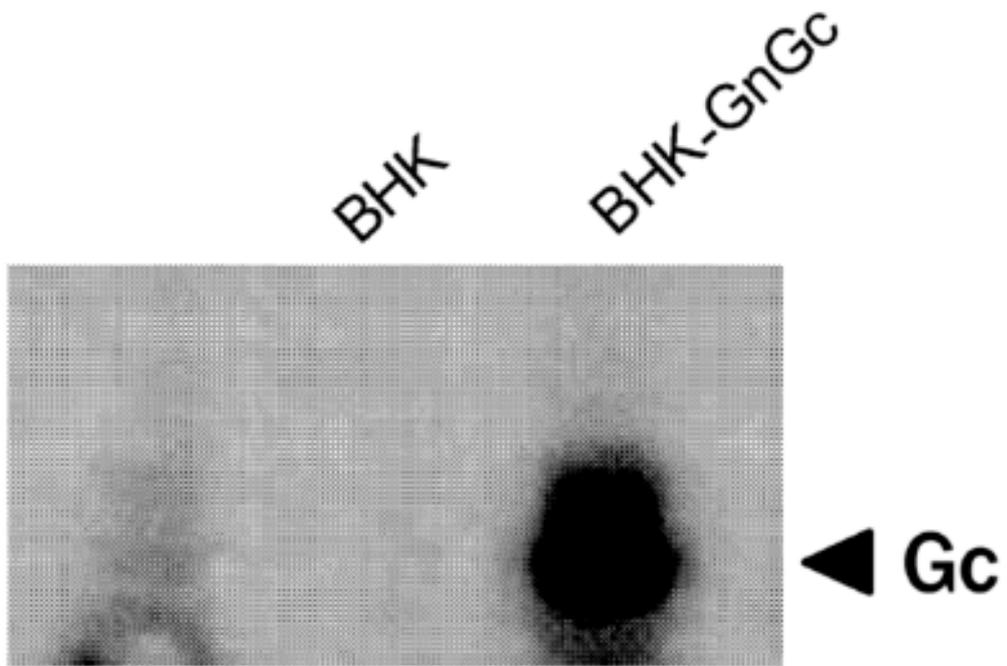


Figura 5

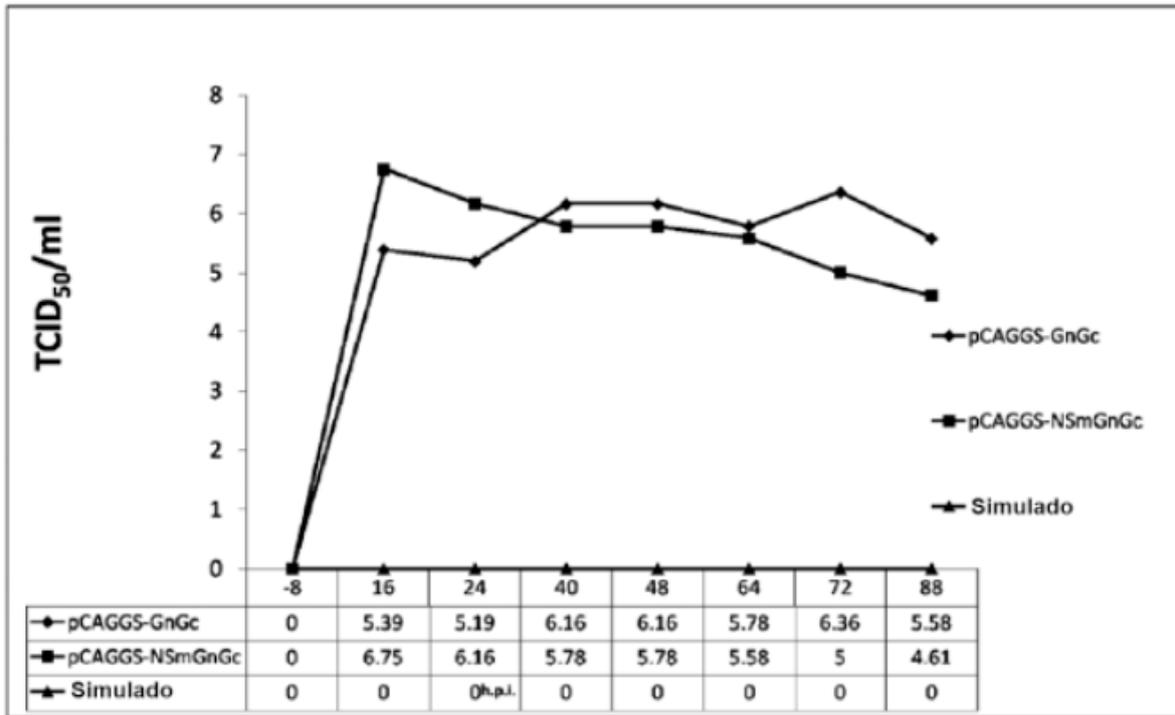


Figura 6

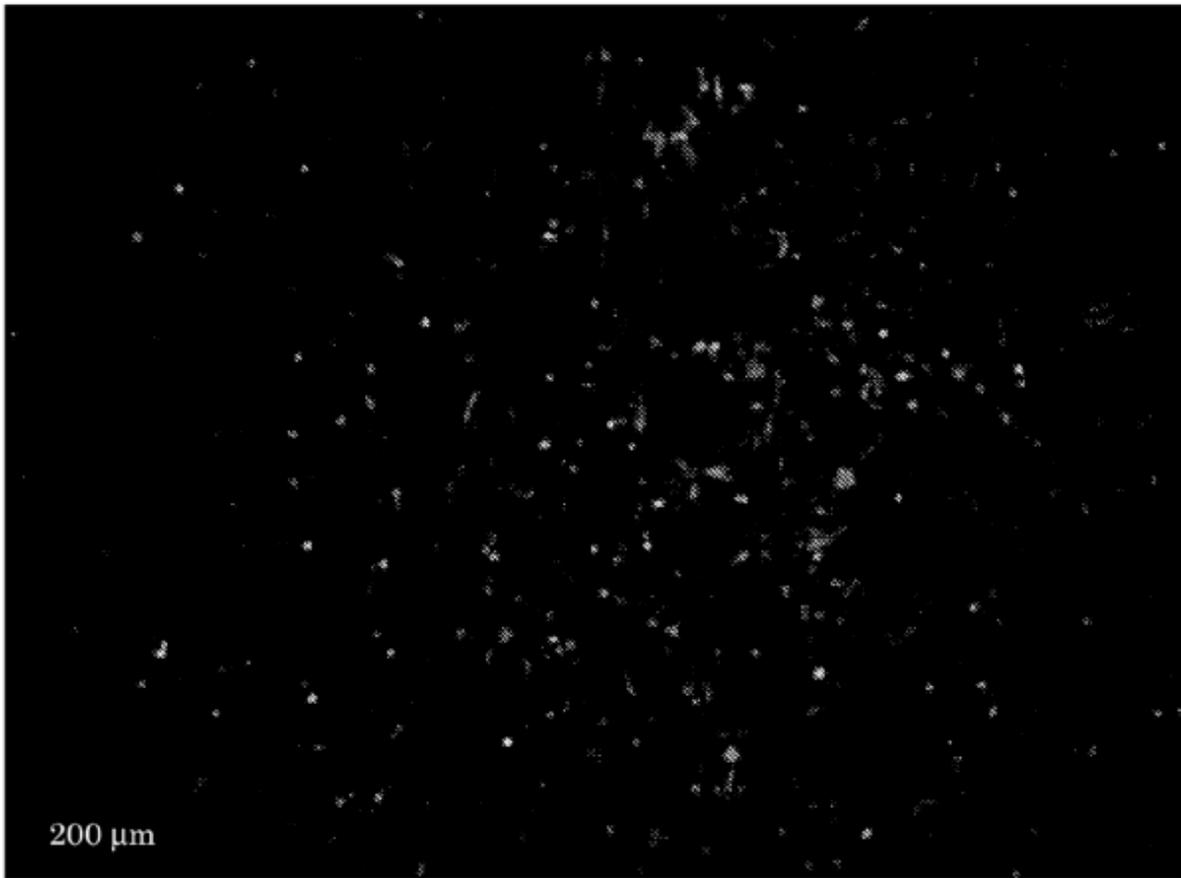


Figura 7

A

TTCGAGCTCGGTACCAGCGGAAAGAGCGCCCAATAAGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTGGCCGATTCTATTAATGACAGGGGGATCT
 CGATCCCGGGAAATTAATACGACTCACTATAGACACAAAGGGCGCCCAATCATGGATTCTATATTACAAAACAGCTGGTTGACAAAG
 ACTGGTTTTGTTAGAGTGCCAAATCAAGCATTATGACTGTACAATGCTAACTCTGGCACTCCCAACATTTGATGTCTCCAAGATGGT
 AGATAGAATACCATAGACTTCAATTTAGACGCATACAAGGAGCATCTGAAATAGGCTCAACTTTGCTACCCCTATGTGATAG
 ATGGGAAGATATGGCCAAATTTGTTACGATTTACCTTTGGCCACTTAGCTGACAAAGACTGACAGACTCTTAATGCGTGAGTTT
 CCCATGATGATGACGGGTTGATCATCTGAGCCCTGACATGATTAATCAAACTACATCTGGCATGTATAAATCGTTGAGTTCCAC
 CACCTTTAGGGGGGATGAAAGAGGTGCATTCAGGCTGCCATGACTAAACTCGCTAAGTATGAGGTTCTTTGTGAGAACAGATCTC
 AGGGCAGGACTGTGTTCTTTATGTTGTTAGCGCTACCGGCATGGTGTGGTCTAATTTGGAGCTAGAGGACTCTGAAGCAGAG
 GAGATGGTATATAGGTACAGACTTGGCCCTTAGTGTGATGGATGAGCTAAGGACCTTGTCCAGAACTGTCATCCACAGATGAGGA
 ACTAGGAAAGACTGAGAGAGATTTGCTAGCCATGGTCTCCTCCATCCAAATAAATTTGGTCACTACAGAAATCTGTGTTTCTCCCT
 TTAGCAGAGAAATGTTTGACAGGTTCCAGATCTTCTCCTCCGATTCAGAGTACATCACAGGAGATAGTGAGCAGATGCCCTCATAAAT
 TCTCAAGAGAAATCATCAATAATTCCTTTCTTTGCTGAAGGAAATGATAAAGTTTTGAGATTTTCAAAAAACGCTGAGGAGTGTTC
 CTTGGCAATAGAGAGAGCTTTAAATCAGTATAGGGCAGAAAGACAACCTTAGGGACCTAAATGACCAAGTCTACTATTCCAGCTGC
 CTCCTGGCTGTCTCATCAGATGCCGATGGCAAAGATCTGTGCCCTCTTCCAGGGATTAGATGTTGAGAGGAGACCATCCCATGTGC
 AACCTGTGGAGAGAAGTGGTTACCTCTGCAAACTAGAGAGGATGAGAGGATGCACGATGATGCAGCGGCAGAACTTGAGTTTGC
 CCTTTCCAGGGGTGAAGGACAGGCCAGATGAAAGAAAAGATACCATAGAGTCCATCTGAAATAGGACTCAGATGATAGTGTCTACA
 TAGCTGCTTTAGGGGTTAATGGAAGAAAGCATAAAGCAGACACATAGTGCAAAAATGAGAGACAGGAGCAACAGCCCTTCTCT
 CCAGATCATGATGGATCACATATCTGAATTTCTCTCTGCATGCTCTAGTGACTTGTGGGCAACAGATGAGGACCTATACAACCC
 TCTCTCTGTGATAAAGAGCTTAGATTGGCAGCTCAGAGAAATCATCAGCCATCTTATCAGAAAGGGGCTTCAATGAGATTATAA
 CAGACACTACAGATTTTGGGAAGTAGGATAGGATCATGGTGCAGAAATGGTCAAGTAAATAGGAGCTGAGCTATCAGCTCTGTGA
 AAGCAACATGTTAAGCCCTAATTTTTGTGATTAACGACTACTAGGTTCTGGGATTTTCTGTGATCAAGCCCTACTCCAGCAA
 AAGCCATATATTGTTCTTTGCAATTAAGCGCTCTTGTCTGGCCCTTTGATCTCTCCACTCCAGGGTTTTCAAACCCCTACATAG
 ATGCCGGGGATCTGTTAGTTACTGACTTTGTTTCTTCAAACTAAGTAAGCTTACCAACCTCTGCAAGTGCCTTCAAGTTTCCCAAGGTTCTCAGG
 TCAGAGCTGACAGTTTACTTATAAACTGCTTATGCAGAAATCCAGAGAAATAGCAGGTGAGCCCTTTATCTTAAAGAAAGGAA
 TCCCTCTCTCATTTTGGGCAGAGGCAATTTGGGATCCAAAGCTGGAACTTGTAGTGACTGTTGAGGCTTCCAGACTCTGAGCTG
 AATGGATGCCCTACATACATGCGCAAACTCTCTTTAATFAACCTTTTGGAAAGCAAAAGCAAACTGAAGAGTTACAGACTATTGCAA
 GATATATAATCATGGAGGGCTTTGCTCTGCCCCAGAAATCCCAAACCTCACAAGATGACCTCAAGTTTCCCAAGGTTCTCAGG
 TCAGAGCTGACAGTTTACTTATAAACTGCTTATGCAGAAATCCAGAGAAATAGCAGGTGAGCCCTTTATCTTAAAGAAAGGAA
 TGGGCTATATCTGGGTTGGCATGTTAATCTTTTCCAGGGCTCCACTGCTTGATATGCACCACTCATCAGCTGTGTTGTACA
 ATGGTTACTTTAAAAACAAAGAAAGAGACTGAGCCTTCTCCCTTCTGGGATGATAAAGAAATATAGAAATTTAGAACCTT
 AGACCACAGTCCAGATGCTTCTTGGGTTATAAGATCCAGAACTACCTAGAAATGCATGAGTTTCAAGTGTCTTCTACTTGAAGGAGG
 TTGCAATCATGCTAAGCTGGTCTAAGGAGTCTCTATGGACAGAAATTTATGGAGCAAAATAGACAAACAAATTTTCGAGAGCTCA
 GTGGGTTGACTCTAGAAAGATTAGCCACACTAAGGCCAACAGCAACTTAAATGAGAATTTGGTATGCTATATAAGGATGTTGGCAGAC
 AAGAATACACAAGGGATAAATATTAGTGAAGATGTCAAAATATGCTTCTGAGGGAAAGAGCCTAGCTATCCAGAAAGTTTGGAGAA
 TTGCATGAGCCAGATAGAGTCAAAAGGATGTCACATTTGTTTAAAGAAACAAAGCATGGAGGTTGAGAGAGATCTATG
 TGATGGGTCAGAGGAAAGAAATTTGTTCAATCGGTGGTGGAGACAATAGCCAGGCTATAGGGAAAGTTCTTGTCTGATACCCCT
 TGTAACCCCCCAATAAGGTGAAATTCCTGAGACACATGGCAATAGGGCTCGAAAGCAATGTAAGGGGCTGTGTGGACTTTGTG
 AACATCAGATGATGCAAGGAAAGTGGAAACCAAGGCCATTTGTTTCAAAAGCTTCCCTCATGCTATGTGATGCACTCTCTCAAG
 GGTGGCCATGATCATTAGGGATGTTCAATGTTTCCAGGAAAGGATGATGATGAATTTGAATATCTTAAAGCTCTGGATGGT
 CATCGAGCTTGATATTAGAGATGACTTTGTGATGATCTCTTCAAAGCTTATCATGGTGGGAGGAGTTCCATGGGCTTTTAA
 GGGTAAAAACATCTGGAACACCGACAGGATGATGCAAGGGATATTGCATTATACCTTCTCATTATACACACCATTCCATCAAG
 AATACATCCGGTCTTGTCTTTAAAAATTTCAACCTGAAAGGTTGCTCCTGAGATGAGCAAAAGCCTGGTTTGTGACATGATGCAA
 GGATCAGATGATAGGCTGCTAATCAGCTTCCAGCTGATGACGAAAGGTTCTCACAGATGCAAGTGGCCGACCATATG
 CTTCCGAATGAAGAAAGGAGCTGGAGTGTACCTTCCATCTACCCCTCAGAGAAAGTCCACAGCAAAACAGATTTTGTGATGGAGT
 ACAATTTCTGAATTTTATTTCCACACCCAGCATGTTAGACCGACATCAGGTGGATGTCAGCATGTTGACGCTGCCAGAGGTGAA
 ACCTAGTACCCCGCCAGGAAAGGCTCTAATCTAATGACTCAGTTACTGAGGGGGTGGGTCATTCTCTTCAAGCTCAAGT
 TCAGCAAGCTCAGTGCATCTCCATTACATGCTAATGGGATGGGAGTGTCTGAGCTATTCTTAGAGTATAAGAAAGGAGTGTGA
 AGTGGAAATGACCCGGTCTGGGTTCTTCTGCTTGACAATCTTATGCGTGGGGTTGGGAGGTTTAGATTAACTCTTCAA
 GCCATCACAGAACTGATTTGAGAAAGTATGCTTTCTTCAAGAAAGGTTAAGGGCTCAGCTGTCAGGACTGGCAGATGA
 GGATTTACCATCCAGAAAGCTGTAGCGTGGCCAGGTTGGCCCTAATTTCTAGCTCCTCTCAAAGTGGGATCTAGGAAAGA
 AGTTTCAGAACTGAGAGACCGTTTGAACATACAGAGAACTGGATGAGCTAATAAATGAGAATCCAGAGGTTCTCATCGAGCT
 CCCAGAAACAGGCCAGAAATAATTTGTCGCAATGACAGAAAGTCCATAGCCCTGGTGTGTGTCATCTTCTTGGCAATGC
 AGTCTGTAAGTCACTGGCTCAGCTGTATATCTTTTCAAGCAAAATTTTGAAGACACTGGACCGCCCTGAGTTCAACTCTTAG
 AGGATTTCAAAGTACAGTTGTCACAAAAGTGGCCGATTTCTGGCTTCTGAGTTTCAATGATAGGAGGAGGAGATATATTA
 TTCTTATCCGAAACATTGAGGAATTAGAATCACTGGATCTATAGTTTACAAAGGGAGAAATAGACATCATCCCAAGAGTTAA
 TATCAGGGGATGCAACCCAAACAGGGTCACTATCTTAAATGAGCAGAAAGCCCTCCGAACATCTCCAGAGAAAGTGGTGTGAGACA
 AGTGGTTCCGAGCTCAGAAAGTAGGATAGGCAAAAACACTTTCTGCTGAAATGGGAGAAAGCTAAAGAAATTTGAAAGTGGTTG
 GAAGACACTCCAGAAAGCAACTTAGCTCACACTCCAAGTAAACCATATTCCAGGTTAGGAAATTTCTTGTGATAGAAAGCAA
 GCCTAGAACGGTTAGAATAACAGGAGCTCCTGTAAGAAAGAGGTCAGGGGTTAGCAAGATAGCTATGGTTATCCGTGACAATTTCT
 CCCGGATGGCCATCTTAGAGGTGTAGAAAGACTCGCTGGCTTCACTGATGTTGTCAGCTGAAATCTCAAGCACTTTCTGTTT
 TGCACTACAGGTTCCATACAGTGAAGCTATAAGCTACAGCTAATCTACAGAGCTTAAAGCTCAGTGTCAAAGCTTGAATGATAA
 GAAATCGGATGGTAAAGCAAAAACCAATTTGATGGGATCCTTACAGAGATTTCTAGATGGTGTATCAGTTGTCTTAAATGAAAG
 AGATGGGAGCCGGAACAGTGGGTTGATTTCAAGAGACAAAGCTCTAAGGTTGTGCAAAATAAAGTGGTCTATTATGGAGTTGGG
 ATCTGGAGAGGCTTATAGGATGGATTCAGGTCATCTTGGATAGAAAATGACATAGGACAGCCCAAGGCTTAGGAAATGTCAC
 AACTAATGTGAGAGGAGCCATGGATCTGAGTGTCCCAATAAGGCAAGTGGCAGAAAGCATGGGGTCAAAAACAGCAGGAT
 ATCTCTAAATCTAGCAGAGGAGCTAGATATTGGATGCAATTTAGGATGCAAGGACCCAGCAAGCCATTTGGATGCCAGTT
 TATATTATTAAGGGTACATGTCAGATGTTATCAGACTGAGAAAAGAGGAGGTTGAGATGAAAGTACGGGGCTTACTCTCAACT
 GTACATAAGCACCATTTCTCAAGACTTACACTTTTATCTTACACTGCATCAGACAAATGATCTCAGTCCAGGCTTTCAAAGT
 CAATATCAGATGAGGGAGTAGCTCAAGCCCTGCAAGTTTGTAGAGGGAGCCAAAGCAACTGCTGGGTGAGATGTGAGTCTGTAGCT
 CCAAAATTCATACAGCCATCCTTGAGATATGTGAGGGGAAAGAGACAGATAAAAAGGAAATCAACAGAAACAGACTCTCAGAGATTGT
 GAGAAATTTGTTCTGAATCTTCCCTAAGATCAAAAGTCCGATCTATGTTCTCATTTGTCGCAATGTTGAGGAGCCCATGATGTTG
 ATTAGTGTGCGTTAATGGATCTAATGATAGAAGATGCTAAGAAACAATGCAATTCAGTCAATGTTGTCGATGATGATGATGATGAT
 AATGGTCTTACAGAGTGGAGCTTTTGTGATACATGATGTCACCTCTTTGGGACAGCCATTACAAGGACATAGTCTATTATC
 TAGATTGCTCATCCCTTAAATGGATAAGTTTGTGATTATGCCATTTTCCAAAGTGGGAGAGCCCTCAGTTAGAAAAGTTCTAGAGA
 CAGGTCGGGTCTCTAGCAAAAGACTATGATTTTCAAGGTTCTCTCTCAGAACTCTACAGAGACCAGAAAGAGAGCATTAGGATAGAT
 GATCTGGGTTATATAGGAGACAGATGGGCGGATGACTGTAGGCTAAGCAAAATAGCAAAAGTCAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGAGT
 ACTACGCTAGTATTTGAAATCCATGTTGGGTTCTGATACTAGCATAAGTGTACAAATTTGGGCGCTTTGTTGTTGGTCCGCAATGGCA
 TCTCCACCTCTCGCGTCCGACTGGGCTCGGAGGAGGAGAGCTGCTCACTCGGATGGCTAAGGGAGAGCTCGGATCCGGCTGTC
 TAAACAAAGCCGAAAGGAGGAGCTGAGTTGGCTGCGGACCGCTGAGCAATAAATAGCAATAAAGGCTTGGGCGCTTAAAGGAGGCT
 TGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATCGAGATCCTCTAGCCAGATCCTCTACGCGGAGCAGCATGTTGGCGGG
 GTCGCAAGCTTTGGCGTAAT

Figura 7

B

GAATTGCGCGAAGAGCGCCCAATA CGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTGGCCGATTCAATTAATGCAGGGGGATCTCGATCCCGC
GAAATTAATACGACTCACTATAGACACAAAGACGGTGCATTAATGTATGTTTTACTAACAATCTGATCACGGTCTCGGTGTGTG
AGGCGGTTATTAGAGTGTCTTAAGTTCCACAAGAGAAGAGACCTGCTTTGGTGACTACACCAACCCAGAGATGATTGAAGGAGCT
TGGGATTCACTCAGAGAGGAGGAGATGCCAGAGGAGCTCTCTGTCCATATCAGGCATAAGGGAGGTCAAAAACCTCAAGCCAGGA
ATTGTATAGGGCAITAAAAGCCATCATTGCTGCTGATGGCTTGAACAACATCACCTGCCATGGTAAGGATCCTGAGGATAAGATTT
CTCTCGTAAAGGGTCTCTCAAAAAAGCGGGTGGGGATAGTTCCGGTGTGAGAGACGAAGAGACGCTAAGCAAATAGGAAGAGAA
ACCATGGCAGGGATTGCAATGACAGTCTTCCAGCCTTAGCAGTTTTTGTCTTTGGCACCTGTTGTTTTGTGAAGACCCTCATCT
CAGAAAAGAGCCAGGGAAAGGGGACAACTACATTGACGGGATGACTCAGGAGGACGCCACATGCAAACTGTGACATATGCTGGGG
CTTGTAGCAGTTTTGATGCTTGTGCGAAAAGGGGAAAATTTCCCTCTTCCAGTCTGATGCCATCACAGAACCTACTAGAAAGCA
GTTTCACGACACCATCATTGCAAAAGCTGATCCACCTAGCTGTGACCTTCAGAGTGTCTATGGGAATCCCTGCATGAAGGAGAAA
CGTGTGAAGACACACTGTCCAAATGACTACCAGTCACTCATTACCTCAACAATGACGGGAAAATGGCTTCAGTCAAGTCCCTC
TAAATATGAGCTCACTGAGGACTGCAATTTTTGACGGCAGATGACAGGTGCTAGCTTGAAGAGGGGTCTTATCCTCTTCCAGGAC
TTATTTGTCAAGTGAAGTATGATGGATCAAAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AAAGTGTGATGGCCAACTCAGCACTGCACATGAGGTTGTGCCCTTTGCAGTATTTAAGAACTCAAAGAAAGGTTTATCTTGATAAGC
TTGACCTCAAGACTGAGGAAAATCTGTTGCCAGACTCATTGTCTGCTTCGAGCATAAGGGACAGTATAAAGGAAACAAATGGACTCT
GGTCAGACCAAGAGGGAGCTCAAAAGCTTTGATATCTCTCAGTCCCAAGATTGGAGGACATGGTAGCAAGAAAGTCACTGGGGA
CGCAGCTTTTTGCTGCTTATGAGTGCAGTCTCAATACGCCAATGCTTATTGTTTACATGCTAATGGGTGAGGAGTTGTACAGA
TACAAGTATCCGGGGTCTGGAAGAAAGCCTTTGTGTGTCGGGTATGAGAGGGTGGTTGTGAAGAGAGAACTCTCTGCTAAGCCCATC
CAGAGAGTTGAGCCTTGCAAACTTGATAAACAAATGTGAGCCTCAAGGATTGGTTGTCCGATCAACAGGTTTCAAGATATCATE
TGCAGTTGCTTGTGCTAGCGGAGTTTGGCTTACAGGATCGCAGAGCCCTTCTACCGAGATTACACTCAAGTATCCAGGGATATCCC
AGTCTCTGGGGGGACATAGGGGTTCCATGACATGATGATCAGTCAAGTACTCCTCAAAATAGTAGCTCACTGCCCTCCCCAG
GATCCATGCCTAGTGCATGGCTGCATAGTGTGCTCATGGCCTGATAAAATACCAAGTGCACACTGCTCTCAGTGCCTTTGTTGT
TGTGTTGCTATTTAGCTCTGTGCAATAATTTGTTGGCCATTCTTATAAAGTTCTCAAGTGCCTAAAGATGCCCCAAGGAAAG
TTCTGGATCCACTAATGTGGATTAAGTTTTCATCAGATGGGTGTATAAAGAGATGGTTGCCAGAGTAGCAGACAATATCAATCAG
GTGAACAGGGAAATAGGATGGATGGAAGAGGGCCAGCTGGCTTAGGGAAACCTGCCCTATTCTGTCATGCTCCAATCCACG
TTATAGCACATACCTAATGCTACTATTGATGCTCATATGCATCAGCATGTTCAGAACTGATTGAGCAAGCTCCAGAATCACCA
CTTGTCCACAGAAAGTGTCAACACCAAGTGTAGGCTGTCTGGCACAGCATTAAATCAGGGCAGGGTCAAGTGGGGCAGAGGCTTGT
TTGATGTTAAAGGGGGTCAAGGAAGACCAAAACCAAGTTTTTGAAGATAAAAACTGTCTCAAGTGAGCTATCGTGCAGGGAGGGCCA
GAGCTATTGGACTGGGCTCTTTAGCCCTAAATGTCTGAGCTCAAGGAGATGCCATCTGTGCGGGAAATGTATGTGGAATAGGTGTC
TGTCTTGGAGAGACAATGAAACCTCAGCAGAATTTTCAATTTGGGAAAGCACAGCATTGCGGGAGAAACAAGTGTGTTTGGAGC
TGTGGAGGATGGGGATGTGGGTGTTTCAATGTGAACCCATCTTGCTTATTTGTGCACACGATATCTGCAGTCACTCAGAAAAGAGGC
CCTTAGAGTTTTCAACTGTATCGATTGGGTGCATAAACTCACTCTAGAGATTACTGACTTTGATGGCTCTGTTTCAACAATAGACC
TGGGAGCATCATCTAGCCGTTTCAAAACTGGGGTTCAAGTTAGCCTCTCACTGGACGAGAGGGCATTTCAGGCTCAAAACAGCTTT
TCCTTCATTGAGAGCCAGGCAAAGGGTATGCAATTTGATGAGCCATTCTCAGAAAATCCTCGGCAAAGGGTCTTGGGGGAGAT
CAGGTGCAATTCAGAAATCTCAGTCTGAGTGTCTCATGAATCATGCCCTTAGGGCACCAAAATCTTATTTCATACAAGCCCATGATAG
ATCAGTTGGAGTGCACAACAATCTGATTGATCCCTTTGTTGTCTTTGAGAGGGGCTCTCTGCCACAGACAGGAATGACAAAACC
TTTGCAGCTTCAAAAGGAAATAGGGGTGTTCAAGCTTTCTTAAAGGGCTCTGTACAGGCTGATCTAACACTGATGTTTGACAATTT
TGAGGTGGACTTTGTGGGAGCAGCCGTGCTTGTGATGCGCCCTTCTTAAATTTGACAGGTTGCTATTCCTGCAATGAGGGGCCA
GAGTCTGCCGTCTATCACATCCACAGGAACCTGAACTCTCTGCCCCAATAAAGATGGATCTCTGCATATAGTCTTCCATCA
GAGAATGGAACAAAGATCAGTGTGAGATACTCACTTCACTGTACCTGAGGTAGAGGAGGATTTATGTAATCTTGTGATGGAGA
TGAGCGGCTCTGTTGGTGAAGGGAAACCTGATAGCTATTGATCCATTTGATGATAGGCGAGAAAGCAGGGGGGAAATCAACAGTTG
TGAATCCAAAATCTGGATCTTGGAAATTTCTTTGACTGGTTTTCTGGACTCATGAGTTGGTTTGGAGGGCCTCTTAAAGACTATACTC
CTCAITTTGCTGTATGTAGCATTATCAATGGGCTCTTTTTCTTCTTATATATCTTGAAGAACAGGCCTCTCTAAAATGTGGCT
TGCTGCCACCAAGAAAGCCTCATAGATCAGTACGTTGTAAGCAATATATAGAAATAAGTAAACATAAGCAAACTCAATATATGTA
ATATTTGACAGATGGGTCAAACCTATTGGGATATCCAAAGTTTGAAGCTTTGTACAAATAGTACTTTAGATGTAAGCTTAGTTGTAAT
TGGGTTGGTGGGTTGAGGCGAGTGTCTCAAGTACATGTTGATATTCTAGTTAATGTGAATGCTTTTGGCAGATTAGCTGGGA
ATTAACCTAACTCTTTGAAGTTGCACCGGCTCTTGTGTTGGTTCGGCATGGCATCTCCACCTCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCG
AAGGAGGACGTCCTCACTCGGATGGCTAAGGGAGAGCTCGGATCCGGCTGTCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCT
GCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCTTTGGGGCTCTTAAACGGTCTTTGAGGGTTTTTTTGTGAAAGGAGGAACTATATC
CGGATGAGATCCTCTAGCCAGATCCTCTACGCCGAGACCATCGTGGCCGGGCTCGACTGCAGAGGC

Figura 7
C

GGATCCGRTCCAATAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCGCGGGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGGGGGATCTC
 GATCCCGCGAAATTAATAACGACTCACTATAGACACAAAGACCCCTAGTGCTTATCAAGTATATCATGGATTACTTTCTGTGATA
 TCTGTTGATTGACAGTGGTCTGTCGTTGTGTGTCAGTGGAGTACATTAGAGGTGATGGTCTCCAGGATACCTTATCTATGGT
 TGGGCCCTGTTGTCTTTCTCATGCACCATCGTCTAGTACAGAGGTTGCGCTTGGGATTCTCTGATTTCTACAATGTCGGAGAAT
 TCCCATACCGAGTCCGACTTGGAGACTTTGTATCAAAACGTTGCACCTCCACCAGCAAAGCCTTTTCAGAGACTTATTGATCTAATA
 GGCCATATGACTCTTAGTGATTACAAAGGTTCCCAATCTGAAAGAAGCCATATCCTGGCCTCTTGAGAAACCCTCCCTGGCTT
 CTTGACCTAAGCTCCACCAGAGTGCATAGGTCTGATGATATTAGAAGGGACCAGATTGCTACTCTAGCAATGAGGAGCTGCAAGA
 TTACCAATGATCTGGAGGACTCCTTTGTTGGCTTACACAGGATGATAGTGACCGAGGCTATCCTCAGAGGGATTGACTTGTGCCTG
 TTGCCAGGCTTTGATCTCATGTATGAGGTTGCTCATGTTGAGTGTGTTGCGCTCCTGCAGGCAGCAAGAGAGGATATTTCTAATGC
 TGTAGTTCCAAACTCAGCTCATTGCTCTTATGGAGGAGAGCTTGATGCTGCGCTCATCACTCCCTAGCATGATGGGGAGAAACA
 ACTGGGTTCCAGTTGTTCTCCAATCCAGATGTTGAGATAGAATCAGAGGAAGAGAGTGTGACGATGGATTGTTGAGGTTGAT
 TAGAGATTAAGGCTGCCCAACCCCAACCCCAATCCCGACCGTAAACCCCAACCCCTTTTCCCAAAACCCCTGGGCAGCCAC
 TTAGGCTGCTGTCTTGTAACGCTGAGCAGCTGCCATGACAGCTGCTGACGGCTTCCCATGGAAATCCAACAAGCCAAAGCTTTCA
 AGAATTCCTCCTCTCTCATGGCTTATAAAGTTGCTATTCAGTCTGCTGCAATTCATGGCTGCGTGAACGTTGGGCAACCTCCTCC
 TTTGTTCTACCTCGGAGGTTTGGGTTGATGACCCCGGAGAACTGCAGCAGATACAGAGAGTGAGCATCCAATATTGCCCTTAGATA
 GTCTTCTGGTAGAGAAGGGTCCACCATGCCAGCAAAGCTGGGGTGCATCATATGCCTTGGGTATGCAGGGGATAGGCCATCCATGG
 TGGTCCCAGTGACAGGAAGCCACTCAAGACGACCAAAGCCTGGCAAAGTCCAGCCAGCCAGGGCAGCAGCAACTCGTGATAGA
 GTCAACTCATCCCGGAAGGATTCCCTCCTTAGCTTATACTTGTGTAGAGAGCCTCCACAGTTGCTTTGCCTTCTTTGACAT
 TTTTCATCATCCTCCGGGGCTTGTGCCACGAGTCAGAGCCAGAAACAATCATTTCCTGGCATCCTTCTCCAGTCAGCCCCAC
 CATACTGCTTTAAGAGTTCGATAACCTACCGGCATCAAATCCTTGATAAGCAAACCTCTCGGACCCACTGTTCAATCTCATTGCCG
 TCCACTGCTTGAGCAGCAAACCTGGATCGCAAGCTCTTGATAGTTGTCCATATTGTAATAGTGTGTTGATCTCTAGGGAGCTTTGT
GTEGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGGGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGTGTCCTCCTCGGATGGCTAAGGGAGA
GCTCGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGG
GCCTCTAAACGGGCTTTGAGGGGTTTTTTCTGAAAGGAGGAACATATCCGGATCGAGATCCTCTAGCCAGATCCTCTACGCCG
 ACGCATCGTGGCCCGCCCAATATCTAGA

Figura 7

D

TCTAGAGAAATTAATACGACTCACTATAGACACAAAGCTCCCTAGAGATACAAACACTATTACAATAATGGACAACATCAAGAGC
TTGCGATCCAGTTTGCTGCTCAAGCAGTGGACCGCAATGAGATTGAACAGTGGGTCGAGAGTTTGCTTATCAAGGATTTGATGCC
CGTAGGGTTATCGAACTCTAAAGCAGTATGGTGGGGCTGACTGGGAGAAGGATGCCAAGAAAATGATTGTTCTGGCTCTGACTCG
TGGCAACAAGCCCGGAGGATGATGATGAAAATGTCGAAAAGAGGCAAAGCAACTGTGGAGGCTCTCATCAACAAGTATAAGCTAA
AGGAGGGGAATCCTTCCCGGGATGAGTTGACTCTATCACGAGTTGCTGCTGCCCTGGCTGGCTGGACTTGCACGGCTTTGGTCGTC
TTGAGTGAAGTGGCTTCTGTCACTGGGACCACCATGGATGGCCTATCCCCTGCATACCCAAGGCATATGATGCACCCAGCTTTGC
TGGCATGGTGGACCCCTTCTTACCAGAAGACTATCTAAGGGCAATATTGGATGCTCACTCTCTGTATCTGCTGCAGTTCTCCCGGG
TCATCAACCCAAACCTCCGAGGTAGAACAAGGAGGAGGTTGCCGCAACGTTACCGCAGCCAATGAATGCAGCAGTGAATAGCAAC
TTTATAAGCCATGAGAAGAGGAGAGAATTCTTGAAGCTTTTGGGCTTGTGGATTCCAATGGGAAGCCGTGAGCAGCTGTCAATGGC
AGCTGCTCAGGCGTACAAGACAGCAGCCTAAAGTGGCTGCCAGGGGTTTGGGGAAAAGGGGGTGGTTGGGGTTACGGTCGGGATTG
GGGTGGGGGGTGGGGCAGCCTTAATCTTCAACAGATATCACAGGAAAGTAATCCATGATATACTTGATAAGCACTAGGGGGTCTT
TGTGTGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGTCGTCACCTCGGATGGCTAAGGG
AGAGCTCGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATACCCCTT
GGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATCGAGATCCTTAGCCAGATCCTCTACGC
CGACGCATCGTGGCCGGCGGGCCC

Figura 7

E

TAATACGACTCACTATAGACACAAAGCTCCCTAGAGATACAAACACTATTACAATAATGGACAACATCAAGAGCTTGCATCCAG
TTTGCTGCTCAAGCAGTGGACCGCAATGAGATTGAACAGTGGGTCGAGAGTTTGCTTATCAAGGATTTGATGCCCGTAGGGTTAT
CGAACTCTAAAGCAGTATGGTGGGGCTGACTGGGAGAAGGATGCCAAGAAAATGATTGTTCTGGCTCTGACTCGTGGCAACAAGC
CCCGGAGGATGATGATGAAAATGTCGAAAAGAGGCAAAGCAACTGTGGAGGCTCTCATCAACAAGTATAAGCTAAAGGAGGGGAAT
CCTTCCCGGGATGAGTTGACTCTATCACGAGTTGCTGCTGCCCTGGCTGGCTGGACTTGCACGGCTTTGGTCGTCCTGAGTGAAGT
GCTTCTGTCACTGGGACCACCATGGATGGCCTATCCCCTGCATACCCAAGGCATATGATGCACCCAGCTTTGCTGGCATGGTGG
ACCCTTCTTACCAGAAGACTATCTAAGGGCAATATTGGATGCTCACTCTCTGTATCTGCTGCAGTTCTCCCGGGTCATCAACCCA
AACCTCCGAGGTAGAACAAGGAGGAGGTTGCCGCAACGTTACCGCAGCCAATGAATGCAGCAGTGAATAGCAACTTTATAAGCCA
TGAGAAGAGGAGAGAATTCTTGAAGCTTTTGGGCTTGTGGATTCCAATGGGAAGCCGTGAGCAGCTGTCAATGGCAGCTGCTCAGG
CGTACAAGACAGCAGCCTAAAGTGGCTGCCAGGGGTTTGGGGAAAAGGGGGTGGTTGGGGTTACGGTCGGGATTGGGGGTGGGGGG
TGGGGCAGCCTTAATCTTAATCAACCTCAACAAATCCATCGTCATCACTCTTCTCTGATTCTATCTCAACATCTGGGATTGG
AGGAACAACCTGGAACCCAGTTGTTTCTCCCATCATGCTAGGGAGTGTAGGCGCAGCATCAAGCTCTCTCCATAAGAGCAATGA
GAGCTGAGTTTGGAACTACAGCATTAGAAAATCCTCTCTGCTGCTGCAGGAGCCGAACACACTGAACATGAGCAACCTCATAC
ATGAGATCAAAGCCTGGCAACAGGCACAAGTCAATCCCTCTGAGGATAGCTCGGTCACTATCATCCTGTGTAAGCCAAACAAGGA
GTCTCCAGATCATTGGTAATCTTGAGCTCCTCATTTGCTAGAGTAGCAATCTGGTCCCTTCTAATATCATCAGACCTATGCATC
TGGTGGAGCTTAGGTCAAAGAAAGCCAGGGAGGGTCTCCAAGAGGCCAGGATATGGCTTCTTTCAGATTGGGGAACTTGTGAAA
TCACTAAGAGTCATATGGCCTATTAGATCAATAAGTCTCTGAAAAGGCTTTGCTGGTGGAGGTCAACGTTTGTATACAAAGTCTCC
AAGTCCGACTCGGTATGGGAATTCTCCGACATTGTAGAAAATCAGAGAATCGCAAGCGAACCTCGTGACTAGGACGATGGTGATGA
GAAAGACACAACAGGGCCCAACCATAGAATAAGGTATCCTGGGAGGACCATCACCTCTAATGTACTCCACTGACACAACACGACGA
CCACTCTGCAAAATCAACAGATATCACAGGAAAGTAATCCATGATACTTGATAAGCACTAGGGGGTCTTTGTGTGGGTCGGCATG
GCATCTCCACCTCCTCGCGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGTCGTCACCTCGGATGGCTAAGGGAGAGCTCGGATCCGGC
TGCTAACAAAGCCGAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATACCCCTTGGGGCTCTAAACGGG
TCTTGGGGGTTTTTTG

Figura 7

F

GGTACCTGGCGAATGCATTAGAGAAATTAATACGACTCAGTATAGACACAAAGCTCCCTAGAGATACAAACTATTACAATAATG
 GACAACATCAAGAGCTTGGCATCCAGTTTGTCTCAAGCAGTGGACCGCAATGAGATGAAACAGTGGGTCCGAGAGTTGCTTA
 TCAAGGATTTGATGCCCGTAGGGTTATCGAACTCTTAAAGCAGTATGGTGGGGCTGACTGGGAGAAGGATGCCAAAGAAAATGATTG
 TTCTGGCTCTGACTCGTGGCAAACAAGCCCCGGAGGATGATGATGAAAATGTCGAAAAGAAAGCAAAGCAACTGTGGAGGCTCTCATC
 AACAAAGTATAAGCTAAAGGAGGGGAATCCTTCCCGGGATGAGTTGACTCTATCACAGTGTGCTGCCCTGGCTGGCTGGACTTG
 CCAGGCTTTGGTCTGCTTGTAGTGTGGCTTCTGTCTACTGGGACCACTATGGATGGCCTATCCCTGCATACCCAAGGCATATGA
 TGCACCCAGCTTTGCTGGCATGGTGGACCCCTCTCTACCAGAAGACTATCTAAGGGCAATATTGGATGCTCACTCTCTGTATCTG
 CTGCAGTTCTCCCGGTTCATCAACCCAAACCTCCGAGGTAGAACAAGGAGGAGGTTGCCGCAACGTTACCGCAGCCAATGAATGC
 AGCAGTGAATAGCAACTTATAAGCCATGAGAAGAGGAGAGAATTCTTGAAAGCTTTTGGGCTTGTGGATTCCAATGGGAAGCCGT
 CAGCAGCTGTCTGGCAGCTGCTCAGGCGTACAAGACAGCAGCCTAAAGTGGCTGCCAGGGTTTGGGAAAAGGGGGTGGTTGGG
 GTTACGGTCCGGATTGGGGGTGGGGGTGGGGCAGCCTTAATCTTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTGAGTATCCC
 GCGCGCGTCAAGAACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGT
 GGTGTGCGGGCAGCAGCACGGGGCCGTGCGCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTGGCGAGCTGCACGCTGCCGCTCTCGATG
 TTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACTGTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTGCGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTGTAGTTGTACTC
 CAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGCTCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCACTCGATGCGGTTCAACAGGGTGTGCCCTCGAACT
 TCACCTCGGGCGGGTCTGTAGTTGCCGCTGCTTGAAGAAGATGGTGGCTCTTGGACGTAGCCTTCCGGCATGGCGGACTTG
 AAGAAGTCGTGCTGCTTCAATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCGTAGGTGAGGGTGGTCAAGGGTGGGCCAGGG
 CACGGGCAGCTTGGCGGTGGTGCAGATGAACCTCAGGGTCACTTGGCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGA
 ACTGTGGCCGTTCACTGCGCGTCCAGCTCGACAGGATGGGCACCAACCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGTCTCACCATGGGA
 TATACTTGATAAGCACTAGGGGGTCTTGTGTGGGTGGCATGGCATCTCCACTCCTCGCGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAG
 GACGTCGTCACCTCGGATGGCTAAGGGAGAGCTCGGATCGGGTCTTAAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACC
 GCTGAGCAATAACTAGCATAAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGTTTTTTGTCTGAAAGGTGCGAC

Figura 7

G

GAATTCGAAATTAATACGACTCAGTATAGACACAAAGACCGGTGCAACTTCAAAGAGTTAGTTTAAATCCAGCTAATCTGGCAAA
 AGACATTCACATTAAGTAGAATATCCACATGTACTTGAGACTACTGCTGCCCTCACCCCAACCCCAAAATTACAACCTAAGCTTACA
 TCTAAAGTACTATTGTACAAAGATCTAAACTTGGATATCCCAATAGTTTACCCATCTGTACAATATTACATAATTAGATTGCT
 TATGTTTACTTATTCTATATATTGCTTCTACACGTAAGTCTTAGAGCCCGTGGCAGTACTAGTAAGCTTGTATATCTCGAGG
 CGCGCCAGCTGCGGCCGCTGATTCCGATACCCGGGATCCTTGTCTCACCATGGTTAATGCAACCGTCTTTGTGTGGGTGGCATGGCAT
 CTCCACTCCTCGCGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGTCGTCCTCGGATGGCTAAGGGAGAGCTCGGATCCGGCTGCT
 AACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCCGTTAGCAATAACTAGCATAAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTT
 GAGGGTTTTTTGTCTGAAAGGAGGAATATATCCGGATCCGATCCTCTAGCCAGATCCTCTACCGCGGACCGCATCGTGGCCGGG
 TCGACTGCCTGAC

Figura 7

H

TAATACGACTCAGTATAGACACAAAGACCGGTGCAACTTCAAAGAGTTAGTTTAAATCCAGCTAATCTGGCAAAAGACATTCACA
 TTAAGTAGAATATCCACATGTACTTGAGACTACTGCTGCCCTCACCCCAACCCCAAAATTACAACCTAAGCTTACATCTAAAGTACT
 ATTGTACAAGATCTAAACTTGGATATCCCAATAGTTTACCCATCTGTACAATATTACATAATTAGATTGCTTATGTTTACTT
 ATTTCTATATATTGCTTCTACACGTAAGTCTTAGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGCGGTGAGTGTATCCCGGCGGGCGGTCAAG
 AACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTGGGAG
 CAGCACGGGGCCGTGCGCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTGGCGAGCTGCACGCTGCCGCTCTCGATGTTGTGGCGGATCT
 TGAAGTTCACTTGTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTGCGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCC
 AGGATGTTGCCGCTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCACTCGATGCGGTTCAACAGGGTGTGCCCTCGAACTTCACTCGGGCGG
 GGTCTGTAGTTGCCGCTGCTTGAAGAAGATGGTGGCTCCTGACGTAAGCTTCCGGCATGGCGGACTGAAAGAAGTGTGCT
 GCTTCAATGTGGTGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCGTAGGTGAGGGTGGTCAAGGGTGGGCCAGGGCACGGGAGCTTG
 CCGTGGTGCAGATGAACCTCAGGGTCACTTGGCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGCGGTT
 CAGTCCCGCTCAGCTCGACAGGATGGGCACCAACCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGTCTCACCATGGTTAATGCAACCGTCTT
 TGTGTGGGTGGCATGGCATCTCC

Figura 7

I

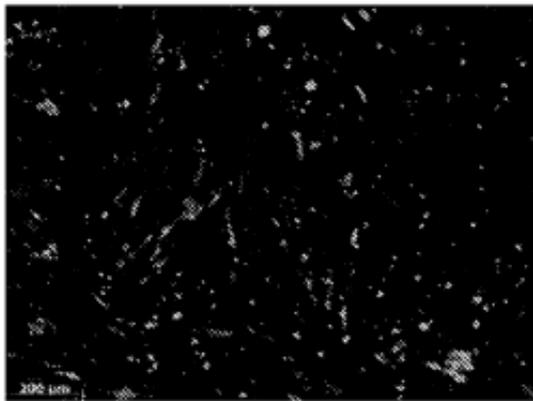
GAATTCGCTCTTCAAGCACCCACCATGGCCGGAATCGCCATGACAGTGTTCCTGCACTGGCCGCTGTTTGGCTCCCCTGGTGG
 TTTGCTGAAGACCCGACCTGCGCAACCGTCTCTGGCAAGGGCCACAACCTATATTGACGGCATGACCCAGGAAGACGCTACATGTAA
 GCCGGTGACATATGCTGGCGCCTGCTCTAGCTTCGACGTGCTCCTGGAAAAGGGAAAATCCCAGTGTTCAGTCTATGCTCATC
 ACCGCACCCCTGCTGGAGGCCGTCACGACACAATATCGCAAAGGCCGATCCCCTAGCTGCGACCTGACAGAGCGCCCATGGCAAC
 CCGTGCATGAAAGAGAAAATGGTGTATGAAAACACATTCGCGAATGACTACCAGTCTGCACACTATCTCAACAATGACGGCAAGAT
 GGCTTCCGTAAGATGCCACCAAAGTACGAACTGACCGAGGATTGTAACTTTTGGCCAGATGACGGGGCGCAAGTCTTAAGAAGG
 GTAGTTACCCCTCTGCAGGACCTGTTTTGTAGTCTCAGAGGACGACGGCAGCAAGCTCAAAAATAAAATGAAGGGCGTGTGCGAG
 GTGGTGTGCAAGCCCTTAAAAAGTGCAGCGCCAGCTCTCCACCGCCACGAAAGTGGTCCCTTTTGTGTTTTTAAGAATAGCAA
 GAAGGTGTACCTCGACAACTGGATCTGAAAACCTGAAGAAAACCTGCTTCTGTATAGTTTCGTGTGCTTCGAGCACAAGGCCAGT
 ACAAGGGTACCATGGACTCCGGTACAGACCAAACGCGAGCTGAAATCCTTCGACATTTCCAGTGCCTCAAGATCGGAGGACACGGA
 AGCAAGAAATGCACCGGCGACGCGCCTTCTGTAGCGCCTACGAATGCACTGCCCAATATGCCAACGCTTATTGCTCTCACGCCAA
 CGGTTCTGGCGTGGTGCAGATTCAGGTGTCCGGCGTCTGGAAGAAGCCGTTGTGTGGGCTATGAACGCGTGGTGGTGAAGCGGG
 AGTTGAGCGCTAAGCCCATCCAGCGTGTGGAGCCATGCACCACCTGCATCACAAAGTGTGAACCACAGGTCTGGTGGTGAAGTCT
 ACCGGATTTAAGATTAGCTCTGCGAGTCCCTGTGCAAGTGGCGTGTGTGTCACTGGCTCACAGAGTCCCTCAACGGAAATCACTTT
 GAAGTATCCCGGCATCAGCCAAAGCTCTGGAGGCGATATCGGCGTCCATATGGCCACGACGACCAGAGCGTGAGCTCAAAGATTG
 TTGCCACTGCCCCCGCAGGACCCTTGCCTTGTGCAGGGCTGCATTGTGTGCGCCACGGATTGATTAACCAATGCCACACC
 GCCTCAGCGCCTTTGTCTGTTGTTTTGTGTTTTCTTCGTTGCAATCATTTGCTGGCCATCCTGTACAAAGTCTCAAAATGCCT
 GAAAATTGCCCTTAGGAAGTCTCGACCCGTTGATGTGGATTACGGTGTTCATCCGATGGGTGTATAAGAAGATGGTGGCAAGGG
 TGGCAGATAACATTAACAGGTGAACAGAGAGATAGGATGGATGGAAGGTGGCCAGTTGGCACTTGGTAACCCCTGCCCCATCCCT
 CGACACGCCCCATTCCGAGATATAGCACCTACCTCATGCTGCTTCTGATCGTGAGCTACGCATCCGCTGCAGCGAGCTGATTCA
 GGCACGAGTAGAATCAGACGTGCAGTACAGAAGGAGTGAACCAAATGCCGCTGTCCGGAACCGCCCTGATTCCGCGCCGGCT
 CCGTCCGGCGCCGAGGCTGTCTCATGCTCAAGGGCGTGAAGGAGGACAGACCAAATTCCTGAAGATCAAGACTGTTTTCATCTGAA
 CTCTCATGTCCGGAGGGACAGTCTACTGGACAGGTAGCTTCAAGTCCAAAGTGTCTTTCCCTCCCGTCTGTCACTGGTCCGGGA
 ATGTCATGTGAATAGGTGTCTGTATGGCGCGACAAACGAGACTTCCGCGCAATTTCTTTTCGTGGGTGAATCCACCACCATGCGGG
 AAAATAAATGTTTCGAAACAGTGCAGCGGCTGGGGTGTGGCTGCTTCAACGTGAACCCGCTTGCCTTTTGTTCATACCTATCTG
 CAATCTGTGCGCAAGGAAGCTCTGCGGTTTTTAATTGTATCGACTGGGTGCATAAGCTCACATTGGAAATCACAGATTTTGACGG
 CTCGCTCAGCACCATCGACCTGGGAGCTTCTTATCACGATTTACAAACTGGGGTAGCGTGAGTCTCTCCCTGGATGCCGAAGGTA
 TTTCAAGGACGCAACAGTTTTAGTTTCATCGAATCCCTGGCAAGGTTATGCCATCGTGGACGAACCTTCTCCGAGATCCCAAGG
 CAGGGCTTCTTGGAGAGATCAGGTGCAACTCAGAAAGCTCCGTTGAGTGTCTCATGAGAGTTGTCTGAGGGCCCCGAACCTGAT
 CTCCTATAAGCCCATGATTGACAGCTTGAGTGCACAACAATCTTATAGATCCCTTCGTGTTTGAAGAGGCTCCCTCCCC
 AGACCCGCAACGACAAGACGTTCCGAGCTTCTAAGGGCAACCGTGGAGTCCAGGCCTTTAGCAAGGTTCCGTCAGGCCGACCTG
 ACATTGATGTTGATAAATTCGAGGTGGATTTCTGTCGGAGCCGCTGTCTCCTGCGATGCAGATTTCTGAAATCTGACTGGCTGCTA
 TAGTTGCAATGCTGGAGCACGGTGTGCCCTGAGCATTACCTCCACTGGTACAGGTACCCTGTCCGCCACAATAAAGATGGAAGTC
 TTCACATCGTGTGCTTAGCGAGAACGGCACAAGGACCAATGTGAGATTTCTGCACTTTACCGTGCCTGAGGTGGAGGAAGAGTTC
 ATGTAATCCTGTGATGGCGATGAGAGGCTCTGCTGGTCAAGGGCACTCTCATGCCATTGACCCTTTTGTATGACAGACGCGAGGC
 TGGCGGAGAGACTGTCTGTTAACCCAAAGAGCGGCTCTTGAATTTCTTTGACTGTTTACGGGACTCATGTCTGGTTTTGGAG
 GCCCACTCAAGACGATTCCTGATCTGCTGTACGTGGCTCTGAGTATCGGACTCTTCTCTCTGATCTATCTCGGAAGAACC
 GGCTTGTCAAAAATGTGGCTGGCCGCTACAAAGAAAGCCAGTTAAGCTCTTCTCAGCGGCGC

Figura 7
L

CTCGAGACCATGGATTCTATATTATCAAACAGCTGGTTGCAAGACTGGTTTTGTTAGAGTGCCAATCAAGCATTATGACTGTAC
AATGCTAACTCTGGCACTCCCAACATTTGATGTCTCCAAGATGGTAGATAGAAATTACCATAGACTTCAATTTAGACGACATACAAG
GAGCATCTGAAATAGGCTCACTTTGCTACCTCTATGTGATAGATGTTGGAAGATATGGCCAAATTTGTTTACGATTTACCTTT
GGCCACTTAGCTGACAAGACTGACAGACTCTTAATGCGTGAGTTTCCCATGATGAATGACGGGTTTGGATCATCTGAGCCCTGACAT
GATTATCAAACACTACATCTGGCATGTATAACATCGTTGAGTTTACCACCTTTAGGGGGGATGAAAGAGGTGCATTCCAGGCTGCCA
TGACTAAACTCGTAAAGTATGAGGTTCTTTGTGAGAAACAGATCTCAGGGCAGGACTGTTGTTCTTTATGTTAGCGCCTACCGG
CATGGTGGTTGGTCTAATTTGGAGCTAGAGGACTCTGAAGCAGAGGAGATGGTATATAGGTACAGACTTGGCTTAGTGTGATGGA
TGAGCTAAGGACCTTGTCCAGAACTGTCTCCACAGATGAGAACTAGGAAAGACTGAGAGAGAGTTGATGACCCATGGTCTCCT
CCATCCAAATAAATGGTCACTCAGAAATCTGTGTTTCTCCCTTTAGCAGAGAAATGTTGACAGGTTCCAGTCTTCTCCTCC
GATTACAGGTACATCACGAGGATAGTGAGCAGATGCCTCATAAAATCTCAAGAGAACTCATCAATAATTCCTTCTTTGCTGAAGG
GAATGATAAAGTTTTGAGATTTTCAA AAAACGCTGAGGAGGTTTCTTGGCAATAGAGAGAGCTTTAAATCCGATATAGGGCAGAA
ACAACCTTAGGGACCTAAATGACCACAACTCTACTATTCCAGTCCCTCCCTGGCTGCTTATCAAGATGCGCAAGATCTG
TGCCCTCTTCAGGGATTAGATGTGAGAGGAGACCCTCCATGTGCAACCTGTGGAGAGAAAGTGGTTACCTCTGCAAACTAGAGGA
GATTGAGAGGATGCACGATGATGACGCGGACAGAACTTGAGTTTGGCCCTTCAGGGGTGAAGGACAGCCAGATGAAAGAAACAGAT
ACCATAGAGTCCATCGAATATGAGTCTCAGATGATAGTGTCTACATAGCTGCTTTAGGGGTTAATGAAAGAAAGCATAAAGCAGAC
ACATTAGTGCAACAAATGAGAGACAGGAGCAAAACGCCCTTCTCCAGATCATGATGGGATCAGATATCGAATTTCTCTGTC
ATGCTCTAGTACTTTGGGGCAACAGATGAGGACCTATACAACCTCTCTCTGTGATAAAGAGCTTAGATTGGCAGCTCAGAGAA
TTCATCAGCCATCTTATCAGAAAGGGGCTTCAATGAGATTTAACAAGAGCACTCAGATTTATGGGAGTAGGATAGGATCATGG
TGCCAAATGGTCAGTTTAAATAGGAGCTGAGCTACAGCTTCTGTAAGCAACATGTTAAGCCTAACTATTTTGTGATTTAAACGACT
ACTAGTTCTGGGATTTTCTGCTGATCAAGCCTACTTCCAGCAAAAAGCCATATATCTGCTGCTTTTGAATTAAGCGCTCTGCT
GGCCCTTTGATCTCTCCACTTCCAGGGTTTTCAAACCTACATAGATGCGGGGATCTGTTAGTTACTGACTTTGTTTCTTACAAA
CTAAGTAAGCTTACCAACCTCTGCAAGTGCGTTTCTGTTAATGGAATCTCCTTCTCATTTTGGGCAGAGGCAATTTGGGATTC
CTGGAACTTTGTTAGTACTTGTTCAGGCTCTCAGACTCTGCGCAATGGATGCCTCATAATGCGGCAAACTCTTCTTATTAACCC
TTTTGGAAGCAAAAGCAAACTGAAGGTTACAGACTTATCAAGATATATAATCATGAGGGGCTTTGCTCGCCCCAGAAATC
CCAAAACCTCACAAAGTACCTCTAAGTTTCCCAAGGTTTCCAGGTCAGAGCTCAGGTTTACTTATTAACCTGTTATGCGAAAC
TATCCAGAGAAATAGCAGGTTGAGCCCTTATCTTAAAGAAAGGATGGGTCATATCTGGGGTGGCATGTTTAACTCTTTTTCAG
GGCCCTCAGCTTGTATGCAACCACTCATCAGCTGTTGTTCAATGTTACTTTAAAAAACAAGAAAGAGACTGAGCCTTCTC
TCCCTTTCTGGGATGTATAAGAAAATATAGAACCTTAGACACTTAGACCACAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAG
ACTACTTGAATGATGAGTTCAGTGTCTTACTTGAAGGAGGCTTGAATCATGCTAAGCTGGTCTTAAAGAGTCTCTATGGAC
AGAATTTCACTGGGACAAATAGACAACCAATATTCCGAGAGTCTCAGTGGGTTGACTCTAGAAAAGATTAGCCACACTTAAGGCCA
AGCAACTTTAATGAGAAATTTGATGTCTATAAGGATGTGGCAGACAAGAACTACACAAGGGGATAAATTTAGTGAAGATGTCAA
ATATGCTCTGAGGGGAAAGCCCTAGCTATCCAGAAAGTTGAGGATGTCATGAGGACAGATAGAGTCAAGAGATGTATGACAAAT
TTTTGTTTGAAGAAACAAGCAGCATGGAGTCTGAGAGAGATCTATGTGATGGGTCAGAGGAAAGAAATTTGTTCAATCGTGGTGG
ACAATAGCCAGGTCATAGGGAAAGTTCTTTGCTTCTGATACCTCTGTAACCCCAATAAAGGTGAAAATTTCTGAGACACATGG
CATTAGGGCTCGGAAGCAATGTAAGGGGCTGTGTGAGACTGTGCAACATCAGATGATGCAAGGAAAGTGGAAACCAAGGCCATTTG
TTACAAAAGTTTGGCCCTCATGCTATGAGTTCACCTCTCCTAAGTGGTGGCCATTGATCATTAGGGGATTTCAATGTTTACCAAG
AAAAGGATGATGATGAATTTGAATTAATCTTAAAGATCTGGATGGTCTATCGAGAGCTTGTATATTAGAGATGACTTTGTGATGGAT
CTTCAAAGTTATCATGTTGAGCCAGAAAGTTCCATGGCTTTTAAAGGTTAAACATATCTGGAAAACAAGCAGGGATGATGTCAGG
GGATTTGCAATATACCTTCTCATTATTACACACTTCAATCAAGAAATACATCCGGTCTTGTCTTTAAATTTCAACCTGAAG
GTTGCTCCTGAGATGAGCAAAAGCCTGGTTTTGTGACATGATGCAAGGATCAGATGATAGTAGCATGTAATCAGCTTCCAGCTGA
TGACGAGAAGGTTCTCACAGATGCAAAAGTGGCCGAGCCATGCTTCCGAATGAAGAAGGAGCTGGGAGTGTACCTTGGCATCT
ACCCCTCAGAGAAGTCCAAGCAACAAGATTTTGTGATGGATGCAAAATTTGATTTTATTTCCACCCAGCATGTTGACACCG
ACGATCAGGTTGGATTGCGAGCATGTTGCGAGCCTGCCAGAAAGTGGAAACAAGTAGCCCGCCAGGAAGAGGCTCTAATCTAATGAC
TTCAGTTACTGAGGGGGGTTGGTCTTCTCTAGCTGCAATGATTTAGCAAGCTCAGTGCCTCTCCATCATGCTAATGGGCA
TGGGAGTGTCTGAGGCTTCTTAGAGTATAAGAAGGCAAGTCTGAGTGGAAATGACCCCTGGTCTGGTTTTCTCTGCTTGAAC
CCTTATGCGTGGGGTTGGGAGGTTTTAGATTTAATCTCTTCAAAGCCATCACCAAGAACTGATTTGCGAAGCTATATGCTTCTT
CATGAAAAGGTTAAGGGCTCAGCTGCTAGGACTGGGCAAGTGGATGTTACCATCCAGAAAACGTTGATGCGTGGAGCCAGGTTG
GCGCTCTAATTTAGCTCTCTCTAAAGTGGGATCTAGGAAGAGGTTTCAAGAACTGAGAGACCGTTTGAACACTCAGAGAAAC
TGGATTGAGCTAATAAATGAGAAATCCAGAGGTTCTCTATCGAGCTCCAGAAACAGGCCAGAAAATTTGTTGCGCATTGCGAGAA
AGTCCATAGCCCTGGTGTGTGTCATCTTCTGCGCAATGCACTGTAAGGTCATGGCCTCAGCTGTATACTTCTTATCAG
CAACAATTTTGAAGACACTGGAAGCCCTGAGTTCAACTTCTAGAGGATTTCAAAGTACAGCTTGTACAAAAGATGGCCGATAT
TCTGGCTTTTCAATGATATGGAGCCAGAAATATATTATTTCTTATCCCGAAACTTGGAGAAATTAGAATCACTGGATTC
TATAGTTTACAACAAGGGAGAAAATAGACATCATCCCAAGATTTAATATCAGGGATGCAACCCAAAACAGGGTCACTATCTTTAATG
AGCAGAAAGCCCTCCGAAACTCTCCAGAGAAAGTTGGTGTGACAGAAAGTGGTTCGGGACTCAGAAAGATGAGGATAGGATGAAACAACT
TTCCTGGCTGAATGGGAGAAGCTAAAGAAAATTTGTAAAGTGGTGGAAAGCACTCCAGAAAGCACTTAGCTCACACTCCACTGAA
TAACCATATTAGGTTAGGAAATTTCTTTGCTAGAATGGAAAGCAAGCTTAGAACCGTTAGAAATAACAGGAGCTCCTGTAAGAAAGA
GGTCAAGGGTTAGCAAGATAGCTATGGTTATCCGTTGCAAAATTTCTCCCGGATGGGCCATCTTAGAGGTGTAGAAGACCTCGCTGGC
TTCACCTCGTAGTGTCTCAGCTGAAATCTCAAGCACTTTCTGTTCTGCATACTACAGGGTCCATACAGTGAAGACTATAAGCTACA
GCTAATCTACAGAGTCTAAGCTCAGTGTCAAACGTTGAGATAAAGGAATCGGATGGTAAGACAAAACCAATTTGATTTGGGATCC
TTCAGAGATTTCTAGATGGTATCAGTTGTCCTTAAATTTGAAGAGATGGGAGCCGGAACAGTGGTGGATTCTCAAGAGACAA
CAGTCTAAGGTTGTGCAAAAATAAAGTGGTCTATTATGGAGTGGGATCTGGAGAGGCTTATGGATGGATATCAGGTCCTCTTGA
GATAGAAAATGACATAGGACAGCCCAAGGCTTAGGAATGTCAACAATCTGTCAGAGCAGCCATGGGATCTGAGTGTCCCAA
TAAGGCAGTGGGCGAAGACATGGGGGTCAAAAACAACAGGATTTCTCTAAATCTAGCAGAGGAGCTAGATATTTGATGATGAT
TCATTTAGGATGCAAGGACCCAGCAAGCCATTTGGATGCCAGTTTATATTATTAAGGGTGCATGTCAGATGTTATCAGACTGAG
AAAAGGAGGAGTGGAGATGAAAGTACGGGGCTCTACTCTCAACTGTGACATCAAGCAACCTTCTCATCAAGACTACACATTTAT
CTTACGTCATCAGCAATGATCTCAGTCCAGGATTTTCAAGTCAATATCAGAGACAGGAGTGGTGTGATGCGTTAATGGATCTAAG
GAGAGGGAGCCAAAGCACTGCTGGTGGATGTGAGTCTGTAGCTCCAAAATTCATATCAGCCATCCTTGGATATGTGAGGGGAA
GAGACAGATAAAAAGGAATCAAAGAAACCTCAGAGATTTGTGAGAAATTTGTTCTGAATCTTCCCTAAGATCAAAGGTTGGAT
CTATGTTCTAATTTGTCGCAATGTTGAGAGGCGCATGATGTTGATGTTGATGCGTTAATGGATCTAAGTACAGAAAGTGTAAAG
AACAATGCAATCAGTCAATGTTGTCATGATGATGATGATGATGTTAATGGTCTTACGAGATGGAGTCTTTTGATACATCTGATGT
CAACTCTTTGGGCCAGCCATACAAGGACATCAGTTTCAATATCTAGTGTCTCCTTAAATGGATTAAGTTGTTGATTAAT
CCATTTCAAAGATGGGAGAGCCCTCAGTTAGAAAAGTTTACAGAGACAGGTCGGTCTTAGCAAAGACTATGATTTTCAAAGGTT
CTCTCAGAACTCTACAGAGACCAGAAAGAGCATTAGGATAGATGATCTGGAGTTATATGAGGAGACAGATGTGGCGGATGACAT
GCTAGGCTAAGCGGCGCC

Figura 8

Infección con RRP



Pasaje de sobrenadante



Figura 9

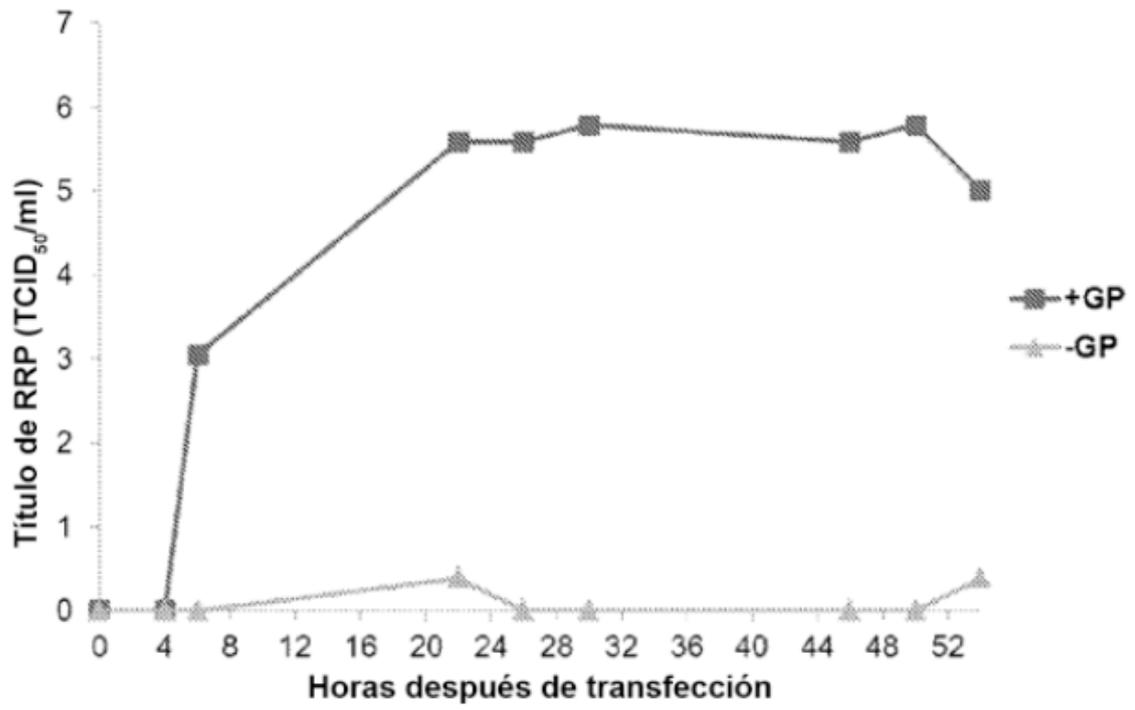


Figura 10

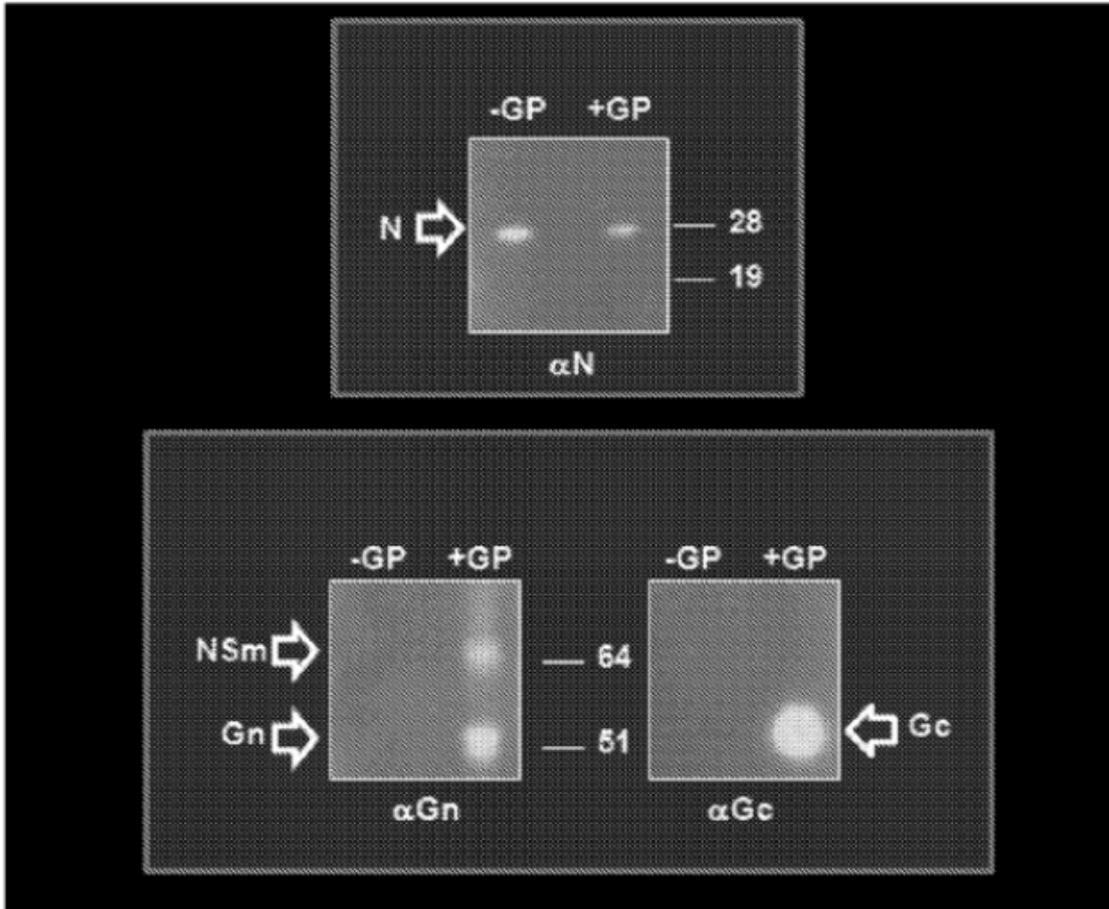


Figura 11

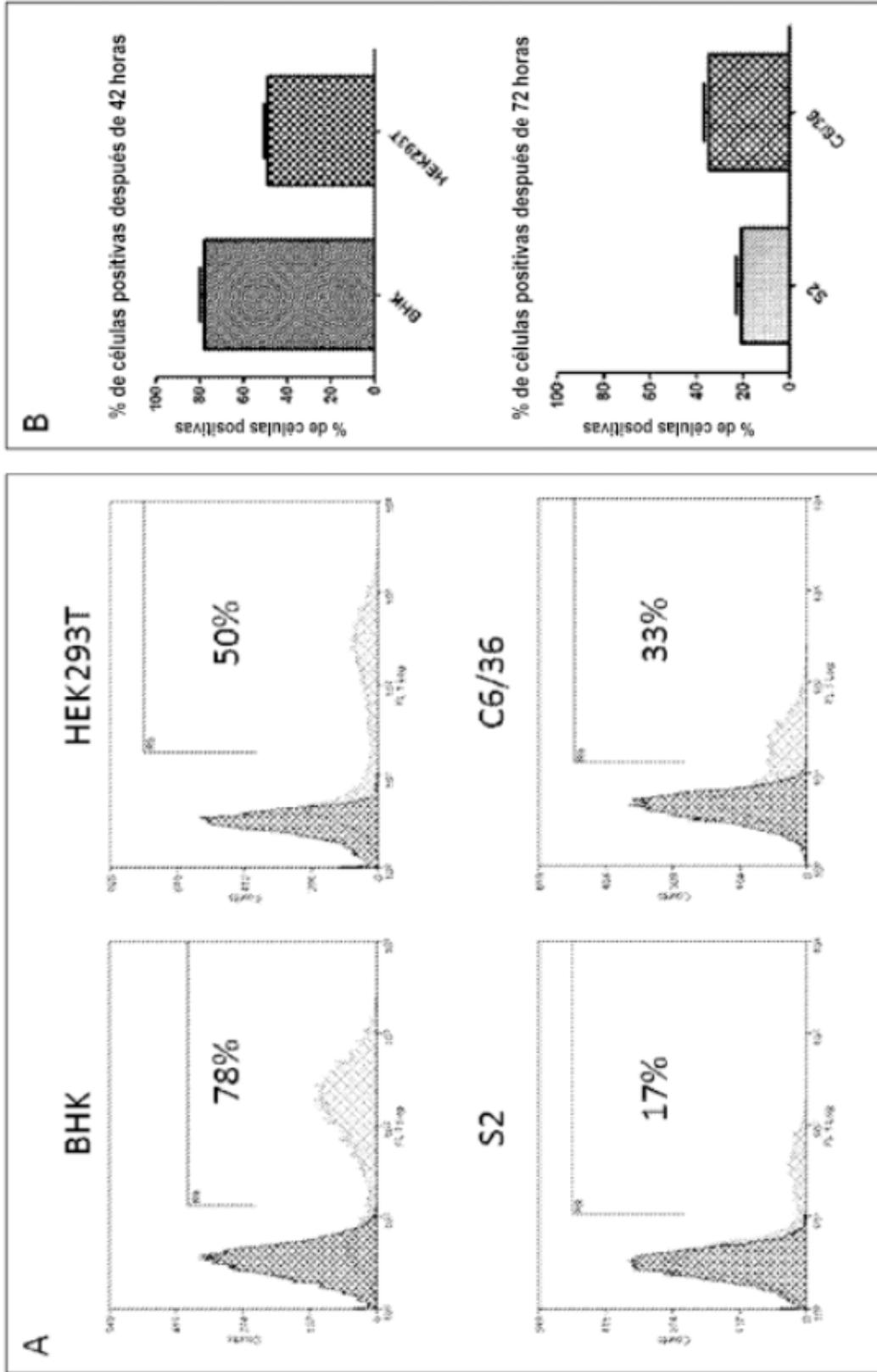


Figura 12

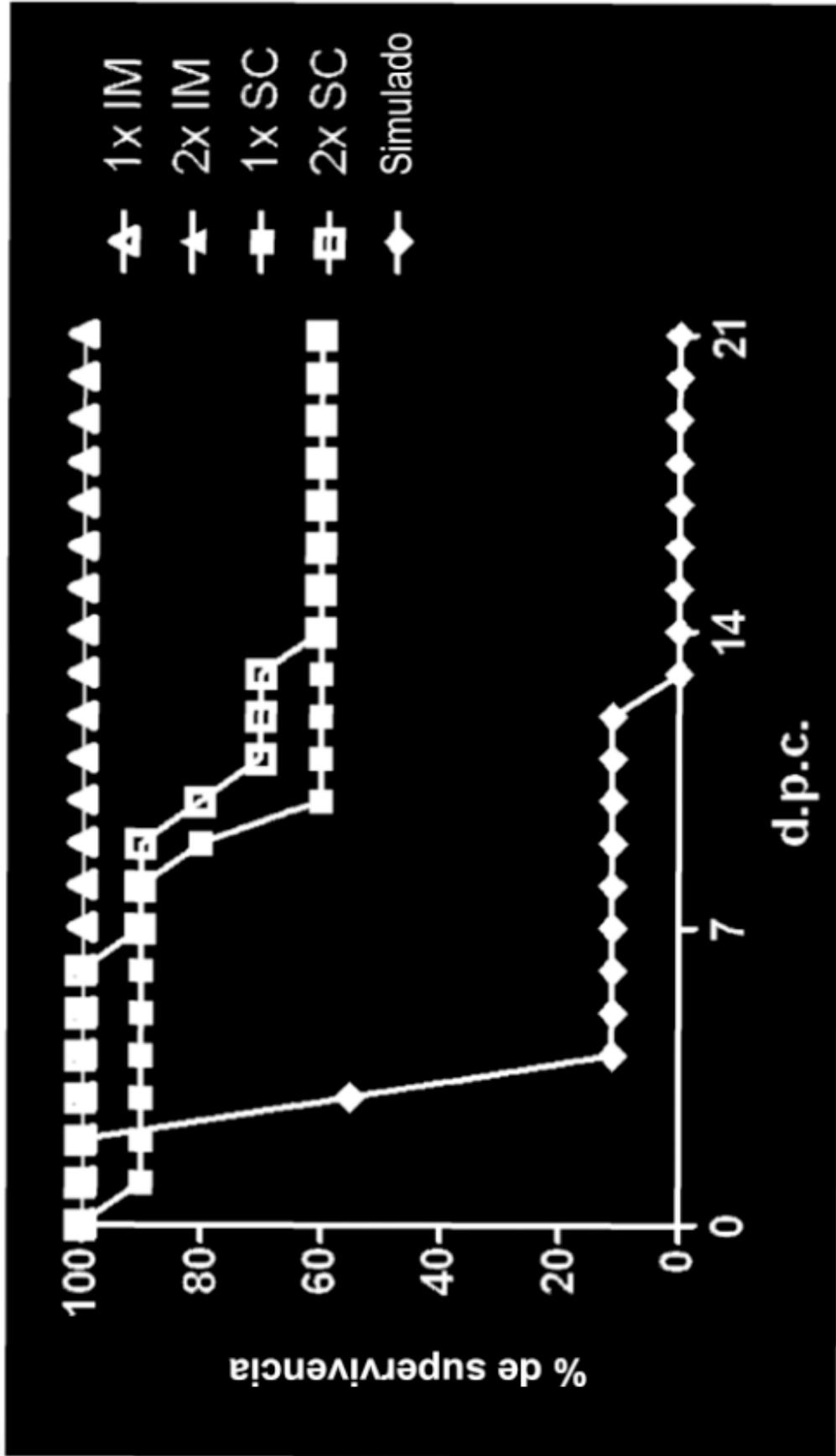


Figura 13

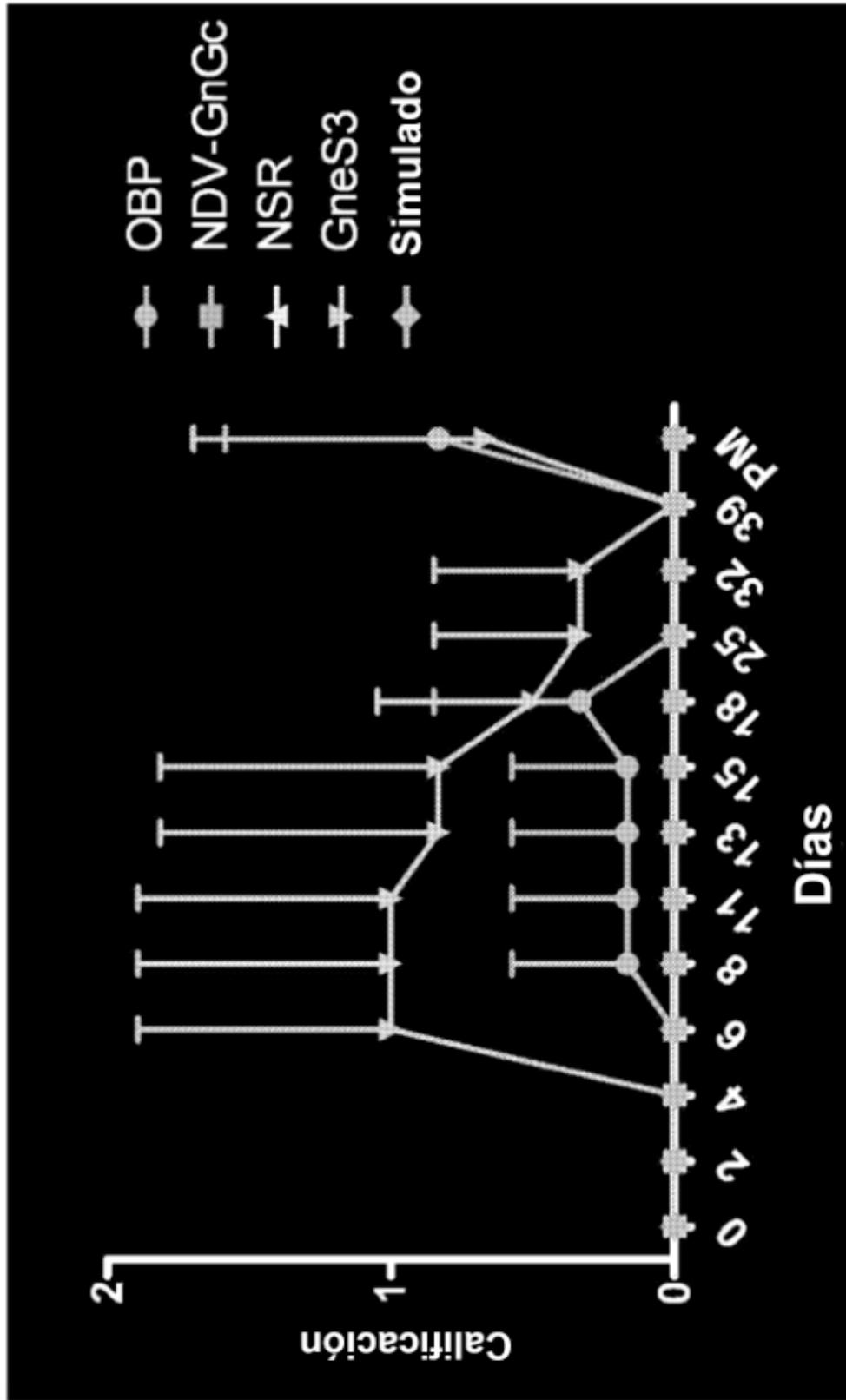


Figura 14

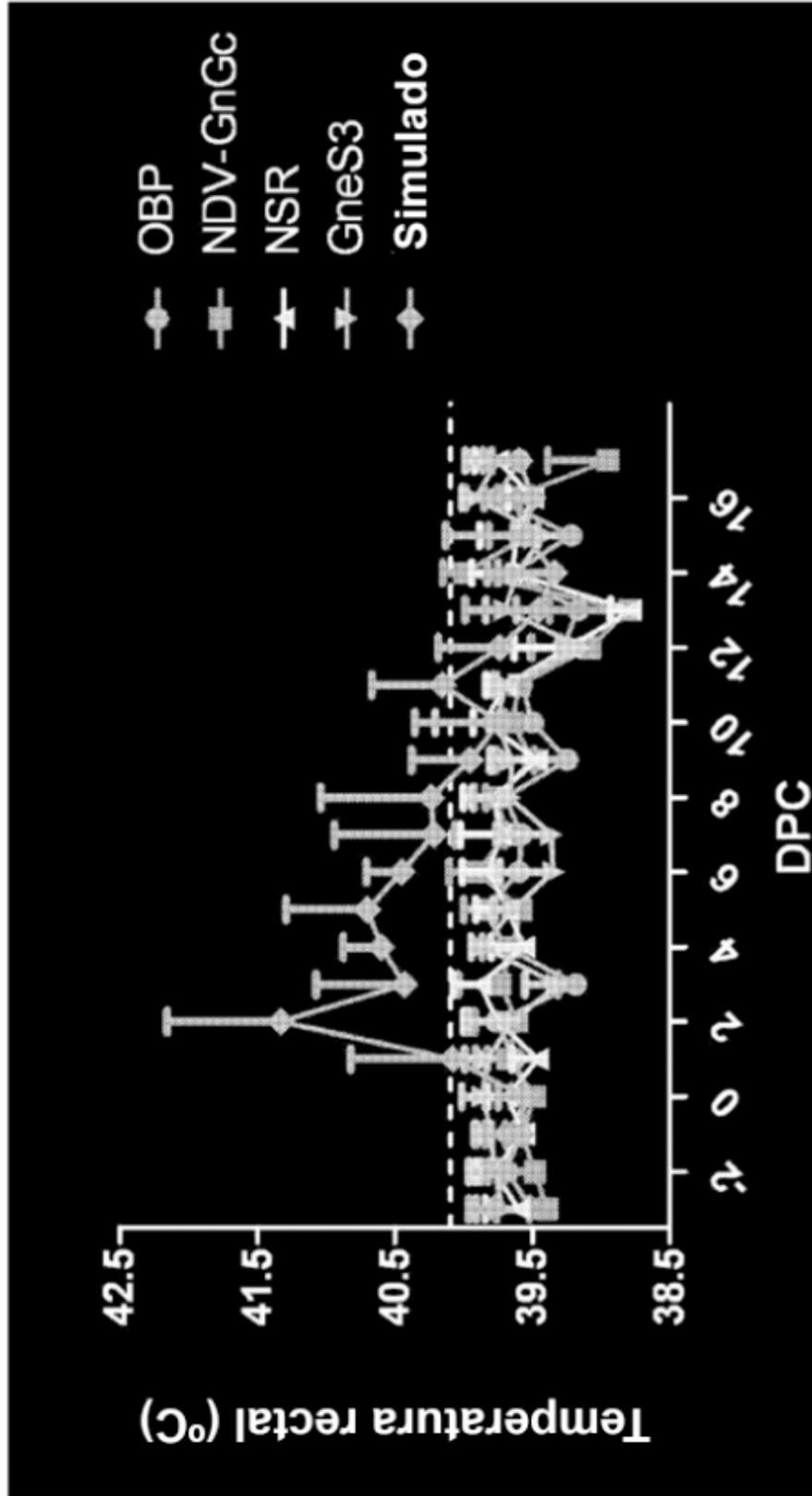


Figura 15

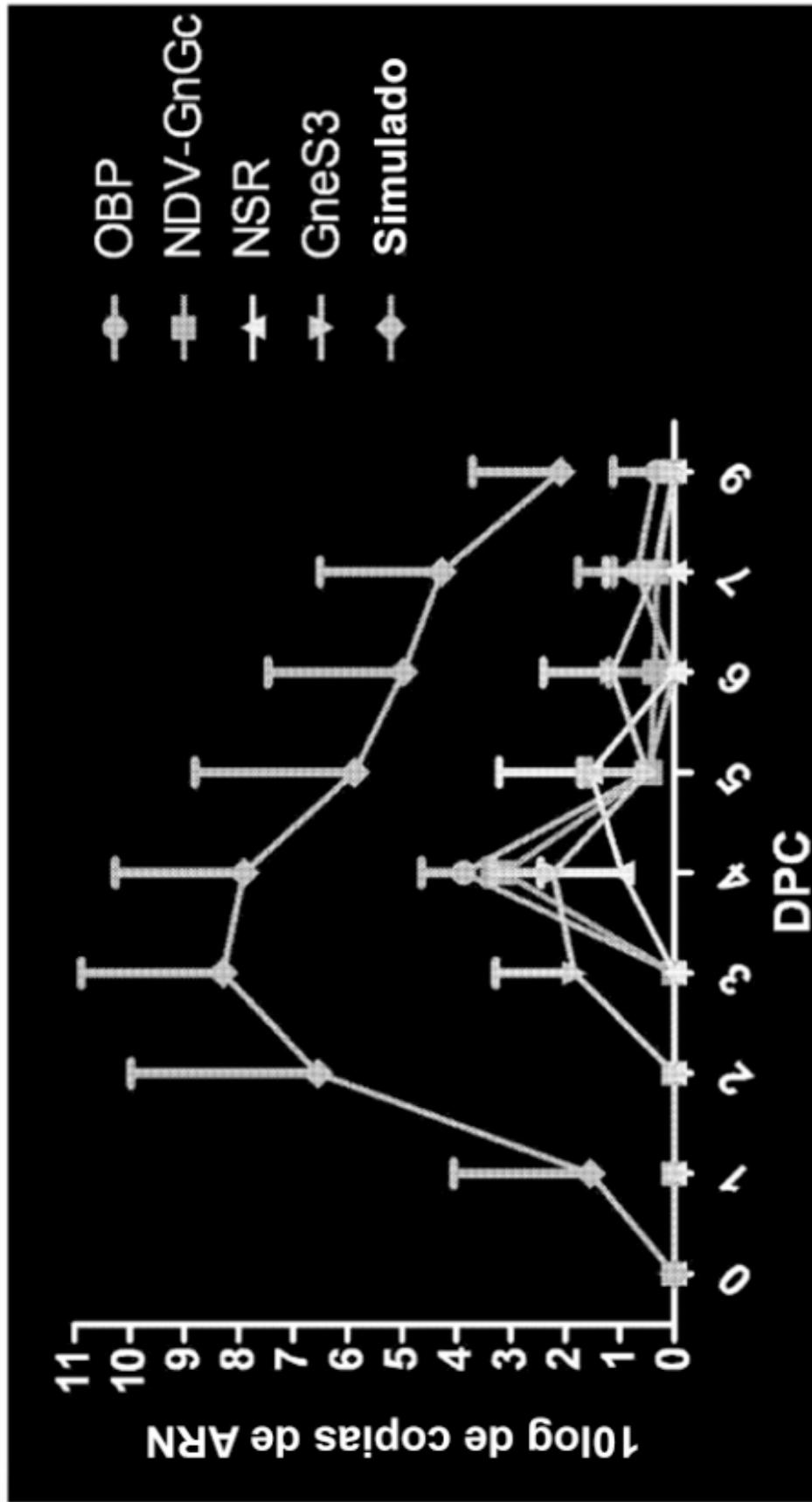


Figura 16

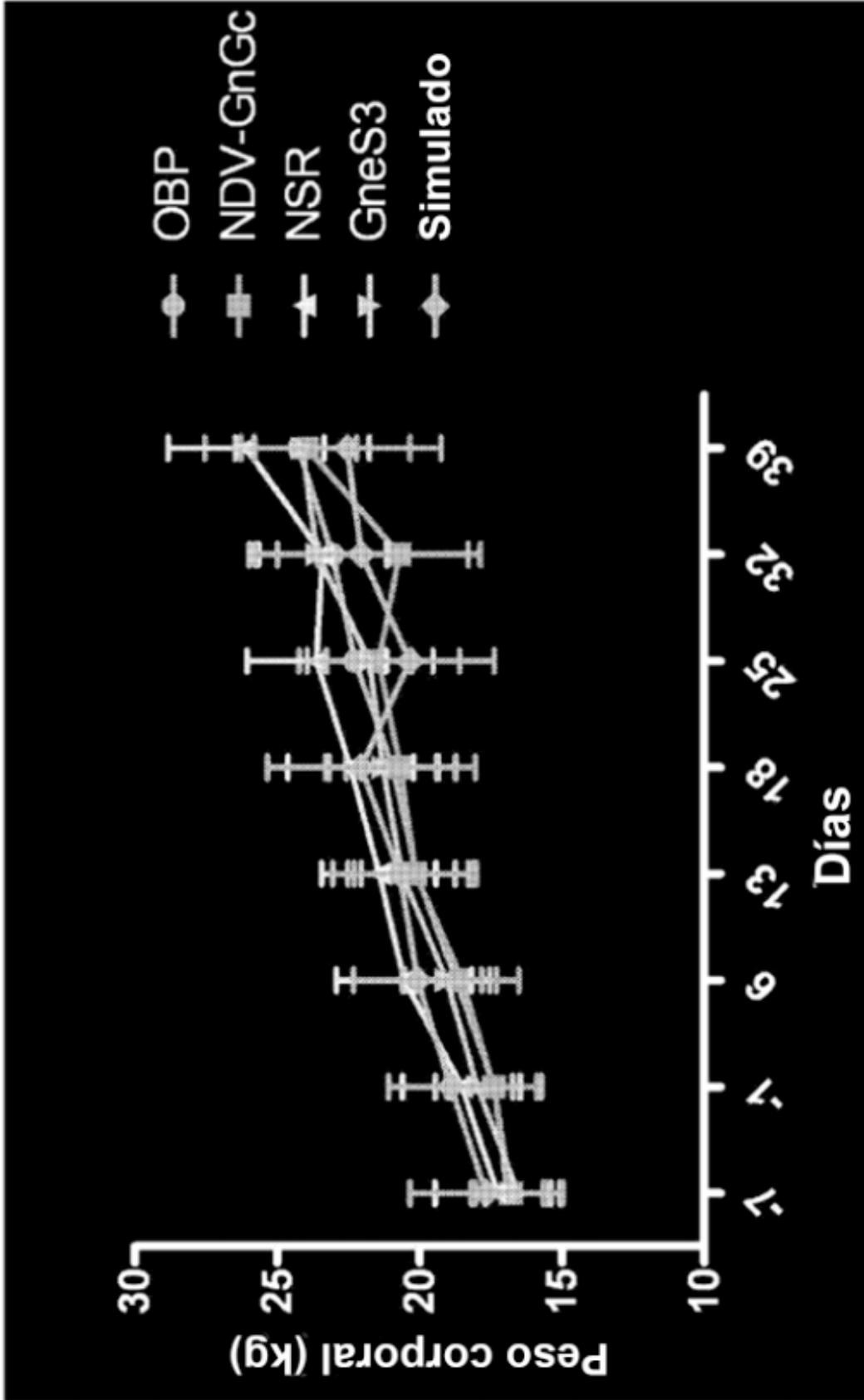


Figura 17

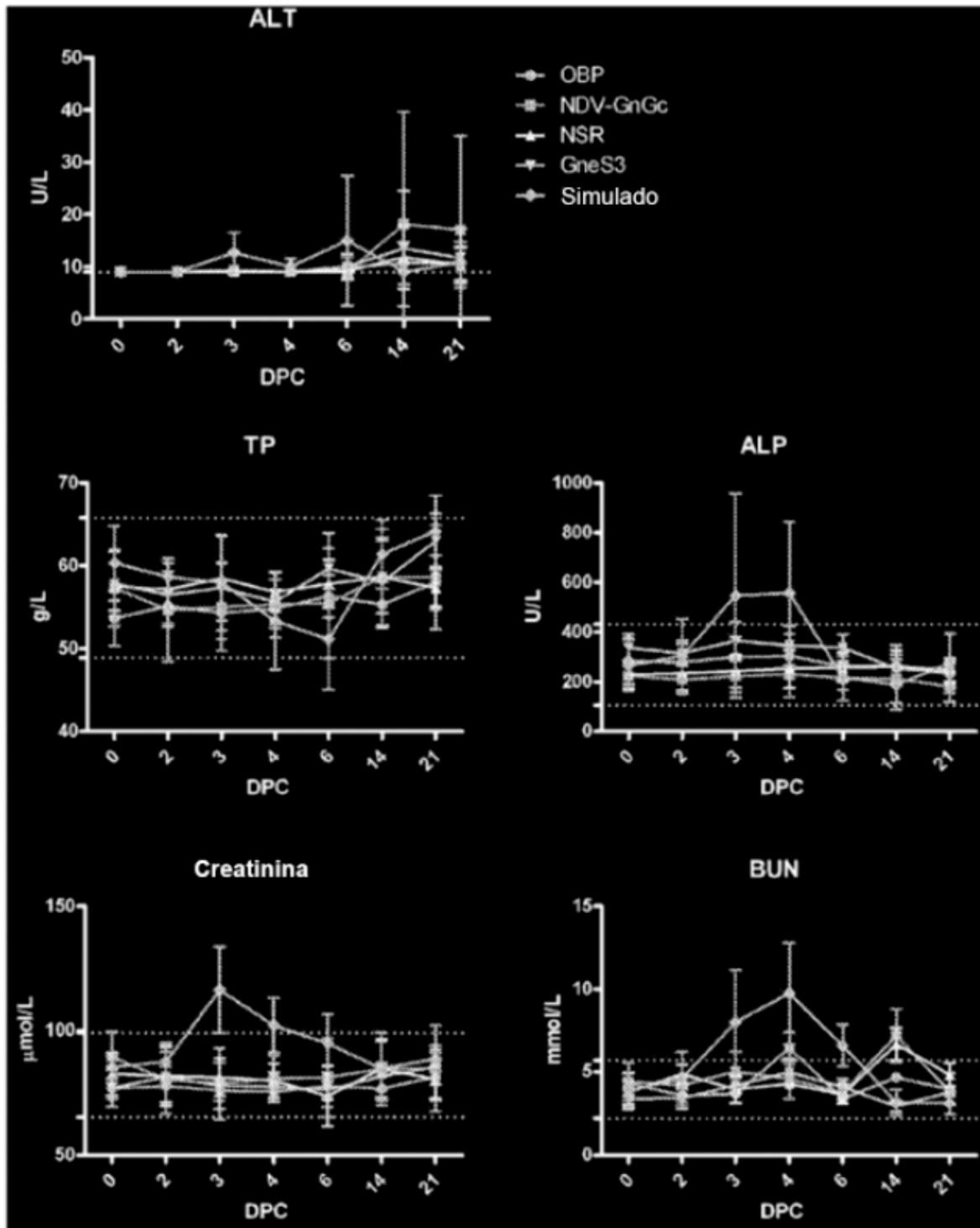


Figura 18

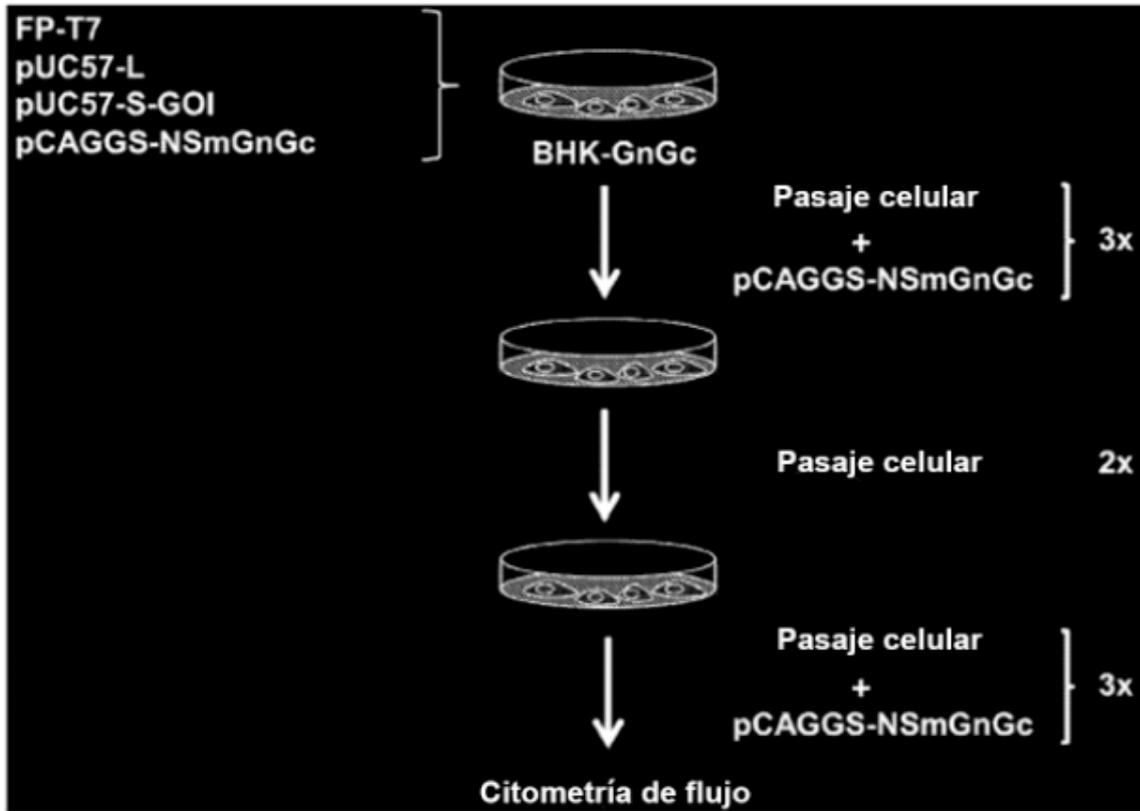


Figura 19

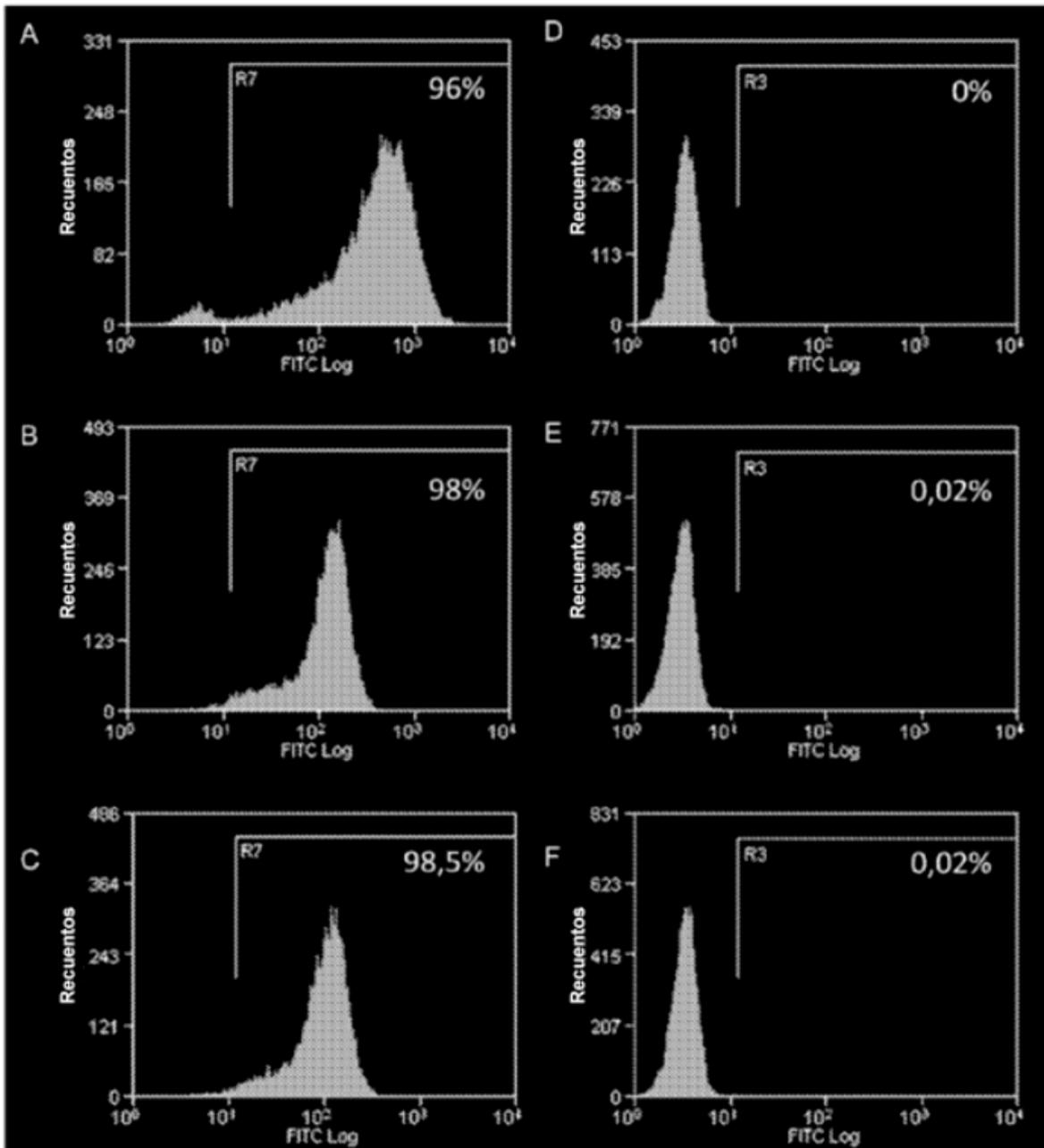


Figura 20

