

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<p>(51) International Patent Classification ⁶ : C12N 1/04, C07K 14/555</p>	<p>A1</p>	<p>(11) International Publication Number: WO 97/08292 (43) International Publication Date: 6 March 1997 (06.03.97)</p>
<p>(21) International Application Number: PCT/US96/13745 (22) International Filing Date: 22 August 1996 (22.08.96) (30) Priority Data: 60/002,621 22 August 1995 (22.08.95) US (71) Applicant: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; 22nd floor, 300 Lakeside Drive, Oakland, CA 94612-3550 (US). (72) Inventor: LAU, Allan, S.; University of California, Dept. of Pediatrics, Room 6E6, SPGH, 1001 Potrero Avenue, San Francisco, CA 94110 (US). (74) Agent: BERLINER, Robert; Robbins, Berliner & Carson, 5th floor, 201 North Figueroa Street, Los Angeles, CA 90012-2628 (US).</p>	<p>(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Published <i>With international search report.</i></p>	
<p>(54) Title: METHODS FOR ENHANCING THE PRODUCTION OF VIRAL VACCINES IN CELL CULTURE BY INTERFERON SUPPRESSION</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Methods for enhancing the production of viral vaccines in animal cell culture are described. These methods rely on the manipulation of the cellular levels of certain interferon induced antiviral activities, in particular, cellular levels of double-stranded RNA (dsRNA) dependent kinase (PKR) and 2'-5' oligoadenylate synthetase (2-5A synthetase). In cell cultures deficient for PKR or 2-5A synthetase, viral yield is enhanced by several orders of magnitude over cell cultures with normal levels of these proteins making these cell cultures useful for the production of viral vaccines.</p>		

METODOS PARA MEJORAR LA PRODUCCION DE VACUNAS VIRALES EN
CULTIVO CELULAR MEDIANTE LA SUPRESION DE INTERFERON

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Esta solicitud es una continuación en parte de la
5 solicitud provisional de los Estados Unidos USSN 60/002,621
presentada el 22 de agosto de 1995.

La presente invención se refiere a métodos para la
producción de virus para la producción de vacunas en cultivos
celulares.

10 El control efectivo de las pandemias de influenza
dependen de la vacunación temprana con el virus inactivado
producido a partir de cepas de influenza identificadas
novedosamente. Sin embargo, para un control pandémico más
efectivo, se necesitan mejoras en la fabricación y la prueba
15 de la vacuna. Los virus de influenza sufren mutaciones muy
frecuentes de los antígenos de la superficie. En
consecuencia, los fabricantes de vacunas no pueden almacenar
millones de pilas de dosis para uso epidémico. Los métodos de
control de influenza corriente demandan la vigilancia y la
20 identificación internacional constante de cualesquiera cepas
recientemente emergentes acopladas con la producción de
vacunas específicas para las cepas recientemente
identificadas. La producción de vacunas para la influenza
actuales, que requieren el uso de huevos embrionados de
25 inoculación e incubación de virus, es molesta y costosa.

También puede limitarse por las fluctuaciones en las estaciones en el suministro de huevos de calidad adecuada. Por lo tanto, para la producción en masa de dosis de vacuna monovalente en un periodo de tiempo corto, sería ventajoso desarrollar tecnología de producción independiente de huevos 5 alternativas. A este respecto, la producción de una vacuna para la influenza sobre una línea de células estable puede resolver muchos de los problemas en la producción en masa. Sin embargo, el rendimiento de los virus de influenza humana 10 sobre cultivos de tejido es desafortunadamente mucho menor que en los huevos embrionados (Tannock et al. Vaccine 1985 3:333-339). Para superar estas limitaciones y mejorar la calidad de las vacunas, sería ventajoso desarrollar líneas de cultivo celular que proporcionan un rendimiento mejorado del 15 virus sobre aquellos comúnmente disponibles.

En el uso de líneas celulares de mamífero para la producción de vacunas virales total, es un problema común para los fabricantes de vacunas en que las células de mamífero tengan propiedades antivirales intrínsecas, 20 específicamente, el sistema de interferon (IFN), que interfiere con la replica viral. IFN puede clasificarse en dos grupos principales con base en su secuencia primaria. Los interferones de Tipo I, IFN- α y IFN- β son codificados mediante una súper familia de genes sin intrón que consisten 25 de la familia de genes IFN- α y un gen IFN- β . El interferon de

Tipo II o IFN- γ , consiste solamente de un tipo individual y se restringe a linfocitos (células T y células exterminadoras naturales). Los interferones del Tipo I median diversos procesos biológicos incluyendo la inducción de actividades antivirales, de regulación de crecimiento y de diferenciación celular y la modulación de funciones inmunes (Sen, G. C. & Lengyel, P. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 5017-5020; Pestka, S, & Langer, J.A. (1987) *Ann Rev. Biochem*, 56, 727-777). La expresión inducida de IFN de Tipo I, que incluye las familias de genes IFN- α y IFN- β , se detecta típicamente siguiendo las infecciones virales. Muchos estudios han identificado elementos de promotor y factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de los IFN del Tipo I (Du, W., Thanos, D. & Maniatis, T. (1993) *Cell* 74, 887-898; Matsuyama, T., Kimura, T., Kitagawa, M. Pfeffer, K., Kawakami, T., Watanabe, N., Kundig, T. M., Amakawa, R., Kishihara, K., Wakeham, A., Potter, J., Furlonger, C. L., Nerendran, A., Suzuki, H., Ohashi, P. S., Paige, C. J., Taniguchi, T. & Mak, T. W. (1993) *Cell* 75, 83-79; Tanaka, N. & Taniguchi, T. (1992) *Adv. Immunol.* 52, 263-81). Sin embargo, aún se desconoce cuales son los indicios bioquímicos particulares que significan infecciones virales para la célula y los mecanismos de señalización involucrados (para una reciente revisión del sistema de interferon véase Jaramillo et al. *Cancer Investigation* 1995 13:327-337).

Los IFN pertenecen a una clase de factores de crecimiento negativo que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de una amplia variedad de células tanto con fenotipos estándares como transformados. La terapia de IFN ha
5 demostrado ser benéfica en el tratamiento de padecimientos humanos tales como el sarcoma de Kaposi, leucemia mielógeno crónica, linfoma que no es de Hodgkin y leucemia de célula pilosa así como el tratamiento de padecimientos infecciosos tales como el virus de papiloma (verrugas genitales) y
10 hepatitis B y C (revisado por Gutterman Proc. Natl. Acad. Sci. 91:1198-1205 1994). Recientemente, el IFN- β producido bacteriamente mediante ingeniería genética, fue aprobado para el tratamiento de esclerosis múltiple, un padecimiento neurológico relativamente común que afecta por lo menos a
15 250,000 pacientes tan solo en los Estados Unidos.

Los IFN deducen sus actividades biológicas al ligarse a sus receptores afines seguido por la transducción de señal que conduce a la inducción de genes estimulados mediante IFN, ISG. Aunque se ha identificado un número de los
20 ISG, sólo se han caracterizado algunos de ellos y se han estudiado sus actividades biológicas. Los ejemplos mejor estudiados de los ISG incluyen una cinasa dependiente del ARN de doble cadena (ARNds) (PKR, antes conocida como cinasa p68), sintetasa (2-5A) oligoadenilato 2'-5'-unido y las
25 proteínas de Mx (Taylor JL, Grossberg SE. *Virus Research* 1990

15:1-26.; Williams BGR. *Eur J. Biochem.* 1991 200:1-11). La proteína A de Mx de humano es una proteína de 76 kD que inhibe la multiplicación del virus de influenza y el virus de estomatitis vesicular (Pavlovic et al (1990) *J. Virol.* 64, 5 3370-3375).

La sinteasa de 2'-5' oligoadenilato (sintetasa 2-5A) utiliza ATP para sintetizar oligómeros cortos de hasta 12 residuos de adenilato ligados mediante los enlaces de 2'-5'-fosfodiéter. Las moléculas de oligoadenilato resultantes
10 activan alostéricamente una ribonucleasa latente, RNasa L, que degrada los ARN viral y celular. La trayectoria de la sintetasa 2-5A parece ser importante para la síntesis reducida de proteínas virales en los sistemas de sintetización de proteína libre de células, aisladas de las
15 células tratadas con IFN y presumiblemente para la resistencia a la infección viral *in vivo* en por lo menos algunas clases de virus.

El PKR (abreviación para cinasa de proteína dependiente de ARN) es la única proteína que se enlaza a
20 ARNs identificada, conocida por poseer una actividad de cinasa. La PKR es una cinasa de serina/treonina cuya activación enzimática requiere ligarse a ARNs y autofosforilación consecuente (Galabru, J. & Hovanessian, A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 15538-15544; Meurs, E., Chong.,
25 Galabru, J. Thomas, N. S., Kerr, I. M., Williams, B. R. G. &

Hovanessian, A. G. (1990) *Cell* 62, 379-390). El PKR también se ha designado en la literatura como cinasa de proteína activada mediante ARNs, cinasa P1/e1F2, DAI o dsI para el inhibidor activado mediante ARNs, y cinasa p68 (humana) o cinasa p65 (murina). Se han descrito enzimas análogas en reticulositos de conejo, tejidos de murino diferentes y células mononucleares de sangre periférica de humano (Farrel et al. (1977) *Cell* 11 187-200; Levin et al (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1121-1125; Hovanessian (1980) *Biochimie* 62, 775-778; Krust et al. (1982) *Virology* 120, 240-246; Buffet-Janvresse et al. (1986) *J. Interferon Res.* 6. 85-96). El mejor sustrato *in vivo* caracterizado de PKR es la subunidad alfa del factor 2 de iniciación eucariótica (eIF-2a) que, una vez fosforilado, conduce por último a la inhibición de la síntesis de proteínas celular y viral (Hershey, J. W. B. (1991) *Ann. Rev. Biochem.* 60, 717-755). La PKR puede ser el factor eIF-2 α *in vitro* de iniciación de fosforilato cuando se activa mediante ARN de doble cadena (Chong et al. (1992) *EMBO J.* 11. 1553-1562). Esta función particular de PKR ha sido sugerida como uno de los mecanismos responsables para la medición de actividades antiviral y antiproliferativa de IFN- α y IFN- β . Una función biológica adicional para PKR es su papel putativo como un transductor de señal. Kumar et al demostraron que PKR puede fosforilar I κ B α , dando por resultado la liberación y activación del

factor κ B nuclear (NF- κ B) (Kumar, A., Haque, J., Lacoste, J., Hiscott, J. & Williams, B. R. G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6288-6292). Dado el sitio NF- κ B bien caracterizado en el promotor de IFN- β , este puede representar un mecanismo a través del cual PKR media la activación de ARNds de la transcripción de IFN- β (Visvanathan. K. V. & Goodbourne, S. (1989) *EMBO J.* 8, 1129-1138).

El subdominio de la cinasa catalítica de PKR (es decir de la cinasa p68 (humana) y la cinasa p65 (murina)) tiene una fuerte identidad de secuencia (38%) con la cinasa GCN2 de levadura (Chong et al. (1992) *EMBO J.* 11, 1553-1562; Feng et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5447-5451). Las cinasa p68 recombinante expresada en *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura, exhibe un fenotipo supresor de crecimiento. Se piensa que esto se atribuye a la activación de la cinasa p68 y la fosforilación subsecuente del equivalente de levadura del eIF2 α de mamífero (Chong et al., Cigan et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 2784-2788).

El inventor de la presente, ha descubierto sorprendentemente que manipulando la expresión de ciertos ISG tiene usos benéficos. Se ha descubierto que la supresión de la expresión de la proteína PKR o la proteína sintetasa 2-5A o ambos, da por resultado un rendimiento viral sustancialmente superior a partir de células infectadas con

virus que es útil para mejorar la producción de vacunas en cultivo celular animal.

Un enfoque común para examinar el papel biológico de la PKR comprende la generación de mutantes deficientes en las actividades de cinasa. Debido a que la PKR posee un sitio regulador para la ligadura de ARNs y un sitio catalítico para la actividad de cinasa, los investigadores han utilizado supresión en bloque o mutagénesis dirigida al sitio para generar mutantes en el sitio regulador o catalítico. Un mutante negativo dominante de PKR, [Arg²⁹⁶]PKR, que contiene una sustitución de arginina de aminoácido individual para la licina no variable en el dominio II catalítico en la posición 296 ha sido descrito (Visvanathan, K. V. & Goodbourne, S. (1989) *EMBO J.* 8, 1129-1138; D'Addario, M. Roulston, A., Wainberg, M.A. & Hiscott, J. (1990) *J. Virol.* 64, 6080-6089). Esta proteína mutante [Arg²⁹⁶]PKR puede suprimir específicamente la actividad de la PKR del tipo silvestre endógena *in vivo*. Se han generado mutantes adicionales alterando los motivos de la ligadura de ARNs. Por ejemplo, Feng et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992 89:5447-5451) abolió la capacidad de ligadura de ARNs de la PKR al suprimir los análisis para obtener mutantes con supresiones entre los residuos 39-50 ó 58-69 del aminoácido. De manera similar, otros investigadores han mutado residuos de aminoácido en la región N-terminal para suprimir la capacidad

de ligadura del ARNs conduciendo a la pérdida de actividades enzimáticas de la PKR (Green SR, Mathews MB. *Genes & Development* 1992 6:2478-2490; McCormack SJ, Ortega LG, Doohan JP, Samuels CE. *Virology* 1994 198:92-99). Un artículo reciente ha identificado además dos residuos de aminoácido que son requeridos absolutamente para enlazar ARNs, es decir la glicina 57 y la lisina 60 (McMillan NAJ, Carpick BW, Hollis B, Toone WM, Zamanian-Daryosh, y Williams BRG. *J. Biol. Chem* 1995 270:2601-2606). Los mutantes en estas posiciones mostraron ser incapaces de enlazar ARNs *in vitro* y no poseyeron actividad antiproliferativa *in vivo* cuando se expresaron en células macrófagas de murino.

La importancia fisiológica de la pérdida de la actividad de la PKR *in vivo* se ha examinado en animales. Los mutantes de PKR catalíticamente inactivos (incluyendo [Arg²⁹⁶]PKR) cuando se transfectan a células NIH 3T3 (fibroblastos de ratón) causan la supresión de la actividad de la PKR endógena en los transfectantes. Cuando se administra a ratones desnudos, estas células transfectadas causan formación de tumor lo que sugiere una actividad supresora de tumor para la PKR (Koromilas, A. E., Roy, S., Barber, G. N., Katze, M. G. & Sonenberg, N. (1992) *Science* 257, 1685-1689; Meurs. E. F., Galabru J., Barber, G. N., Katze, M. G., & Hovanessian, A. G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 232-236), Meurs et al (J. Virol, 1992 66:5805)

produjo transfectantes estables de células NIH 3T3 con un gel de PKT del tipo silvestre (wt) o bien un mutante negativo dominante bajo control de un promotor de CMV y mostró que sólo los transfectantes que reciben el clon de wt fueron
5 parcialmente resistentes a la infección con virus de encefalomiocarditis (EMCV). Lee et al. (Virol. 1993 193:1037) construyó un vector de virus de vaccinia recombinante conteniendo el gen de PKR bajo el control de promotor inducible y demostró que en las células HeLa infectadas con
10 el virus recombinante e inducidas dieron por resultado una inhibición de la proteína de virus de vaccinia y una disminución global en el rendimiento viral. Henry et al (J. Biol. Regulators and Homeostatic Agents 1994 8:15) demostró que los RNAm reovirales que contienen una secuencia de
15 activador de PKR, se expresan deficientemente en comparación con otros RNAm reovirales, pero esa adición de 2-aminopurina, un inhibidor de PKR, o la transfección con un mutante de PKR negativo dominante, aumentó específicamente la expresión de
ARNm que contiene la secuencia de activador. Maran et al.
20 (Science 1994 265:789) mostró que las células HeLa que fueron eliminadas selectivamente para PKR ARNm mediante el tratamiento con oligos antisentido de PKR unidos a oligoA 2'-5' no respondieron a la activación del factor κ B nuclear mediante la ARNds poli(I):poli(C).

Se han utilizados diversas estrategias con el fin de mejorar el rendimiento del virus obtenido a partir del cultivo celular para la producción de vacunas. Se han sometido a prueba, diferentes tipos de células para obtener la mejor línea celular para el crecimiento óptimo de virus específicos. Las líneas celulares de pulmón embrional humano diploide, MRC-5 y WI-38, se han desarrollado específicamente para la producción de vacunas (véase Pearson Devel. Biol. Standard. 1992 76:13-17; MacDonald, C. Critical Reviews Biotech, 1990 10:155-178; Wood et al. Biologicals 1990 18:143-146). Otros intentos para mejorar la producción de vacunas a partir de cultivos celulares incluyen el uso de un factor de remplazo de suero de proteína bajo (Candal et al. Biologicals 1991 19:213-218), y el tratamiento del cultivo celular con enzimas proteolíticas (Patente de los Estados Unidos No. RE 33,164).

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para la producción mejorada de virus en cultivo celular, el método de la presente invención es útil, entre otras cosas, para la producción de vacunas virales para una variedad de virus animales, para la evaluación de compuestos antivirales y para la identificación y cultivo de patógenos virales.

Este objeto se cumple generalmente proporcionando cultivos celulares animales en los cuales la expresión de los

genes de interferon se disminuye sustancialmente desde el nivel estándar de expresión. Esto puede efectuarse manipulando el nivel de expresión de los factores que funcionan *in vivo* para regular el nivel de interferon, 5 incluyendo ciertos reguladores transcriptivos de interferon (por ejemplo IRF1), ciertos receptores de interferon y ciertos productos de gen estimulados mediante interferon (por ejemplo PKR y sintetasa 2-5A).

Este y otros objetos que en lo subsecuente serán 10 evidentes, se cumplen particularmente proporcionando cultivos celulares animales en los cuales el nivel de la actividad de proteína antiviral mediada con interferon, particularmente para la cinasa dependiente de ARN de doble cadena (PKR) y la sintetasa de oligoadenilato de 2'-5' (sintetasa 2-5A), 15 disminuye significativamente desde los niveles estándares.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Actividad de PKR y niveles de proteína en líneas celulares de transfectante estable derivadas de U-937. (A). Se determinó la actividad de la PKR funcional usando un 20 ensayo de celulosa de poli(I):poli(C) para autofosforilación de PKR. Se prepararon extractos celulares a partir de diferentes líneas celulares de transfectante de U937 siguiendo incubación con (+) o (-) IFN- α 2 de humano recombinante (200 U/ml) tal como se indica, mientras que se 25 trataron de manera similar células de L929 con INF- α/β de

ratón. Línea 1, HeLa; líneas 2 y 3, U937-neo; línea 4, U937-AS1; línea 5, U937-AS3; línea 6, U937-M13; línea 7, U937-M22; línea 6, L929. Las posiciones de las proteínas de PKR en humano

5 (68 kDa) y ratón (65 kDa), y se indican las moléculas de tamaño estándar (80 y 50 kDa). (B) Se prepararon extractos celulares de la misma forma después de la inducción con IFN- α o γ y se determinaron los niveles de proteína PKR mediante análisis de mancha Western.

10 Figura 2. Se mejora la cinética de la réplica de EMCV en células deficientes de PKR. Las diferentes líneas celulares de U937 fueron estimuladas con EMCV a 0.1 (A) o 0.001 (B) TCID₅₀/célula. Se cosecharon las muestras a los tiempos indicados y se midieron los rendimientos virales en
15 términos de TCID₅₀.

La presente invención depende del descubrimiento por parte del inventor en cuanto a que el nivel de producción de interferon en las células puede ser regulada manipulando la expresión o actividad de ciertos factores que normalmente
20 regulan la expresión y la actividad *in vivo* de interferon. Estos factores incluyen ciertos reguladores transcriptivos específicos de interferon, particularmente IRF1, ciertos receptores de interferon, así como los productos de gen de ciertos genes estimulados por interferon (también llamadas
25 respuestas antivirales mediadas por interferon),

particularmente PKR y sintetasa 2-5A. La eliminación o supresión de la expresión o actividad de cualquiera de estos factores dará por resultado un nivel inferior al estándar de expresión de genes de interferon. Una consecuencia de este nivel de expresión de interferon menor al estándar es una permisividad incrementada de la célula respecto a la réplica viral. Las células que tienen un permisividad incrementada respecto a la réplica viral son útiles para un número de aplicaciones que incluyen la producción de vacunas, la supresión sensible de bajos niveles de virus y para la evaluación de compuestos antivirales.

El inventor de la presente ha encontrado sorprendentemente que las células animales que tienen deficiencia en las respuestas antivirales mediadas por interferon, particularmente las células deficientes en cinasa dependiente de ARNds, sintetasa de oligoadenilato 2'-5' o ambas, producen un rendimiento viral superior cuando se infectan con un virus animal que las células con niveles estándares de estas proteínas. Los aumentos del rendimiento viral en tanto como 10^3 a 10^4 o más pueden obtenerse usando el método de la presente invención. La capacidad de obtener altos rendimientos de virus en cultivos celulares deficientes en PKR o sintetasa 2-5A hacen posible producir grandes cantidades de virus dentro de un corto periodo de tiempo. Esto es particularmente importante para la producción de

vacunas virales, más particularmente para virus de ARN, incluyendo el virus de influenza. Esta permisividad incrementada de las células deficientes a la réplica viral las hacen útiles en un método para evaluar los fármacos antivirales en los cultivos celulares y en método para detectar los organismos patógenos virales.

Un aspecto de la presente invención proporciona un método para la producción de una vacuna viral en cultivo celular que comprende (a) infectar un cultivo celular con un virus animal de cepa de donador en donde el cultivo celular es deficiente en la actividad del producto de gen de un gen estimulado por interferon, (b) cultivar el cultivo de célula infectado bajo condiciones suficientes para proporcionar un crecimiento de virus eficiente y (c) cosechar el virus producido. El virus cosechado puede ser preparado adicionalmente para uso de vacuna mediante purificación, por ejemplo mediante filtración estéril, ultrafiltración y/o concentración mediante cromatografía de columna u otros métodos. El virus cosechado puede ser tratado opcionalmente para inactivar el virus para la producción de vacunas virales inactivas.

En una modalidad preferida, el cultivo celular es deficiente en actividad de PKR. Deficiente en PKR significa que la actividad de la PKR es menor que 5% del nivel estándar de actividad de PKR. Por nivel estándar de actividad de PKR

quiere decir que la actividad de PKR observada en el cultivo celular parenteral del cual las células deficientes en PKR estables se obtiene o, si la deficiencia de PKR es inducida transitoriamente, el nivel de actividad de PKR observado en las células antes de la inducción respecto a la deficiencia de PKR. Preferiblemente, las células deficientes en PKR tienen menos de 1% del nivel estándar de la actividad de PKR, más preferiblemente las células deficientes en PKR tienen menos de 0.1% del nivel estándar de la actividad de PKR.

10 Actividad de PKR significa la capacidad para mediar las actividades antivirales y antiproliferativas de $\text{INF-}\alpha$ y $\text{INF-}\beta$, la capacidad para fosforilar el factor de $\text{eIF-2}\alpha$ de iniciación, o la capacidad para fosforilar $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ para liberar el factor κB nuclear. PKR significa cinasa p68 de humano o

15 cualquier análogo u homólogo de cinasa p68 de humano. Análogo de cinasa p68 de humano significa cualquier cinasa que depende de ARN de doble cadena que media la activación de ARN-ds de la transcripción de interferon. Típicamente, tales cinasas dependientes del ARN-ds son equivalentes de cinasa

20 p68 presentes en otras especies, tales como por ejemplo conejos o ratones y en tejidos diferentes entre las diferentes especies. Por ejemplo, la cinasa p65 de murino es un análogo de la cinasa p68 de humano. Otro ejemplo de un análogo de cinasa p68 se ha descrito en las células

25 mononucleares de sangre periférica humana (Farrel et al.).

Homólogo significa una proteína homóloga a por lo menos un dominio de la cinasa p68 de humano, tal como, por ejemplo, el dominio de ligadura ARNs o el dominio de cinasa. Un homólogo de cinasa funcional tal es la cinasa GCN2 de levadura.

5 Las células deficientes en PKR pueden obtenerse mediante cualquiera de una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. Los mutantes deficientes en PKR pueden ser establemente deficientes en PKR o pueden ser inducidos transitoriamente para deficiencia de PKR. Las técnicas para
10 producir mutantes deficientes en PKR estables incluyen, pero no se limitan a, mutagenesis aleatoria o dirigida al sitio (por ejemplo Deng WP, y Nickoloff JA Analytical Biochemistry 1992 200:81-88; S, Irani M. Crombrugghe B. J. Mol. Biol. 1982 154:197-209), supresión del gen objetivo ("gene knock-out")
15 (por ejemplo Camper SA, et al. Biology of Reproduction 1995 52:246-257; Aguzzi A, Brander S. Sure U et al. Brain Pathology 1994 4:3-20), transfección con polinucleótidos antisentido de PKR (por ejemplo Lee, et al Virology 1993 192:380-385) y transfección con un gen mutante negativo
20 dominante de PKR.

Un mutante dominante de PKR es un mutante de PKR para el cual sólo necesita expresarse un alelo individual con el fin de suprimir la actividad de PKR estándar. Los genes mutantes dominantes de PKR incluyen una cinasa p68 de humano
25 mutante, una cinasa p65 de murino mutante y mutantes de

cualesquiera otras cinasas dependientes de ARNds o mutante de análogos u homólogos de cinasa p68 de humano que suprimen la actividad de PKR estándar, por ejemplo [Arg²⁹⁶]PKR (Meurs et al. *J. Virol* 1992 66:5805-5814). Ejemplos de otros mutantes dominantes de PKR incluyen mutantes de PKR obtenidos a partir de reticulitos de conejo, tejidos diferentes de ratón y células mononucleares de sangre periférica de humano (Farrel et al., Levin et al., Hovanessian Krust et al., Buffet-Janvresse et al.). Los mutantes dominantes de PKR incluyen mutantes de homólogos funcionales que suprimen la síntesis de proteína al interferir con la fosforilación del factor de iniciación, particularmente la fosforilación de eIF-2 α . Uno de tales mutantes homólogos de cinasa funcionales es un mutante de cinasa GCN2 de levadura.

Las técnicas para producir células que son deficientes en PKR transitoriamente incluyen, pero no se limitan al uso de oligonucléotidos antisentido de PKR ligados a 2',-5' oligoadenilato (Maran, A., Maitra, R. K., Kumar, A., Dong, B., Xiao, W., Li, G., Williams, B. R. G., Torrence, P. F. & Silverman, R. H. (1994) *Science* 265, 789-792) o inhibidores específicos de la proteína PKR, tales como 2-aminopurina (Marcus, P. I. & Sekellick, M. J. (1988) *J. Gen Virol* 69, 1637-45, Zinn, K. Keller, A., Whittemore, L. A. & Maniatis, T. (1988) *Science* 240, 210-3) así como otros inhibidores competitivos que pueden bloquear la fosforilación

de los sustratos de PKR, o los inhibidores que puede bloquear la ligadura de ARN de doble cadena. Los cultivos celulares deficientes en PKR en forma transitoria pueden obtenerse cultivando una línea celular en la presencia de tales
5 oligonucléotidos o inhibidores antisentido.

Preferiblemente, para el uso en el método de la presente invención, los cultivos celulares serán deficientes en PKR establemente. Típicamente, los cultivos deficientes en PKR se producen mediante transfección de una línea celular a
10 fin, preferiblemente una línea celular corrientemente usada en la producción de vacunas, preferiblemente MCR-5, WI-38 o Vero (célula del Mono Verde Africano), con un vector que contiene un constructo de gen antisentido de PKR funcional o un constructo mutante negativo dominante de PKR seguido por
15 la selección de aquellas células que han recibido el vector. Un constructo de gen antisentido de PKR funcional puede prepararse mediante métodos convencionales; por ejemplo clonando un ADNc de PKR tal como aquel descrito en Meurs et al (Cell 1990 62:379-390), en una orientación antisentido,
20 bajo el control de un promotor apropiado, por ejemplo, un promotor de CMV. Un constructo mutante negativo dominante de PKR puede prepararse clonando el ADNc para una mutante negativo dominante de PKR, por ejemplo el ADNc para [Arg²⁹⁶]PKR, bajo el control de un promotor apropiado.

Preferiblemente los constructos de gen mutante de PKR son clonados bajo el control de un promotor inducible para reducir el riesgo de formación de tumor por parte de estas células deficientes en PKR ya que las células van a usarse para la producción de vacunas en los métodos de la invención. Este método asegurará la seguridad de las vacunas producidas mediante estas células. La pérdida de la actividad de PKR se ha asociado con la formación de tumores (Koromilas et al.; Meurs et al). Aunque el virus cosechado puede ser purificado de los componentes de cultivo celulares, permanece sin embargo un riesgo de que algunas células deficientes en PKR sean transportadas a la preparación de la vacuna final. Si la actividad de PKR permanece constitutivamente suprimida, estas células pueden llegar a ser potencialmente tumorigénicas. Esto crearía un riesgo potencial en la salud para aquel que recibe la vacuna. Sin embargo, si se usa un promotor inducible para controlar la expresión del constructo de gen, la actividad de PKR endógena se restaurará después de la remoción del inductor. Los promotores inducibles adecuados incluyen un promotor de lac, un promotor de impacto de calor, un promotor de metalotioneina, un promotor de glucocorticoide o cualquier otro promotor inducible conocido por el experto en la técnica.

Otras formas de construir vectores similares, por ejemplo usando ADN química o enzimáticamente sintetizado, fragmentos del ADNc de PKR o el gen de PKR, serán fácilmente evidentes para aquellos expertos en la técnica. La transfección del cultivo celular parenteral se efectúa mediante métodos estándar, por ejemplo, el método DEAE-dextrano (McCutchen and Pagano, 1968, J. Natl. Cancer Inst. 41:351-357), el procedimiento de calcio-fosfato (Graham et al. 1973, J. Virol. 33:739-748) o mediante cualquier otro método conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a microinyección, lipofección, y electroporación. Tales métodos generalmente se describen en Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd Edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Se seleccionan transfectantes que tiene actividad de PKR deficiente. Para una fácil selección, un gen marcador tal como neomicin fosfotransferasa II, resistente a la ampicilina o resistente a G418, pueden incluirse en el vector que porta el gen antisentido o mutante. Cuando se incluye un gen marcador, el transfectante puede seleccionarse para la expresión del gen marcador (por ejemplo resistencia antibiótica), cultivado y después sometido a prueba para actividad de PKR.

La actividad de PKR residual en las células deficientes en PKR puede determinarse mediante cualquier número de técnicas que son bien conocidas en la técnica. La

actividad de la PKR puede determinarse directamente mediante, por ejemplo, una prueba de autofosforilación tal como aquella descrita en Maran et al (Science 265:789-792 1994) o Silverman et al. (Silverman, R.H. y Krause, D. (1986) en 5 *Interferons: A practical approach*. Morris, A. G. y Clemens, M. J. eds. 71-74 IRL Press, Oxford-Washington, DC.). Típicamente, se efectúa una prueba de autofosforilación para la actividad de PKR de la manera siguiente. Los extractos de las células que van a examinarse para la actividad de PKR que 10 contienen aproximadamente 100 μg de proteínas se incuban con 20 μl de lechos de celulosa de poli(I):poli(C) durante 60 minutos sobre hielo. La cinasa se inmoviliza y se activa sobre los lechos. Después de los lavados de las fracciones de cinasa ligada a celulosa de polinucleótido, se efectúa una 15 reacción de autofosforilación a 30°C durante 30 minutos en una solución de prueba. La solución de prueba contiene 1 μCi de [γ ^{32}P]ATP, acetato de magnesio a 1.5 mM, 10 μM de ATP, pH 7.5, 0.5% de NP40, y 100 μM de leupetina. Las muestras se calientan a 90°C durante 3 minutos en solución reguladora de 20 pH de muestra de gel que contiene dodecilsulfato de sodio (SDS) y se analizan las proteínas mediante electroforesis de gel de poliacrilamida-SDS al 10%. Los geles se secan y se preparan autorradiografías usando película de rayos X XAR-5 (KodaK).

También puede determinarse indirectamente la actividad de la PKR residual sometiendo a prueba para la presencia de la proteína PKR, por ejemplo mediante mancha Western con anticuerpos específicos de PKR, o para la presencia de ARN de PKR, por ejemplo mediante mancha Northern con oligonucleótido o sondas de ADNc específicas para PKR. Como resultará muy evidente, el tipo de prueba apropiada para la determinación de la actividad de la PKR residual en la mayoría de los casos dependerá del método usado para obtener el fenotipo deficiente en PKR. Si, por ejemplo, el método usado par producir la célula deficiente en PKR da por resultado la supresión o supresión de la expresión del gen de PKR (por ejemplo, gene knock-out), las técnicas de análisis que detectan la presencia de ARNm o ADNc (por ejemplo manchas Northern o Southern) o la presencia de la proteína (por ejemplo mancha Western) o que detectan la actividad de proteína pueden ser útiles para determinar la actividad de PKR residual en las células deficientes en PKR. Por otra parte, si el método usado para producir las células deficientes en PKR da por resultado la inhibición de la proteína en lugar de la supresión de la expresión del gen (por ejemplo, transfección con un vector que porta un mutante de PKR negativo dominante), una prueba de autofosforilación es más apropiada que una mancha Western para la determinación de la actividad de PKR residual.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para la producción de una vacuna viral en un cultivo celular que es deficiente en actividad de sintetasa de 2'-5' oligoadenilato. Un cultivo celular deficiente en sintetasa 2-5A puede aislarse en una forma similar para cultivos celulares deficientes en PKR, por ejemplo mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio, supresión del gen objetivo de los genes de la sintetasa 2-5A o transfección con constructos de sintetasa 2-5A de antisentido. Deficiente en sintetasa 2-5A significa que la actividad de sintetasa 2-5A es menor que 5% del nivel estándar de la actividad de la sintetasa 2-5A. Nivel estándar de actividad de sintetasa 2-5A significa que la actividad de sintetasa 2-5A observada en el cultivo celular parenteral del cual se obtienen las células deficientes en sintetasa 2-5A estable o, si la deficiencia de sintetasa 2-5A se induce transitoriamente, el nivel de actividad de sintetasa 2-5A observados en las células antes de la inducción para la deficiencia de sintetasa 2-5A. Preferiblemente, las células deficientes en sintetasa 2-5A tienen menos de 1% del estándar de la actividad de la sintetasa 2-5A, más preferiblemente, las células deficientes en sintetasa 2-5A tienen menos de 0.1% del nivel estándar de la actividad de sintetasa 2-5A. La actividad de sintetasa 2-5A residual en las células deficientes en sintetasa 2-5A puede determinarse mediante

métodos similares a aquellos usados para determinar la actividad de la PKR residual, es decir, mancha Western usando anticuerpos específicos de sintetasa 2-5A, mancha Northern, usando oligonucleótido o sondas de ADNc específicas para la sintetasa 2-5A o pruebas de actividad de enzima (véase Read et al. J. Infect. Dis. 1985 152:466-472; Hanssel and Ts'o J. Virol Methods 1994 50:323-334). Típicamente, la actividad de sintetasa 2-5A se determina de la siguiente manera. Las células que van a ser sometidas a prueba son tratada con IFN- α_2 (100 U/ml en RPMI más suero de bobino fetal al 10%). Brevemente, los cultivos celulares se incuban durante 18 horas a 37°C, se lavan y las pellas celulares se tratan con solución reguladora de pH de lisis de célula durante 10 minutos a 4°C. Se incuban alícuotas del extracto celular con lechos de poli(I):poli(C)-agarosa durante 30 minutos a 30°C, para permitir la ligadura así como la activación de la enzima de sintetasa 2-5A. Los lechos se lavan y después se incuban en una solución de prueba que contiene ATP a 3 mM, 4 μ Ci 3 H-ATP por muestra de prueba, y 20 mM de solución reguladora de Hepes pH 7.5 durante 20 horas a 30°C. Después de la incubación, las muestras se calientan a 90°C para inactivar la enzima, seguido por el tratamiento con alcalinfosfatasa bacterial (BAP). El 2-5 oligoA sintetizado es resistente a BAP. La cantidad de 2-5 oligo A se determina manchando una muestra sobre papel de filtro, lavando y

contando la radioactividad de ^3H usando un contador de cintilación. La cantidad del producto de oligo A producida se correlaciona con la actividad de la enzima mediante métodos convencionales. Alternativamente, la sintetasa 2-5A puede ser
5 sometida a prueba mediante un método de radioinmunidad y radioligadura (Knight M, et al. Radioimmune, radiobinding and HPLC analysis of 2-5A y related oligonucleotides from intact cells Nature 1980 288:189-192).

Será evidente que los cultivos celulares
10 deficientes tanto en actividad de PKR como en actividad de sintetasa 2-5A pueden hacerse mediante una combinación de los métodos antes descritos. Los cultivos celulares doblemente deficientes pueden prepararse ya sea secuencialmente, (es decir seleccionado primero cultivos deficientes en una
15 actividad y después usando aquel cultivo celular como el material de partida para preparar el segundo cultivo deficiente) o simultáneamente (selección de ambas deficiencias al mismo tiempo).

En otra modalidad, la presente invención
20 proporciona un método para la producción de una vacuna viral en un cultivo celular que es deficiente en actividad de proteína MxA humana. Un cultivo celular deficiente en actividad de proteína MxA humano puede aislarse en una forma similar a los cultivos celulares deficientes en PKR, por
25 ejemplo, mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio,

supresión de gen objetivo de los genes de MxA o transfección con constructos de MxA antisentido. Deficiente en proteína MxA significa que la actividad de MxA es menor que 5% del nivel estándar de la actividad de MxA. Nivel estándar de actividad de MxA significa que la actividad de MxA observada en el cultivo celular parenteral del cual se obtienen las células deficientes en MxA estables o, si la deficiencia de MxA es inducida transitoriamente, el nivel de actividad de MxA observado en las células antes de la inducción para la deficiencia en MxA. Preferiblemente, las células deficientes en MxA tienen menos de 1% del nivel estándar de la actividad de MxA, preferiblemente las células deficientes en MxA tienen menos de 0.1% del nivel estándar de actividad de MxA. La actividad de MxA residual en las células deficientes en MxA puede determinarse mediante métodos similares a aquellos usados para determinar la actividad de PKR residual, es decir, mancha Western, usando anticuerpos específicos de MxA, mancha Northern usando oligonucléotido o sondas de ADNc específicas para MxA o pruebas de actividad de enzima (Garber et al. (1991) 66, *Virology* 180, 754-762; Zürcher et al. (1992) *Journal of Virology* 66, 5059-5066). Típicamente, la actividad de MxA se determina tal como se describe en Zürcher et al.

Aún en otra modalidad, la presente invención proporciona un método para la producción de una vacuna viral en un cultivo celular que es deficiente en respuesta a

interferon. Respuesta a interferon significa la capacidad de una célula para responder a estimulación por interferon. Un cultivo celular deficiente en respuesta a interferon puede obtenerse cultivando las células en presencia de un inhibidor de un receptor de interferon. Alternativamente, las células pueden ser sometidas a ingeniería para expresar, en la ausencia de un receptor de interferon estándar, un receptor de interferon mutante que responde al interferon.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para la producción de una vacuna viral en un cultivo celular que es deficiente en reguladores transcriptivos específicos de interferon. Uno de tales reguladores de transcripción específicos de interferon es IRF1. Las células establemente deficientes en reguladores transcriptivos específicos a interferon pueden obtenerse mediante cualquier número de las técnicas bien conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio, supresión de gen dirigida o transfección con vectores de antisentido. Las células transitoriamente deficientes pueden obtenerse cultivando células en la presencia de oligonucléotidos de antisentido o inhibidores específicos de la transcripción de interferon.

El método de la presente invención puede llevarse a la práctica con una variedad de cultivos celulares animales, incluyendo cultivos celulares primarios, cultivos celulares

diploides y cultivos celulares continuos. Son particularmente útiles los cultivos celulares que se usan actualmente para la producción de vacunas, más particularmente aquellos cultivos celulares que han sido aprobados para la producción de vacunas por la USFDA y/o WHO, por ejemplo MRC-5, una línea de célula diploide humana de tejido de pulmón fetal (Nature Lond. 1970 227:168-170) y WI-38, una línea de célula diploide humana derivada de tejido pulmonar embriónico (Am J. Hyg. 1962 75:240; First International Conference on Vaccines Against Viral and Rickettsial Diseases of Man, Pan American Health Organization, Pub. No.147:581 May 1981). También son útiles las células de hígado de Chang (Chang RS Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1954 87:440), las células promonocíticas de humano U937 (Sundström et al, Int. J. Cancer 1976 17:565-577), células Vero, células MRC-9, células 1MR-90, células 1MR-91 y células Lederle 130 (Biologicals 18:143-146 1991). Las células de U937 son particularmente útiles para los virus que infectan células inmunes expresando CD4, por ejemplo, VIH. Para una revisión general de los cultivos celulares usados en la producción de vacunas, véase Grachev, V. P. en Viral Vaccines Mizrahi, A. ed. páginas 37-67 1990 Wiley-Liss. El cultivo celular particular elegido dependerá del virus que va a producirse; en general, el cultivo celular se derivará de la especie que es el huésped natural para el virus, aunque esto no es esencial para la práctica de la presente invención

(por ejemplo, el virus humano puede hacerse crecer sobre una línea celular de riñón canino (células MDCK) o una línea celular de riñón de mono verde (células Vero; Swanson et al J. Biol Stand. 1988 16:311)). Típicamente, las células
5 elegidas serán deficientes en PKR o derivados deficientes en sintetasa 2-5A de células o líneas celulares conocidas por ser huéspedes apropiados para el virus que va a producirse. Por ejemplo, para las vacunas del virus de influenza y del virus de hepatitis A, las células huésped preferidas son
10 derivados de MRC-5. Para la producción de la vacuna de VIH, las células huésped preferidas son derivados de U937, H9, CEM o CD4-expresando células HUT78. Las líneas celulares usadas para la producción de las vacunas son bien conocidas y fácilmente disponibles a partir de proveedores comerciales,
15 por ejemplo American Type Culture Collection.

La infección de las células deficientes en respuesta antiviral mediada con interferon con virus donador de acuerdo con la presente invención se efectúa mediante técnicas convencionales (véase por ejemplo Peetermans, J.
20 Vaccine 1992 10 supp 1:S99-101; Shevitz et al. en Viral Vaccines Mizrahi, a ed. pp 1-35 1990 Wiley-Liss). Típicamente, el virus se agrega al cultivo celular a entre 0.001 a 0.5 TCID₅₀ por célula, preferiblemente a 0.01 a 0.10 TCID₅₀ por célula, pero variará según sea adecuado para el
25 virus particular y el huésped celular que está siendo usando.

Como será evidente para el experto en la técnica, cada célula de cultivo celular no necesita infectarse inicialmente para la producción viral eficiente. Las células infectadas se cultivan bajo condiciones adecuadas para las células
5 particulares y la producción viral a diversos tiempos después de que la infección se supervisa. La producción viral puede ser supervisada mediante cualquier número de técnicas estándares incluyendo pruebas de unidad formadora de placa, pruebas de TCID₅₀ o pruebas de inhibición de hemaglutinación
10 (Robertson et al. J. Gen Virol. 1991 72:2671-2677). Las células infectadas se cultivan bajo condiciones suficientes para proporcionar un crecimiento viral eficiente. Las células pueden cultivarse hasta que se logra una producción viral máxima como se indica mediante una forma de meseta del
15 rendimiento viral. El virus se cosecha mediante técnicas estándares y se purifica sustancialmente de otros componentes celulares (véase por ejemplo Peetermans 1992). El virus cosechado puede usarse como una vacuna viral activa, ya sea completamente virulenta o atenuada o puede inactivarse antes
20 de uso mediante métodos que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante tratamiento con formaldehído (Peetermans, J. Vaccine 1992 10 Suppl 1:S99-101; Patente de los Estados Unidos No. RE 33,164).

La vacuna puede estar disponible en forma seca,
25 estar mezclada con un diluyente o puede estar en forma

líquida, preferiblemente en solución acuosa, ya sea concentrada o lista para uso. La vacuna se administra sola o en combinación con portadores, adyuvantes, conservadores, diluyentes u otros aditivos farmacéuticamente aceptables, 5 útiles para mejorar la inmunogenicidad o ayuda de administración o almacenamiento como se sabe bien en la técnica. Los adyuvantes adecuados incluyen hidróxido de aluminio, alumbre, fosfato de aluminio, Freund's o aquellos descritos en la Patente de los Estados Unidos Nos. 3,790,665 10 y 3,919,411. Otros aditivos adecuados incluyen sacarosa, dextrosa, lactosa y otras sustancias no tóxicas. Las vacunas se administran a animales a través de diversas rutas, incluyendo intramuscular, intravenosa, subcutánea, intratraqueal, intranasal o mediante aspersion en aerosol y 15 las vacunas se contemplan para el uso benéfico en una variedad de animales incluyendo humanos, equinos, aves, felinos, caninos y bovinos.

El método de la presente invención puede ponerse en práctica con una variedad de virus de animal donador. Virus 20 donador significa la cepa viral particular que se replica *in vivo* para producir la vacuna. El virus de animal donador particular usado dependerá de la vacuna viral deseada. Los virus donadores actualmente usados para la producción de vacunas son bien conocidos en la técnica y el método de la 25 presente invención puede adaptarse fácilmente a cualquier

virus donador recientemente identificado. Los virus donadores preferidos incluyen virus de influenza humana, especialmente influenza A (H3N2) e influenza A (H1N1) (véase USPN 4,552,758; ATCC Nos. VR-2072, VR-2073, VR-897); influenza 5 descrita en USPN 3,953,592; influenza B (USPN 3,962,423; ATCC Nos. VR-786, VR-791); y para influenza I (virus Sendai) (Cantell et al. Meth Enzymol. 78A:299-301 180; ATCC No. VR-907). El virus donador puede ser idéntico al organismo patógeno viral o puede ser una forma atenuada tal como se 10 presenta en la naturaleza, una forma producida mediante el paso en serie a través del cultivo celular o una forma recombinante o reaclificadora. Cualquier cepa viral puede usarse como virus donador siempre que retenga la antigenicidad de requisito para dar protección contra el 15 organismo patógeno viral. El método de la presente invención es particularmente útil con virus donadores atenuados o de replica deficiente.

Algunas de las vacunas que pueden proporcionarse mediante los métodos de la presente invención incluyen, pero 20 no se limitan a, vacunas humanas para poliovirus, sarampión, paperas, rubéola, hepatitis A, influenza, parainfluenza, encefalitis Japonesa, citomegalovirus, VIH, virus del fiebre del Dengue, virus de la rabia y de Varicela zoster, así como mucha otras vacunas animales no humanas incluyendo, por 25 ejemplo, vacunas para el virus de leucemia en felino, virus

de rinotraqueitis bobina (virus de la nariz roja), virus vacuno, virus de hepatitis canica, virus de moquillo canino, rinovirus equino, virus de influenza equina, virus de neumonía equina, virus de anemia infecciosa de equino, virus
5 de encefalitis de equino, virus de encefalitis de ovino, virus de la lengua azul de ovino, virus de rabia, virus de influenza en cerdos y virus de inmunodeficiencia en simios. Como será evidente a partir de lo anterior el método de la presente invención no se limita a la producción de vacunas
10 para virus en humanos sino que también es igualmente adecuada para la producción de vacunas virales en animales no humanos.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para evaluar la actividad de compuestos antivirales. Debido a la permisibilidad incrementada de las
15 células deficiente en PKR respecto a la replica viral, las células son útiles en una prueba de detección para determinar la efectividad de los compuestos antivirales. En este aspecto, la presente invención comprende las etapas de (a) tratar un virus, células huésped infectadas con virus o
20 células huésped antes de la infección con el virus con el compuesto antiviral y (b) realizar pruebas para la presencia del virus infeccioso que permanece mediante la exposición bajo condiciones de infección de un cultivo celular indicador deficiente en PKR o deficiente en sintetasa-2-5A.

En este aspecto, el virus contra el cual el compuesto antiviral va a ser probado puede tratarse directamente con el compuesto. En este caso, el virus tratado pueden analizarse después directamente para la presencia del virus infeccioso que permanezca mediante la exposición bajo condiciones no infecciosas de un cultivo celular indicador deficiente en PKR o deficiente en sintetasa 2-5A respecto a una alícuota del virus tratado, cultivando durante un tiempo suficiente para permitir la replica de cualquier virus infeccioso que permanece y analizar el cultivo indicador para la presencia del virus duplicado. Alternativamente, el virus contra el cual va a probarse el compuesto antiviral puede usarse para infectar un cultivo de célula huésped, el cultivo de célula huésped infectado es tratado después con el compuesto antiviral. Un extracto de célula del cultivo celular huésped infectado tratado se prepara mediante técnicas convencionales y se analiza una alícuota del extracto para la presencia del virus infeccioso que permanece mediante la exposición a un cultivo celular indicador deficiente en PKR o deficiente en sintetasa 2-5A tal como se describió en la anterior. En otra alternativa, el cultivo celular huésped puede ser tratado con el compuesto antiviral antes de la infección con el virus en lugar de después de la infección. Las células tratadas se infectan después con el virus contra el cual el compuesto antiviral va a ser probado,

se cultivan y se analizan para la presencia del virus replicado. El régimen de tratamiento particular elegido dependerá del modo de acción conocido o postulado del compuesto antiviral y se encontrará fácilmente dentro de la
5 determinación de un experto en la técnica. Mediante la exposición bajo condiciones no infecciosas se pretende reunir el cultivo celular indicador deficiente y una alícuota de la muestra tratada (ya sea extracto celular infectado o de virus) bajo condiciones que darían por resultado la infección
10 del cultivo celular deficiente si cualquier virus estaría presente en la muestra tratada. Después de la exposición a la muestra tratada, el cultivo celular indicador deficiente se cultiva adicionalmente y se somete a pruebas para la replica del virus mediante métodos normales (por ejemplo, pruebas de
15 placa o pruebas de TCID₅₀ o análisis de Northern or Wester para ARN o proteína viral).

El cultivo celular huésped puede ser cualquier cultivo celular que sea susceptible a infección mediante el virus contra el cual se va a probar el compuesto antiviral.
20 El cultivo celular indicador es un cultivo celular deficiente en PKR o en sintetasa 2-5A que se usa para realizar pruebas para el virus infeccioso que permanece después del tratamiento con el compuesto antiviral. El cultivo celular deficiente en PKR o en sintetasa 2-5A indicador se prepara
25 como se describió en lo anterior para la producción de

vacunas. Las células adecuadas como un origen para generar el indicador deficiente son las mismas a aquellas que son útiles para generar los cultivos celulares deficientes en PKR o deficientes en sintetasa 2-5A para la producción de vacunas.

5 Además, también son adecuadas las siguientes líneas celulares: línea celular de hepatoma en general, particularmente carcinoma hepatocelular en humano Hep G2 (Nature 1979 282:615-616; USPN 4,393,133) y Hep 3B (USPN 4,393,133). Será evidente que el cultivo celular indicador

10 también es susceptible a infección por medio del virus contra el cual va a ser tratado el compuesto antiviral. El cultivo celular huésped y el cultivo celular indicador pueden ser los mismo o diferentes. El compuesto antiviral puede ser cualquier preparación química o biológica de la que se espera

15 que tenga cierta actividad antiviral. Si el virus mismo es tratado con el compuesto antiviral, el compuesto puede ser retirado antes de la infección del cultivo celular indicador mediante la exposición del virus tratado. Si se trata un cultivo huésped infectado (o un cultivo huésped pre-

20 infectado) por el compuesto antiviral, el compuesto puede ser retirado antes de la preparación del extracto de célula.

En un aspecto relativo separado, la presente invención proporciona un método para la identificación y cultivo de organismos patógenos virales. La permisibilidad de

25 las células deficientes de PKR respecto a la replicación viral

las hacen particularmente útiles en un método para detectar niveles muy bajos y/o virus que son difíciles de cultivar, por ejemplo, VIH en monocitos o linfocitos de neonatos. En este aspecto la presente invención comprende las etapas de

5 (1) exponer bajo condiciones no infecciosas un cultivo celular deficiente en PKR o deficiente de sintetasa 2-5A para una muestra de la que se espera contenga un virus y (2) realizar pruebas para la presencia del virus replicado en las células expuestas. La práctica de este aspecto de la presente

10 invención es similar aquella del aspecto anterior excepto que el tratamiento con el compuesto antiviral se omite. En este aspecto, la muestra que va a ser sometida a prueba para la presencia de virus generalmente es una muestra clínica de un paciente del que se sospecha tiene una infección viral. La

15 muestra puede ser cualquier muestra clínica apropiada incluyendo sangre, saliva, orina, así como muestras de biopsia de tejido de tumor de linfa, pulmón, intestino, hígado, riñón y cerebro. La muestra puede ser tratada apropiadamente para liberar partículas virales (por ejemplo,

20 pueden prepararse extractos de células) o la muestra puede usarse tal como se recibió del paciente. La muestra o una alícuota de la muestra se expone bajo condiciones no infecciosas a un cultivo celular indicador y la presencia de cualquier virus replicador se determina como se describió en

25 lo anterior.

En los siguientes ejemplos se exponen ejemplos específicos de las etapas antes descritas. Sin embargo, será evidente para el experto en la técnica que son posibles muchas modificaciones y que los ejemplos se proporcionan para propósitos de ilustración únicamente y no se limitan a la invención a menos que así se especifique.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de plásmidos

Los insertos de ADNc correspondiente al gen de PKR humano del tipo silvestre y el gen mutante del PKR [Arg²⁹⁶] negativo dominante, de los plásmidos pBS-8.6R y yex6M (Meurs E, Chong K, Galabru J. et al. Cell 1990 62: 379-90; Chong et al. EMBO J. 11:1553-1563 1992), respectivamente, se liberaron mediante digestión de HindIII y subclonaron a pRC-CMV (Invitrogen), un plásmido de expresión eucariótica consecutiva que contiene un marcador de resistencia G418. La orientación de los insertos en los clones seleccionados se determinó mediante análisis de digestión de restricción y se confirmaron mediante secuencia (Sequenase 2.0, USB). Este proceso dio por resultado el aislamiento de los plásmidos de expresión usados, pPKR-AS* (conteniendo el ADNc de PKR en una orientación de antisentido bajo el control de promotor de CMV en el vector) y p[Arg²⁹⁶]PKR (conteniendo el ADNc de Arg²⁹⁶PKR bajo el control del promotor de CMD en el vector).

Ejemplo 2: Aislamiento de los Transfectantes estables deficientes en PKR.

Se obtuvieron transfectantes estables mediante electroporación de 5×10^6 haciendo crecer exponencialmente 5 células U937 con 10mg de cada plásmido, en RPMI-1640 libre de suero conteniendo DEAE-dextran (50 mg/ml), con un aparato de Gene Pulser (BioRad) fijado $500\mu\text{F}$, 250V. Se obtuvieron poblaciones en lote de transfectantes estables mediante la selección con $400\mu\text{g/ml}$ de geneticina (GIBCO-BRL) durante 3 10 semanas. Se obtuvieron subsecuentemente líneas clonales limitando la clonación de dilución. Se cultivaron líneas celulares en RPMI-1640 conteniendo suero de becerro fetal al 10% (media completa) y geneticina.

Se seleccionaron cinco líneas celulares 15 representativas para la caracterización inicial: "U937-neo" (también llamado U9K-C) fue la línea celular de control transfectada con el vector parenteral, pRC-CMV; "U937-AS1" (también llamado U9K-A1) y "U937-AS3" (también llamado U9K-A3) fueron clones independientes transfectados con pPKR-AS; 20 "U937-M13" (también llamados U9K-M13) y "U937-M22" (también llamados U9K-M22) fueron clones independientes transfectados con p[Arg²⁹⁶]PKR.

Ejemplo 3: Caracterización de los transfectantes deficientes en PKR.

Se midió la actividad de tñasa de PKR en una prueba de autofosforilación que utiliza poli(I): poli(C)-celular para ligadura y activación de la encima de PKR. Se efectuó la prueba de autofosforilación PKR esencialmente tal como se describe en Maran et al. con las siguientes modificaciones. Se incubaron los extractos celulares (100µg de proteína por prueba) con poli(I):poli(C)-celulosa durante 1 hora sobre hielo, se lavaron tres veces y se incubaron durante 30 minutos a 30°C en 50µl de una solución reguladora de reacción de (pH(20mM HEPES 7.5), 50 mM KCl, 5 mM 2-mercaptoetanol, 1.5 mM acetato de magnesio, 1.5 mM MnCl₂) conteniendo 1µCi de [γ -³²P]ATP. Se separaron las proteínas sobre un gel de poliacrilamida-SDS al 10% y se analizaron mediante autorradiografía.

Se usaron extractos celulares de células de L929 de ratón y HeLa tratados con IFN como controles positivos, ya que la actividad de la PKR en estas células había sido previamente caracterizada (Meurs et al.) (Fig. 1A, líneas 1 y 8). Las neo-células U937 contuvieron niveles basales bajos de actividad de PKR que aumentaron después del tratamiento con IFN- α (Fig. 1A, líneas 2 y 3). La actividad de la PKR en las células U937, no transfectadas parentales fue similar a las neo-células U937. Sin embargo, no se detectó la actividad de la PKR en ninguna de las cuatro líneas celulares transfectadas con plásmidos de pPKR-AS o p[Arg²⁹⁶]PKR. Además

el tratamiento de estas células con IFN- α no restauró la actividad de la PKR (Fig. 1A, líneas 4-7), ni el tratamiento con IFN- γ .

Ejemplo 4: Análisis de Western de los transfectantes deficientes en PKR.

Para confirmar adicionalmente la inhibición de la expresión de la PKR en las líneas celulares transfectadas con pPKR-AS, se efectuó análisis de Western blot usando un anticuerpo monoclonal específico para PKR humana. Se separaron extractos celulares (100 μ g) sobre un gel de poliacrilamida-SDS al 10% y se electrotransferieron sobre membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anticuerpo monoclonal anti PKR (Meusr et al. Cell 1990) a 1:100 en BLOTTO (leche descremada al 5%, Tween-20 al 0.5% en salina de solución reguladora de pH Tris). Se facilitó la detección final de la PKR sondeando con un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de nabo secundario (Santa Cruz Biotech) y usando un método quimioluminiscente (Amerham ECL).

El nivel basal de la proteína PKR fue detectable en neo células U937 (Fig. 1B, línea 1), e incremento después del tratamiento con IFN- α o IFN- γ (Fig. 1B, líneas 2 y 3). En contraste, la expresión de PKR fue significativamente disminuida tanto en las células U937-AS1 y U937-AS3 (Fig. 1B líneas 4 y 6) y no aumento después del tratamiento con IFN- α

(Fig. 1B, líneas 5 y 7). Aunque la proteína PKR fue detectable en la células U937-M13 y U937-M22, la proteína de PKR [Agr²⁹⁶] mutante no fue distinguible de la PKR del tipo silvestre usando análisis de Western blot.

5 Ejemplo 5: Replica de EMCV mejora en células deficientes en PKR.

Debido a que el sistema de IFN juega un papel importante en las respuestas antivirales, se investigo si la perdida de la función de la PKR afectaría el régimen de
10 réplica del virus de encefalomeocarditis (EMCV). Se prepararon lotes de EMCV (ATCC N° VR-1314) mediante el paso en células L929. Para la determinación de la réplica de EMCV, se cultivaron transfectantes derivados de U937 en medios completos con o sin IFN_γ (IFN-α2 de humano recombinante,
15 Schering; IFN-γ de humano recombinante, Amgen) durante 18 horas. Después de dos lavados con PBS, se incubaron las células con EMCV en medios libres de sueros durante 2 horas. Las células se lavaron nuevamente dos veces y se llenaron con medio que contiene FCS 1%. Se cogieron las muestras en los
20 puntos de tiempos requeridos y se lisiaron mediante tres vueltas de congelamiento. Se añadieron diluciones en serie de cuatro vueltas de las muestras sobre monocapas de L929 y se incubaron durante 48 horas, seguido por la mancha con violeta de cristal al 0.05% para determinar los efectos citopáticos y
25 la dosis infectiva de cultivo de tejido media (TCID₃₀).

En el control las líneas neo-celular U937 después de la estimulación con EMCV a 0.1 TCID₅₀/célula, títulos virales pico a aproximadamente 10⁴ TCID₅₀/ml después de 48 horas y no aumentaron adicionalmente después de 72 horas (Fig. 2A). Sin embargo, en las células U937-AS1 y U937-M22, la replica de, EMCV fue sustancialmente superior alcanzando títulos de 10⁴ a 10⁵ TCID₅₀/ml después de solo 24 horas y 10⁸ TCID₅₀/ml a las 48 horas, representando un incremento de 10³ a 10⁴ en el rendimiento viral sobre aquel obtenido en las células de control. En experimentos separados usando un inóculo de virus inferior de 0.001 TCID₅₀/célula, se observaron diferencias más gramáticas en la susceptibilidad de EMCV entre las células de control y las células deficientes en PKR (Fig. 2B). Bajo estas condiciones la replica de EMCV en las neo-células U937 fue mínima, no excediendo 10² TCID₅₀/ml incluso después de 72 horas, mientras que se alcanzaron títulos virales altos de 10⁸ TCID₅₀/ml después de 48 horas tanto en células U937-AS1 y U937-M22. Los resultados indicaron que mediante la supresión de la actividad de la PKR *in vivo*, las células se hacen más permisibles a la replicación viral, mostrando cuando mucho un incremento de mil veces sobre las células de control.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan en la presente por referencia al mismo grado como si cada

publicación individual o solicitud de patente fuera indicada específica e individualmente para ser incorporada por referencia.

Habiendo siendo descrita ahora la invención será
5 evidente para el experto en la técnica que pueden hacerse mucho cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del espíritu o alcance de la invención descrita.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de una vacuna viral para un virus animal que comprende:

(a) infectar un cultivo celular con un virus donador, en donde el cultivo celular es deficiente en la actividad del producto de gen de por lo menos un gen estimulado con interferón;

(b) cultivar tal cultivo celular infectado bajo condiciones suficientes para proporcionar crecimiento de virus eficiente; y

(c) cosechar el virus producido.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el cultivo celular es deficiente en la actividad PKR o deficiente en la actividad sintetasa 2-5A o es deficiente en ambas actividades.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque las células deficientes en PKR se obtienen mediante transfección de una línea celular afín con un polinucleotido de antisentido de PKR.

4. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque las células deficientes en PKR se obtienen mediante transfección de una línea celular afín con un gen mutante negativo dominante de PKR.

5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el mutante negativo dominante es [Arg²⁹⁶]PKR.

6. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el mutante negativo dominante es cinasa p65 de murino.

7. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el mutante negativo dominante es un mutante de PKR obtenido a partir de reticulocitos de conejo.

8. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el mutante negativo dominante es un mutante de PKR obtenido a partir de células mononucleares de sangre periférica humana.

9. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el mutante negativo dominante es un mutante de cinasa GCN2 de levadura.

10. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque tal cultivo celular deficiente se obtiene mediante cultivo de una línea celular en la presencia de oligonucleotidos de antisentido de PKR.

11. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado por que el tal cultivo celular deficiente se obtiene mediante cultivo de una línea celular en la presencia de un inhibidor de la proteína PKR.

12. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado por que tal inhibidor es 2-animopurina.

13. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque tal cultivo celular deficiente se
5 obtiene cultivando una línea celular en la presencia de un inhibidor de un receptor de inhibidor que es esencial para la respuesta de interferon de tal línea celular.

14. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el cultivo celular deficiente es
10 deficiente tanto en PKR como en sintetasa 2-5A.

15. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el cultivo celular deficiente es un cultivo celular humano.

16. El método de conformidad con la reivindicación
15 2, caracterizado porque el cultivo celular deficiente se deriva de una línea celular seleccionada a partir del grupo MRC-5, WI-38, Chang liver, U937, Vero, MRC-9, IMR-90, IMR-91, Lederle 130, MDCK, H9, CME, y CD4 expresando HUT78.

17. El método de conformidad con la reivindicación
20 16, caracterizado porque el cultivo celular deficiente se deriva a partir de células MRC-5 o WI-38 o Vero.

18. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el cultivo celular deficiente se deriva a partir de células U937.

19. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el virus donador es un virus atenuado.

20. El método de conformidad con la reivindicación 5 2, caracterizado porque el virus donador es un virus recombinante.

21. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el virus donador es un virus humano.

22. El método de conformidad con la reivindicación 10 2, caracterizado porque el virus donador es un virus de influenza humano.

23. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el virus donador es un virus no humano.

15 24. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el cultivo celular es deficiente en la actividad de proteína Mx y tal virus donador es virus de influenza o virus de estomatitis vesicular.

20 25. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las células deficientes tienen un receptor de interferon mutante y no responden a interferon.

26. Un método para la producción de una vacuna viral para un virus animal comprendiendo:

(a) infectar un cultivo celular con un virus donador en donde el cultivo celular es deficiente en reguladores transcriptivos específicos de interferon.

(b) cultivar tal cultivo celular infectado bajo 5 condiciones suficientes para proporcionar el crecimiento del virus eficiente; y

(c) cosechar el virus producido.

27. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el regulador transcriptivo es IRF1.

10 28. El método para la producción de una vacuna viral para un virus animal comprendiendo:

(a) infectar un cultivo celular con un virus donador en donde el cultivo celular es deficiente en la expresión o actividad de un factor que regula la expresión de 15 interferon;

(b) cultivar tal cultivo celular infectado bajo condiciones suficientes para proporcionar crecimiento del virus eficiente; y

(c) cosechar el virus producido.

20 29. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque tal factor es PKR.

30. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque tal factor es IRFI.

31. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque tal factor es 2'-5'sintetasa de oligoadenilato.

32. Un método para la producción de una vacuna viral para un virus animal comprendiendo:

(a) infectar un cultivo celular con un virus donador en donde en cultivo celular es deficiente en respuestas antivirales mediadas con interferon;

(b) cultivar tal cultivo celular infectado bajo condiciones suficientes para proporcionar el crecimiento del virus; y

(c) cosechar el virus producido.

33. Un método para determinar la actividad viral de un compuesto contra un virus animal tal método comprendiendo:

(a) infectar un cultivo celular con tal virus animal en donde el cultivo celular es deficiente en la actividad PKR o deficiente en actividad de sintetasa 2-5A;

(b) tratar tal cultivo celular infectado con tal compuesto;

(c) cultivar tal cultivo celular infectado bajo condiciones suficientes para proporcionar crecimiento del virus eficiente; y

(d) determinar el rendimiento del virus producido.

34. Un método para determinar la actividad viral de un compuesto contra un virus animal tal método comprendiendo:

(a) infectar un cultivo de célula huésped susceptible con tal virus animal;

(b) tratar tal cultivo infectado con tal compuesto;

(c) preparar un extracto celular de tal cultivo
5 celular tratado;

(d) exponer bajo condiciones no infecciosas un cultivo celular indicador al extracto celular en donde tal cultivo celular indicador es deficiente en actividad de PKR o deficiente en actividad de sintetasa 2-5A;

10 (e) cultivar tal cultivo celular expuesto bajo condiciones suficientes para proporcionar crecimiento del virus máximo; y

(f) determinar el rendimiento del virus producido.

35. Un método para determinar la actividad viral de
15 un compuesto contra un virus animal tal método comprendiendo:

(a) tratar tal virus animal con tal compuesto;

(b) exponer bajo condiciones infecciosas el cultivo celular indicador con tal virus animal tratado, en donde el cultivo celular indicador es deficiente en la actividad de
20 PKR o deficiente en la actividad de sintetasa 2-5A;

(c) cultivar el cultivo celular expuesto bajo condiciones suficientes para proporcionar máximo crecimiento del virus; y

(d) determinar el rendimiento del virus producido.

36. Un método para detectar la presencia del virus en una muestra comprendiendo:

(a) exponer bajo condiciones infecciosas un cultivo celular indicador a tal muestra de la que se sospecha tiene un virus, en donde el cultivo celular es deficiente en la actividad de PKR o deficiente en sintetasa 2-5A;

(b) cultivar tal cultivo celular expuesto bajo condiciones suficientes para proporcionar un máximo crecimiento del virus; y

(c) analizar tal cultivo celular para la presencia de tal virus.

RESUMEN

Se describen métodos para mejorar la producción de vacunas virales en cultivos celulares animales. Estos métodos dependen de la manipulación de los niveles celulares de ciertas actividades antivirales inducidas por interferón, en particular, los niveles celulares de cinasa que dependen de ARN de doble cadena (dsARN) (PKR) y sintetasa de 2'-5' oligoadenilato (sintetasa 2-5A). En los cultivos celulares deficientes para PKR o sintetasa 2-5A, el rendimiento viral se mejora en varios ordenes de magnitud sobre los cultivos celulares con niveles normales de estas proteínas haciendo a estos cultivos celulares útiles para la producción de vacunas virales.

15

FIG. 1A

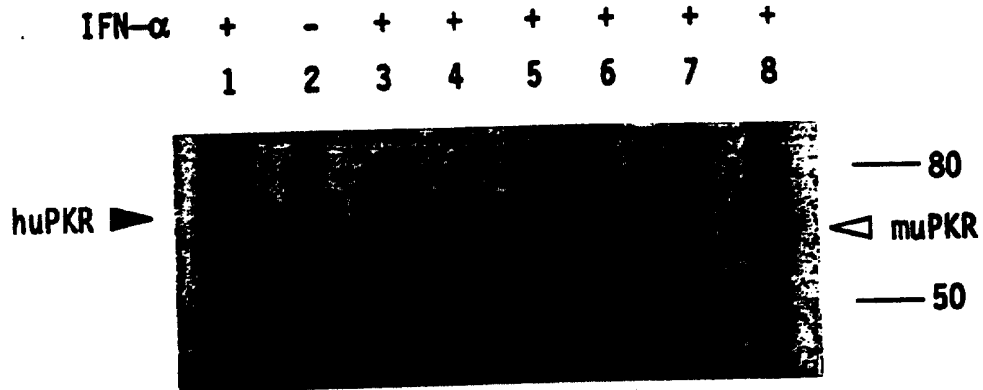


FIG. 1B

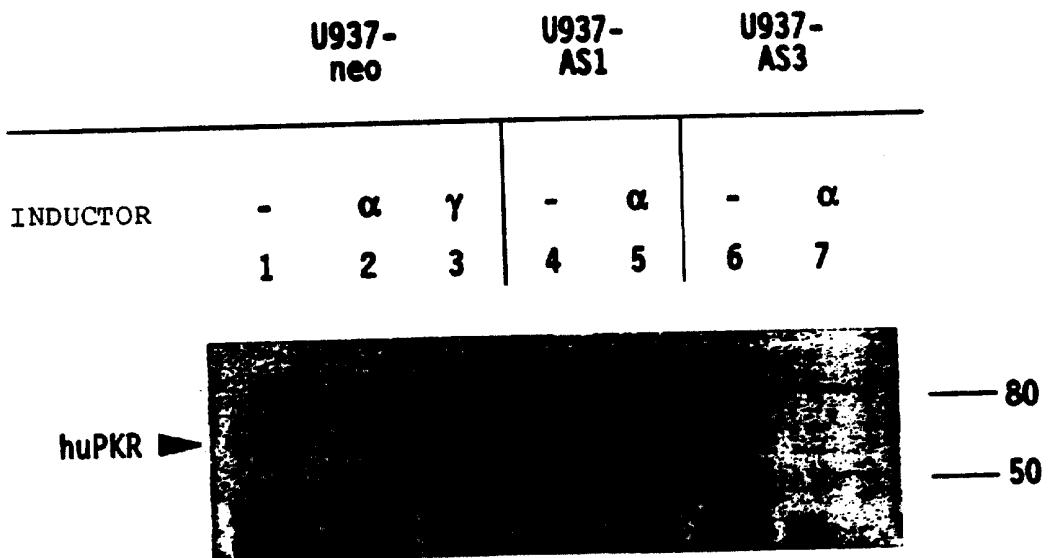


FIG. 2A

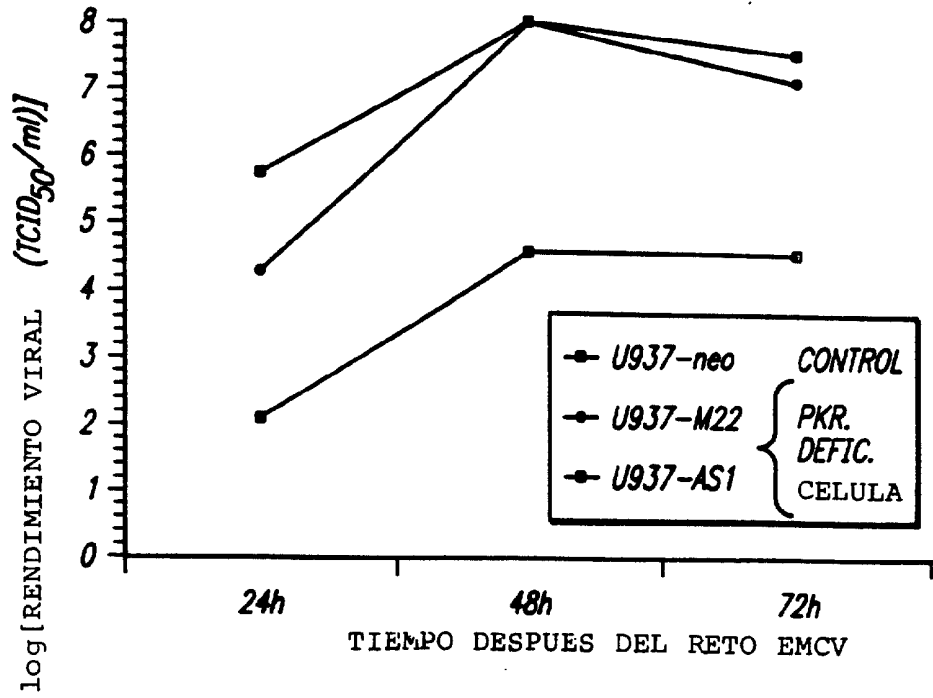


FIG. 2B

