



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 849**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/45** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07758585 .9**

96 Fecha de presentación : **15.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1996708**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

54 Título: **Vectores de virus mononegavirales recombinantes.**

30 Prioridad: **15.03.2006 US 783194 P**  
**15.03.2006 EP 06075628**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2011**

73 Titular/es: **INTERVET INTERNATIONAL B.V.**  
**Wim de Körverstraat 35**  
**5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es: **Römer-Oberdörfer, Angela;**  
**Veits, Jutta y**  
**Mebatsion, Teshome**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 358 849 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).

## DESCRIPCION

Vectores de virus mononegavirales recombinantes

Esta invención se refiere a un vector de virus Mononegavirales recombinante que alberga una unidad de transcripción adicional que comprende un gen extraño unido operativamente con una secuencia de inicio de gen (GS) de virus Mononegavirales cadena arriba y una secuencia de fin de gen (GE) de virus Mononegavirales cadena abajo así como a una vacuna que comprende tal vector de virus Mononegavirales recombinante.

Los virus vivos que son capaces de replicarse en un hospedador infectado inducen una respuesta inmune fuerte y de larga duración contra sus antígenos expresados. Son eficaces provocando respuestas inmunes mediadas tanto de forma humoral como por células, así como estimulando rutas de citocinas y quimiocinas. Por lo tanto, los virus vivos atenuados ofrecen distintas ventajas con respecto a composiciones de vacuna basadas en inmunógenos inactivados o de subunidades que típicamente estimulan en gran medida solamente la rama humoral del sistema inmune.

A lo largo de la última década, la tecnología del ADN recombinante ha revolucionado el campo de la ingeniería genética de los genomas de virus tanto ADN como ARN. En particular, ahora es posible introducir genes extraños en el genoma de un virus de tal forma que después de la replicación del nuevo virus de vector en un animal hospedador se expresa una proteína extraña que puede ejercer efectos biológicos en el animal hospedador. Como tales, los virus de vector recombinantes se han aprovechado no solamente para el control y prevención de infecciones microbianas, sino también para concebir terapias diana para enfermedades no microbianas, tales como tumores malignos y en terapia génica.

La generación de virus ARN no segmentados de polaridad negativa (virus del orden Mononegavirales) completamente a partir de ADNc clonado mediante una técnica denominada "genética inversa", descrita por primera vez en 1994 (Schnell et al., EMBO J., 13, 4195-4203, 1994) ha hecho posible usar también virus del orden Mononegavirales (MV) como vectores. Desde entonces se han publicado estudios que describen el uso de muchos virus del orden MV como vectores virales para expresar antígenos extraños obtenidos de un patógeno con el objetivo de desarrollar vacunas contra ese patógeno. El orden de Mononegavirales se clasifica en cuatro familias principales: Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae y Bornviridae. Los virus que pertenecen a estas familias tienen genomas que están representados por una única molécula de ARN de sentido negativo (-), es decir, la polaridad del genoma del ARN es opuesta a la polaridad de ARN mensajero (ARNm) que se denomina sentido más (+). La clasificación de los principales virus MV humanos y veterinarios se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 1: clasificación de los virus dentro del orden de Mononegavirales

Familia	Género	Especie
Rhabdoviridae	Lyssavirus	Virus de la rabia (RV)
	Vesiculovirus	Virus de la estomatitis vesicular (VSV)
	Novirhabdovirus	Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV)
Paramyxoviridae	Respirovirus	Virus Sendai (SeV)
		Virus de la parainfluenza humana de tipo 1 y tipo 3 (hPIV 1/3)
		Virus de la parainfluenza bovina de tipo 3 (bPIV3)
	Morbillivirus	Virus del sarampión (MV)
		Virus de la peste bovina
		Virus del moquillo canino (CDV)
	Rubulavirus	Virus de Simio 5 (SV-5)
		Virus de la parainfluenza humana de tipo 2 (hPIV 2)
		Virus de las paperas
	Avulavirus	Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV)
	Pneumovirus	Virus sincitial respiratorio humano (hRSV)
		Virus sincitial respiratorio bovino (bRSV)

Familia	Género	Especie
Filoviridae	virus	Virus del Ébola
	de tipo Ébola	Virus Marburg

La organización genómica y detalles del ciclo vital de virus del orden MV actualmente se comprende bien y se ha revisado por diversos autores (Neumann et al., J. Gen. Virology 83, 2635-2662, 2002; Whelan et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 203, 63-119, 2004; Conzelmann, K.; Curr. Top. Microbiol. Immunol. 203, 1-41, 2003). Aunque los virus Mononegavirales tienen diferentes hospedadores y distintas propiedades morfológicas y biológicas, tienen muchas características en común, tales como la organización genómica y los elementos esenciales para su modo típico de replicación y expresión génica, ilustrando que se han originado de un ancestro común. Son virus envueltos que se replican en el citoplasma de la célula y producen ARNm que no se cortan y empalman.

Un virus Mononegavirales consiste en dos unidades funcionales principales, un complejo de ribonucleoproteína (RNP) y una envuelta. Las secuencias de genoma completo de virus representativos de los géneros de todas las familias que se han mencionado anteriormente se han determinado. Los genomas varían en tamaño de aproximadamente 9.000 nucleótidos a aproximadamente 19.000 y contienen de 5 a 10 genes. La estructura y la organización de los genomas de los virus MV son muy similares y están gobernadas por su modo particular de expresión génica. Todos los genomas de virus MV comprenden tres genes centrales que codifican: una nucleoproteína (N o NP), una fosfoproteína (P) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (L). La envuelta viral está compuesta de una proteína de matriz (M) y una o más glucoproteínas transmembrana (por ejemplo, proteínas G, HN y F) que desempeñan un papel en el ensamblaje/gemación del virus así como en la unión celular y/o entrada del virus. Dependiendo del género, el repertorio de proteína se extiende mediante proteínas accesorias que presentan ciertas funciones reguladoras específicas en la transcripción y en la replicación del virus o que están implicadas en reacciones del hospedador del virus (por ejemplo, proteínas C, V y NS). El orden de los genes de virus MV está altamente conservado con los genes centrales N y P en o cerca del extremo 3' y con el gen grande (L) en la posición distal 5'. El M, los genes de glucoproteína de superficie así como los demás genes accesorios están localizados entre los genes N, P y L.

En el complejo de RNP, el ARN genómico o antígenómico está estrechamente encapsidado con la proteína N y está asociado con la ARN polimerasa dependiente de ARN que consiste en la proteína L y P. Después de la infección de una célula, el complejo de RNP, pero el genoma de ARN desnudo, sirve como un molde para dos funciones de síntesis de ARN distintas, es decir, transcripción de ARNm subgenómicos y replicación de ARN genómico de longitud completa.

Todos los genes dispuestos en tándem están separados mediante denominadas estructuras de "unión de genes". Una unión de genes comprende una secuencia de "fin de gen" (GE) conservada, una "región intergénica" (IGR) no transcrita y una secuencia de "inicio de gen" (GS) conservada. Estas secuencias son tanto suficientes como necesarias para la transcripción génica. Durante la transcripción cada gen se transcribe secuencialmente en ARNm mediante la ARN polimerasa dependiente de ARN viral que comienza el proceso de transcripción en el extremo 3' del ARN genómico en la primera secuencia de GS. En cada unión de gen la transcripción se interrumpe como resultado del desacoplamiento de la ARN polimerasa en la secuencia de GE. El reinicio de la transcripción tiene lugar en la siguiente secuencia de GS, aunque con una eficacia reducida. Como resultado de este proceso interrumpido, también denominado un proceso de "detención-inicio", la atenuación de la transcripción tiene lugar en cada unión génica como resultado de lo cual los genes proximales 3' en un genoma de virus MV se transcriben de forma más abundante que los sucesivos genes cadena abajo. La forma modular de la transcripción de genes de virus MV en la que cada gen es parte de un cistrón separado o unidad de transcripción hace que estos virus sean extremadamente adecuados para la inserción y expresión de genes extraños. Cada unidad de transcripción en un genoma de virus MV comprende los siguientes elementos: 3'-GS-fase de lectura abierta (ORF)-GE-5'.

En los extremos genómicos 3' y 5' todos los genomas de virus MV tienen una región corta no transcrita denominada "líder" (aproximadamente 40-50 nt) y "remolque" (aproximadamente 20-600 nt), respectivamente. Las secuencias líder y remolque son secuencias esenciales que controlan la replicación del ARN genómico, encapsidación y empaquetamiento viral.

La tecnología de genética inversa y el rescate del virus MV infeccioso ha hecho posible manipular su genoma de ARN mediante su copia de ADNc. El mínimo complejo de inicio de la replicación requerido para sintetizar ARN vírico es el complejo de RNP. El virus de MV infeccioso se puede rescatar mediante co-expresión intracelular de ARN (anti)genómicos y las proteínas de soporte apropiadas de plásmidos dirigidos por ARN polimerasa (T7). Desde la descripción inicial en 1994 por Schnell et al., 1994 (anteriormente) se ha conseguido la recuperación fiable de muchas especies de virus MV basándose en el protocolo original (o ligeras variables del mismo).

La enfermedad de Newcastle y la influenza aviar son importantes enfermedades de aves de corral, que pueden provocar graves pérdidas económicas en la industria de aves de corral a nivel mundial. El virus de la

5 enfermedad de Newcastle es un virus ARN no segmentado de polaridad negativa dentro del orden de MV. El genoma, que tiene aproximadamente 15 kb de longitud, contiene seis genes que codifican la nucleoproteína (NP), fosfoproteína y proteína V (P/V), proteína de matriz (M), proteína de fusión (F), proteína de hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y ARN polimerasa dependiente de ARN o proteína grande (L). Los genes del NDV se disponen secuencialmente en el orden 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' y están separados mediante regiones intergénicas de diferente longitud. Todos los genes están precedidos por una secuencia de inicio de gen (GS) que va seguida de una región no codificante, la fase de lectura abierta que codifica las proteínas del NDV, una segunda región no codificante y la secuencia de fin de gen (GE). La longitud del genoma del NDV es un múltiplo de seis, que se tiene que considerar para la introducción de genes extraños.

10 La influenza aviar (AI) es una enfermedad de aves de corral caracterizada por leves signos respiratorios a una enfermedad grave con una alta mortalidad. El agente causal es el virus de la influenza aviar A (AIV) que pertenece a la familia Orthomyxoviridae. El AIV contiene ocho segmentos de ARN genómico de polaridad negativa que codifican 10 proteínas. Basándose en la antigenicidad de las glucoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (N), se subtiparon los virus AI. Hasta ahora se conocen 16 subtipos de hemaglutinina (H 1 - H 16) y nueve de neuroaminidasa (N 1 - N 9). Los anticuerpos para H y N son importantes en la respuesta inmune humoral e inhiben la infección o previenen la enfermedad.

15 Los virus de la influenza aviar y enfermedad de Newcastle se pueden agrupar en dos patotipos distintos de acuerdo con su virulencia. Los síntomas causados por AIV de baja patogenicia (LPAI) o NDV lentogénico se consideran de menor relevancia. Por el contrario, la influenza aviar altamente patógena (HPAI) y la enfermedad de Newcastle causada por virus altamente virulentos (NDV: cepas mesogénicas y velogénicas) son enfermedades de declaración obligatoria.

20 Mientras que se realiza la vacunación rutinaria contra NDV con cepas de NDV lentogénicas para proteger pollos contra cepas de NDV altamente virulentas, no se realiza la vacunación con HPAI en la mayoría de los países, ya que la HPAI se controla mediante una estrategia de erradicación. Sin embargo; la vacunación se puede usar como una estrategia para minimizar pérdidas y para reducir la incidencia de la enfermedad. La inmunidad inducida por vacunas es específica de subtipo, lo que significa que una vacuna de subtipo H puede proteger contra AIV H5 pero no contra los demás subtipos de H. Normalmente, la replicación del virus de la influenza está restringida a los pulmones debido a que la hemaglutinina de los virus de LPAI se puede escindir solamente mediante la tripsina Clara, una serina proteasa restringida a los pulmones. Hasta ahora todos los virus de HPAI han sido del subtipo H5 y H7. Estos virus de HPAI contienen múltiples aminoácidos básicos en el sitio de escisión de H de tal forma que se puede escindir mediante enzimas ubicuas de furina y de tipo subtilisina en las subunidades HA1 y HA2. Por lo tanto, tales virus pueden desarrollarse en otros órganos.

25 Las vacunas del subtipo H5 y H7 pueden proporcionar protección de pollos y pavos contra signos clínicos y muerte después de la infección por HPAI. Además del AIV completo basado en aceite inactivado convencional se ha demostrado experimentalmente que las vacunas de virus de vector, proteínas de subunidades y de ADN son eficaces para la inmunización contra AI. Desde la aparición de la genética inversa para diferentes virus, la generación de virus recombinantes para el uso como vectores de vacuna es una aplicación importante. Se han construido diferentes virus ARN de cadena negativa recombinantes que expresan proteínas extrañas. Además, la hemaglutinina de AIV se insertó en diferentes virus de vector tales como el virus de la laringotraqueítis infecciosa (IL TV) (Luschow et al., Vaccine 19, 4249-59, 2001), virus de la peste bovina (Walsh et al., J. Virol. 74, 10165-75, 2000) y virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Robert et al., J. Virol. 247, 4704-11, 1998).

30 El virus de la peste bovina también se usó como un virus de vector para la expresión de la proteína de cápside del virus de la glosopeda VP1 (Baron et al., 1999, J. of Gen. Virol, vol. 80, págs. 2031-2039).

35 Tao et al., (1998, J. of Virol., vol. 72, págs. 2955-2961) describen la construcción de un virus de parainfluenza humana quimérico (hPIV) de tipo 3, en el que los genes HN y F de hPIV de tipo 1 se usaron para una sustitución de (no una adición de) los genes HN y F de hPIV de tipo 3 endógenos.

40 Además, el NDV se usó para la expresión de hemaglutinina de AIV. El gen de hemaglutinina de influenza A/WSN/33 se insertó entre los genes P y M de la cepa de NDV Hitchner B1. Este recombinante protegió ratones contra una infección mortal aunque había una pérdida de peso detectable en ratones que se recuperaron completamente en 10 días Nakaya et al. (J. Virol. 75, 11868-73, 2001). Un NDV recombinante adicional con el mismo sitio de inserción para el gen extraño expresó el H7 de una LPAI pero solamente el 40% de los pollos vacunados estaban protegidos tanto contra NDV velogénico como contra HPAI (Swayne et al., Avian Dis. 47, 1047-50, 2003).

45 Sin embargo, esas publicaciones no describen ningún efecto ventajoso de las denominadas regiones no codificantes de genes de MV endógenos sobre la expresión de genes extraños adicionales insertados en el genoma de un vector de MV.

55 Es un objeto de esta invención proporcionar un vector de virus MV recombinante que presente un mayor nivel de expresión de una proteína codificada por un gen extraño insertado en el genoma del virus de vector y/o que muestre una inmunogenicidad más fuerte que los vectores de virus MV existentes.

Los presentes inventores han encontrado que este objeto se puede cumplir mediante un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la invención. Por lo tanto, la presente invención proporciona un vector de virus Mononegavirales recombinante que alberga una unidad de transcripción adicional que comprende un gen extraño unido operativamente con una secuencia de inicio de gen (GS) de virus Mononegavirales cadena arriba y una secuencia de fin de gen (GS) de virus Mononegavirales cadena abajo, caracterizado por que entre la secuencia de GS y un codón de inicio del gen extraño y entre un codón de detención del gen extraño y la secuencia de GE están localizadas una región no codificante 3' y una región no codificante 5' (sentido de genoma) de un gen de virus Mononegavirales, respectivamente, donde el gen extraño está flanqueado por las regiones no codificantes 3' y 5'.

Se señala que las indicaciones de la polaridad de las cadenas de ácido nucleico en este punto y en el resto del texto se indican en el sentido del genoma (-), excepto en el contexto de secuencias de ARNm y ADNc.

Se ha observado que la presencia de las regiones no codificantes 3' y 5' de un gen de virus MV en una unidad de transcripción que comprende un gen extraño insertado en el genoma de un virus MV tiene un efecto positivo sobre la transcripción y/o expresión del gen extraño. Se muestra en la Figura 3 que la modificación de las regiones no codificantes de un gen de virus MV entre una secuencia de GS y un gen de hemaglutinina (HA) de virus de influenza aviar (AIV) y entre el gen de HA de AIV y una secuencia de GE aumenta la cantidad de ARNm de HA sintetizada por un vector de virus MV que alberga ese gen de HA de AIV. También se observa un efecto positivo sobre el nivel de expresión de proteína: la comparación de los vectores de virus MV mostró solamente una intensa tinción inmunológica con un antisuero específico de HA de AIV en el caso de que el vector de virus MV que alberga el gen de HA de AIV extraño estaba flanqueado por las regiones no codificantes (Figura 4). Por lo tanto, se ha observado que aunque los inventores no quieren quedar ligados a ninguna teoría o modelo que pueda explicar estas observaciones, la presencia de regiones no codificantes de virus MV que flanquean un gen extraño tiene un efecto positivo sobre el rendimiento del vector de virus MV resultante.

Un gen extraño es una molécula polinucleotídica que codifica un polipéptido o proteína y que no está presente en la naturaleza en el genoma del virus MV receptor.

Como ya se ha indicado con detalle anteriormente, una característica común de la organización genómica de virus MV es su forma modular de transcripción en la que se transcriben sucesivamente unidades de transcripción dispuestas en tándem. En un virus MV de tipo silvestre, los genes transcritos están flanqueados (i) en su extremo 3' con una secuencia de GS y una secuencia de nucleótidos denominadas en la técnica "región no codificante" y (ii) en su extremo 5' con una secuencia de nucleótidos también denominada "región no codificante" y una secuencia de GE. Por lo tanto, la expresión "región no codificante" (3' o 5') como se usa en este documento define una secuencia de nucleótidos que está localizada cadena arriba (3') o cadena abajo (5') de un gen natural de un virus MV y que abarca la región entre la secuencia de GS y el codón de inicio (ATG) del gen de virus MV y la región entre el codón de detención (TAA, TAG o TGA) del gen del virus MV y la secuencia de GE, respectivamente. Las regiones no codificantes usadas en este documento se obtienen de un gen del mismo virus que el virus vector (es decir, las regiones no codificantes son homólogas al vector de virus MV).

En la técnica se conoce información detallada de la organización genómica de virus MV, incluyendo las secuencias de nucleótidos de los diversos genes de virus MV y sus secuencias de control de la transcripción (GS y GE) y secuencias no codificantes que flanquean los genes. Tal información está disponible, por ejemplo, en la base de datos del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI), por ejemplo, a través de su página web en Internet; véase las Tablas 2 y 3).

Las secuencias no codificantes que se usan preferiblemente en esta invención se obtienen de genes de virus MV naturales, pero la sustitución de uno o más nucleótidos en una región no codificante natural también se considera que pertenece a la invención. En particular se consideran sustituciones de nucleótidos que están localizadas inmediatamente cadena arriba o abajo del codón de inicio/detención del gen extraño, respectivamente, y se producen por la introducción de sitios de escisión por enzima de restricción artificiales que permiten la manipulación genética de estas regiones.

En un vector de virus MV recombinante preferido de acuerdo con la presente invención las regiones no codificantes son de un gen que codifica una proteína de envuelta de virus MV, en particular, una proteína M, G, F o HN o una proteína RNP, en particular, una proteína N, P o L.

En un virus MV recombinante particularmente preferido de acuerdo con la invención las regiones no codificantes son de un gen que codifica una proteína F o HN.

En la Tabla 3 se presentan secuencias de nucleótidos específicas de regiones no codificantes a usar en un vector de virus MV recombinante de acuerdo con las invenciones.

Tabla 2: información de genoma y vector en virus Mononegavirales

Virus MV	Información de genoma: Nº de acceso a NCBI	Referencia de vector de virus recombinante
RV	NC_001542	Mebatsion et al., PNAS 93, 7310-14, 1996
VSV	NC_001560	Kretzschmar et al., J. Virol. 71, 5982-89, 1997
IHNV	NC_001652	-
SeV	NC_001552	Sakai et al., FEBS Lett. 456, 221-6, 1999
hPIV 1	NC_003461	-
H PIV3	NC_001796	Tao et al, J. Virol. 74, 6448-58, 2000
bPIV3	NC_002161	Tang et al. Vaccine 23, 1657-67, 2005
Virus del sarampión	NC_001498	Singh et al, J. Virol. 73, 4823-28, 1999
Virus de la peste bovina	NC_006296	Walsh et al, J. Gen. Virol. 81, 709-18, 2000
CDV	NC_001921	Plattet et al. Virus Res. 101, 147-53, 2004
SV 50	NC_006430	He et al. Virology 237, 249-60, 1997
NDV	NC_002617	Zhao et al, J. Gen. Virol. 84, 781-88, 2003
Virus de paperas	NC 002200	-
hPIV2	NC_003443	-
hRSV	NC_001781	Bukreyev et al, PNAS 96, 2367-72, 1999
bRSV	NC_001989	Stope et al, J. Virol, 75, 9367-77, 2001
Virus del Ébola	NC_006432	-
Virus de Marburg	NC_001608	-

Las secuencias de GS y GE a usar en esta invención como las secuencias de control de la transcripción son preferiblemente las obtenidas de los genes naturales de los virus MV. Se cree que estas secuencias modulan la actividad de la ARN polimerasa durante el proceso de transcripción, en particular, en el proceso del inicio de la transcripción y la modificación del extremo 5' de ARN y en el control de la transcripción de poliadenilación del extremo 3' y terminación. Para cada virus de MV el comienzo de cada gen está marcado por una secuencia de aproximadamente 10 nucleótidos. Aunque en algunas especies de virus MV las secuencias de GS son iguales para cada gen, las secuencias de GS en el genoma de otras especies de virus MV pueden presentar diferencias sutiles.

En vista de su función común en la formación de la cola poli-A del extremo 3' de ARNm y terminación de la transcripción, las secuencias de GE en virus MV comparten características de secuencia comunes. Una secuencia de GE típica comprende un tramo de U entre 4-8 nucleótidos de longitud. Además, existe una fuerte conservación de un resto de C directamente cadena arriba del tramo de U y que está precedido por una extensión de nucleótidos que es rico en A/U. En diversas secuencias de GE los 4 nucleótidos directamente cadena arriba del tramo de U están compuestos de 3'-AUUC-5'.

Las secuencias de control de la transcripción que definen los bordes de genes o uniones de genes de genes de virus MV se han identificado para muchos genes de virus MV comparando las secuencias de nucleótidos en el molde genómico y las secuencias de nucleótidos presentes en los extremos de ARNm. Además, muchos estudios han identificado secuencias consenso de GS y GE que se requieren para expresión génica eficaz. Se pueden obtener características generales y ejemplos específicos de secuencias de GS y GE a partir de la información en la base de datos de secuencia de NCBI (véase la Tabla 2 para los Nº de acceso a NCBI) y también se revisan por Neumann et al. (J. Virol. 83, 2635-2662, 2002) y Whelan et al. (Current Topics Microbiol. Immunol. 203, 63-119, 2004).

Las secuencias de GS y GE especialmente preferidas a usar en un vector de virus MV recombinante de acuerdo con la invención están enumeradas en la Tabla 3, aunque se reconoce que no siempre se puede determinar un límite preciso entre secuencias de GS, NCR y GE. Esta información de secuencia se describe en la base de datos de NCBI (véase el Nº de acceso en la Tabla 2). Para NDV se ha referencia al Nº de acceso de EMBL Y18898, para RV, al Nº de acceso de GenBank M31046.

Tabla 3: información de secuencia de unión de genes de diversos genes de MV (sentido +)

Virus	GS	NCR (nt) entre GS y codón de inicio	ORF	NCR (nt) entre codón de detención y GE	GE	IGR (entre GE y GS)
RV	aacaccct	3	N	50	tgaaaaaa	ct
	aacaccct	20	P	59	tgaaaaaa	caggc
	aaccacct	6	M	171	tgaaaaaa	ctatt
	aacatcct	18	G	459	agaaaaaa	cattagatcagaag aaccaactggc
	aacacttct	21	L	52	tgaaaaaa	
IHNV	ggcacttcagttg	100	NP	70	tagaaaaaa	t
	ggcactatagtc	25	P	32	agaaaaaa	t
	ggcacgcaagtgt	41	M2	90	agacagaaaaaa	t
	ggcactttgtgc	39	G	28	agacagaaaaaa	c
	ggcacattgtgc	14	NV	-6	<u>agata</u> gaaaaaa	t
	ggcactttgtgc	64	L	41	agatacaaaaaaa	
Virus Sendai	agggtcaag	54	NP	34	taaaaaaa	ctt
	agggtgaag	93	P	74	taaaaaaa	ctt
	agggtgaag	22	M	85	taaaaaaa	ctt
	agggataaag	43	F	61	taaaaaaa	ctt
	agggtgaag	46	HN	95	taaaaaaa	ccc
	agggtgaatg	18	L	76	taaaaaaa	
hPIV1	agggtaaag	54	N	31	aagtaagaaaaa	ctt

Virus	GS	NCR (nt) entre GS y codón de inicio	ORF	NCR (nt) entre codón de detención y GE	GE	IGR (entre GE y GS)
	agggtgaatg	93	P	71	aaattaagaaaaa	ctt
	agggtcaaaag	22	M	82	aaataagaaaaa	cgt
	agggacaaaag	265	F	76	aagtaagaaaaa	ctt
	agggttaaag	46	HN	98	gaataagaaaaa	ctt
	agggttaatg	18	L	88	tagtaagaaaaa	
bPIV3	aggattaaag	45	N	34	taagaaaaa	ctt
	aggattaatg	69	P	116	taagaaaaa	ctt
	aggatgaaag	22	M	51	aaacaaaaa	ctt
	aggatcaaaag	101	F	26	tacaaaaa	ctt
	aggacaaaag	63	HN	86	taataaaaaa	ctt
	aggagaaaag	12	L	62	taagaaaaa	
hPIV3	aggattaaag	45	NP	34	taagaaaaa	ctt
	aggattaaag	69	P	53	taagaaaaa	ctt
	aggattaaag	22	M	51	taatcaaaaaa	ctt
	aggacaaaag	183	F	28	ttataaaaaa	ctt
	aggagtaaag	63	HN	81	tataaaaaa	ctt
	aggagcaaag	12	L	62	taataaaaaa	
Virus de sarampión	aggattcaaaag	42	N	49	ttataaaaaa	ctt
	aggaccagg	50	P	62	ttataaaaaa	ctt

Virus	GS	NCR (nt) entre GS y codón de inicio	ORF	NCR (nt) entre codón de detención y GE	GE	IGR (entre GE y GS)
	aggagcaaaag	22	M	417	taaacaaaa	ctt
	agggccaagg	574	F	128	taattaaaa	ctt
	agggtgcaag	10	H	74	ttaagaaaaa	cgt
	agggttcaag	12	L	59	ttaagaaaaa	
Virus de la peste bovina	aggattcaag	42	N	49	ttalaaaaaa	ctt
	aggacccagg	49	P	62	ttalaaaaaa	ctt
	aggagcaaaag	22	M	408	taccaaacaata	ctt
	agggitcaag	579	F	125	tataaacaaaaa	ctt
	aggatgcaag	10	H	98	ttalaaaaaa	cgt
	agggttcaag	12	L	60	taaagaaaaa	
CDV	agggitcaatg	42	N	49	ttalaaaaaa	ctt
	aggacccagg	49	P	62	ttalaaaaaa	ctt
	aggacacaag	22	M	394	taattaatcaaaa	ctt
	agggttcagg	16	F	122	ttaagaaaaa	ctt
	agggctcagg	10	H	100	ttalaaaaaa	cta
	aggatccaag	12	L	53	tacgaaaaaaaa	
SV5	aggtcggaaact	83	NP	92	tttaagaaaaaaa	t
	agccccggacgggt	47	P	54	ttttagaaaaaa	cgattaacgataaata
	agccccaaact	20	M	193	ttcaagaaaaa	caatcatttaagactatccta

Virus	GS	NCR (nt) entre GS y codón de inicio	ORF	NCR (nt) entre codón de detención y GE	GE	IGR (entre GE y GS)
	agcacgaacccat	15	F	25	ttttaagaaaaaaa	cgat
	aggaccgaacct	67	SH	64	ttttaagaaaaaaa	ta
	agggccgaacct	54	HN	99	ttttaagaaaaaaa	ccaagagacaat
	agggcagaatg	-3	L	22	Tttaagaaaaaaa	
VSV	aacagtaatc	3	NP	42	tgaaaaaa	ct
	aacagatc	0	NS	-3	tgaaaaaa	gt
	aacagatc	31	M	98	tgaaaaaa	ct
	aacagatc	19	G	98	tgaaaaaa	ct
	aacagcaatc	0	L	31	tgaaaaaa	
NDV	acgggtagaa	56	NP	200	ttagaaaaa	gt
	acgggtagaa	73	P	169	ttagaaaaa	t
	acgggtagaa	24	M	102	ttagaaaaa	c
	acgggtagaa	36	F	73	ttagaaaaa	ctaccgggtgtagat gaccaaggacga tat
	acgggtagaa	81	HN	166	ttagaaaaa	tgtaaggccaatg agatacaaggcaa aacagctcatggta aataat
	acgggtagga	1	L	67	ttagaaaaa	

En un vector de virus MV recombinante preferido de la invención, la secuencia de GS, GE y las regiones no codificantes se obtienen del mismo gen de virus MV.

5 En la técnica se conocen bien métodos para la preparación de un vector de virus MV recombinante que alberga una unidad de transcripción adicional que comprende un gen extraño. Por ejemplo, la Tabla 2 se refiere a documentos que describen la preparación de tal virus de vector recombinantes para diversas especies de virus MV. En principio, el método usado en la presente invención es el mismo que en la técnica anterior, excepto porque el gen extraño a insertar en el genoma de virus MV está flanqueado por las regiones no codificantes 3' y 5' apropiadas, como se ha definido anteriormente.

10 En un método general de acuerdo con la invención, el vector de virus MV recombinante se prepara insertando una molécula de ácido nucleico aislado que comprende (i) un gen extraño flanqueado por las regiones no codificantes 3' y 5' como se ha definido anteriormente y (ii) las secuencias de control de la transcripción apropiadas en el genoma del virus MV, de tal forma que en el vector de virus MV resultante el gen extraño está tanto precedido como seguido de una unión de genes de virus MV, en particular de un fragmento de secuencia de nucleótidos genómico que comprende elementos GE-IGR-GS. La presencia de tales elementos cadena arriba y cadena abajo garantiza la transcripción apropiada no solamente de los genes extraños insertados, sino también de los genes de virus MV homólogos que están localizados cadena arriba y abajo del gen extraño insertado.

20 Más en particular, en este método la molécula de ácido nucleico aislado y el genoma del virus MV se usan en su forma de ADNc (sentido +). Esto permite la manipulación sencilla e inserción de las moléculas de ácido nucleico deseadas en el genoma vírico.

25 En general se podrían usar diversas partes del genoma para la inserción del gen extraño, entre dos genes, es decir, en regiones intergénicas (IGR), regiones no codificantes 3' o 5' de un gen así como un extremo proximal a promotor 3' (delante de los genes N/NP) o distal 5' (detrás de los genes L) de un genoma.

El gen extraño podría insertarse ventajosamente delante del gen N/NP, entre NP-P, P-M, M-G/F, G/F-HN, HN-L y detrás del gen L.

30 El modo más sencillo es usar una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción (RE) ya existente en uno de estos sitios cortado con la enzima e introduciendo un casete de transcripción apropiado. Ya que las secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción existentes de forma natural no están localizadas siempre en la localización deseada, se podrían introducir sitios de reconocimiento de RE en el genoma convencionalmente mediante mutagénesis dirigida o de PCR. Se pueden encontrar ejemplos de IGR adecuadas para la inserción del gen extraño en la Tabla 3.

35 La composición del casete de transcripción a insertar depende del sitio de inserción. Por ejemplo, en caso de que se inserte un casete de transcripción en una IGR, el casete puede comprender los siguientes elementos: 3' sitio de reconocimiento de RE-GS-región no codificante-ORF (de gen extraño)-región no codificante-GE-sitio de reconocimiento de RE 5'.

40 Como alternativa, en el caso de que se introduzca un casete de transcripción en una región no codificante 5' de un gen de virus MV natural, el casete puede estar compuesto de: 3' sitio de reconocimiento de RE-GE-IGR-GS-región no codificante-ORF (de gen extraño)-región no codificante-sitio de reconocimiento de RE 5'.

45 De forma similar, en el caso de que se tenga que introducir un casete de transcripción en una región no codificante 3' de un gen de virus MV natural, el casete puede estar compuesto de: 3' sitio de reconocimiento de RE-región no codificante-ORF (de gen extraño)-región no codificante-GE-IGR-GS-sitio de reconocimiento de RE 5'.

50 La preparación de tales casetes de transcripción y la inserción de los mismos en un genoma de virus MV implica solamente técnicas de biología molecular rutinarias, tales como se ilustran en las referencias bibliográficas enumeradas en la Tabla 2 y en los presentes Ejemplos. En particular, se pueden usar para este fin técnicas tales como mutagénesis dirigida y de PCR (Peeters et al., 1999, anteriormente; Current Protocols in Molecular Biology, eds.: F. M. Ausubel et al., Wiley N. Y., edición 1995, páginas 8.5.1.-8.5.9; Kunkel et al., Methods in Enzymology Vol. 154, 376-382, 1987).

Más en particular se puede preparar un vector de virus MV recombinante de acuerdo con la presente invención mediante el método de "genética inversa" bien establecido que permite la modificación genética de virus ARN no segmentados de polaridad negativa del orden MV (revisado, por ejemplo, por

Conzelmann, K. K., *Current Topics Microbiol. Immunol.* 203, 1-41, 2004; y Walpita et al., *FEMS Microbiol. Letters* 244, 9-18, 2005).

5 En este método se co-transfecta una célula apropiada mediante un vector que comprende una molécula de ADNc que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un genoma de longitud completa, o, preferiblemente, un antigenoma (sentido positivo) de un virus MV y uno o más vectores que comprenden las moléculas de ADNc que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de soporte requeridas en condiciones suficientes para permitir la transcripción y co-expresión del (anti)genoma de MV y proteínas de soporte y la producción de un vector de MV recombinante. En este método, la dicha molécula de ácido nucleico que codifica el (anti)genoma de virus MV de longitud 10 completa comprende una unidad de transcripción adicional como se ha definido anteriormente.

Con vector se quiere decir un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido al que se puede unir otro segmento de ADN a fin de llevar a cabo la replicación del segmento de ADN unido y su transcripción y/o expresión en una célula transfectada con este vector.

15 Preferiblemente, el vector para la transcripción del genoma de longitud completa es un plásmido que comprende una secuencia de ADNc que codifica el (anti)genoma del virus MV, flanqueada por un promotor de polimerasa de T7 en su extremo 5' y una secuencia de ribozima (hepatitis delta) en su extremo 3' aunque también se puede usar un promotor de ARN polimerasa de T3 o SP6.

20 Para la expresión intracelular de las proteínas de soporte apropiadas se usan, preferiblemente, plásmidos que comprenden la secuencia de ADNc que codifica estas proteínas bajo el control de secuencias de control de la expresión apropiadas, por ejemplo, un promotor de polimerasa de T7.

En un método particularmente preferido para la preparación de un vector de virus MV recombinante de acuerdo con la presente invención se usan plásmidos de expresión que codifican las proteínas N (o NP), P y L del virus MV.

25 Las cantidades o proporciones de plásmidos de soporte transfectados a usar en esta tecnología de genética inversa abarcan un amplio intervalo. Las proporciones para los plásmidos de soporte N:P:L pueden variar de aproximadamente 20:10:1 a 1:1:2 y en la técnica se conocen protocolos de transcripción eficaces para cada virus.

30 Se prepara una copia exacta del ARN genómico en una célula transfectada mediante la acción combinada del promotor de ARN polimerasa de T7 y la secuencia de ribozima y este ARN se empaqueta y replica posteriormente por las proteínas de soporte víricas suministradas por los plásmidos de expresión co-transfectados.

35 Se prefiere que se proporcione una enzima polimerasa de T7 por un virus vaccinia recombinante que infecta la célula transfectada, en particular, por el virus vaccinia vTF7-3, aunque también se pueden usar otros vectores de viruela recombinantes, tales como virus de la viruela aviar, por ejemplo, fpEFLT7pol u otros vectores víricos para la expresión de la ARN polimerasa de T7.

La separación del virus rescatado de virus vaccinia se puede conseguir de forma sencilla mediante simples técnicas físicas, tales como filtración. Para el rescate del virus Sendai o NDV, el rescate se puede conseguir mediante la inoculación del sobrenadante de células transfectadas en huevos embrionados.

40 En una realización incluso más preferida se usan líneas celulares para la transfección de los vectores de transcripción y expresión que expresan constitutivamente la ARN polimerasa (T7) y/o una o más de las proteínas de soporte requeridas.

45 Por ejemplo, el rescate del virus del sarampión se puede conseguir en una línea celular de riñón embrionario humano, 293-3-46, que expresa tanto la ARN polimerasa de T7 como las proteínas de soporte del virus del sarampión N y P (Radecke et al., *EMBO J.*, 14, 5773-5784, 1995). Otra línea celular muy útil que se puede usar ventajosamente en la presente invención se basa en células BSR que expresan la ARN polimerasa de T7, es decir, la línea celular BSR-T7/5 (Buchholz et al., *J. Virol.* 73, 251-259, 1999).

50 Además, información más detallada con referencia a la tecnología de genética inversa a usar en este documento para la preparación de un virus MV de acuerdo con la presente invención se describe en la revisión por Conzelmann, K. K. (anteriormente) y el Ejemplo 1.

La capacidad de vectores de virus MV recombinantes de expresar establemente genes extraños ha dado como resultado el desarrollo de vectores para aplicaciones tanto profilácticas como terapéuticas.

En un vector de virus MV recombinante de acuerdo con la presente invención, el gen extraño puede variar dependiendo de la especie de vector de virus MV específico y la aplicación del virus vector.

5 El gen extraño puede codificar un antígeno de un patógeno microbiano (diferente) (por ejemplo, un virus, bacteria o parásito), especialmente el gen extraño codifica un antígeno de un patógeno que es capaz de provocar una respuesta inmune protectora.

10 Por ejemplo, las secuencias génicas heterólogas que se pueden insertar en los vectores de virus de la invención incluyen, pero sin limitación, genes de glucoproteína de virus de la influenza, en particular, genes de hemaglutinina H5 y H7 de virus de la influenza aviar, genes obtenidos del Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (IBDV), específicamente VP2 de (IBDV), genes obtenidos del Virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), virus de la leucemia felina, virus del moquillo canino, virus de la anemia infecciosa equina, virus de la rabia, organismo de ehrliquia, en particular Ehrlichia canis, virus respiratorios sincitiales, virus de la parainfluenza, metapneumovirus humanos y virus del sarampión.

15 Como alternativa, el gen extraño puede codificar un modulador inmune de polipéptido que es capaz de aumentar o modular la respuesta inmune a la infección por virus, por ejemplo, co-expresando una citocina tal como una interleucina (por ejemplo, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o GM-CSF).

El orden de MV incluye tanto virus que son capaces de replicarse en seres humanos y animales como en ambos (por ejemplo, virus de la rabia y virus la enfermedad de Newcastle). Por lo tanto, el gen extraño puede seleccionarse de una amplia diversidad de patógenos microbianos humanos y veterinarios.

20 Aunque todos los virus MV se pueden usar como un virus vector en la presente invención, en una realización preferida de la invención el vector de virus MV recombinante es un virus de la familia Rhabdoviridae, preferiblemente del género Lyssavirus o Novirhabdovirus, más preferiblemente de la especie de virus de la rabia o IHNV, respectivamente.

25 En una realización también preferida, el virus MV recombinante es un virus de la familia Paramyxoviridae, preferiblemente de los géneros Respovirus, en particular las especies hPIV3 o bPIV3, Morbillivirus, en particular las especies CDV, Penumovirus, en particular las especies RSV y Avulavirus, en particular la especie NDV.

30 En una realización particularmente preferida de la presente invención se proporciona un vector de virus MV recombinante en el que el virus es el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). Ya que el NDV es capaz de replicarse tanto en seres humanos como en animales, en particular en aves de corral, más particularmente en pollos, un vector de NDV recombinante de acuerdo con la invención puede comprender un gen extraño que codifica un antígeno de un patógeno, en particular de un patógeno respiratorio o un modulador inmune que es capaz de provocar una respuesta inmune apropiada en seres humanos o cualquiera de estos animales.

35 Los métodos de genética inversa para la manipulación genética de NDV se han descrito específicamente para NDV por Peeters et al. (J. Virology 73, 5001-5009, 1999), Römer-Oberdörfer et al. (J. Gen. Virol. 80, 2987-2995, 1999) y en la revisión por Conzelmann, K. K. (anteriormente). Además, también se conoce que el NDV se puede usar como un vector para la expresión de genes extraños, por ejemplo, para la provocación de una respuesta inmune en animales infectados por el vector de NDV (Nakaya et al., 2001, anteriormente) y Swayne et al., Avian Dis. 47, 1047-50, 2003).

40 Un gen extraño se puede introducir ventajosamente en un genoma de NDV en diversas posiciones como se ha indicado en general anteriormente para virus MV. En particular, en un vector de NDV recombinante de acuerdo con la invención, se puede insertar un gen extraño (como parte de una unidad de transcripción apropiada) entre los siguientes genes de NDV: NP-P, P-M, M-F, F-HN, HN-L y en el locus proximal 3' y distal 5' (Zhao et al., 2003, anteriormente; Nakaya et al., 2001, anteriormente),  
45 preferiblemente en las regiones P-M, M-F y F-HN proximales 3', siendo la región F-HN la más preferida.

Además, en un vector de NDV recombinante de acuerdo con la presente invención las regiones no codificantes que flanquean el gen extraño pueden obtenerse de todos los genes de NDV de origen natural, en particular de los genes N, P, M, F o HN, prefiriéndose el gen HN.

50 En una realización particular de la invención se proporciona un vector de NDV recombinante, en el que la unidad de transcripción adicional se localiza entre los genes F-HN y el gen extraño insertado está flanqueado por las regiones no codificantes del gen HN de NDV.

Más específicamente se proporciona un vector de NDV en el que la NCR 3' y 5' (y opcionalmente la secuencia de GS y GE) tienen una secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEC ID N°: 1 y 2 ó

3 y 4.

Un vector de NDV recombinante de acuerdo con la presente invención puede usarse ventajosamente para inducir una respuesta inmune en aves de corral, en particular en pollos, frente a otros patógenos. Por lo tanto, el vector de NDV recombinante comprende preferiblemente un gen extraño que codifica un antígeno protector de un patógeno aviar, en particular del virus de la influenza, el virus de la enfermedad de Marek (MDV), el virus de laringotraqueítis infecciosa (ILTV), virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV), virus de la anemia del pollo (CAV), reovirus, retrovirus aviar, adenovirus del pollo, virus de la rinotraqueítis del pavo (TRTV), E. coli, especies de Eimeria, Criptosporidia, Micoplasmas, tales como M. gallinarum, M. synoviae y M. meleagridis, Salmonella, Campylobacter, Ornithobacterium (ORT) o Pasteurella sp.

Más preferiblemente, el vector de NDV recombinante comprende un gen extraño que codifica un antígeno de AIV, MDV, ILTV, IBV, TRTV, E. coli, ORT o Micoplasma.

En particular, el mutante de vector de NDV recombinante comprende un gen de hemaglutinina (HA) de un virus de influenza, preferiblemente de un virus de influenza aviar (AIV), más preferiblemente de un AIV H5 o H7 altamente patógeno.

En principio, el gen de HA de todas las cepas de influenza (aviar) se puede usar en esta invención. Las secuencias de nucleótidos de muchos genes de HA se han descrito en la técnica y se pueden recuperar de bases de datos de secuencia de ácido nucleico, tales como GenBank o la base de datos EMBL.

El gen de hemaglutinina (HA) del AIV aislado recientemente de subtipo H5N2 altamente patógeno A/chicken/Italy/8/98 puede usarse ventajosamente como un gen extraño en la presente invención como se ha indicado anteriormente. El gen se transcribe de manera inversa, se clona en el vector de expresión eucariota pcDNA3 (Invitrogen) y se secuencia (Lüschow et al., Vaccine, vol. 19, págs. 4249-4259, 2001 y N° de Acceso GenBank AJ305306). A partir del plásmido de expresión obtenido pCD-HA5 se puede obtener el gen de HA mediante amplificación usando cebadores específicos que generan sitios de reconocimiento de RE artificiales que permiten la inserción del gen de HA en secuencias genómicas de NDV.

En una realización adicional, el gen de HA del subtipo H7N1 altamente patógeno de AIV A/chicken/Italy/445/99 puede usarse como un gen extraño en la presente invención como se ha indicado anteriormente. El gen de HA se transcribe de manera inversa y se amplifica mediante pCR. El producto de 1711 pb se clona en el vector digerido con SmaI pUC18 (Amersham) y se secuencia (Veits et al., J. Gen Virol. 84, 3343-3352, 2003; y N° de Acceso GenBank AJ580353).

En un vector de virus MV recombinante particularmente ventajoso de acuerdo con la presente invención, el virus de vector MV está atenuado, es decir: el virus de vector no es patógeno para el animal diana o muestra una reducción sustancial de la virulencia en comparación con el virus de tipo silvestre. Muchos virus MV usados en este documento como vectores de virus tienen un registro de larga seguridad como vacunas atenuadas vivas tales como el virus del sarampión y NDV, mientras que otros virus, tales como SeV y VSV se consideran no patógenos para seres humanos. Además, existen técnicas convencionales para obtener y explorar virus atenuados que muestran una replicación o potencial de infectividad limitados. Tales técnicas incluyen el paso (en frío) seriado del virus en un sustrato heterólogo y la mutagénesis química.

Un vector de NDV recombinante de acuerdo con la invención puede obtenerse de cualquier cepa de vacuna ND convencional. Los ejemplos de cepas de NDV adecuadas de este tipo presentes en vacunas de ND disponibles en el mercado son: Clone-30<sup>®</sup>, La Sota, Hitchner B1, NDW, C2 y AV4, siendo la cepa preferida Clone-30<sup>®</sup>.

También se ha encontrado por los presentes inventores que un vector de virus MV recombinante de acuerdo con la presente invención es capaz de inducir una respuesta inmune protectora en animales.

Por lo tanto, en otra realización de esta invención se proporciona una vacuna contra un patógeno microbiano que comprende un vector de virus MV recombinante como se ha definido anteriormente en una forma viva o inactivada y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Se puede preparar una vacuna de acuerdo con la invención mediante métodos convencionales tales como los usados comúnmente para las vacunas de virus MV vivas e inactivadas disponibles en el mercado.

En resumen se inocula un sustrato susceptible con el vector de virus MV recombinante y se propaga hasta que el virus se haya replicado hasta un título deseado después de lo cual se recoge el material que contiene virus. Posteriormente, el material recogido se formula en una preparación farmacéutica con propiedades inmunizantes.

5 Cualquier sustrato que sea capaz de soportar la replicación del vector de virus MV recombinante se puede usar en la presente invención. Como sustrato pueden usarse células hospedadoras de origen tanto procariota como eucariota, dependiendo del virus MV. Las células hospedadoras apropiadas pueden ser células de vertebrados, por ejemplo, de primate. Son ejemplos adecuados; las líneas celulares humanas HEK, WI-38, MRC-5 o H-239, la línea celular de simio Vero, la línea celular de roedor CHO, BHK, la línea celular de canino MDCK o células aviares CEF o CEK.

10 Un sustrato particularmente adecuado sobre el que puede propagarse un vector de NDV recombinante de acuerdo con la presente invención son los huevos embrionados SPF. Los huevos embrionados pueden inocularse, por ejemplo, con 0,2 ml de NDV que contiene líquido alantoideo que comprende al menos  $10^{20}$  DIE<sub>50</sub> por huevo. Preferiblemente se inoculan huevos embrionados de 9 a 11 días de edad con aproximadamente  $10^{5,0}$  DIE<sub>50</sub> y posteriormente se incuban a 37°C durante 2-4 días. Después de 2-4 días se puede recoger el producto de virus ND preferiblemente recogiendo el líquido alantoideo. El líquido puede centrifugarse después de eso durante 10 min a 2500 g seguido de filtración del sobrenadante a través de un filtro (100 µm).

20 La vacuna de acuerdo con la invención comprende el vector de virus MV recombinante junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable usado de forma personalizada para tales composiciones.

La vacuna que contiene el virus vivo puede prepararse y comercializarse en forma de una suspensión o en una forma liofilizada. Los vehículos incluyen estabilizantes, conservantes y tampones. Los diluyentes incluyen agua, tampón acuoso y polioles.

25 En otro aspecto de la presente invención se proporciona una vacuna que comprende el vector de virus MV recombinante en una forma inactivada. Las ventajas principales de una vacuna inactivada son su seguridad y los altos niveles de anticuerpos protectores de larga duración que se pueden inducir.

30 El objetivo de la inactivación de los virus recogidos después de la etapa de propagación es eliminar la reproducción de los virus. En general, esto se puede conseguir mediante medios químicos o físicos conocidos.

Si se desea, la vacuna de acuerdo con la invención puede contener un adyuvante. Son ejemplos de compuestos y composiciones adecuados con actividad de adyuvante para este fin hidróxido, fosfato u óxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite basadas, por ejemplo, en un aceite mineral, tal como Bayol F® o Marcol 52® o un aceite vegetal tal como acetato de vitamina E y saponinas.

35 La administración de una vacuna de acuerdo con la invención puede ser mediante cualquiera de las formas efectivas bien conocidas y puede depender del tipo del vector de virus MV. Los modos adecuados de administración incluyen vacunación parenteral, intranasal, oral y de pulverización.

40 Una vacuna de vector NDV de acuerdo con la invención se administra preferiblemente mediante técnicas de aplicación masiva baratas usadas comúnmente para la vacunación de NDV. Para la vacunación de NDV, estas técnicas incluyen vacunación en el agua de bebida y pulverización.

45 Una vacuna de acuerdo con la invención comprende una dosificación eficaz del vector de virus MV recombinante como el componente activo, es decir, una cantidad de material de virus MV inmunizante que inducirá inmunidad en las aves vacunadas frente a la exposición a un organismo microbiano virulento. En este documento se define la inmunidad como la inducción de un nivel significativamente mayor de protección en una población de seres humanos o animales contra mortalidad y síntomas clínicos después de la vacunación en comparación con un grupo no vacunado. En particular, la vacuna de acuerdo con la invención protege una gran proporción de seres humanos o animales vacunados contra la aparición de síntomas clínicos de la enfermedad y mortalidad.

50 Típicamente, la vacuna viva puede administrarse en una dosis de  $10^{2,0}$ - $10^{8,0}$  cultivo tisular/dosis infecciosa de embrión (CT/DIE<sub>50</sub>), preferiblemente en una dosis que varía de  $10^{4,0}$ - $10^{7,0}$  CT/DIE<sub>50</sub>. Las vacunas inactivadas pueden contener el equivalente antigénico de  $10^{4,0}$ - $10^{9,0}$  CT/DIE<sub>50</sub>.

La invención también incluye vacunas de combinación que comprenden, además del vector de virus MV recombinante de acuerdo con la invención, una cepa de vacuna capaz de inducir protección

contra un patógeno adicional.

#### EJEMPLOS

Ejemplo 1: generación de un vector de virus MV recombinante que expresa un gen de HA de virus de la influenza aviar (NDV/AIVH5)

#### 5 • Virus y células

Se propagó NDV recombinante rescatado y el aislado de virus de influenza A/chicken/Italy/8/98 en huevos de pollo embrionados de 10 días de edad sin patógenos específicos (SPF). Se usaron la cepa de NDV velogénica Herts 33/56 y el Clon 30 de NDV vacunal (Nobilis®).

#### 10 Se usaron células BSR-T7/5 que expresan de forma estable ARN polimerasa de fago T7 para recuperar NDV infeccioso de ADNc.

#### • Construcción de ADNc que codifica ARN antígenómico de NDV que contiene el gen H5 de AIV

La numeración entre paréntesis como se usa en este documento para identificar posiciones de nucleótidos en el genoma de NDV y restos de aminoácido en las proteínas de NDV es como se describe por Römer-Oberdörfer et al. (J. Gen. Virol. 80, 2987-2995, 1999, EMBL N° de acceso Y18898). El plásmido pINDV que expresa el ARN antígenómico de longitud completa del Clon 30 (Römer-Oberdörfer et al., anteriormente) se usó para introducir el gen H5 de AIV que se había amplificado del plásmido pCD-HA5 (Luschow et al., anteriormente) mediante cebadores específicos con sitios de restricción MluI artificiales (PH5F1: 5' - cta aac gcg taa aat gga gaa aat agt gc -3' (SEC ID N° 5) y PH5R1: 5' - tcg gac gcg ttt aaa tgc aaa ttc tgc act g -3' (SEC ID N° 6), los sitios MluI están subrayados) para rNDV/AIVH5-A y con sitios NcoI o AflIII (PH5F2: 5' -cct tcc atg gag aaa ata gtg ctt c -3' (SEC ID N° 7) y PH5R2: 5' - cct cct taa gta taa ttg act caa tta aat gca aat tct gca ctg caa tga tcc -3' (SEC ID N° 8) , los sitios de restricción están subrayados) para rNDV/AIVH5-B. La introducción de H5 en el antígenoma del Clon 30 (Fig. 1 A) se realizó usando los sitios MluI como se ha descrito previamente para la inserción de GFP (Engel-Hertiert et al., J. Virol. Methods 108, 19-28, 2003). En resumen, para la construcción del plásmido de longitud completa pINDV/AIVH5-A, la ORF de H5 se amplificó con cebadores que contenían sitios MluI artificiales (véase anteriormente) que se usaron para insertar la ORF de H5 en el casete génico mínimo entre el gen F y HN de NDV (Fig. 1 A). La construcción del plásmido de longitud completa que contiene el gen de H5 de AIV para la generación de rNDV/AIVH5-B se da en la Figura 1B. Se realizaron reacciones de mutagénesis usando el kit de mutagénesis dirigida Quik Change® II XL (Stratagene). En este punto se usaron un plásmido pUC 18 (pUCNDV1) que contenía el fragmento de NotI/BsiWI (nt 4953 - 8852) del genoma del Clon 30 y los siguientes cebadores: MP1 (5' - gac aac agt cct caa cca tgg acc gcg ccg -3') (SEC ID N°: 9) y MP2 (5' - ctg gct agt tga gtc aat tct taa gga gtt gga aag atg gc - 3') (SEC ID N°: 10) para mutagénesis A (Fig. 1 B) dando como resultado el plásmido pUCNDV1 con sitios recién creados NcoI y AflIII (los sitios de restricción en los cebadores están subrayados). Después de la digestión con NcoI y AflIII se substituyó la ORF de HN del Clon 30 por la ORF de H5 de AIV amplificada. Para la mutagénesis B para crear sitios SgfI y SnaBI en la región intergénica delante del gen L de pUCNDVH5 dando como resultado pUCNDV/AVIS-1b (Fig. 1 B) se usaron los cebadores MP3 (5' - caa aac agc tca tgg tac gta ata cgg gta gga cat gg - 3') (SEC ID N°: 11) y MP4 (5' - gta agt ggc aat gcg atc gca ggc aaa aca gct cat gg - 3') (SEC ID N°: 12). La mutagénesis C se realizó con MP3 y MP5 (5' - gaa aaa act acc ggc gat cgc tga cca aag gac gat ata cgg g - 3') (SEC ID N°: 13) dando como resultado el plásmido pUCNDV1c para obtener sitios SgfI y SnaBI que se usaron para la introducción del gen HN del Clon 30 en la región intergénica delante del gen L en el plásmido pUCNDVHS\_1b. Finalmente se substituyó el fragmento de NotI/BsiWI de pINDV-1 por el fragmento de NotI/BsiWI de pUCNDVHS\_1c (Fig. 1 B). Las longitudes de los nuevos genomas generados de longitud completa representan un múltiplo de seis (16938 nt para rNDV/AIVH5-A y 17196 nt para rNDV/AIVH5-B).

#### • Transfección y propagación de virus

Se realizaron experimentos de transfección, propagación de virus y confirmación de la recuperación de virus infeccioso como se ha descrito anteriormente (Römer-Oberdörfer et al., anteriormente; Engel-Herbert et al., anteriormente). La única diferencia fue que se usó una cantidad total de ADN de 20 µg (10 µg del genoma de longitud completa que contiene plásmido, 6 µg de pCiteNP, 2 µg de pCiteP y 2 µg de pCiteL) para la transfección.

#### • Resultados

La fase de lectura abierta de H5 de AIV se insertó entre los genes F y HN del plásmido que se ha

descrito previamente pflNDV (Römer-Oberdörfer et al., anteriormente). En este punto, la ORF de H5 de AIV del aislado de AIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) se amplificó del plásmido pCD-HA5 (Luschow et al., anteriormente) mediante cebadores específicos con sitios de restricción *MluI* que se usaron para inserción de la ORF de H5 de AIV en el sitio de restricción *MluI* singular de pflNDV<sub>oligo1</sub>; (Engel-Herbert et al., anteriormente) dando como resultado el plásmido pflNDV/AIVH5-A (Fig. 1A). En esta construcción de ORF de H5 de AIV estaba flanqueada por las secuencias de inicio de gen (GS) y de fin de gen (GE) artificiales en la región intergénica entre los genes F y HN de NDV. Para la construcción del plásmido de longitud completa pflNDV/AIVH5-B la ORF de HN del plásmido pUCNDV1a se sustituyó por la ORF de H5 amplificada como un fragmento de *NcoI/AflII* (Fig. 1B). En el plásmido resultante pUCNDVH5 se crearon sitios de restricción *SgfI* y *SnaBI* en la región intergénica cadena abajo del gen de H5 dando como resultado el plásmido pUCNDVHS\_1b (Fig. 1 B). Los sitios de restricción creados *SgfI* y *snaBI* se usaron para introducir el gen de HN del plásmido pUCNDV1c, en el que el gen de HN también estaba flanqueado por sitios de restricción *SgfI* y *SnaBI* (Fig. 1 B). Finalmente se usó el plásmido resultante pUCNDVHS\_1 c para sustituir el fragmento de *NotI/BsVI* de pflNDV (Fig. 1 B). El pflNDV/AIVH5-B construido difiere del plásmido pflNDV/AIVH5-A ya que se insertaron regiones no codificantes de HN de NDV adicionalmente entre los elementos de control de la transcripción (GS, GE) y la ORF de H5.

Se recuperaron recombinantes de NDV rNDV/AIVH5-A y rNDV/AIVH5-B de células BSR-T7/5 transfectadas con el ADNc de longitud completa respectivo y plásmidos de soporte como se ha descrito previamente (Römer-Oberdörfer et al., anteriormente; Engel-Herbert et al., anteriormente). Para la recuperación del virus se inyectaron sobrenadantes de transfección en las cavidades alantoideas de huevos de pollo embrionados de 10 días de edad y se incubaron durante 5 días. El líquido alantoideo se recogió y analizó para la presencia de virus mediante ensayo de hemoaglutinación o inmunofluorescencia indirecta (IF). Se usaron líquidos alantoideos que contenían virus para un segundo paso de huevo para la propagación adicional de virus. La presencia del gen de H5 insertado en los genomas virales de rNDV/AIVH5-A y rNDV/AIVH5-B se confirmó mediante PCR de transcripción inversa y secuenciación (datos no mostrados). La Figura 2A y 2B muestran la secuencia de nucleótidos de regiones que flanquean la ORF de HN en NDV y del ORF de H5 en el vector de NDV.

Ejemplo 2: caracterización *in vitro* del vector NDV/AIVH5

- Análisis de ARN

Se infectaron células CEF con el Clon 30 de NDV, rNDV/AIVH5-A, rNDV/AIVH5-B y AIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 por célula y se incubaron durante 8 h a 37°C. Se preparó ARN total de células infectadas y no infectadas, se separó en geles de agarosa desnaturalizantes y se hibridó con ARNc radiomarcados. Los plásmidos pCD-HA5 y pCD-NDVHN que contenían la fase de lectura abierta de H5 de A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) de AIV y HN del Clon 30 de NDV respectivamente se usaron para la transcripción *in vitro* del ARNc marcado con <sup>32</sup>P (kit de Transcripción SP6/T7, Roche).

Para verificar la transcripción del gen de H5 de AIV insertado en rNDV/AIVH5-A y -B se realizaron análisis de transferencia de Northern con ARN total de fibroblastos de embrión de pollo primarios infectados con NDV/AIVH5 recombinante. Se usaron preparaciones de ARN de células infectadas por el Clon 30 de NDV y A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) de AIV como controles. Se detectó la transcripción del gen de H5 de AIV insertado para rNDV/AIVH5-A así como para rNDV/AIVH5-B con ARNc antisentido específico de gen (Fig. 3). Se puede observar que el transcrito de AIV-H5B se extiende aproximadamente 81 nt y está más abundantemente presente que el transcrito de AIV-H5A.

- Análisis de transferencia de Western

Se infectaron células CEK con el Clon 30 de NDV, rNDV/AIVH5-A, rNDV/AIVH5-B y A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) de AIV y se incubaron durante 20 h a 37°C. Se separaron lisados de células infectadas y de control no infectadas mediante SDS-PAGE (aproximadamente 10<sup>4</sup> células por carril) y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (Trans-Blot®SD cell, Bio-Rad). Las transferencias se incubaron con un antisuero de conejo policlonal contra el NDV o un antisuero de pollo policlonal contra AIV del subtipo H5 a diluciones de 1:20000 y 1:2500, respectivamente. La unión de anticuerpos secundarios específicos de especie conjugados con peroxidasa se detectó mediante quimioluminiscencia usando el Sustrato Quimioluminiscente SuperSignal® West Pico (Pierce) en películas de rayos x (Hiperfilm® MP, Amersham).

En análisis de transferencia de Western la proteína H5 era detectable solamente en células infectadas por rNDV/AIVH5-B. El antisuero específico de subtipo H5 de AIV detectó dos proteínas prominentes de aproximadamente 70 y 50 kDa y una proteína escasamente visible de aproximadamente

25 kDa que no se encontraron en células infectadas por el Clon 30 de NDV (Fig. 4).

■ Ensayos de Inmunofluorescencia indirecta (IF)

5 Para ensayos de IF indirecta se infectaron células CEF con una baja MOI por el Clon 30 de NDV, rNDV/AIVH5-A, rNDV/AIVH5-B y A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) de AIV durante 20 h. Después de la fijación con metanol y acetona (1:1) las células se incubaron posteriormente con un antisuero de conejo policlonal frente a NDV o un antisuero de pollo policlonal frente a AIV del subtipo H5 a diluciones de 1:3000 y 1:100, respectivamente. Después de la incubación con el fragmento F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos de IgG anti-conejo y anti-pollo conjugada con fluoresceína se analizaron las muestras mediante microscopía de fluorescencia convencional.

10 La expresión de H5 se examinó mediante el ensayo de IF indirecta de células CEF infectadas. Después de la incubación con un antisuero específico de NDV era detectable una pronunciada fluorescencia en células infectadas por el Clon 30 de NDV, rNDV/AIVH5-A, rNDV/AIVH5-B pero no en células infectadas por A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) de AIV o en células no infectadas (Fig. 5, panel derecho). La incubación con un antisuero específico del subtipo H5 de AIV mostró una fluorescencia marcada en células infectadas por AIV. Comparando los dos recombinantes, rNDV/AIVH5-B mostró una fluorescencia específica de H5 más intensa que rNDV/AIVH5-A indicando un mayor nivel de expresión de la proteína H5 (Fig. 5, panel izquierdo).

■ Microscopía Inmunoelectrónica

20 Las partículas víricas se adsorbieron a rejillas de cobre revestidas con formvar durante 7 min. Las rejillas se lavaron cuatro veces con PBS que contenía albúmina sérica bovina al 0,5% y se incubaron posteriormente con un antisuero específico de NDV o un específico de subtipo H5 de AIV durante 45 min. Después de varios lavados con PB, las rejillas se incubaron durante 45 min adicionales con proteína A oro (10 nm, PAG 10, Biocell International) u oro anti-pollo de conejo (10 nm, RCHL 10, Biocell International). Después de los lavados finales con PB se contrastaron las partículas de virus con ácido fosfotúngstico (PTA, pH 7,2) y se examinaron con un microscopio electrónico.

25 Cuando se examinaron viriones del Clon 30 de NDV o rNDV/AIVH5-A se observó tinción solamente con el antisuero específico de NDV. Por el contrario para rNDV/AIVH5-B se observó tinción usando antisueros contra NDV y también usando antisueros contra AIV demostrando que los viriones de rNDV/AIVH5-B contienen hemaglutinina H5. Las partículas de oro se encontraron predominantemente a lo largo de la superficie de viriones rNDV/AIVH5-B, indicando que la hemaglutinina estaba anclada en la membrana vírica.

Ejemplo 3: Caracterización *in vivo* del vector NDV/AIVH5

■ Evaluación de la protección mediante rNDV/AIVH5-A y rNDV/AIVH5-B recombinantes:

35 Se asignaron de forma aleatoria pollos de un día de edad a dos grupos y se vacunaron por vía ocular con  $10^6$  DIE<sub>50</sub> de rNDV/AIVH5-A o con una vacuna comercial de Clon 30 de NDV (Nobilis®, Intervet, NL) mediante pulverización. A los 28 días de edad se administró una segunda inmunización por la misma vía. El día 12 después de la segunda inmunización se recogió sangre para evaluar la presencia de anticuerpos de NDV y AIVH5 mediante ensayo de HI. Dos semanas después de la segunda vacunación los grupos inmunizados se dividieron y una parte de cada grupo se expuso por vía ocular a  $10^8$  DIE<sub>50</sub> del aislado de AIV altamente patógeno A/chicken/Italy/8/98 (H5N2). Los pollos restantes se usaron para evaluar la eficacia protectora de las vacunas contra NDV velogénico. Por lo tanto, las aves y los animales de control adicionales recibieron  $10^{5,3}$  DIE<sub>50</sub> de la cepa de NDV Herts 33/56 por vía intramuscular.

45 Después de la inmunización e infección de exposición todas las aves se observaron diariamente durante periodo de 10 días para signos clínicos y se clasificaron como sanas (0), enfermas (1; uno de los siguientes signos: signos respiratorios, depresión, diarrea, cianosis, edema, signos nerviosos), gravemente enfermas (2; más de uno de los siguientes signos: signos respiratorios, depresión, diarrea, cianosis, edema, signos nerviosos) o muertas (3). Se calculó una puntuación clínica que representa el valor medio de todos los pollos por grupo para este periodo. Finalmente, tres semanas después de la exposición se tomaron muestras de sangre de todos los animales supervivientes para evaluar los títulos de anticuerpo frente a AIV y NDV.

50 El rNDV/AIVH5-B recombinante de NDV se ensayó en un experimento de animales separado de diseño experimental prácticamente idéntico. Las únicas diferencias fueron que se administraron inmunizaciones con  $10^8$  DIE<sub>50</sub> de rNDV/AIVH5-B o de vacuna de Clon 30 de NDV en ambos grupos por

vía oculonasal y no se realizó infección de exposición a NDV.

5 Todos los datos de estos experimentos están resumidos en la Tabla 4 y la Figura 6. Los sueros de los pollos inmunizados se analizaron mediante ensayo de HI tres semanas después de la vacunación, pero no se pudieron detectar anticuerpos en suero específicos de HA en ambos casos. Todos los animales de ambos grupos desarrollaron anticuerpos específicos de NDV a altos niveles ya incluso después de la primera inmunización (títulos de HI medios de  $2^6$ - $2^7$ ) los animales estaban completamente protegidos contra una infección por NDV velogénico, mientras que todos los animales de control murieron en el intervalo de 4 días mostrando signos típicos de ND. Como se esperaba, la infección de exposición a AIV provocó enfermedad grave en pollos inmunizados con el Clon 30 de NDV con una tasa de mortalidad del 90%. Los animales del grupo inmunizado con rNDV/AIVH5-A sobrevivieron a una dosis mortal de AIV altamente patógeno, pero todos los pollos mostraron diversos signos de influenza aviar indicando una puntuación clínica de 0,64 una protección significativa aunque parcial. Sin embargo, los pollos inmunizados con rNDV/AIVH5-B estaban completamente protegidos contra cualquier signo de enfermedad después de infección por un virus de la influenza aviar A altamente patógeno.

15 Tabla. 4: resumen de experimentos con animales de rNDV/AIVH5-A y rNDV/AIVH5-B

1. Inmunización	Escala de Tiempo <sup>1)</sup>	rNDV/AIV H5-A oculon.	Pulverización de Clon 30	control oculon.	Escala de Tiempo <sup>1)</sup>	rNDV/AIV H5-B oculon.	oculon. de Clon 30
DIE <sub>50</sub> /animal		10 <sup>5,7</sup>	10 <sup>6,0</sup>	-			10 <sup>6,0</sup>
Mortalidad	1.-10. d pi	0/24	0/34	-	1.-10. d pi	0/5	0/5
Morbilidad	1.-10. d pi	6/24	5/34	-	1.-10. d pi	0/5	0/5
puntuación clínica <sup>2)</sup>		0,034	0,016			0	0
Ac específico de NDV	17 d pi	22/22	34/34	-	21 d pi	5/5	5/5
Título de HI Ø		2 <sup>5,6</sup>	2 <sup>7,2</sup>			2 <sup>5,6</sup>	2 <sup>7,6</sup>
Ac específico de HA	17 d pi	22/22	34/34	-	21 d pi	5/5	5/5
Título de HI Ø		0	0			0	0
2. Inmunización	28 d pi	rNDV/AIV H5-A oculon.	Pulverización de Clon 30	control	28 d pi	rNDV/AIV H5-B oculon.	oculon. de Clon 3
DIE <sub>50</sub> /animal		10 <sup>6,0</sup>	10 <sup>6,0</sup>	-		10 <sup>6,0</sup>	10 <sup>6,0</sup>
Mortalidad	1-10. d pb	0/22	0/24	-	1-10. d pb	0/5	0/5
Morbilidad	1-10. d pb	4/22	3/24	-	1-10. d pb	0/5	0/5
puntuación clínica <sup>2)</sup>		0,023	0,017			0	0
Ac específico de NDV	12 d pb	21/21	24/24	5/5	12 d pb	5/5	5/5
Título de HI Ø		2 <sup>7,3</sup>	2 <sup>6,8</sup>	0		2 <sup>6,0</sup>	2 <sup>7,8</sup>

Ac específico de HA	12 d pb	2/21	24/24	5/5	12 d pb	5/5	5/5
Título de HI Ø		2 <sup>3</sup>	0	0		0	0
Exposición	14 d pb	NDV Herts 33/56					
DIE <sub>50</sub> /animal		10 <sup>5,3</sup>					
Mortalidad	3-4. d pc	0/10	0/10	5/5			
Morbilidad	1-10. d pc	4/10	5/10	5/5			
puntuación clínica <sup>2)</sup>	1.-10. d pc	0,04	0,05	2,4			
Ac específico de NDV	20 d pc	10/10	10/10	†			
Título de HI Ø		2 <sup>8,9</sup>	2 <sup>9,2</sup>				
Exposición	14 d pb	AIV A/ch/Italy/8/98			14 d pb	AIV A/ch/Italy/8/(H5N2)	
DIE <sub>50</sub> /animal		10 <sup>8,0</sup>				10 <sup>7,7</sup>	
Mortalidad	3.-6. d pc	0/10	9/10		3.- 4. d pc	0/5	4/6
Morbilidad	1.-10. d pc	10/10	10/10		1.-10. d pc	0/5	5/5
puntuación clínica <sup>2)</sup>		0,64	2,57			0	2,2
Ac específico de AIV	20 d pc	10/10	1/1		24 d pc	5/5	1/1
Título de HI Ø		2 <sup>6,5</sup>	2 <sup>9,0</sup>			2 <sup>8,0</sup>	2 <sup>11</sup>

Ejemplo 4: Construcción de un vector NDV/AIV-H5 con ncr flanqueante del gen F de NDV

5 Usando esencialmente los mismos métodos y materiales como se ha descrito anteriormente (Engel-Herbet et al., anteriormente) se preparó una construcción de vector de NDV que llevaba el gen de AIV de H5 entre los genes F y HN del plásmido que se ha descrito previamente pflNDV (Rtimer-Oberdarfer et al., anteriormente), pero ahora el inserto de H5 estaba flanqueado por regiones no codificantes del gen F de NDV.

En resumen, las diversas etapas y materiales usados fueron:

10 Un plásmido pUC con el fragmento de 1,6 kb de NotI-PstI de NDVH5 (pUCIRA) se mutó para crear un sitio de enzima de restricción MluI usando los cebadores de mutagénesis: pMPMLUIGRFHNF (5' - ggt tgt aga tga cca aag gac gca tta cgg gta gaa cgg taa gag agg -3'; SEC ID N°: 14) y pMPMLUIGRFHNR (5' cct ctc tta ccg ttc tac ccg taa cgc gtc ctt tgg tca tct aca acc -3'; SEC ID N°: 15) (sitio MluI subrayado, con la secuencia de GS en negrita), dando como resultado el plásmido pUCIRAMLU.

15 Se hibridaron dos oligonucleótidos: OFVOF: 5' - agg acg cgt tac ggg tag aag att ctg gat ccc ggt tgg cgc cct cca ggt gca gca cca tgg ag -3' (SEC ID N°: 16, sitio MluI subrayado) y OFVOR: 5' - ctc cat ggt gct gca cct gga ggg cgc caa ccg gga tcc aga atc ttc tac ccg taa cgc gtc ct -3' (SEC ID N°: 17, sitio Mlu I subrayado). A continuación, éstos se dirigieron con MluI y NcoI.

Digestión del plásmido pUCIRAMLU con MluI y NcoI.

Ligación del fragmento de aproximadamente 4,3 kb de MluI - NcoI de pUCIRAMLU con oligohíbrido OFVOF/OFVOR digerido con MluI-NcoI. El plásmido resultante se denomina pUCIRA2.

5 Un plásmido pUC (pUCAROK) con el fragmento de NotI-BsiWI de NDV con la orf de H5 en lugar de la orf de HN y pUCIRA2 se digirieron con NcoI y SgfI y el fragmento de NotI-NcoI de pUCAROK se substituyó por el de pUCIRA2, dando como resultado el plásmido pUCAROK2.

10 Se realizó HF-PCR (Roche) para amplificar la ncr del gen F de NDV detrás del gen F insertado usando los cebadores: PNCRFHIIHF: 5' - ata ctt aag ttc cct aat agt aat ttg tgt -3' (SEC ID N°: 18, sitio AfIII subrayado) y PNCRFHIR: 5' - cac gca atc gca ttg cca ctg tac att ttt tct taa ctc tct gaa ctg aca gac tac c -3' (SEC ID N°: 19, sitio SgfI subrayado) y el plásmido pUCAROA (pUC con fragmento de NotI-SpeI de NDV). El fragmento resultante de ~ 100 pb se ligó en el vector pGEMTeasy para dar el plásmido pGEMFncrhi.

Se dirigieron los plásmidos pUCAROK2 y pGEMFncrhi con AfIII y SgfI para substituir la ncr de HN detrás de H5 del plásmido pUCAROK2 por la de F de pGEMFncrhi. El plásmido resultante se denominó pUCAROK4.

15 En la última etapa el fragmento de NotI-SgfI del plásmido NDVH5 se substituyó por el de pUCAROK4 dando como resultado el nuevo plásmido de longitud completa E18C, que comprende el gen de H5 de AIV insertado en el vector de NDV entre F y HN y flanqueado por las ncr del gen F.

Con las nuevas construcciones se realizaron experimentos de transfección, propagación de virus rec y confirmación de la recuperación de virus infeccioso como se ha descrito anteriormente. A continuación el virus se caracterizó bioquímica y biológicamente.

20 Ejemplo 5: Generación de otras construcciones de vector de NDV y virus rec:

Usando técnicas similares se prepararon varios insertos diferentes en el vector de NDV usando diferentes genes insertados y diferentes sitios de inserción.

Con los detalles ya proporcionados en este documento éstas pertenecen al alcance de las capacidades del experto en la materia, por lo tanto es suficiente presentar las mismas en forma de tabla:

25 Tabla 5: Otras construcciones de vector de NDV de acuerdo con la invención:

Gen insertado	Región de inserción de NDV	Región ncr flanqueante de NDV
H de AIV	P - M	HN
H5 de AIV	M - F	HN
AIV de H7	F - HN	HN
N1 de AIV	F - HN	HN
H5 de AIV	Delante de NP	HN

Ejemplo 6: Generación de un vector de virus de la Rabia recombinante que expresa un gen de envuelta de EIAV

30 Para demostrar que los efectos ventajosos de la invención (el uso de regiones no codificantes del gen de MV para aumentar la expresión y/o presentación de proteínas extrañas en viriones de MV rec) se expanden más allá de la familia *Paramyxoviridae*, se usó el virus de la rabia -un miembro de la familia *Rhabdoviridae*- como un vector para expresar una proteína de envuelta obtenida de un virus no relacionado, el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV).

35 En este ejemplo se describe la construcción de un virus de vector de la rabia rec que comprende la proteína de envuelta de EIAV insertada entre los genes de la rabia G y L, por lo que el gen env está flanqueado por las ncr del gen de la proteína G de la rabia.

40 Se prepararon subclones de virus de la rabia en el fagémido pBluescript® SK+ usando el clon de longitud completa SAD-D29 (Mebatsion, 2001, J. Virol, vol. 75, págs. 11496-11502), que se denomina en este documento ORA-D. Para preparar un vector de clonación se digirió en primer lugar un vector de pSK con SacI, ligado por extremos romos con enzima Klenow, seguido de digestión con HindIII y purificación en gel del fragmento de ~ 3 kb. El inserto se preparó digiriendo ORA-D con StuI y HindIII, purificando el

fragmento resultante de 1,3 kb y ligando el mismo en el vector pSK preparado para generar el plásmido pNCR-b.

5 El plásmido pNCR-b se digirió con BstXI y HindIII y el fragmento de ~ 4,0 kb se purificó y usó para la ligación con los oligonucleótidos BSSNH+ y BSSNH- (véase la Tabla 6) para crear el plásmido pSSNsc que contiene un casete de transcripción mínimo y ligación con oligonucleótidos RABGNCR1-4 (Tabla 6) para generar la construcción GNCR-b, que contiene regiones no codificantes además de la unidad de transcripción mínima (Figura 7).

10 El gen env de la cepa Wyoming del EIAV se obtuvo mediante amplificación de un gen sintético de 2052 nt que se había optimizado en cuanto a codón, eliminado los sitios de corte y empalme del ARN (Cook, et al., 2005, Vet. Micro., vol. 108, págs. 23-37) y truncado 134 aminoácidos en la región codificante 3' del gen original.

Tabla 6: secuencias de oligonucleótidos usados durante la construcción de virus de rabia rec

Nombre de oligo	SEC ID N°:	Secuencia de oligo (5' -> 3')
BSSNH+	20	CTGGTGAAAAAACTAACACCCCTGCTAGCA
BSSNH-	21	CGTTGACCACTTTTTTTGATTGTGGGGACGA-TCGTTCGA
RABGNCRoligo1 (*)	22	CTGGTGAAAAAACTATTAACATCCCTCAAAA-GACTCAAGGATACGTACT
RABGNCRoligo2	23	GTATCCTTGAGTCTTTTGAGGGATGTTAATAG-TTTTTTTCACCAGTTGC
RABGNCRoligo3	24	GGCCGTCCTTTCAACGATCCAAGTCCTGAAGA-TCACCTCCCCTTGGGGGA
RABGNCRoligo4	25	AGCTTCCCCCAAGGGGAGGTGATCTTCAGGAC-TTGATCGTTGAAAGGACGGCCAGTAC
EIAsynCDF	26	ATGGTGTCCATCGCCTTCTA
EIAsynCDstopR	27	TCAGTGTATGTTGTGTTGGGC
(*) 3 nt cambiados del ORA-D original : GGAAAG GGACTGG, a: GGATAC GTACTGG		

15 El gen env amplificado se sometió a quinasa y se insertó en subclones de la siguiente forma: un amplicón de ~ 2,0 Kb, modificado para representar toda la proteína de envuelta de EIAV truncada se generó usando el conjunto de cebador EIAsynCDF + EIAsynCD-stopR (véase la Tabla 6). El amplicón se insertó en el subclón GNCR-b que se había predigerido con SnaBI y desfosforilado para generar el plásmido recombinante pGNCR-b:envG: El fragmento de ~ 2,0 Kb también se insertó en el subclón SSNsc que se había predigerido con NheI, unido por extremos romos y desfosforilado para generar el plásmido recombinante pSSNsc:env.

20 Cada construcción recombinante se digirió con SphI y HindIII y ligó en el subclón de SSNsc, que se había predigerido con SphI/HindIII y desfosforilado con CIAP. Después de volver al subclón SSNsc, los insertos modificados se devolvieron a la cadena principal de ORA-D mediante digestión con SphI y MluI para generar los virus de la rabia recombinantes RV-env y RV-envG (Figura 8). Los extremos 5' y 3' de las construcciones se verificaron mediante análisis de secuencia usando química de Secuenciación de Terminador de Ciclo Big-Dye® (Applied Biosystems) y se analizaron usando un Secuenciador de Electroforesis Capilar de Applied Biosystems 3100-Avant.

25 La construcción de un clon de ADNc de longitud completa basada en la cepa de la rabia SAD modificada ORA-D y generación de un virus de la rabia recombinante se ha descrito (Schnell et al., 1994, EMBO J., vol. 13, págs. 4195-4203; Mebatsion, 2001, anteriormente). Cada virus de la rabia recombinante se introdujo mediante transfección en células BSR como se ha descrito previamente (Schnell, et al., 1994, anteriormente) usando Mirus Trans-IT-LT1. Tres días post-transfección se recogieron y pasaron células y sobrenadante. Los pases posteriores fueron solamente de sobrenadante usando una moi estimada de 0,5. Cada virus recombinante se pasó un mínimo de cinco veces para verificar la estabilidad.

5 Las células BSR infectadas por rabia recombinante se fijaron ~ 40 horas post-infección. Éstas se analizaron mediante inmunofluorescencia directa usando Globulina Monoclonal Anti-Rabia FITC (FDI Diagnostics Inc.) o usando sueros de caballo policlonales anti-EIAV. En diluciones seriadas de factor 10, la proporción de células infectadas que producen virus de la rabia también se compararon con células infectadas que expresan env de EIAV para controlar la estabilidad del virus y la expresión de antígeno recombinante.

10 Los virus de la rabia recombinantes del pase cinco se inocularon en matraces T-75 con células BSR frescas con una moi de 0,01. 24 horas post infección el medio se cambió a sin suero. Se recogió el sobrenadante y se aclaró mediante centrifugación (10.000 x g) a las 72 horas post-infección. Los sobrenadantes víricos se purificaron mediante gradientes de sacarosa para analizar viriones purificados.

15 Los viriones purificados y la proteína celular infectada total se combinaron con tampón de muestra reductor Laemmli 2x y se pusieron en agua en ebullición durante 5-10 minutos. Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida de Tris-HCL al 10% (Bio-Rad) en Tampón de Procesado de SDS-PAGE 1x. Los geles de SDS-PAGE se procesaron a 20 mA hasta que el frente del colorante estaba cerca o en la parte inferior del gel. Las proteínas separadas se transfirieron a membrana Immobilon-P (PVDF) (IPVH10100, Immobilon) mediante transferencia a 225 mA durante 45 minutos. Las transferencias se incubaron en tampón de bloqueo (PBS-Tween 20 + leche desnatada en polvo al 1%) durante una hora a temperatura ambiente y después se enjuagaron 3 veces durante 5 minutos en PBS-Tween 20. La expresión de rabia se detectó usando sueros policlonales de conejo anti-rabia dirigidos contra la glucoproteína y nucleoproteína de la rabia diluidas 1:20000 y 1:2000, respectivamente, en tampón de bloqueo.

25 Simultáneamente se detectó la expresión de env de EIAV usando sueros de caballo policlonales anti-EIAV diluidos 1:500 en tampón de bloqueo. Se incubaron las transferencias durante una hora a temperatura ambiente y después se enjuagaron 3 veces durante 5 minutos en PBS-Tween 20. Las transferencias se pusieron en conjugado de IgG de cabra anti-conejo marcado con HRP (H+L) (KPL) y conjugado de IgG de cabra anti-caballo marcado con HRP (H+L) (Bethyl Labs), diluido cada uno 1:2000 en tampón de bloqueo e incubado durante una hora a temperatura ambiente. Después las transferencias se enjuagaron 3 x 5 minutos en PBS-Tween 20. Las transferencias se incubaron en sustrato de peroxidasa de membrana TMB (KPL) hasta que el desarrollo fue completo, aproximadamente 1-3 minutos. Las transferencias se pusieron en agua destilada para detener la reacción.

30 Un resultado típico de un experimento de transferencia de Western de este tipo se muestra en la Figura 9 y demuestra la composición proteica de virus de la rabia recombinantes que expresan proteína de envuelta de EIAV.

35 Carril 1: Escalera de PM de amplio intervalo (Bio-Rad);  
 Carril 2: Virus de cadena principal ORA-D;  
 Carril 3: RV-env, que comprende el gen env de EIAV, insertado entre los genes G y L de la rabia, sin ncr flanqueantes  
 Carril 4: RV-envG, que comprende el gen env de EIAV, flanqueado por las regiones ncr de la proteína G del virus de la rabia.

40 Ambos virus de la rabia recombinantes produjeron un título infeccioso comparable y expresaron de forma estable el inserto de gen env de EIAV después de múltiples pases *in vitro*.

45 Sin embargo, a pesar de someter cantidades comparables de viriones a la transferencia de Western, RV-env recombinante, construido de modo habitual (por tanto, sin ncr flanqueantes) mostró solamente una banda muy débil correspondiente a la proteína env de EIAV; mientras que RV-envG de virus recombinante que tenía las regiones no codificantes de proteína G flanqueando la proteína env de EIAV insertada se expresó a una tasa mucho mayor: Figura 9, compárese la banda para la proteína env en los carriles 3 - 4.

50 Ya que las construcciones e insertos de RV-envG y RV-env son por lo demás idénticos, esto es una prueba fuerte de que las regiones no codificantes tienen un efecto positivo en la promoción de un alto nivel de la producción de proteína extraña y presentación inmune.

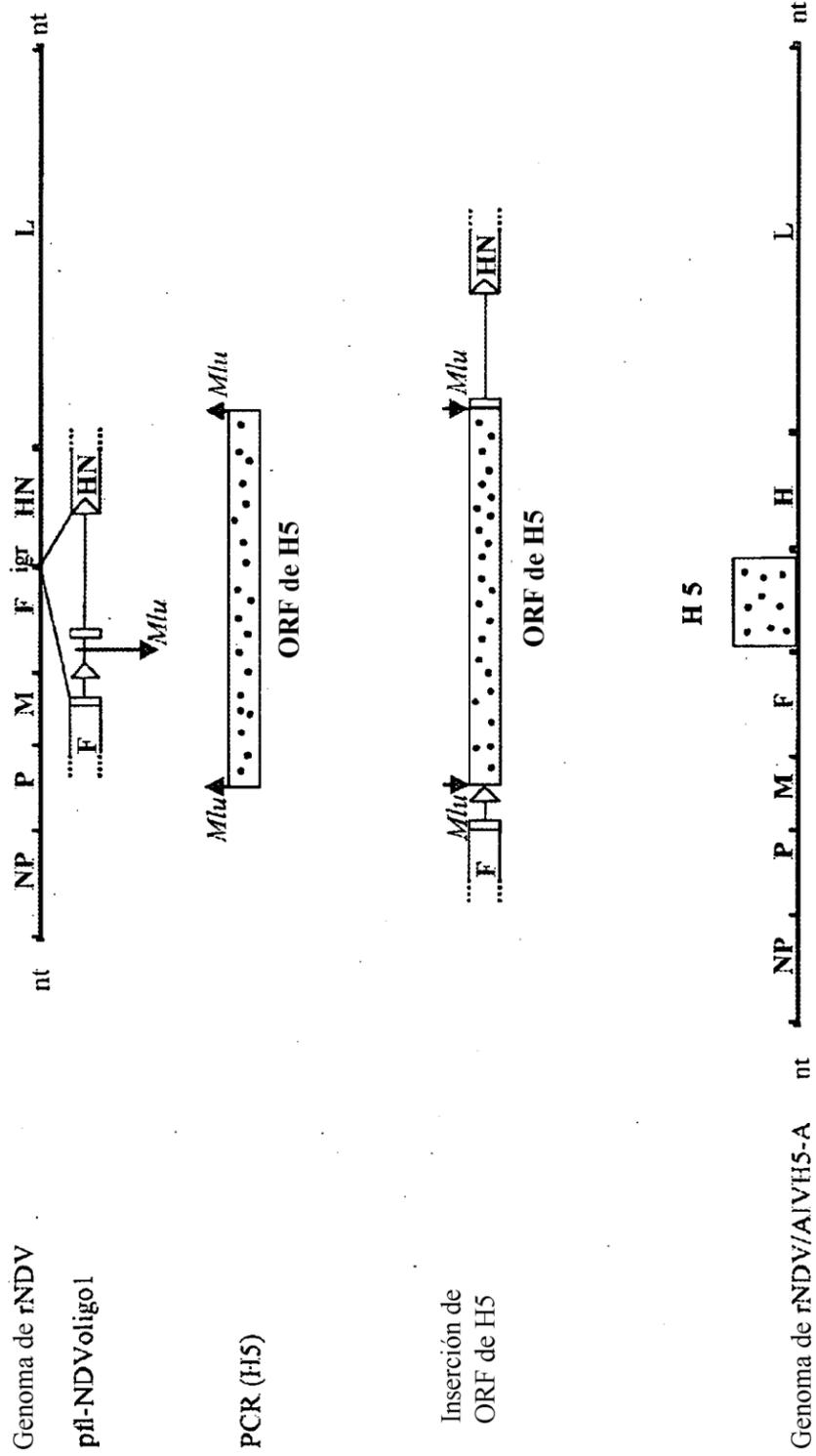
## REIVINDICACIONES

1. Un vector de virus Mononegavirales recombinante que alberga una unidad de transcripción adicional que comprende un gen extraño unido operativamente con una secuencia de inicio de gen (GS) de virus Mononegavirales cadena arriba y una secuencia de fin de gen (GE) de virus Mononegavirales cadena abajo, caracterizado por que entre la secuencia de GS y un codón de inicio del gen extraño y entre un codón de detención del gen extraño y la secuencia de GE están localizadas una región no codificante 3' y una región no codificante 5' (sentido de genoma) de un gen de virus Mononegavirales, respectivamente, donde el gen extraño está flanqueado por las regiones no codificantes 3' y 5'.
2. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que las regiones no codificantes 3' y 5' son de un gen que codifica una proteína de envuelta de un virus Mononegavirales, en particular de un gen M, G, F o HN.
3. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que las regiones no codificantes 3' y 5' son de un gen que codifica una proteína RPN de un virus Mononegavirales.
4. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 1-3, caracterizado por que el gen extraño codifica un antígeno de un patógeno.
5. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 1-3, caracterizado por que el gen extraño codifica un modulador inmune.
6. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 1-5, caracterizado por que el vector de virus Mononegavirales es un virus de la familia Rhabdoviridae.
7. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que el vector de virus Mononegavirales es un virus de la rabia.
8. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que el vector de virus Mononegavirales es un virus de necrosis hematopoyética infecciosa.
9. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 6-8, caracterizado por que las regiones no codificantes 3' y 5' son de un gen N, P, M o G.
10. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 6-9, caracterizado por que la unidad de transcripción adicional está localizada en una posición proximal 3' o entre los genes P-M, M-G o G-L.
11. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 1-5, caracterizado por que el vector de virus Mononegavirales es un virus de la familia Paramyxoviridae.
12. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por que el vector de virus Mononegavirales es un virus de la enfermedad de Newcastle, virus del moquillo canino o virus de parainfluenza (bovina).
13. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 11-12, caracterizado por que las regiones no codificantes 3' y 5' son de un gen NP, P, M, F o HN.
14. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 11-13, caracterizado por que la unidad de transcripción adicional está localizada en una posición proximal 3' o entre los genes P-M, M-F, F-HN o HN-L.
15. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 11-14, caracterizado por que el vector de virus Mononegavirales es el virus de la enfermedad de Newcastle.
16. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado por que la unidad de transcripción adicional está localizada entre los genes F-HN.
17. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 15-16, caracterizado por que las regiones no codificantes son de un gen HN.
18. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 15-17, caracterizado por que el gen extraño codifica un antígeno de un patógeno aviar.

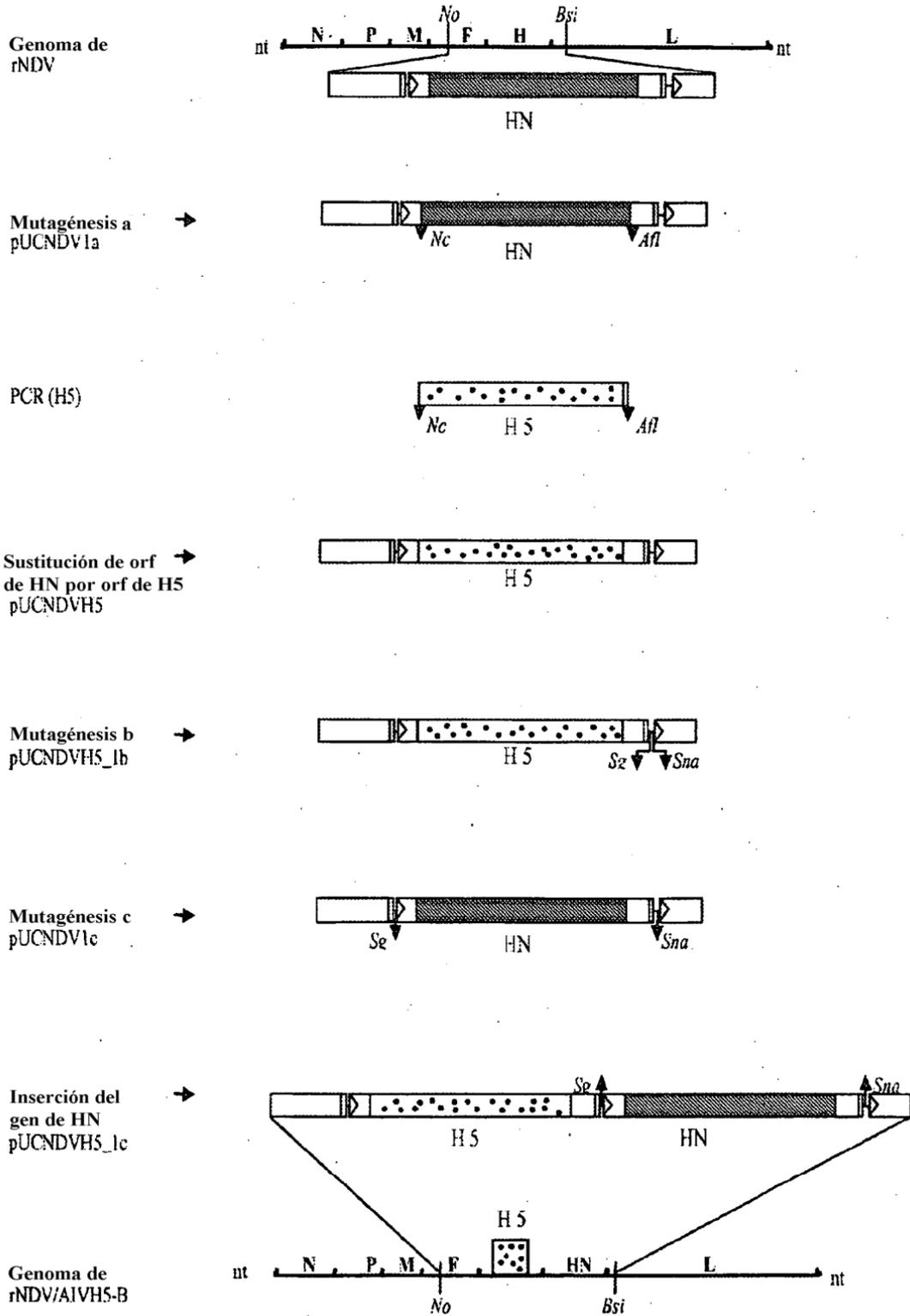
19. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con la reivindicación 15-18, caracterizado por que el gen extraño codifica una hemaglutinina (HA) de un virus de influenza, preferiblemente una hemaglutinina H5 o H7.
- 5 20. Un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 1-19, caracterizado por que el vector de virus Mononegavirales es un virus atenuado.
21. Una vacuna contra un patógeno microbiano, caracterizada por que comprende un vector de virus Mononegavirales recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 1-20 en una forma viva o inactivada y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 10 22. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 21, caracterizada por que comprende adicionalmente un adyuvante.
23. Una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 21-22, caracterizada por que comprende una cepa de vacuna adicional.

**FIG. 1A**

Construcción de rNDV/AIVH5-A

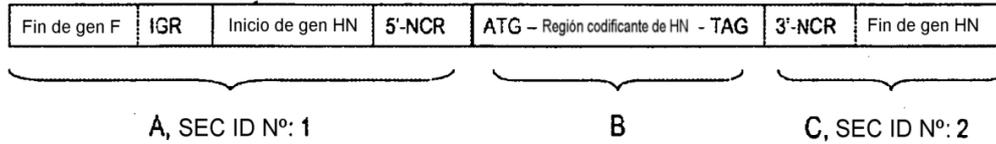


**FIG. 1B** Construcción de rNDV/AIVH5-B



## FIG. 2A

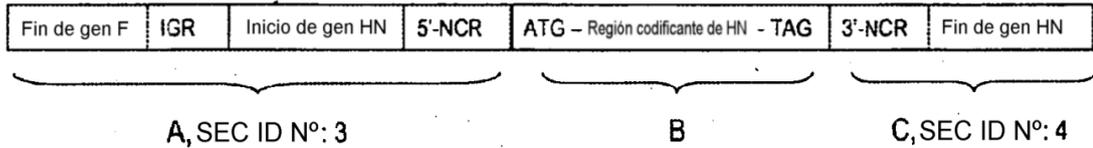
Secuencias flanqueantes de HN del Clon 30 de NDV



	[Fin de gen F]	[IGR]	[Inicio de gen HN]
A	1 <u>TTAAGAAAA</u> ACTACCGGT GTAGATGACC AAAGGACGAT ATACGGGTAG		
	51 <u>AACGGTAAGA</u> GAGCCGCCCTCTCAATTGGC AGCCAGGCTT CACAACCTCC		
	101 GTTCTACCGC TTCACCGACA ACAGTCCTCA ATC		
		[5' -NCR]	
B	- ATG – [Región codificante de HN] – TAG -		
		[3' -NCR]	
C	1 TTGAGTCAAT TATAAAGGAG TTGGAAAGAT GGCATTGTAT CACCIATCIT		
	51 CTGGACATC AAGAATCAAA CCGAATGCCG GCGCGTGCTC GAATTCATG		
	101 TTGCCAGITG ACCACAATCA GCCAGTGCTC ATGCGATCAG ATTAAGCCTT		
	151 GTCAATAGTC ICTTGATTAA <u>GAAAAA</u>		
		[Fin de gen HN]	

## FIG. 2B

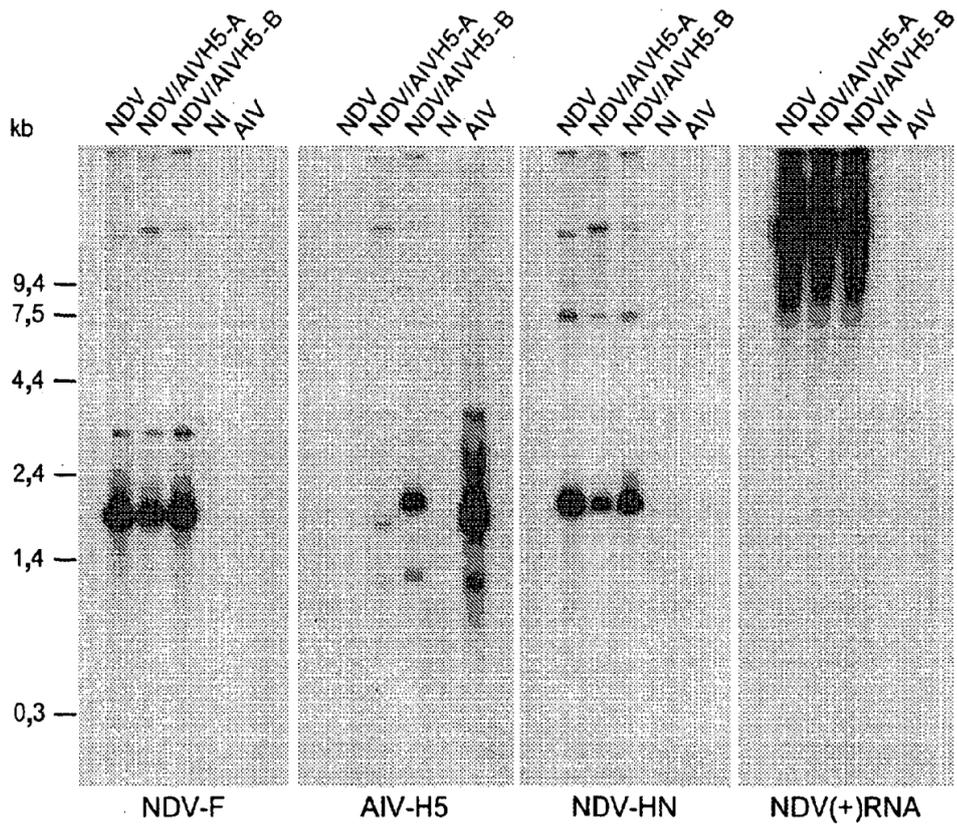
rNDV con inserto de gen H5 de AIV y secuencias flanqueantes de HN-NDV



	[Fin de gen F]	[IGR]	[Inicio de gen HN]
A	1 <u>TTAAGAAAA</u> ACTACCGGT 51 <u>AACGGTAAGA</u> GAGGCCGCC 101 GTTCTACCGC TTCACCGACA ACAGTCTCA ACC	GTAGATGACC AAAGGACGAT CTCAATTGCG AGCCAGGCTT	ATACGGGTAG CACAACCTCC
		[5' -NCR]	
B	- ATG – [Región codificante de HN] – TAG -		
		[3' -NCR]	
C	1 TTGAGTCAAT <u>TCTAAGGGAG</u> TTGAAAGAT GCCATTGTAT CACCTATCTT 51 CTGCGACATC AAGAATCAAA CCGAATGCCG GCGCGTGCTC GAATTCCATG 101 TTGCCAGTTG ACCACAATCA GCCAGTGCTC ATGCGATCAG APTAAGCCTT 151 GTCAATAGTC TCTTGATTA <u>GAAAAA</u>		
		[Fin de gen HN]	

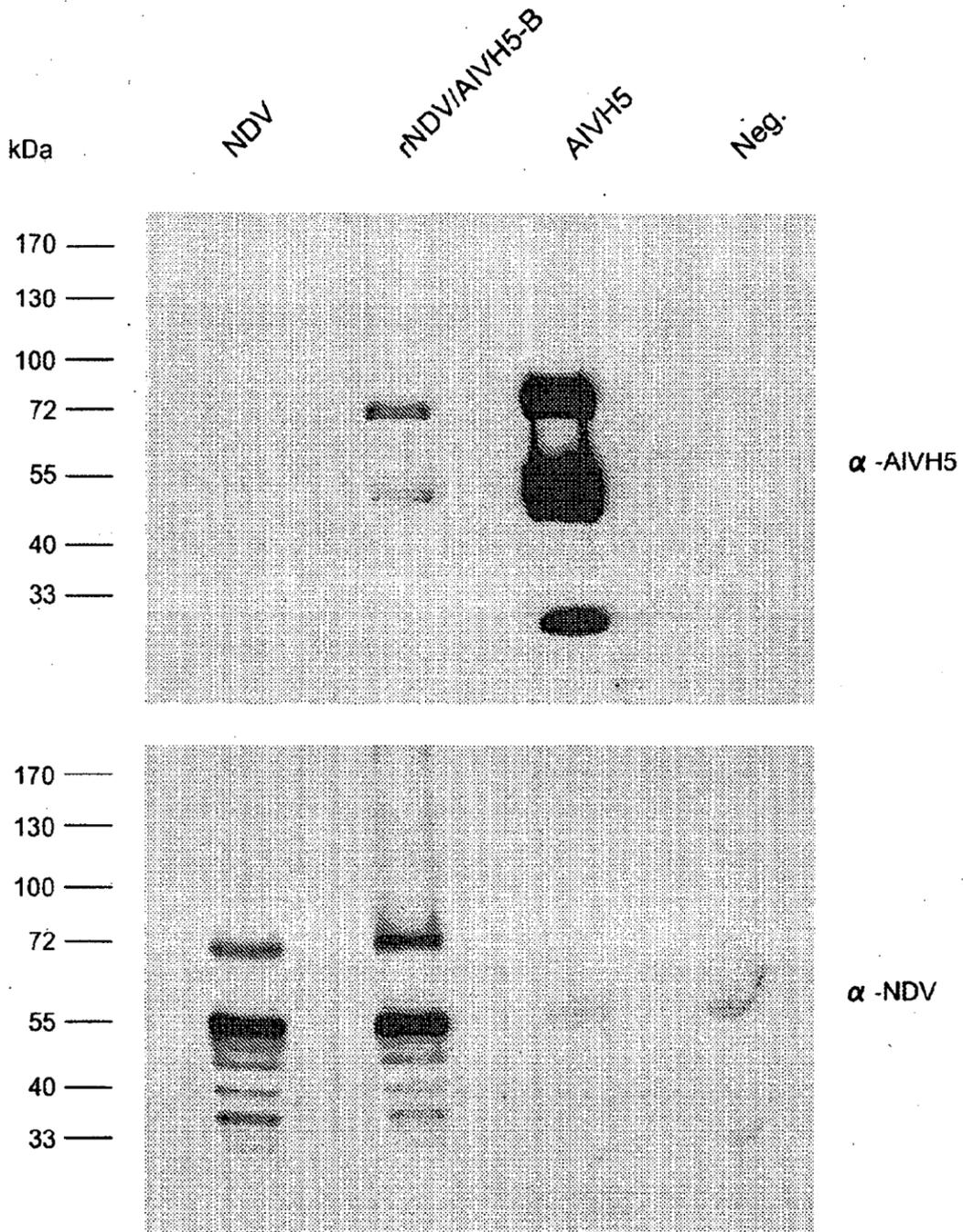
**FIG. 3**

Transferencia de Northern



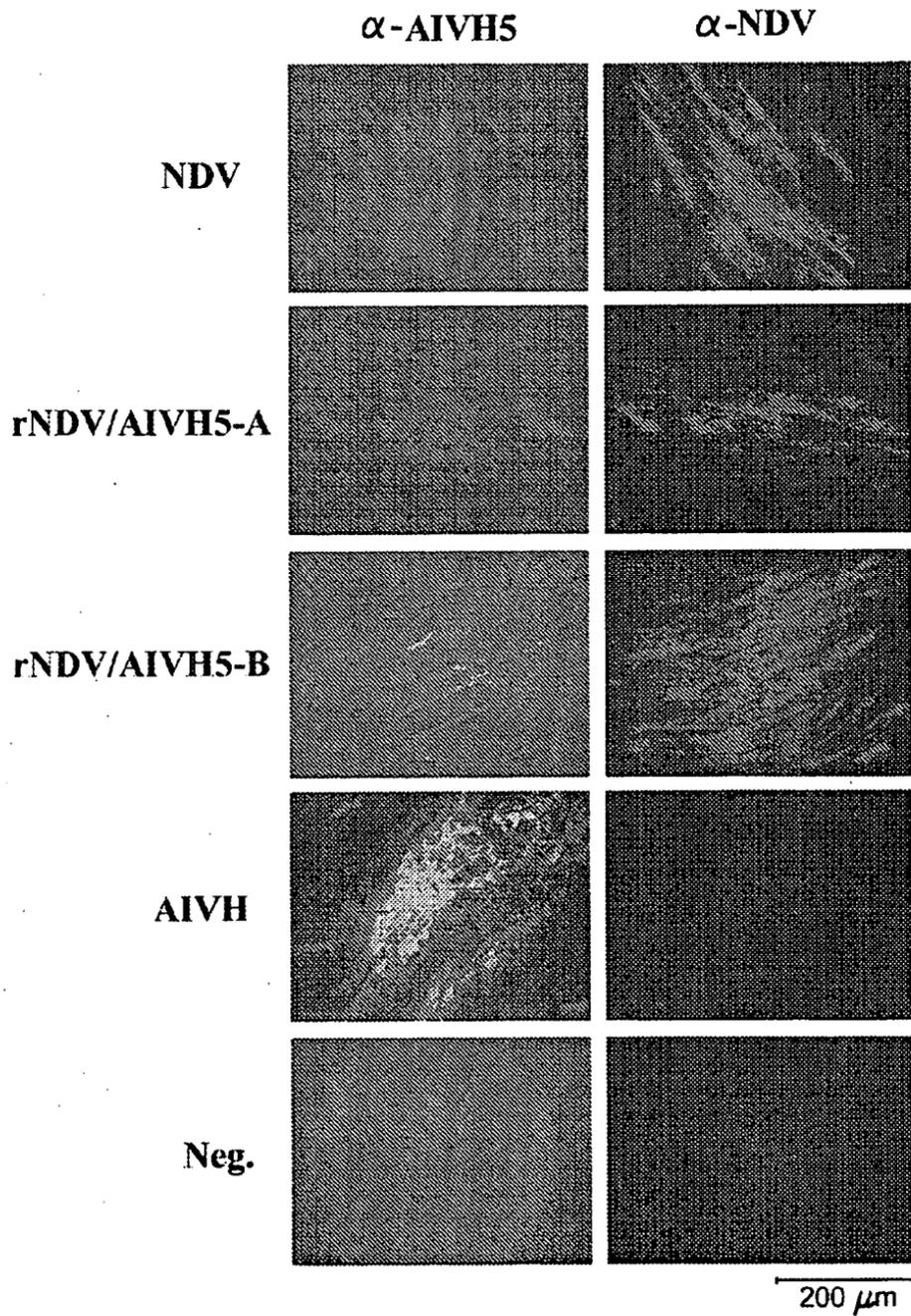
### FIG. 4

Transferencia de Western



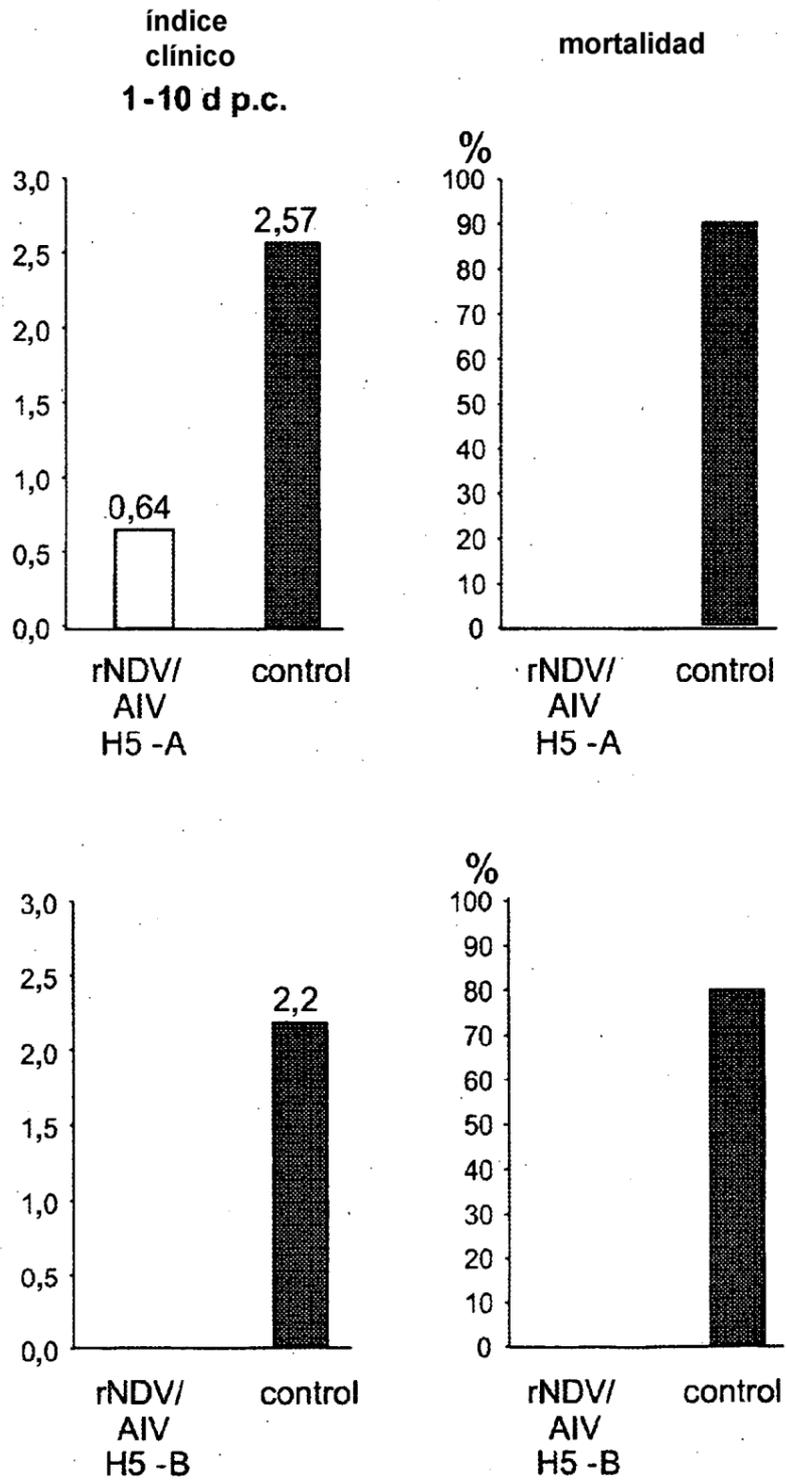
**FIG. 5**

Ensayo de IF



### FIG. 6

Índices clínicos y tasas de mortalidad



# FIG. 7

Regiones de clonación de construcciones de GNCR/SSN

Región de clonación de SSNsc

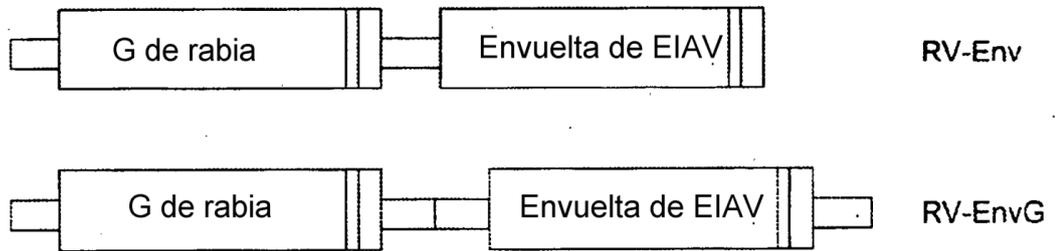
<u>BstXI</u>	<u>Ts DELECCIÓN</u>	<u>IG</u>	<u>Ts INICIO</u>	<u>NheI</u>	<u>HindIII</u>
	CTGG	TGAAAAAA	CT	AACACCCCT	GCTAGC A
	CGT	TGACC	ACTTTTTT	GA	TTGTGGGA CGATCG TTCGA

Región de clonación de GNCR-b

<u>BstXI</u>	<u>Ts DELECCIÓN</u>	<u>IG</u>	<u>Ts INICIO</u>	<u>5'-NCR</u>	<u>SnaBI</u>
5' -	CTGG	TGAAAAAA	CTATT	AACATCCCT	CAAAGACTCAAGGATAC GTACT
3' -	CGTTGACC	ACTTTTTT	GATAA	TTGTAGGA	GTTTCTGAGTTCCCTATG
	<u>-SnaBI</u>		<u>3'-NCR</u>		<u>HindIII</u>
5' -		GGCCGT	CCTTCAAGATCCAAGTCCCTGAAGATCACCTCCCTTGGGG A		
3' -	CATGACCGCA	GGAAAGTTGCTAGGTTCCAGGACTTCTAGTGGAGGGGAACCCCC	TTCGA		

# FIG. 8

Resumen de Construcciones de Rabia/EIAV Recombinantes



# FIG. 9

Transferencia de Western de viriones purificados de rabia- EIAVenv

