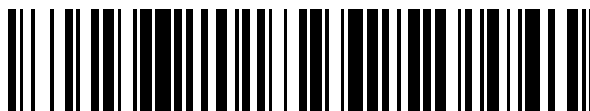


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 514**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/34** (2006.01)

**C12P 21/06** (2006.01)

**G01N 33/567** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2007 E 07760860 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2016194**

54 Título: **Métodos y composiciones para expresar ARN viral de sentido negativo en células de canino**

30 Prioridad:

**19.04.2006 US 793522 P**

**19.04.2006 US 793525 P**

**20.06.2006 WO PCT/US2006/023867**

**20.06.2006 US 455734**

**09.08.2006 US 501067**

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

**01.07.2015**

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)  
ONE MEDIMMUNE WAY  
GAITHERSBURG, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**DUKE, GREGORY;  
KEMBLE, GEORGE;  
WANG, ZHAOTI y  
YOUNG, JAMES**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 539 514 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para expresar ARN viral de sentido negativo en células de canino

## 5 1. Campo de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende un promotor de ARN polimerasa I canina, tal como se define en las reivindicaciones. En otros aspectos, la invención proporciona vectores de expresión y células que comprenden dichos ácidos nucleicos, así como métodos para usar dichos ácidos nucleicos para producir virus de la gripe, incluyendo virus de la gripe infecciosos.

## 2. Antecedentes

Las pandemias de la gripe se definen por un aumento global dramático en la morbilidad y mortalidad debido a la enfermedad de la gripe. Varios factores se combinan para modular la gravedad y el alcance de la pandemia, incluyendo el bajo grado de inmunidad en la población y la eficacia con la que el virus puede transmitirse entre seres humanos. Esto último está influenciado generalmente no solo por el virus en sí, sino por la densidad de población y la facilidad para viajar dentro y fuera de una región. El virus responsable de la pandemia es generalmente una variante antigénica de reciente aparición con la que la mayoría de la población no ha tenido experiencia previa y para la que, por lo tanto, tienen poca o ninguna inmunidad. Además, la transmisión eficaz de humano a humano es un requisito previo para su rápida difusión y, en el caso de la introducción zoonótica de virus de animales en poblaciones humanas, el virus tiene que adaptarse a la replicación en seres humanos y ser capaz de una transmisión eficiente.

Las pandemias de gripe se extienden muy rápidamente y pueden tener un impacto devastador. La pandemia más grave del siglo XX, la pandemia de 1918, mató más de 500.000 de ciudadanos de los Estados Unidos y de 20 a 40 millones de personas en todo el mundo. La pandemia puede producir oleadas de la enfermedad, con picos de incidencia separados por varias semanas hasta meses. La aparición y dispersión relativamente rápida de la gripe pandémica presenta varios problemas para responder a un ataque global de esta magnitud, e impone cargas abrumadoras en los servicios de emergencia y en los trabajadores de la salud. La identificación y respuesta rápida a la pandemia emergente es claramente un elemento necesario de la solución; actualmente hay varios programas funcionando en todo el mundo para controlar la aparición de los virus de la gripe, incluyendo los virus de la gripe aviar que de manera infrecuente causan enfermedad en los seres humanos. Estos datos de vigilancia se usan de manera conjunta con los niveles de alerta de pandemia predefinidos para identificar la probabilidad de la amenaza y para proporcionar orientación para una respuesta eficaz.

La vacunación es la medida de salud pública más importante para prevenir la enfermedad causada por las epidemias anuales de gripe. El corto intervalo entre la identificación de una potencial pandemia y la aparición de niveles de enfermedad aumentados de manera significativa presenta desafíos significativos para producir vacunas suficientes como para proteger a un gran segmento de la población. Tener la tecnología de vacunas y la infraestructura de fabricación disponible antes de la aparición de la siguiente pandemia será crítico para mejorar una cantidad significativa de enfermedad y muertes. Los cortos tiempos de respuesta necesarios para producir una "vacuna pandémica" no permitirán que se lleve a cabo una investigación o desarrollo de procesos para proporcionar una respuesta eficaz.

Hasta la fecha, todas las vacunas comerciales para la gripe para cepas no pandémicas en los Estados Unidos se han propagado en huevos de gallina embrionados. Aunque el virus de la gripe crece bien en los huevos de gallina, la producción de vacuna depende la disponibilidad de huevos. Deben organizarse los suministros de huevos, y seleccionarse las cepas para vacunación meses antes de la siguiente temporada de gripe, limitando la flexibilidad de esta estrategia, y dando a menudo como resultado retrasos y escasez en la producción y distribución. Desafortunadamente, algunas cepas de vacuna de gripe, tales como el prototipo de cepa A/Fujian/411/02 que circuló durante la temporada 2003-04, no se replica bien en huevos de gallina embrionados, y tiene que aislarse mediante cultivo celular en un procedimiento costoso y laborioso.

Los sistemas para producir virus de la gripe en cultivo celular también se han desarrollado en los últimos años (véase, *por ejemplo*, Furminger. Vaccine Production, en Nicholson et al. (eds) Textbook of Influenza págs. 324-332; Merten et al. (1996) Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation, en Cohen & Shafferman (eds) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines* págs. 141-151). Típicamente, estos métodos implican la infección de células hospedadoras inmortalizadas adecuadas con una cepa seleccionada del virus. Aunque se eliminan muchas de las dificultades relacionadas con la producción de vacunas en huevos de gallina, no todas las cepas patogénicas de gripe crecen bien y pueden producirse de acuerdo con los métodos de cultivo tisular establecidos. Además, muchas cepas con características deseables, por ejemplo, atenuación, sensibilidad a la temperatura y adaptación fría, adecuadas para la producción de vacunas atenuadas vivas, no han crecido satisfactoriamente en cultivo tisular usando métodos establecidos.

65

Además de los métodos basados en cultivo celular que se basan en infectar el cultivo celular con virus vivo, se han producido virus de la gripe completamente infecciosos en cultivo celular usando tecnología de ADN recombinante. La producción de virus de la gripe a partir de ADN recombinante aumenta significativamente la flexibilidad y utilidad de los métodos de cultivo tisular para la producción de vacunas de la gripe. Recientemente, se han comunicado sistemas para producir virus de la gripe A y B a partir de plásmidos recombinantes que incorporan ADNc que codifican el genoma viral. Véase, *por ejemplo*, Neumann et al. (1999) Generation of influenza A virus entirely from cloned cDNAs. Proc Natl Acad Sci USA 96:9345-9350; Fodor et al. (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. J. Virol 73:9679-9682; Hoffmann et al. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids Proc Natl Acad Sci USA 97:6108-6113; documento WO 01/83794; Hoffmann y Webster (2000), Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids, 81:2843-2847; Hoffmann et al. (2002), Rescue of influenza B viruses from 8 plasmids, 99(17): 11411-11416; Patentes de los Estados Unidos N° 6.649.372 y 6.951.754; Publicaciones de los Estados Unidos N° 20050003349 y 20050037487. Estos sistemas, a menudo citados como "rescate de plásmido", ofrecen el potencial para producir virus recombinantes que expresan las proteínas HA y NA inmunógenas de cualquier cepa seleccionada.

Sin embargo, estos métodos recombinantes se basan en el uso de vectores que comprenden elementos reguladores de ARN polimerasa I (ARN pol I) para dirigir la transcripción del ARNr genómico viral. Dichos elementos reguladores son necesarios para producir los extremos 5' y 3' definidos del ARN genómico de la gripe de tal forma que pueda producirse un virus de la gripe plenamente infeccioso. Los sistemas recombinantes actuales, tales como los descritos anteriormente, usan el sistema regulador de la ARN pol I humana para expresar el ARN viral. Debido a la especificidad de especie del promotor de la ARN pol I, estos elementos reguladores solo están activos en células de ser humano o de primate. Por lo tanto, el rescate de plásmidos de virus de la gripe solo ha sido posible hasta la fecha transfecando plásmidos adecuados en células de ser humano o de primate.

Además, dichas células de ser humano o de primate no producen frecuentemente el título suficiente del virus necesario para producir vacunas. Sin embargo, las células de riñón canino Madin-Darby (células MDCK) pueden usarse para replicar cepas de vacunación a un título suficiente como para fabricar vacunas comerciales. Por lo tanto, la producción de una vacuna de la gripe que use rescate de plásmido requiere actualmente el uso de al menos dos cultivos celulares diferentes. La identificación y clonación de las secuencias reguladoras de la ARN pol I canina podría permitir el que el rescate de plásmidos se llevase a cabo en el mismo cultivo celular que la replicación viral, eliminando la necesidad de un cultivo de rescate separado. Como tal, sigue habiendo una necesidad para la identificación y clonación de elementos reguladores de la ARN pol I canina que puedan utilizarse para construir vectores adecuados para el rescate de plásmido en células MDCK y otras células caninas. La presente invención proporciona estas y otras necesidades no satisfechas.

La cita o discusión de una referencia en el presente documento no debe interpretarse como la admisión de que tal es técnica anterior para la presente invención. Además, la cita de una patente no debe entenderse como una admisión de su validez.

La presente invención está definida por las reivindicaciones. En más detalle, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende un promotor de la ARN polimerasa I canina, en el que el ácido nucleico comprende (a) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 26, (b) un fragmento funcionalmente activo del polinucleótido definido en (a) que comprende al menos 250, o al menos 350, o al menos 450 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 26, o (c) un polinucleótido que tiene al menos un 99 % de identidad con el polinucleótido definido en (a). También está abarcado por la presente invención un método para producir un virus de la gripe recombinante, que comprende i) introducir en una población de células caninas vectores de expresión a) que expresan en dichas células segmentos de ARNv genómico para proporcionar los segmentos de ARNv genómicos completos de dicho virus, en el que uno o más de dichos vectores de expresión comprenden un ácido nucleico promotor de la ARN polimerasa I canina de acuerdo con la reivindicación 1, y b) también en dichas células ARNm que codifica uno o más polipéptidos de la gripe seleccionados del grupo que consiste en: proteína básica de polimerasa 2 (PB2), proteína básica de polimerasa 1 (PB1), proteína ácida de polimerasa (PA), hemaglutinina (HA), nucleoproteína (NP), neuraminidasa (NA), proteína de matriz 1 (M1), proteína de matriz 2 (M2), proteína no estructural 1 (NS1), y proteína no estructural 2 (NS2); y ii) cultivar dichas células produciéndose de este modo partículas virales de la gripe. La invención además se refiere al vector de expresión pAD4000 expuesto como SEC ID N°: 29.

### 3. Resumen

En el presente documento se divulgan ácidos nucleicos que comprenden elementos reguladores que pueden usarse para expresar, por ejemplo, ARN genómico de la gripe en células caninas. En el presente documento se describen composiciones, tales como ácidos nucleicos aislados, vectores y células que comprenden las secuencias reguladoras caninas descritas en el presente documento, y métodos de uso de las mismas.

Por consiguiente, en determinados aspectos, los ácidos nucleicos aislados descritos en el presente documento comprenden una secuencia reguladora de ARN polimerasa I (pol I) canina. La secuencia reguladora puede

comprender un promotor. La secuencia reguladora puede comprender un potenciador. La secuencia reguladora puede comprender tanto un promotor como un potenciador. La secuencia reguladora puede comprender los nucleótidos -250 a -1 (en relación al primer nucleótido transcrito a partir del promotor, también conocido como el nucleótido +1) del correspondiente promotor nativo o un derivado funcional del mismo. La secuencia reguladora puede estar unida operativamente a un ADN viral, *por ejemplo*, un ADNc viral clonado. El ADNc viral clonado puede codificar ARN viral de un virus de hebra positiva o negativa o el correspondiente ARNc. El ADNc viral clonado puede codificar ARN viral genómico (o el ARNc correspondiente) de un virus de la gripe-

Los ácidos nucleicos aislados descritos en el presente documento comprenden una secuencia reguladora de ARN polimerasa I canina y una secuencia de terminación transcripcional. La secuencia de terminación transcripcional puede ser una secuencia de terminación de ARN polimerasa I. La secuencia de terminación transcripcional puede ser una secuencia de terminación de pol I humana, de mono, o canina.

En el presente documento se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende un promotor de ARN pol I canina. Preferentemente, el promotor de ARN pol I canina está unido operativamente a un ácido nucleico que se va a transcribir, tales como, *por ejemplo*, un ARN genómico de la gripe. La introducción del ácido nucleico en una célula canina puede dar como resultado la transcripción del ARN genómico de la gripe, y, en presencia de proteínas adecuadas de la gripe, puede empaquetarse el transcrito aislado de ARN en un virus de la gripe infeccioso. Se proporcionan ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia reguladora de ARN canino descrita en el presente documento (por ejemplo, un promotor de ARN pol I canina), en el que la secuencia reguladora está unida operativamente a un ácido nucleico que se va a transcribir y se transcribe, en presencia de proteínas adecuadas (por ejemplo, un complejo RNP en el caso de un ácido nucleico que codifica un segmento de ARNv de la gripe) *in vitro* o *in vivo*. El ácido nucleico unido operativamente a dicha secuencia reguladora puede ser un segmento de ARNv de la gripe.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento comprenden una secuencia polinucleotídica o un fragmento funcionalmente activo de la misma, *por ejemplo*, una secuencia reguladora de la ARN pol I canina, que se une a un polipéptido de pol I de ser humano, de primate, de ratón o canino y es al menos un 100 % o aproximadamente un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, o un 65 % idéntica a una o más secuencias nucleotídicas seleccionadas del grupo que consiste en: las SEC ID N°: 1-28. La secuencia polinucleotídica o un fragmento funcionalmente activo de la misma puede mantener además la capacidad para iniciar la transcripción, en presencia de polipéptidos adecuados (por ejemplo, polipéptidos de pol I de ser humano, de primate, de ratón o caninos), de una segunda secuencia polinucleotídica unida operativamente a la secuencia nucleotídica. Los "fragmentos funcionalmente activos" de los ácidos nucleicos expuestos en las SEC ID N°: 1-28 pueden retener una o más actividades funcionales descritas en el presente documento de las secuencias de longitud completa de las SEC ID N°: 1-28. Por ejemplo, se proporcionan fragmentos funcionalmente activos de la secuencia reguladora expuesta como SEC ID N°: 1 por los que se une operativamente el fragmento de secuencia reguladora a un ácido nucleico que se va a transcribir y, en presencia de proteínas adecuadas *in vitro* o *in vivo*, se transcribe.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento comprenden una secuencia polinucleotídica o un fragmento de la misma, *por ejemplo*, una secuencia reguladora de la ARN pol I canina, que se une a un polipéptido de pol I de ser humano, de primate, de ratón o canino y/o es un 100 % o al menos o aproximadamente un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, o un 65 % idéntica a una o más secuencias nucleotídicas seleccionadas del grupo que consiste en: las SEC ID N°: 1-28. La secuencia polinucleotídica o un fragmento de la misma puede mantener además la capacidad para iniciar la transcripción, en presencia de polipéptidos adecuados (por ejemplo, polipéptidos de pol I de ser humano, de primate, de ratón o caninos), de una segunda secuencia polinucleotídica unida operativamente a la secuencia nucleotídica.

Los ácidos nucleicos aislados descritos en el presente documento pueden comprender una secuencia reguladora de ARN polimerasa I canina y una secuencia de ribozima. Esta puede ser, *por ejemplo*, la secuencia de ribozima genómica del virus de la hepatitis delta o un derivado funcional de la misma.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden codificar ARN viral de cualquier virus de ARN de hebra negativa conocido por un experto en la materia, sin limitación. El ARN viral puede codificar ARN viral genómico de un virus del orden Mononegavirales. El ARN viral puede codificar ARN viral genómico de un virus de la familia Paramyxoviridae, Pneumovirinae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Bornaviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, o Arenaviridae. El ARN viral puede codificar ARN viral genómico de un virus del género Respirovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, Henipavirus, Avulavirus, Pneumovirus, Metapneumovirus, Vesiculovirus, Lyssavirus, Ephemerovirus, Cytorhabdovirus, Nucleorhabdovirus, Novirhabdovirus, Marburgvirus, Ebolavirus, Bomavirus, Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Thogotovirus, Isavirus, Orthobunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, Phlebovirus, Tospovirus, Arenavirus, Ophiovirus, Tenuivirus, o Deltavirus. En determinadas realizaciones, el ARN viral codifica ARN genómico viral de un virus seleccionado del grupo que consiste en virus de Sendai, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de Hendra, virus de la enfermedad de Newcastle, virus respiratorio sincitial humano, neumovirus aviar, virus Indiana de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus de la fiebre efímera bovina, virus del amarillamiento necrótico de la lechuga, virus del enanismo amarillo de la patata, virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, *Lake Victoria marburgvirus*, *Zaire ebolavirus*, virus de la enfermedad de Boma, virus de

la gripe A, virus de la gripe B, virus de la gripe C, virus de Thogoto, virus de la anemia infecciosa del salmón, virus de Bunyamwera, virus de Hantaan, virus de Dugbe, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus del bronceado del tomate, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus de la psorosis de los cítricos, virus del rayado del arroz, y virus de la hepatitis delta.

5 En el presente documento se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de la invención. El vector puede ser un vector de expresión. El vector puede comprender un origen de replicación bacteriano. El vector puede comprender un origen de replicación de eucariota. El vector puede comprender un marcador de selección que puede seleccionarse en una célula procariota. El vector puede comprender un marcador de selección que puede seleccionarse en una célula eucariota. El vector puede comprender un sitio de clonación múltiple. El sitio de clonación múltiple puede orientarse en relación a la secuencia reguladora de la ARN polimerasa I canina para permitir la transcripción de la secuencia polinucleotídica introducida en el sitio de clonación múltiple de la secuencia reguladora. El vector puede comprender una secuencia polinucleotídica que puede expresarse en células caninas, por ejemplo, en células MDCK.

15 En el presente documento se proporcionan vectores de expresión que son útiles para rescatar por medios recombinantes un virus de un cultivo celular, por ejemplo, cultivos de células MDCK. En general, los vectores son útiles para rescatar cualquier virus conocido para un experto en la materia para requerir producción de ARN con límites definidos durante su ciclo vital. Dichos virus incluyen, pero sin limitación, virus de ADN de hebra de sentido negativo, tales como los descritos anteriormente. Preferentemente, el virus es un virus de la gripe, *por ejemplo*, un virus de la gripe A, de la gripe B, o de la gripe C.

20 Uno o más de los vectores descritos en el presente documento pueden comprender además una secuencia de terminación de la transcripción. La secuencia de terminación de la transcripción puede seleccionarse del grupo que consiste en una secuencia de terminación de la transcripción de una ARN polimerasa I, una secuencia de terminación de la transcripción de una ARN polimerasa II, una secuencia de terminación de la transcripción de una ARN polimerasa III, y una ribozima.

25 Los vectores de expresión pueden ser vectores de expresión unidireccionales. Los vectores de expresión pueden ser vectores de expresión bidireccionales. Los vectores de expresión bidireccionales descritos en el presente documento incorporan un primer promotor insertado entre un segundo promotor y un sitio de poliadenilación, por ejemplo, un sitio de poliadenilación de SV40. El primer promotor puede ser un promotor de ARN pol I canina. El segundo promotor puede ser un promotor de ARN pol I canina. El primer promotor y el segundo promotor pueden situarse en orientaciones opuestas flanqueando a al menos un sitio de clonación.

30 Los vectores de expresión pueden comprender una secuencia de ribozima o una secuencia de terminación de la transcripción 3' de al menos un sitio de clonación en relación al promotor de ARN pol I canina. Los vectores de expresión pueden comprender una secuencia de ribozima o una secuencia de terminación 3' de al menos un sitio de clonación en relación al promotor de ARN pol I canina, de tal forma que pueda sintetizarse el ARNv intracelularmente con extremos 5' y 3' exactos.

35 En los vectores de expresión bidireccionales descritos en el presente documento, se localiza un gen o un ADNc entre un promotor de pol II cadena arriba y una secuencia reguladora de pol I canina cadena abajo (por ejemplo, un promotor de pol I) descrito en el presente documento. La transcripción del gen o ADNc a partir del promotor de pol II produce ARNm viral de sentido positivo tapado y la transcripción a partir de la secuencia reguladora de pol I canina produce ARNv de sentido negativo sin tapar. Como alternativa, en un sistema de vector unidireccional descrito en el presente documento, el gen o ADNc se localiza cadena abajo de un promotor de pol I y de pol II. El promotor de pol II produce ARNm viral de sentido positivo tapado y el promotor de pol I produce ARNc viral de sentido positivo sin tapar.

40 En el presente documento se proporciona una composición que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis o diecisiete vectores, en la que los vectores comprenden uno o más ácidos nucleicos descritos en el presente documento (por ejemplo, una secuencia reguladora de pol I canina descrita en el presente documento) unida operativamente a ADNc viral, por ejemplo, ADNc viral de la gripe.

45 Uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, o más de doce de los vectores descritos en el presente documento pueden estar presentes en un solo plásmido. Al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, o doce de los vectores pueden estar presentes en un plásmido separado. Cada vector puede estar en un plásmido separado.

50 Los vectores pueden ser vectores de expresión bidireccionales. Un vector de expresión bidireccional descrito en el presente documento incluye típicamente un primer promotor y un segundo promotor, en el que el primer y el segundo promotor están unidos operativamente a hebras alternas del mismo ADNc bicatenario que codifica el ácido nucleico viral, incluyendo un segmento del genoma viral de la gripe. En general, al menos uno de estos promotores es un promotor de ARN pol I canina. Opcionalmente, el vector de expresión bidireccional puede incluir una señal de

poliadenilación y/o una secuencia de terminación. Por ejemplo, la señal de poliadenilación y/o la secuencia de terminación pueden estar localizadas flanqueando a un segmento del genoma del virus de la gripe interno a los dos promotores. Una señal de poliadenilación favorable es una señal de poliadenilación de SV40.

5 En el presente documento se describe un sistema de expresión basado en plásmidos bidireccionales y un sistema de expresión basado en plásmidos unidireccionales, en el que el ADNc se inserta entre una secuencia reguladora de pol I canina (por ejemplo, un promotor de pol I) descrita en el presente documento y secuencias de terminación (unidad de transcripción interna). Esta unidad de traducción interna está flanqueada por un promotor de ARN polimerasa II (pol II) y un sitio de poliadenilación (unidad de transcripción externa). En el sistema unidireccional, los  
10 promotores de pol I y pol II se encuentran cadena arriba del ADNc y producen ARNc tapado de sentido positivo (a partir del promotor de pol I) y ARNm tapado de sentido positivo tapado (a partir del promotor de pol II). Se puede decir que el promotor de pol I, la secuencia de terminación de pol I, el promotor de pol II y la señal de poliadenilación en el sistema unidireccional comprenden una "orientación de cadena arriba a cadena abajo". En el sistema bidireccional, los promotores de pol I y de pol II están en lados opuestos del ADNc, en el que un promotor de pol II  
15 cadena arriba produce ARNm tapado de sentido positivo y un promotor de pol I cadena abajo produce ARN viral no tapado de sentido negativo (ARNv). Estos sistemas de pol I-pol II comienzan con la iniciación de la transcripción de las dos enzimas ARN polimerasa celulares a partir de sus propios promotores, supuestamente en diferentes compartimentos del núcleo. Se puede decir que el promotor de pol I y la secuencia de terminación de pol I en el sistema bidireccional comprenden una "orientación de cadena abajo a cadena arriba" mientras que se puede decir  
20 que el promotor y la señal de poliadenilación de pol II en el sistema bidireccional comprenden una "orientación de cadena arriba a cadena abajo".

También se describen en el presente documento composiciones que comprenden un vector de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que se puede transcribir por la ARN polimerasa I. El polinucleótido puede  
25 producir un ARNv o ARNc de la gripe. La composición puede comprender una variedad de vectores de expresión que comprenden cada uno una secuencia polinucleotídica que se puede transcribir por la ARN polimerasa I canina. Los polinucleótidos pueden producir una variedad de ARNv o ARNc. Los polinucleótidos pueden producir todos los ocho ARNv o ARNc.

30 También se describen en el presente documento composiciones que comprenden una variedad de vectores de expresión descritos en el presente documento que, cuando se introducen en una célula canina en ausencia/presencia de un virus auxiliar, dan como resultado la producción de un genoma de la gripe.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender una variedad de vectores de expresión  
35 que, cuando se introducen en una célula canina en ausencia/presencia de un virus auxiliar, dan como resultado la producción de un virus de la gripe infeccioso. El virus de la gripe infeccioso puede ser un virus de la gripe sensible al frío. El virus de la gripe infeccioso puede ser un virus de la gripe atenuado. El virus de la gripe infeccioso puede ser un virus de la gripe sensible a la temperatura. El virus de la gripe infeccioso puede ser un virus de la gripe adaptado al frío. El virus de la gripe infeccioso puede ser un virus atenuado, sensible a la temperatura adaptado al frío.

40 Las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender un vector que comprende, de 5' a 3', un promotor unido operativamente a secuencias 5' no codificantes del virus de la gripe unidas a ADNc unido a secuencias 3' no codificantes del virus de la gripe unidas a una secuencia de terminación de la transcripción. Uno o más de los ADNc en los vectores pueden estar en orientación sentido. Uno o más de los ADNc en los vectores  
45 pueden estar en orientación antisentido.

La invención puede proporcionar composiciones que comprenden una variedad de vectores, en las que la pluralidad de vectores comprenden un vector que comprende una secuencia reguladora canina descrita en el presente documento unida operativamente a un ADNc de proteína ácida (PA) de polimerasa del virus de la gripe unido a una  
50 secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende una secuencia reguladora canina unida operativamente a un ADNc de proteína básica 1 (PB1) de polimerasa del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende una secuencia reguladora canina unida operativamente a un ADNc de proteína básica 2 (PB2) de polimerasa del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende una secuencia reguladora canina unida operativamente a un ADNc de hemaglutinina (HA) del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que  
55 comprende una secuencia reguladora canina unida operativamente a un ADNc de nucleoproteína (NP) del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende una secuencia reguladora canina unida operativamente a un ADNc de neuraminidasa (NA) del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende una secuencia reguladora canina unida operativamente a un ADNc de proteína de matriz del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, y un vector que comprende una secuencia reguladora canina unida operativamente a un ADNc de NS del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción. La composición puede comprender además uno o más vectores de expresión que expresan un ARNm que codifica uno o más polipéptidos de la gripe seleccionados del grupo que consiste en: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, proteína de matriz 1 (M1), proteína de matriz 2 (M2), y las proteínas no estructurales 1 y 2 (NS1 y NS2). La composición, cuando se introduce en una célula canina,  
60 puede dar como resultado la producción de un virus de la gripe infeccioso. El virus de la gripe infeccioso puede ser  
65

un virus de la gripe sensible al frío. El virus de la gripe infeccioso puede ser un virus de la gripe atenuado. El virus de la gripe infeccioso puede ser un virus de la gripe sensible a la temperatura. El virus de la gripe infeccioso puede ser un virus de la gripe adaptado al frío. El virus de la gripe infeccioso puede ser un virus atenuado, sensible a la temperatura adaptado al frío.

5 En el presente documento se proporciona una composición que genera virus de la gripe infecciosos a partir de ADNc viral clonado, que comprende una serie de plásmidos en los que cada plásmido comprende ADNc que codifica al menos un segmento genómico viral, y en los que el ADNc viral correspondiente al segmento genómico viral está insertado entre una secuencia reguladora de ARN polimerasa I canina descrita en el presente documento y una  
10 secuencia reguladora (por ejemplo, una secuencia de terminación de pol I canina) para la síntesis de ARNv o ARNc con un extremo 3' exacto, que da como resultado la expresión de ARNv o ARNc.

15 En el presente documento se proporciona una composición que genera virus de la gripe infecciosos a partir de ADNc viral clonado, que comprende una serie de plásmidos en los que cada plásmido comprende ADNc que codifica al menos un segmento genómico viral, y en los que el ADNc viral correspondiente al segmento genómico viral está insertado entre una secuencia reguladora de ARN polimerasa I canina descrita en el presente documento y una secuencia reguladora (por ejemplo, una secuencia de terminación de pol I canina) para la síntesis de ARNv o ARNc con un extremo 3' exacto, que da como resultado la expresión de ARNv o ARNc, en el que la secuencia reguladora de la ARN polimerasa I canina, el ADNc viral, y un elemento regulador para la síntesis de ARNv o ARNc con un  
20 extremo 3' exacto están a su vez insertados entre un promotor de ARN polimerasa II (pol II) y una señal de poliadenilación, que da como resultado la expresión de ARNm viral y una correspondiente proteína viral, en el que la expresión del conjunto completo de ARNv o ARNc y de proteínas virales da como resultado el ensamblaje de un virus de la gripe infeccioso.

25 El elemento regulador para la síntesis de ARNv o ARNc con un extremo 3' exacto puede ser una secuencia de terminación de ARN polimerasa I (pol I). Como se habrá dado cuenta un experto en la materia, la replicación y transcripción eficiente del ARNv de la gripe necesita secuencias muy específicas en los extremos 5' y 3' del ARNv. El experto en la materia puede usar una secuencia de terminación de ARN polimerasa I (pol I) para asegurarse de que la secuencia del extremo 3' del transcrito de ARN producido se defina como el extremo exacto deseado para la replicación y/o transcripción eficaz de este ARN genómico. El elemento regulador para la síntesis de ARNv o ARNc con un extremo 3' exacto puede ser una secuencia de ribozima. El promotor de pol I puede ser proximal a la señal de poliadenilación y la secuencia de terminación de pol I puede ser proximal al promotor de pol II. El promotor de pol I puede ser proximal al promotor de pol II y la secuencia de terminación de pol I puede ser proximal a la señal de poliadenilación. El virus de la gripe puede ser un virus de la gripe A. El virus de la gripe puede ser un virus de la gripe B.  
35

En el presente documento se proporciona un método para producir un ARN genómico de la gripe, que comprende transcribir un ácido nucleico descrito en el presente documento, produciendo de este modo un ARN genómico de la gripe. El ARN genómico de la gripe puede transcribirse en un sistema sin células. El ARN genómico de la gripe puede transcribirse en un sistema de células caninas, *por ejemplo*, una célula MDCK.  
40

Los métodos pueden comprender transcribir una variedad de ácidos nucleicos descritos en el presente documento, produciendo de este modo una variedad de moléculas de ARN, por ejemplo, una pluralidad de ARN genómicos de la gripe. Pueden transcribirse uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho ARN genómicos de la gripe. Puede transcribirse un conjunto completo de ARN genómicos de la gripe. El ARN genómico de la gripe, cuando se transcribe en una célula canina, *por ejemplo*, una célula MDCK, en presencia de PA, PB1, PB2, y NP, puede expresar una proteína de la gripe. La proteína de la gripe puede seleccionarse del grupo que consiste en PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1, y NS2. El conjunto completo de ARN genómicos de la gripe, cuando se transcribe en una célula canina, por ejemplo, una célula MDCK, en presencia de PA, PB1, PB2, y NP, puede expresar un virus de la gripe infeccioso. Los métodos pueden comprender introducir PA, PB1, PB2, y NP junto con ARN genómicos de la gripe. PA, PB1, PB2, y NP pueden proporcionarse por un virus auxiliar. El conjunto completo de ARN genómicos de la gripe pueden ser de un virus de la gripe adaptado al frío, sensible a la temperatura y atenuado.  
45  
50

Se proporciona en el presente documento un método para transcribir un segmento de ARNv de un virus de la gripe, comprendiendo dicho método las etapas de 1) poner en contacto un polinucleótido que comprende un ácido nucleico (o fragmento activo del mismo) seleccionado del grupo que consiste en: las SEC ID N°: 1-28 con una o más proteínas de la gripe PB1, PB2, NP, y PA, en el que dicho ácido nucleico está unido operativamente a una molécula de ADNc que codifica dicho segmento de ARNv; y 2) aislar un segmento de ARNv transcrito. Puede usarse un virus auxiliar en el método.  
55  
60

La invención puede proporcionar un método para producir virus recombinantes infecciosos que comprenden un genoma de ARN segmentado (por ejemplo, un virus de la gripe infeccioso), que comprende las etapas de cultivar células hospedadoras caninas, por ejemplo, células MDCK, que comprenden uno o más vectores de expresión descritos en el presente documento que comprenden ADNc viral correspondiente a cada gen en el genoma viral y uno o más vectores de expresión que expresan ARNm viral que codifica uno o más polipéptidos virales; y aislar una población de virus infecciosos. La población de virus infecciosos puede ser una población de virus de la gripe. El  
65

método puede comprender además la etapa de introducir los uno o más vectores de expresión en las células hospedadoras de canino antes de dicha etapa de cultivo. El método puede comprender además la etapa de producir los uno o más vectores de expresión antes de dicha etapa de introducción.

5 Se proporciona en el presente documento un método de producción de virus recombinantes infecciosos que comprenden un genoma de ARN segmentado (por ejemplo, un virus de la gripe infeccioso) en el que el método comprende las etapas de: a) insertar en uno o más vectores de expresión descritos en el presente documento ADNc viral correspondiente a cada gen en el genoma viral; (b) introducir (por ejemplo, mediante electroporación) dichos vectores de expresión y uno o más vectores de expresión que expresan ARNm viral que codifica uno o más polipéptidos virales en una célula hospedadora (por ejemplo, una célula canina) o en una población de células hospedadoras; (c) incubar dichas células hospedadoras; y d), aislar una población de virus infecciosos. El virus recombinante infeccioso puede ser de gripe. El virus de la gripe puede ser un virus de la gripe adaptado al frío, sensible a la temperatura y atenuado.

15 Se proporciona un método de producción de un virus recombinante infeccioso que comprende un genoma de ARN segmentado (por ejemplo, un virus de la gripe infeccioso) en el que el método comprende las etapas de: a) insertar en uno o más vectores de expresión descritos en el presente documento un ADNc viral correspondiente a cada gen en el genoma viral; (b) introducir (por ejemplo, mediante electroporación) dichos vectores de expresión en una célula hospedadora (por ejemplo, una célula canina) o en una población de células hospedadoras; (c) incubar dichas células hospedadoras; y d), aislar una población de virus infecciosos. El virus recombinante infeccioso puede ser de gripe. El virus de la gripe puede ser un virus de la gripe adaptado al frío, sensible a la temperatura y atenuado.

25 En el presente documento se proporcionan métodos para generar virus de la gripe recombinantes infecciosos en células hospedadoras usando vectores de expresión descritos en el presente documento para expresar los segmentos de ARNV o los correspondientes ARNc y proteínas del virus de la gripe, en particular PB1, PB2, PA y NA. En el presente documento, puede usarse o no un virus auxiliar para generar los virus de la gripe recombinantes infecciosos.

30 En el presente documento se proporciona un método para producir un virus de la gripe recombinante, que comprende cultivar células caninas que comprenden una variedad de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia reguladora de ARN polimerasa I canina unida operativamente a uno o más ADNc que codifican cada uno ARN genómico de la gripe y uno o más vectores de expresión que expresan ARNm viral que codifica uno o más polipéptidos de la gripe: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1 y NS2; y aislar dicho virus de la gripe recombinante de las células.

35 Los métodos pueden comprender introducir en células caninas vectores de expresión que dirigen la expresión en las células de segmentos de ARN viral genómicos o antígenómicos, una nucleoproteína, y una polimerasa dependiente de ARN, de tal forma que puedan formarse complejos de ribonucleoproteína y puedan ensamblarse las partículas virales en ausencia de virus auxiliar; y (b) cultivar las células en las que se empaquetan y rescatan las partículas virales. El virus de hebra negativa recombinante puede ser un virus no segmentado. El virus de hebra negativa de ARN recombinante puede ser un virus segmentado. El virus de ARN de hebra negativa puede ser un virus de la gripe.

45 Los métodos pueden comprender introducir en células caninas cultivadas vectores de expresión que dirigen la expresión de los segmentos de ARN genómicos o antígenómicos de un virus de ARN de hebra negativa segmentado, una nucleoproteína, y una polimerasa dependiente de ARN en condiciones que permiten la formación de complejos de RNP que contienen los segmentos de ARN genómico del virus y ensamblar las partículas virales en ausencia del virus auxiliar; y cultivar las células en las que se producen las partículas virales. Los vectores de expresión pueden dirigir la expresión de segmentos de ARN genómico del virus.

50 Las células caninas usadas en los métodos descritos en el presente documento pueden comprender uno o más vectores de expresión que expresan una o más proteínas seleccionadas de la nucleoproteína y las subunidades de la ARN polimerasa dependiente de ARN. Los vectores de expresión pueden dirigir la expresión de una o más de las nucleoproteínas y las subunidades de dicha ARN polimerasa dependiente de ARN. La expresión de las una o más proteínas virales a partir de los vectores de expresión puede encontrarse bajo el control de una secuencia reguladora seleccionada del promotor principal tardío de adenovirus 2 unido a la secuencia líder tripartita empalmada del adenovirus humano de tipo 2 o el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano, o un derivado funcional de la secuencia reguladora.

60 El virus puede ser un virus de la gripe de tipo A, B o C. El virus puede ser un virus reagrupado que tiene segmentos de ARNV derivados de más de un virus progenitor.

65 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender introducir una variedad de vectores descritos en el presente documento, cada uno de los cuales incorpora una porción de un virus de la gripe en una población de células hospedadoras capaces de soportar replicación viral. Las células hospedadoras pueden cultivarse en condiciones permisivas para el crecimiento viral, y pueden recuperarse virus de la gripe. Los virus de la gripe pueden



ser virus atenuados, virus adaptados al frío y/o virus sensibles a la temperatura. Por ejemplo, los virus de la gripe recombinantes derivados de vectores pueden ser virus atenuados, adaptados al frío y sensibles a la temperatura, de tal forma que son adecuados para su administración como una vacuna atenuada viva, *por ejemplo*, en una formulación de vacuna intranasal. Los virus pueden producirse introduciendo una diversidad de vectores que incorporan la totalidad o parte de un genoma de virus de la gripe P/Ann Arbor/1/66, *por ejemplo*, un genoma de virus ca B/Ann Arbor/1/66.

Puede introducirse una variedad de vectores que comprenden ADNc que codifica al menos los 6 segmentos de genoma internos (por ejemplo, los segmentos de genoma que codifican todas las proteínas de la gripe, excepto HA y NA) de una cepa de gripe y ADNc que codifica uno o más segmentos de genoma (por ejemplo, los segmentos de ARNv de HA y NA) de una cepa de gripe diferente en una población de células hospedadoras. Por ejemplo, al menos los 6 segmentos internos de genoma ("el armazón") de una cepa seleccionada atenuada, adaptada al frío y/o sensible a la temperatura de la gripe A o B, *por ejemplo*, una cepa ca, att, ts de B/Ann Arbor/1/66 o una cepa ca, att, ts de gripe A o B modificada artificialmente por ingeniería genética, pueden introducirse en una población de células hospedadoras junto con uno o más segmentos que codifican antígenos inmunogénicos derivados de otra cepa viral. Típicamente, los antígenos de superficie inmunogénicos incluyen uno o ambos de los antígenos de hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA). En los casos donde se introduce un solo segmento que codifica un antígeno de superficie inmunogénico, también se introducen los 7 segmentos complementarios del virus seleccionado en las células hospedadoras.

Los vectores de expresión pueden transfectarse a las células por electroporación. Los vectores de expresión pueden introducirse en las células por transfección en las células en presencia de un reactivo de transfección liposomal o mediante precipitación de fosfato de calcio. Los vectores de expresión pueden ser plásmidos. Los vectores de expresión pueden comprender un vector de expresión separado para la expresión de cada segmento de ARN genómico de dicho virus o los ARN codificante correspondientes. La expresión de cada segmento de ARN genómico o ARN codificante puede estar bajo el control de una secuencia promotora derivada de un promotor de pol I canina, tal como se describe en el presente documento.

Pueden introducirse una variedad de vectores plasmídicos que incorporan segmentos del genoma del virus de la gripe en una población de células hospedadoras. Por ejemplo, puede utilizarse 8 plásmidos, cada uno de los cuales incorpora un segmento de genoma diferente, para introducir un genoma de gripe completo en las células hospedadoras. Como alternativa, puede emplearse un número mayor de plásmidos, que incorporan subsecuencias genómicas más pequeñas.

En el presente documento se proporciona un método para generar partículas virales infecciosas en células cultivadas de un virus de ARN de cadena negativa segmentado que tienen más de 3 segmentos de ARNv genómico, por ejemplo, un virus de la gripe, tal como un virus de la gripe A, comprendiendo dicho método: (a) introducir en una población de células capaces de soportar el crecimiento de dicho virus un primer conjunto de vectores de expresión capaces de expresar en dichas células segmentos de ARNv genómico para proporcionar los segmentos de ARNv genómicos completos de dicho virus; (b) introducir en dichas células un segundo conjunto de vectores de expresión capaces de expresar ARNm que codifica uno o más polipéptidos de dicho virus; y (c) cultivar dichas células, produciéndose de este modo dichas partículas virales. Las células pueden ser células caninas. Las células pueden ser células MDCK. El virus puede ser el virus de la gripe B. El primer conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-8 plásmidos. El primer conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en un plásmido. El segundo conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-8 plásmidos. El segundo conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en un plásmido. El primero, el segundo, o ambos conjuntos de vectores de expresión pueden introducirse por electroporación. El conjunto de vectores de expresión puede codificar cada segmento de ARNv de un virus de la gripe. El segundo conjunto de vectores de expresión puede codificar el ARNm de uno o más polipéptidos de la gripe. El primer conjunto o el segundo conjunto de vectores de expresión (o ambos conjuntos) pueden comprender un ácido nucleico descrito en el presente documento, por ejemplo, una secuencia reguladora canina descrita en el presente documento (por ejemplo, pol I canina). El primer conjunto o el segundo conjunto de vectores de expresión (o ambos conjuntos) pueden codificar un ARNv o ARNm de un segundo virus. Por ejemplo, un conjunto de vectores comprende uno o más vectores que codifican el ARNm y/o ARNv de HA y/o NA de un segundo virus de la gripe.

En el presente documento se proporciona un método para generar partículas virales infecciosas en células cultivadas de un virus de ARN de cadena negativa segmentado que tienen más de 3 segmentos de ARNv genómico, por ejemplo, un virus de la gripe, tal como un virus de la gripe A, comprendiendo dicho método: (a) introducir en una población de células capaces de soportar el crecimiento de dicho virus un conjunto de vectores de expresión capaces tanto de expresar en dichas células segmentos de ARNv genómico para proporcionar los segmentos de ARNv genómicos completos de dicho virus y capaces de expresar ARNm que codifica uno o más polipéptidos de dicho virus; (b) cultivar dichas células, produciéndose de este modo dichas partículas virales. Las células pueden ser células caninas. Las células pueden ser células MDCK. El virus puede ser el virus de la gripe B. El conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-17 plásmidos. El conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-8 plásmidos. El conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-3 plásmidos. El conjunto de vectores de expresión puede introducirse mediante electroporación. El conjunto de vectores de

expresión puede codificar cada segmento de ARNV de un virus de la gripe. El conjunto de vectores de expresión puede codificar el ARNm de uno o más polipéptidos de la gripe. El conjunto de vectores de expresión puede codificar cada segmento de ARNV de un virus de la gripe y el ARNm de uno o más polipéptidos de la gripe. El conjunto de vectores de expresión puede comprender un ácido nucleico de la invención, por ejemplo, una secuencia reguladora canina descrita en el presente documento (por ejemplo, pol I canina). El conjunto de vectores de expresión puede codificar un ARNV o ARNm de un segundo virus. Por ejemplo, el conjunto de vectores comprende uno o más vectores que codifican el ARNm y/o ARNV de HA y/o NA de un segundo virus de la gripe. El conjunto de vectores de expresión (o ambos conjuntos) pueden codificar un ARNV o ARNm de un segundo virus. Por ejemplo, un conjunto de vectores comprende uno o más vectores que codifican el ARNm y/o ARNV de HA y/o NA de un segundo virus de la gripe.

Los métodos pueden comprender además amplificar partículas virales producidas por las células caninas mediante una o más etapas de infección celular adicionales empleando células que son iguales o diferentes a las células caninas. Los métodos pueden comprender además aislar partículas virales infecciosas. Los métodos pueden comprender además una etapa de atenuación o muerte viral. Los métodos pueden comprender además incorporar partículas virales atenuadas o muertas en una composición de vacuna.

Los métodos para producir virus descritos en el presente documento dan como resultado títulos de virus (24 horas, o 36, o 48 horas, o 3 días, o 4 días después de introducir los vectores de la invención en células hospedadoras) de al menos  $0,1 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $0,5 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $1,0 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $2 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $3 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $4 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $5 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $6 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $7 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $8 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $9 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $1 \times 10^4$  UFP/ml, o de al menos  $5 \times 10^4$  UFP/ml, o de al menos  $1 \times 10^5$  UFP/ml, o de al menos  $5 \times 10^5$  UFP/ml, o de al menos  $1 \times 10^6$  UFP/ml, o de al menos  $5 \times 10^6$  UFP/ml, o de al menos  $1 \times 10^7$  UFP/ml, o en el intervalo de  $0,1-1 \times 10^3$  UFP/ml, o en el intervalo de  $1 \times 10^3-1 \times 10^4$  UFP/ml, o en el intervalo de  $1 \times 10^4-1 \times 10^5$  UFP/ml, o en el intervalo de  $1 \times 10^5-1 \times 10^6$  UFP/ml, o en el intervalo de  $1 \times 10^6-1 \times 10^7$  UFP/ml, o mayor de  $1 \times 10^7$  UFP/ml. Por consiguiente, se proporcionan métodos para rescatar virus, en los que el título de los virus rescatados a las 24 a 36 horas o 2-3 días es al menos  $0,1 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $0,5 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $1,0 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $2 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $3 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $4 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $5 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $6 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $7 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $8 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $9 \times 10^3$  UFP/ml, o de al menos  $1 \times 10^4$  UFP/ml, o de al menos  $5 \times 10^4$  UFP/ml, o de al menos  $1 \times 10^5$  UFP/ml, o de al menos  $5 \times 10^5$  UFP/ml, o de al menos  $1 \times 10^6$  UFP/ml, o de al menos  $5 \times 10^6$  UFP/ml, o al menos  $1 \times 10^7$  UFP/ml o en el intervalo de  $0,1-1 \times 10^3$  UFP/ml, o en el intervalo de  $1 \times 10^3-1 \times 10^4$  UFP/ml, o en el intervalo de  $1 \times 10^4-1 \times 10^5$  UFP/ml, o en el intervalo de  $1 \times 10^5-1 \times 10^6$  UFP/ml, o en el intervalo de  $1 \times 10^6-1 \times 10^7$  UFP/ml, o mayor de  $1 \times 10^7$  UFP/ml.

Los virus de la gripe pueden corresponder a un virus de la gripe B. Los virus de la gripe pueden corresponder a un virus de la gripe A. Los métodos pueden incluir recuperar virus de la gripe recombinantes y/o reagrupados capaces de provocar una respuesta inmune tras su administración, por ejemplo, administración intranasal, a un sujeto. Los virus pueden inactivarse antes de su administración y también pueden administrarse virus vivos atenuados. Los virus de la gripe A y de la gripe B recombinantes y reagrupados producidos de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento también son una característica descrita en el presente documento. Los virus pueden incluir un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a la temperatura, o un virus con cualquier combinación de estas características deseables. El virus de la gripe puede incorporar un virus de la cepa B/Ann Arbor/1/66, *por ejemplo*, una cepa B/Ann Arbor/1/66 adaptada al frío, sensible a la temperatura y atenuada. El virus de la gripe puede incorporar un virus de la cepa A/Ann Arbor/6/60, *por ejemplo*, una cepa A/Ann Arbor/6/60 adaptada al frío, sensible a la temperatura y atenuada.

Opcionalmente, los virus reagrupados se producen introduciendo vectores que codifican los seis ARNV internos de una cepa viral seleccionada por sus propiedades favorables en relación a la producción de vacunas, en combinación con vectores que codifican segmentos de ARNV de los antígenos de superficie (HA y NA) de una cepa seleccionada, *por ejemplo*, patógena. Por ejemplo, el segmento HA puede seleccionarse favorablemente de una cepa H1, H3 o B patogénicamente relevante, tal como se efectúa rutinariamente para la producción de vacunas. De manera similar, el segmento HA puede seleccionarse de una cepa patogénica emergente, tal como una cepa H2 (por ejemplo, H2N2), una cepa H5 (por ejemplo, H5N1) o una cepa H7 (por ejemplo, H7N7). Como alternativa, los siete segmentos génicos complementarios de la primera cepa se introducen en combinación con el segmento que codifica HA o NA. Los segmentos génicos internos pueden derivarse de la cepa B/Ann Arbor/1/66 o de la cepa A/Ann Arbor/6/60 de la gripe. Además, puede producirse un virus de la gripe (por ejemplo, un H5N1, H9N2, H7N7, o HxNy (donde  $x = 1-9$  e  $y = 1-15$ ) que comprende un gen de HA modificado. Por ejemplo, el gen HA puede modificarse eliminando el sitio de escisión polibásico.

En el presente documento se proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o vector de expresión descrito en el presente documento. La célula puede ser una célula canina. La célula canina puede ser una célula de riñón. La célula de riñón canino puede ser una célula MDCK. La célula puede seleccionarse del grupo que consiste en células Vero, células Per.C6, células BHK, células PCK, células MDCK, células MDBK, células 293 (por ejemplo, células 293T), y células COS. Los co-cultivos de una mezcla de al menos dos de estas líneas celulares, *por*

*ejemplo*, una combinación de células COS y MDCK o una combinación de células 293T y MDCK, puede constituir la población de células hospedadoras.

Las células hospedadoras que comprenden los virus de la gripe descritos en el presente documento pueden crecer en cultivo en condiciones permisivas para la replicación y ensamblaje de virus. Típicamente, las células hospedadoras que incorporan los plásmidos de la gripe pueden cultivarse a una temperatura por debajo de 37 °C, preferentemente a una temperatura igual a, o menor de, 35 °C. Las células pueden cultivarse a una temperatura entre 32 °C y 35 °C. Las células pueden cultivarse a una temperatura entre aproximadamente 32 °C y 34 °C, *por ejemplo*, a aproximadamente 33 °C. Después del cultivo durante un periodo de tiempo adecuado para permitir la replicación del virus hasta un título concreto, pueden recuperarse virus recombinantes. Opcionalmente, pueden inactivarse los virus recuperados.

En el presente documento se describe un método para diseñar por ingeniería genética un virus de la gripe de tal forma que se restringe su crecimiento a tipos celulares particulares incluyendo, pero sin limitación, MRC-5, WI-38, FRhL-2, PerC6, 293, NIH 3T3, CEF, CEK, DF-1, Vero, MDCK, MvLu, células epiteliales humanas y tipos celulares SF9. El crecimiento se puede restringir de tal modo que no puede crecer un virus de la gripe en una célula primaria humana (por ejemplo, PerC6). El crecimiento se puede restringir de tal modo que no puede crecer un virus de la gripe en una célula epitelial humana. Un experto en la materia reconocerá que el fenotipo de restricción de crecimiento puede combinarse con uno o más fenotipos adicionales, tales como adaptación al frío, sensibilidad a la temperatura, atenuado, etc. También se reconocerá que una mutación responsable de un fenotipo de crecimiento restringido también puede contribuir y/o ser responsable de fenotipos adicionales, tales como aquellos listados anteriormente.

En el presente documento se proporcionan nuevos métodos para reconstituir virus de la gripe A o de la gripe B recombinantes o reorganizados (es decir, cepas de tipo silvestre y variantes de la gripe A y/o virus de la gripe) a partir de células MDCK en cultivo. Se electropora una pluralidad de vectores que incorporan un genoma de virus de la gripe cuya transcripción puede controlarse mediante una secuencia reguladora canina descrita en el presente documento en una población de células MDCK. Las células pueden crecer en condiciones permisivas para la replicación viral, *por ejemplo*, en el caso de cepas del virus adaptadas al frío, atenuadas y sensibles a la temperatura, se hacen crecer las células MDCK a una temperatura por debajo de 37 °C, preferentemente a una temperatura igual a, o menor de, 35 °C. Típicamente, las células se cultivan a una temperatura de entre 32 °C y 35 °C. Las células pueden cultivarse a una temperatura entre aproximadamente 32 °C y 34 °C, *por ejemplo*, a aproximadamente 33 °C. Opcionalmente (por ejemplo, para la producción de vacunas), se hace crecer las células en medio sin suero sin productos derivados de animales.

En los métodos descritos anteriormente, pueden recuperarse los virus de la gripe después de cultivar las células hospedadoras que incorporan los plásmidos del genoma de la gripe. Los virus recuperados pueden ser virus recombinantes. Los virus pueden ser virus de la gripe reagrupados que tienen contribuciones genéticas de más de una cepa de virus progenitora. Opcionalmente, los virus recombinantes o reagrupados recuperados se amplifican adicionalmente mediante paso por cultivos celulares o en huevos de gallina.

Opcionalmente, pueden inactivarse los virus recuperados. Los virus recuperados pueden comprender una vacuna para la gripe. Por ejemplo, la vacuna para la gripe recuperada puede ser un virus de la gripe reagrupado (por ejemplo, 6:2 o 7:1 de virus reagrupados) que tienen un antígeno HA y/o NA derivado de una cepa seleccionada de gripe A o de gripe B. El antígeno HA o NA puede estar modificado. Los virus de la gripe reagrupados pueden tener un fenotipo atenuado. Opcionalmente, los virus de la gripe reagrupados están adaptados al frío y/o son sensibles a la temperatura, por ejemplo, un virus de la gripe A o B atenuado, adaptado al frío o sensible a la temperatura. Dichos virus de la gripe son útiles, por ejemplo, como vacunas vivas atenuadas para la producción profiláctica de una respuesta inmunitaria específica para una cepa seleccionada, *por ejemplo*, patogénica de la gripe. Los virus de la gripe, *por ejemplo*, virus de la gripe reagrupados, producidos de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento son una característica adicional de la invención.

También se describen en el presente documento métodos para producir una vacuna de virus de la gripe recombinante que comprende introducir una variedad de vectores que incorporan un genoma de virus de la gripe cuya transcripción se controla mediante una secuencia reguladora canina descrita en el presente documento (por ejemplo, un promotor de ARN pol I canino) en una población de células hospedadoras capaces de soportar la replicación de virus de la gripe, cultivar las células hospedadoras a una temperatura menor o igual a 35 °C, y recuperar un virus de la gripe capaz de provocar una respuesta inmunitaria tras su administración al sujeto. Las vacunas pueden comprender virus de cepas de gripe A o gripe B.

Los virus de la vacuna de la gripe pueden incluir un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, o un virus de la gripe sensible a la temperatura. Los virus pueden poseer una combinación de estas propiedades deseables. El virus de la gripe puede contener un virus de la cepa A/Ann Arbor/6/60, El virus de la gripe puede incorporar un virus de la cepa B/Ann Arbor/1/66. Como alternativa, la vacuna incluye virus de la gripe A o de la gripe B diseñados artificialmente por ingeniería genética que incorporan al menos un aminoácido sustituido que influencia

las propiedades biológicas características de ca A/Ann Arbor/6/60 o ca/B/Ann Arbor/1/66, tal como un único aminoácido de estas cepas.

Se proporciona una vacuna que comprende una población de virus recombinantes (o virus derivados de estos) producidos mediante los métodos descritos en el presente documento. La vacuna puede comprender un virus vivo producido mediante los métodos. La vacuna puede comprender un virus muerto o inactivado producido mediante los métodos. La vacuna puede comprender una composición inmunogénica preparada a partir de un virus vivo, muerto o inactivado producido mediante los métodos. La vacuna puede comprender una composición inmunogénica preparada a partir de un virus de la gripe vivo atenuado, adaptado al frío y sensible a la temperatura producido mediante el método. La vacuna puede comprender un virus de la gripe vivo atenuado, adaptado al frío y sensible a la temperatura producido mediante el método o un virus derivado de este.

#### 4. Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 presenta las curvas de crecimiento de la cepa B ts y ca (B/Pekín/243/97) en células PerC6 y MDCK; el título del virus para cada punto temporal se determinó mediante el ensayo de TCID50.

La Figura 2 presenta curvas de crecimiento de cepas A ts y ca A (A/Sidney/05/97 y A/Pekín/262/95) en células PerC6 y MDCK; el título del virus para cada punto temporal se determinó mediante el ensayo de TCID50.

La Figura 3 presenta las curvas de crecimiento de la cepa A ts y ca (A/Ann Arbor/6/60) en células PerC6 y MDCK; el título del virus para cada punto temporal se determinó mediante el ensayo de TCID50.

La Figura 4 presenta el análisis en tiempo real del ARN viral de A/Sidney en células PerC6 y MDCK, usando sondas Taqman® (Roche Molecular Systems; Palo Alto, CA) específicas para el segmento M del ARN viral.

La Figura 5 presenta curvas de crecimiento de ca A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) en células MDCK; el título del virus para cada punto temporal se determinó mediante el ensayo de TCID50.

La Figura 6 presenta un diagrama que muestra el rescate de cada segmento génico de la gripe como un reorganizado 7:1 generado mediante la técnica de rescate de ocho plásmidos.

La Figura 7 presenta curvas de crecimiento de cada uno de los reorganizados 7:1 en células PerC6; el título del virus para cada punto temporal se determinó mediante el ensayo de TCID50.

La Figura 8 presenta un mapa de restricción de un fragmento Eco RI que comprende una secuencia reguladora de ARN pol I canina.

Las Figuras 9A, 9B y 9C presentan la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 1) de un ácido nucleico de aproximadamente 3,5 kB clonado a partir de ADN genómico canino, que codifica al menos una porción del gen de ARNr 18s, comenzando en el nucleótido 1809 (+1) en la secuencia presentada.

La Figura 10 presenta un mapa del plásmido pAD3000, que puede adaptarse fácilmente para producir un vector de expresión de la invención.

La Figura 11 presenta un diagrama de las construcciones de promotor de pol I de MDCK usadas en el ensayo de mini-genoma.

La Figura 12 presenta los resultados de un ensayo de mini-genoma. La señal EGFP generada a partir de las construcciones de promotor de pol I de MDCK -1, +1 y +2 se muestra en los paneles izquierdo, central y derecho superiores, respectivamente. Un control de promotor negativo solo muestra fluorescencia de fondo (inferior izquierdo). Como control positivo, las células también se transfectaron con una construcción de CMV-EGFP (inferior derecha).

La Figura 13 presenta la secuencia del vector de expresión en plásmido pAD4000 (SEC ID N°:29) que comprende un fragmento de 469 pb (bases 1-469 en pAD4000) a partir del subclon MDCK EcoRI-BamHI (bases 1340-1808 de SEC ID N°: 1). Nota: El fragmento de 469 pb se muestra en orientación de complemento inverso y la secuencia enlazante está subrayada y en negrita.

La Figura 14 indica las posiciones de hibridación de los cebadores usados para llevar a cabo las reacciones de RT-PCR en el ARN de los virus rescatados.

La Figura 15 presenta las secuencias de cebadores usados para llevar a cabo las reacciones de RT-PCR en el ARN de virus rescatados.

Las Figuras 16A-B muestran las secuencias parciales de los segmentos NS y PB1 y las posiciones de las mutaciones silentes introducidas.

##### 5. Descripción detallada de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones. El rescate de plásmidos de virus de la gripe comprende generalmente la introducción de vectores de expresión para expresar proteínas virales y transcribir el ARN genómico viral en células hospedadoras adecuadas. La transcripción del ARN genómico viral se lleva a cabo generalmente con una enzima ARN polimerasa I, ya que estas enzimas producen transcritos con extremos adecuados para su uso como genomas virales. Por lo tanto, se usan promotores de ARN pol I y otros elementos reguladores para iniciar la transcripción de ARN genómicos durante el rescate de plásmidos. Desafortunadamente, los promotores de ARN pol I son elevadamente específicos de especie. Esto es, la ARN pol I de una especie puede o no unirse de manera eficaz a un promotor de ARN pol I de una especie no relacionada. Por consiguiente, la disponibilidad de promotores de ARN pol I limita las células en las que puede efectuarse el rescate de plásmidos. Antes de la presente invención, no era posible el rescate de plásmidos en células caninas. Por primera vez, es posible el rescate de plásmidos en células caninas basándose en la divulgación en el presente documento del modo siguiente.

Por consiguiente, en un primer aspecto, se proporcionan ácidos nucleicos aislados descritos en el presente documento que comprenden una secuencia reguladora de ARN polimerasa I canina. La secuencia reguladora puede ser un promotor. La secuencia reguladora puede ser una secuencia promotora de pol I canina. La secuencia reguladora puede estar unida operativamente a ADNc viral clonado. El ADNc viral clonado puede codificar ARN viral de un virus de hebra positiva o negativa o el correspondiente ARNc. El ADNc viral clonado puede codificar ARN viral genómico (o el ARNc correspondiente) de un virus de la gripe-

Los ácidos nucleicos aislados descritos en el presente documento pueden comprender una secuencia reguladora de ARN polimerasa I canina y una secuencia de terminación transcripcional. Las secuencias de terminación transcripcional pueden ser una secuencia de terminación de pol I. Las secuencias de terminación transcripcional pueden ser una secuencia de terminación de pol I humana, de mono o canina.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento comprenden una secuencia polinucleotídica o un fragmento funcionalmente activo de la misma, *por ejemplo*, una secuencia reguladora de la ARN pol I canina, que se une a un polipéptido de pol I de ser humano, de primate, de ratón o canino y es al menos un 100 % o aproximadamente un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, o un 65 % idéntica a una o más secuencias nucleotídicas seleccionadas del grupo que consiste en: las SEC ID N°: 1-28. La secuencia polinucleotídica o un fragmento funcionalmente activo de la misma puede mantener además la capacidad para iniciar la transcripción, en presencia de polipéptidos adecuados (por ejemplo, polipéptidos de pol I de ser humano, de primate, de ratón o caninos), de una segunda secuencia polinucleotídica unida operativamente a la secuencia nucleotídica. Los "fragmentos funcionalmente activos" de los ácidos nucleicos expuestos en las SEC ID N°: 1-28 pueden retener una o más actividades funcionales descritas en el presente documento de las secuencias de longitud completa de las SEC ID N°: 1-28. Por ejemplo, se proporcionan fragmentos funcionalmente activos de la secuencia reguladora expuesta como SEC ID N°: 1 por los que se une operativamente el fragmento de secuencia reguladora a un ácido nucleico que se va a transcribir y, en presencia de proteínas adecuadas *in vitro* o *in vivo*, se transcribe. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento puede comprender una secuencia de polinucleótido del ácido nucleico expuesto en SEC ID N°: 26.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento comprenden una secuencia polinucleotídica o un fragmento de la misma, *por ejemplo*, una secuencia reguladora de la ARN pol I canina, que se une a un polipéptido de pol I de ser humano, de primate, de ratón o canino y/o es un 100 % o al menos o aproximadamente un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, o un 65 % idéntica a una o más secuencias nucleotídicas seleccionadas del grupo que consiste en: las SEC ID N°: 1-28. La secuencia polinucleotídica o un fragmento de la misma puede mantener además la capacidad para iniciar la transcripción, en presencia de polipéptidos adecuados (por ejemplo, polipéptidos de pol I de ser humano, de primate, de ratón o caninos), de una segunda secuencia polinucleotídica unida operativamente a la secuencia nucleotídica.

En el presente documento se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende un promotor de ARN pol I canina. Preferentemente, el promotor de ARN pol I canina está unido operativamente a un ácido nucleico que se va a transcribir, tales como, *por ejemplo*, un ARN genómico de la gripe. La introducción del ácido nucleico en una célula canina da como resultado la transcripción del ARN genómico de la gripe, y, en presencia de proteínas adecuadas de la gripe, puede empaquetarse el transcrito de ARN en un virus de la gripe infeccioso. Se proporcionan ácidos nucleicos aislados que pueden comprender una secuencia reguladora de ARN canino descrita en el presente documento (por ejemplo, un promotor de ARN pol I canina), en el que la secuencia reguladora está unida operativamente a un ácido nucleico que se va a transcribir y, en presencia de proteínas adecuadas *in vitro* o *in vivo*, se transcribe. El ácido nucleico unido operativamente a dicha secuencia reguladora puede ser un segmento de ARNv de la gripe.

En el presente documento se proporcionan vectores y métodos para producir virus de la gripe recombinantes en cultivo de células caninas a partir de ADN viral clonado. Por ejemplo, los virus de la gripe pueden producirse introduciendo una variedad de vectores que comprenden ADNc clonado que codifica cada segmento de genoma viral bajo el control transcripcional de una secuencia reguladora de ARN canino (por ejemplo, un promotor de pol I canino) descrita en el presente documento en células hospedadoras caninas, cultivar las células caninas, y aislar los virus de la gripe recombinantes producidos del cultivo celular. Cuando se introducen de este modo vectores que codifican un genoma del virus de la gripe (por ejemplo, mediante electroporación) en células caninas, pueden recuperarse virus recombinantes adecuados como vacunas mediante procedimientos de purificación convencionales. Usando el sistema de vector y los métodos descritos en el presente documento, pueden producirse virus reorganizados que incorporan los seis segmentos génicos internos de una cepa seleccionada por sus propiedades deseables respecto a la producción de vacunas, y los segmentos inmunogénicos HA y NA de una cepa seleccionada, *por ejemplo*, patogénica, de una manera rápida y eficaz en cultivo tisular. Por lo tanto, el sistema y los métodos descritos en el presente documento son útiles para la producción rápida en cultivo de células caninas de virus de la gripe A y B recombinantes y reorganizados, incluyendo virus adecuados para su uso como vacunas, incluyendo vacunas vivas atenuadas. Las vacunas preparadas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento pueden administrarse por vía intranasal o intramuscular.

Típicamente, se selecciona una sola cepa de virus donante maestro (MDV) para cada uno de los subtipos A y B. En el caso de una vacuna viva atenuada, la cepa de virus donante maestro se selecciona típicamente por sus propiedades favorables, *por ejemplo*, sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío y/o atenuación, en relación a la producción de vacunas. Por ejemplo, las cepas donantes maestras ejemplares incluyen dichas cepas de A/Ann Arbor/6/60 y B/Ann Arbor/1/66 sensibles a la temperatura, atenuadas y adaptadas al frío, respectivamente.

Por ejemplo, puede producirse un virus donante maestro de tipo A (MDV-A), o un virus donante maestro de tipo B (MDV-B), a partir de una pluralidad de ADNc virales clonados que constituyen el genoma viral. Los virus recombinantes pueden producirse a partir de ocho ADNc virales clonados. Los ocho ADNc virales clonados que representan las secuencias seleccionadas de MDV-A o MDV-B para PB2, PB1, PA, NP, HA, NA, M y NS se clonan en un vector de expresión, *por ejemplo*, un vector de expresión bidireccional, tal como un plásmido (por ejemplo, pAD3000 o pAD4000), de tal forma que el ARN genómico viral puede transcribirse a partir de un promotor de ARN polimerasa I (pol I) canina de una hebra y los ARNm virales pueden sintetizarse a partir de un promotor de ARN polimerasa II (pol II) de la otra hebra. Opcionalmente, puede modificarse cualquier segmento génico, incluyendo el segmento de HA (por ejemplo, para eliminar el sitio de escisión multibásico).

Entonces se recupera el virus MDV-A o MDV-B recombinante infeccioso después de la transfección de plásmidos que portan los ocho ADNc virales en células hospedadoras adecuadas, *por ejemplo*, células MDCK. Usando los plásmidos y los métodos descritos en el presente documento, la divulgación es útil, *por ejemplo*, para generar vacunas de la gripe de reorganizados 6:2 mediante cotransfección de los 6 genes internos (PB1, PB2, PA, NP, M y NS) del virus seleccionado (por ejemplo, MDV-A, MDV-B, PR8) junto con la HA y la NA derivadas de virus de la gripe diferentes de tipo correspondiente (A o B). Por ejemplo, el segmento HA se selecciona favorablemente de una cepa H1, H3 o B patogénicamente relevante, tal como se efectúa rutinariamente para la producción de vacunas. De manera similar, el segmento HA puede seleccionarse de una cepa con relevancia emergente como cepa patogénica, tal como una cepa H2 (por ejemplo, H2N2), una cepa H5 (por ejemplo, H5N1) o una cepa H7 (por ejemplo, H7N7). También pueden producirse reorganizados que incorporan siete segmentos de genoma del MDV y bien el gen HA o NA de una cepa seleccionada (reorganizados 7:1). Además, este sistema es útil para determinar la base molecular de características fenotípicas, *por ejemplo*, los fenotipos atenuados (att), adaptados al frío (ca), y sensibles a la temperatura (ts), relevantes para la producción de vacunas.

### 5.1 Definiciones

A menos que se defina de otro modo, se entiende que todos los términos científicos y técnicos tienen el mismo significado al usado de manera común en la técnica a la que pertenecen. Para el fin de la presente invención se definen a continuación los siguientes términos.

Las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido", "secuencia polinucleotídica" y "secuencia de ácido nucleico" se refieren a polímeros de desoxirribonucleótido o ribonucleótido monocatenarios o bicatenarios, o a quimeras o análogos de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, la expresión incluye opcionalmente polímeros de análogos de nucleótidos de origen natural que tienen la naturaleza esencial de nucleótidos naturales en tanto que hibridan con ácidos nucleicos monocatenarios de una manera similar a los nucleótidos de origen natural (por ejemplo, ácidos peptidonucleicos). A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular descrita en el presente documento abarca secuencias complementarias, además de la secuencia indicada explícitamente.

El término "gen" se usa ampliamente para referirse a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen secuencias codificantes y/o las secuencias reguladores necesarias para su expresión. El término "gen" se aplica a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc o a un ARNm codificado por esa secuencia genómica.

Los genes también incluyen segmentos de ácido nucleico no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Las secuencias reguladoras no expresadas incluyen "promotores" y "potenciadores", a los que se unen proteínas reguladoras, tales como factores de transcripción, dando como resultado la traducción de secuencias adyacentes o próximas. Un promotor o potenciador "específico de tejido" es uno que regula la transcripción en un tipo o tipos de tejido o célula específicos.

Un "promotor" o una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de iniciar la transcripción de una secuencia de ácido nucleico a la que está unido operativamente, cuando las enzimas relacionadas con la transcripción adecuadas, por ejemplo, la ARN polimerasa, están presentes en condiciones, *por ejemplo*, condiciones de cultivo o biológicas, en las que las enzimas son funcionales. Un promotor puede estar presente cadena arriba o cadena abajo de la secuencia de ácido nucleico cuya transcripción inicia. Una secuencia promotora que está localizada cadena arriba de un ADNc está unida a su extremo 3' por un sitio de iniciación de la transcripción y se extiende cadena arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Una secuencia promotora que está localizada cadena abajo de un ADNc (para expresar un (-)ARN) está unida a su extremo 5' por un sitio de iniciación de la transcripción y se extiende cadena abajo (dirección 3') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. El sistema bidireccional descrito en el presente documento incluye promotores tanto cadena arriba como cadena abajo; el sistema unidireccional incluye solo promotores cadena arriba. En o adyacente a la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción (convenientemente definido, por ejemplo, mapeando con nucleasa S1), y también puede incluir dominios de unión a proteína (secuencias consenso) que promueven, regulan, potencian, o son de otro modo responsables de la unión a ARN polimerasa.

Una "secuencia reguladora de ARN polimerasa I canina" o un "elemento regulador de ARN polimerasa I canina" (o fragmentos funcionalmente activos de los mismos), tal como se usan en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es capaz de aumentar la transcripción de una secuencia de ácido nucleico a la que está unida operativamente, cuando la ARN polimerasa I canina y, opcionalmente, factores de transcripción asociados, están presentes en condiciones, *por ejemplo*, condiciones de cultivo o biológicas, en las que las enzimas son funcionales. Los ejemplos de secuencias reguladoras de ARN polimerasa I canina incluyen un promotor de ARN polimerasa I canina, que aumenta la transcripción de un ácido nucleico unido operativamente a este por encima del fondo, y un potenciador de ARN polimerasa I canina, que aumenta la transcripción de un ácido nucleico unido operativamente a un promotor de ARN polimerasa I canina por encima del nivel observado en ausencia de un potenciador de ARN polimerasa I canina. Una prueba para identificar un elemento regulador de ARN polimerasa I canina es introducir el elemento regulador de ARN polimerasa I canina putativo, unido operativamente a un ácido nucleico de interés, en una célula canina adecuada, *por ejemplo*, una célula MDCK, y detectar la transcripción del ácido nucleico de interés usando un ensayo convencional, *por ejemplo*, una transferencia de Northern. La comparación de los niveles de transcripción del ácido nucleico en presencia y ausencia del elemento regulador de ARN polimerasa I canina permite al experto en la materia determinar si el elemento de ácido nucleico es un elemento regulador de ARN polimerasa I canina.

El término "vector" se refiere a un ácido nucleico, *por ejemplo*, un plásmido, un vector viral, un ácido nucleico o un ADNc que puede usarse para introducir secuencias de ácido nucleico heterólogas en una célula. Un vector descrito en el presente documento comprenderá típicamente una secuencia reguladora descrita en el presente documento. Los vectores pueden ser de replicación autónoma o de replicación no autónoma. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido compuesto tanto de ADN como de ARN en la misma hebra, un ADN o ARN conjugado a poli-lisina, un ADN o ARN conjugado a un péptido, un ADN conjugado a liposomas, o similares, que no se replican autónomamente. Más comúnmente, los vectores descritos en el presente documento son plásmidos.

Un "vector de expresión" es un vector, tal como un plásmido, que es capaz de promover la expresión, por ejemplo, la transcripción, de un ácido nucleico incorporado en este. Un vector de expresión descrito en el presente documento comprenderá típicamente una secuencia reguladora descrita en el presente documento. Los vectores de expresión pueden ser de replicación autónoma o de replicación no autónoma. Típicamente, el ácido nucleico que se va a expresar está "unido operativamente" a un promotor y/o potenciador, y se somete a control regulador de la transcripción por el promotor y/o potenciador.

Un "vector de expresión bidireccional" está caracterizado típicamente por dos promotores alternativos orientados en direcciones opuestas en relación a un ácido nucleico situado entre los dos promotores, de tal forma que pueda iniciarse la transcripción en ambas orientaciones, dando como resultado, por ejemplo, la transcripción de ARN tanto de hebra más (+) o sentido, como negativo (-) o antisentido. Como alternativa, el vector de expresión bidireccional puede ser un vector ambisentido, en el que el ARNm viral y el ARN genómico viral (en forma de ARNc) se expresan a partir de la misma hebra.

En el contexto descrito en el presente documento, el término "aislado" se refiere a un material biológico, tal como un ácido nucleico o una proteína, que está sustancialmente libre de componentes que acompañan normalmente o interactúan con este en su ambiente de origen natural. El material aislado comprende opcionalmente material no

5 encontrado con el material en su ambiente natural, por ejemplo, una célula. Por ejemplo, si el material está en su ambiente natural, tal como una célula, el material se ha puesto en una localización en la célula (por ejemplo, genoma o elemento genético) no nativa para un material encontrado en ese ambiente. Por ejemplo, un ácido nucleico de origen natural (por ejemplo, una secuencia codificante, un promotor, un potenciador, etc.) se hace aislado si se introduce mediante medios no naturales en un locus del genoma (por ejemplo, un vector, tal como un plásmido o un vector viral, o amplicón) no nativo para ese ácido nucleico. Dichos ácidos nucleicos también se citan como ácidos nucleicos "heterólogos".

10 El término "recombinante" indica que el material (por ejemplo, un ácido nucleico o proteína) se ha alterado artificial o sintéticamente (de manera no natural) por la intervención humana. La alteración puede efectuarse en el material en, o retirado de, su ambiente o estado natural. Específicamente, en referencia a un virus, *por ejemplo*, un virus de la gripe, el virus es recombinante cuando se produce mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

15 El término "reorganizado", cuando se refiere a un virus, indica que el virus incluye componentes genéticos y/o polipeptídicos derivados de más de una cepa viral o fuente progenitora. Por ejemplo, un reorganizado 7:1 incluye 7 segmentos virales genómicos (o segmentos génicos) derivados de un primer virus progenitor, y un solo segmento genómico viral complementario, *por ejemplo*, que codifica hemaglutinina o neuraminidasa, a partir de un segundo virus progenitor. Un reorganizado 6:2 incluye 6 segmentos genómicos, más comúnmente los 6 genes internos de un primer virus progenitor, y dos segmentos complementarios, *por ejemplo*, hemaglutinina y neuraminidasa, procedentes de un virus progenitor diferente.

20 La expresión "introducido" en referencia a un ácido nucleico heterólogo o aislado se refiere a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota o procariota donde puede incorporarse el ácido nucleico en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertido en un replicón autónomo, o expresado de manera transitoria (por ejemplo, ARNm transfectado). El término incluye métodos tales como "infección", "transfección", "transformación" y "transducción". En el contexto descrito en el presente documento, pueden emplearse una variedad de métodos para introducir ácidos nucleicos en células procariotas, incluyendo electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por lípidos (lipofección), etc.

30 La expresión "célula hospedadora" significa una célula que puede captar o ha captado un ácido nucleico, tal como un vector, y soporta la replicación y/o la expresión del ácido nucleico, y opcionalmente la producción de uno o más productos codificados, incluyendo un polipéptido y/o un virus. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas, tales como *E. coli*, o células eucariotas, tales como células de levadura, de insecto, de anfibio, de ave o de mamífero, incluyendo células de ser humano. Las células hospedadoras ejemplares descritas en el presente documento incluyen células Vero (riñón de mono verde africano), células Per.C6 (células reinales embrionarias humanas), células BHK (riñón de cría de hámster), células primarias de riñón de pollo (PCK), células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), células de riñón bovino Madin-Darby (MDBK), células 293 (por ejemplo, células 293T), y células COS (por ejemplo, células COS1 y COS7). La expresión célula hospedadora abarca combinaciones o mezclas de células, incluyendo, *por ejemplo*, cultivos mixtos de diferentes tipos celulares o líneas celulares (por ejemplo, células Vero y CEK). Se describe un co-cultivo de células Vero electroporadas con SF, por ejemplo, en el documento PCT/US04/42669 registrado el 22 de diciembre de 2004.

45 La expresión "diseñado por ingeniería genética de manera artificial" se usa en el presente documento para indicar que el virus, el ácido nucleico viral o el producto codificado de manera viral, *por ejemplo*, un polipéptido, una vacuna, comprende al menos una mutación introducida mediante métodos recombinantes, *por ejemplo*, mutagénesis dirigida a sitio, mutagénesis por PCR, etc. La expresión "diseñado por ingeniería genética de manera artificial", cuando se refiere a un virus (o a un componente o producto viral) que comprende una o más mutaciones de nucleótido y/o sustituciones de aminoácidos indica que el genoma viral o el segmento genómico que codifica el virus (o componente o producto viral) no se deriva de fuentes naturales, tales como una cepa de origen natural o de laboratorio preexistente de virus producida mediante métodos no recombinantes (tales como paso progresivo a 25 °C), *por ejemplo*, una cepa A/Ann Arbor/6/60 o B/Ann Arbor/1/66 de tipo silvestre o adaptada al frío.

55 La expresión "% de identidad de secuencia" se usa de manera intercambiable en el presente documento con la expresión "% de identidad" y se refiere al nivel de identidad de secuencia de aminoácidos entre dos o más secuencias peptídicas o al nivel de identidad de secuencia de nucleótidos entre dos o más secuencias de nucleótidos, cuando se alinean usando un programa de alineamiento de secuencias. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento, un 80 % de identidad significa lo mismo que un 80 % de identidad de secuencia determinada mediante un algoritmo definido, y significa que una secuencia dada es al menos un 80 % idéntica a otra porción de otra secuencia. Los niveles ejemplares de identidad de secuencia incluyen, pero sin limitación, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 % o más identidad de secuencia con una secuencia dada.

65 La expresión "% de homología de secuencia" se usa de manera intercambiable en el presente documento con la expresión "% de homología" y se refiere al nivel de identidad de secuencia de aminoácidos entre dos o más secuencias peptídicas o al nivel de homología de secuencia de nucleótidos entre dos o más secuencias de nucleótidos, cuando se alinean usando un programa de alineamiento de secuencias. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento, un 80 % de homología significa lo mismo que un 80 % de homología de secuencia



determinada mediante un algoritmo definido, y por consiguiente, un homólogo de una secuencia dada tiene más de un 80 % de homología de secuencia para una porción de la secuencia dada. Los niveles ejemplares de homología de secuencia incluyen, pero sin limitación, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 % o más homología de secuencia con una secuencia dada.

5 Los programas informáticos ejemplares que pueden usarse para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, la suite de programas BLAST, *por ejemplo*, BLASTN, BLASTX, y TBLASTX, BLASTP Y TBLASTN, disponibles públicamente en internet en la página web del NCBI. Véase *también* Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10 (con especial referencia a la configuración por defecto publicada, *es decir*, parámetros  $w = 4$ ,  $t = 17$ ) y Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. Las búsquedas de secuencias se llevan típicamente a cabo usando el programa BLASTP cuando se evalúa una secuencia dada de aminoácidos en relación a secuencias de aminoácidos en las Secuencias de Proteínas de GenBank y otras bases de datos públicas. Se prefiere el programa BLASTX para buscar secuencias de ácido nucleico que se han traducido en todos los marcos de lectura contra secuencias de aminoácidos en las Secuencias de Proteínas de GenBank y otras bases de datos públicas. Tanto BLASTP como BLASTX se ejecutan usando parámetros por defecto de una penalización por espacio en blanco abierto de 11,0, y una penalización por espacio en blanco extendido de 1,0, y utiliza la matriz BLOSUM-62. Véase *lo anterior*.

20 Un alineamiento preferido de secuencias seleccionadas para determinar el "% de identidad" entre dos o más secuencias, se lleva a cabo usando, por ejemplo, el programa CLUSTAL-W en MacVector versión 6.5, operado con parámetros por defecto, incluyendo una penalización por espacio en blanco abierto de 10,0, una penalización por espacio en blanco extendido de 0,1, y una matriz de similitud BLOSUM 30.

25 "Que hibrida específicamente con" o "hibridación específica" o "que hibrida selectivamente con", se refiere a la unión, duplexación, o hibridación de una molécula de ácido nucleico, preferentemente a una secuencia nucleotídica particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja, por ejemplo, ADN o ARN celular total.

30 La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda hibridará preferentemente con su subsecuencia diana, y en menor medida con, o en absoluto con, otras secuencias. La "hibridación rigurosa" y "las condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico, tales como hibridaciones de Southern y de Northern son dependientes de secuencia, y son diferentes en parámetros ambientales diferentes. Puede encontrarse una guía extensiva para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte I, Capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, NY; Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 3ª ed., NY; y Ausubel et al., eds., Edición actual, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, NY.

40 En general, la hibridación y las condiciones de lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C menores que el punto térmico de fusión (T<sub>m</sub>) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T<sub>m</sub> es la temperatura (con una fuerza iónica y pH definidos) a la cual el 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente emparejada. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean iguales a la T<sub>m</sub> para una sonda particular.

45 Un ejemplo de condiciones rigurosas de hibridación para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de aproximadamente 100 restos complementarios en un filtro en una transferencia de Southern o de Northern es formalina al 50 % con 1 mg de heparina a 42 °C, llevándose a cabo la hibridación durante toda la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado elevadamente rigurosas es NaCl 0,15 M a 72 °C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado de SSC 0,2 X a 65 °C durante 15 minutos. Véase Sambrook et al., para una descripción del tampón SSC. Un lavado de alta rigurosidad puede estar precedido de un lavado de baja rigurosidad para eliminar la señal de fondo de la sonda. Un lavado de rigurosidad media para un dúplex de, *por ejemplo*, más de aproximadamente 100 nucleótidos, es SSC 1 x a 45 °C durante 15 minutos. Un lavado de rigurosidad baja para un dúplex de, *por ejemplo*, más de aproximadamente 100 nucleótidos, es SSC 4-6 x a 40 °C durante 15 minutos. En general, una relación de señal a ruido de 2x (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica.

60 El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, salvo que se indique lo contrario, se refiere a un valor que no está más de un 10 % por encima o por debajo del valor que está siendo modificado por el término. Por ejemplo, la expresión "aproximadamente 5 µg/kg" significa un intervalo de desde 4,5 µg/kg hasta 5,5 µg/kg. Como otro ejemplo, "aproximadamente 1 hora" significa un intervalo de desde 48 minutos hasta 72 minutos.

65 El término "codificar", como se usa en el presente documento, se refiere a la propiedad de un ácido nucleico, *por ejemplo*, ácido desoxirribonucleico, para transcribir un ácido nucleico complementario, incluyendo un ácido nucleico que puede traducirse en un polipéptido. Por ejemplo, un ácido desoxirribonucleico puede codificar un ARN que se

transcribe a partir del ácido desoxirribonucleico. De manera similar, el ácido desoxirribonucleico puede codificar un polipéptido traducido a partir de un ARN transcrito a partir del ácido desoxirribonucleico.

## 5.2 Ácidos nucleicos que comprenden elementos reguladores de ARN Pol I canina

Se proporcionan ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia reguladora de ARN canino descrita en el presente documento (por ejemplo, un promotor de ARN pol I canina). La secuencia reguladora puede, por ejemplo, unirse operativamente a un ácido nucleico que se va a transcribir y puede, en presencia de proteínas adecuadas *in vitro* o *in vivo*, transcribirse. El ácido nucleico unido operativamente a dicha secuencia reguladora puede ser un segmento de ARNv de la gripe.

En el presente documento se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende un promotor de ARN pol I canina. Preferentemente, el promotor de ARN pol I canina está unido operativamente a un ácido nucleico que se va a transcribir, tales como, *por ejemplo*, un ARN genómico de la gripe. La introducción del ácido nucleico en una célula canina puede dar como resultado la transcripción del ARN genómico de la gripe, y, en presencia de proteínas adecuadas de la gripe, el transcrito o transcritos de ARN pueden empaquetarse en un virus de la gripe, *por ejemplo*, un virus de la gripe infeccioso.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento comprenden una secuencia reguladora de ARN pol I canina o un fragmento de la misma que se une a un polipéptido de pol I humana, de primate, de ratón o canina y es al menos o aproximadamente un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, 66 %, 65 %, 64 %, 63 %, 62 %, 61 %, o un 60 % idéntica a una o más secuencias nucleotídicas seleccionadas del grupo que consiste en: las SEC ID N°: 1-28. La secuencia reguladora de la ARN pol I o un fragmento de la misma puede mantener además la capacidad para iniciar la transcripción de un gen unido operativamente a la secuencia de nucleótido. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden comprender una secuencia de polinucleótido que es al menos o aproximadamente un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, 66 %, 65 %, 64 %, 63 %, 62 %, 61 %, o un 60 % idéntica a la secuencia de SEC ID N°: 29.

Además, los ácidos nucleicos descritos en el presente documento también pueden abarcar versiones derivadas de ácidos nucleicos que comprenden un promotor de ARN pol I canina. Dichos derivados pueden producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia sin limitación a las secuencias reguladores de ARN pol I canina identificadas más adelante en el presente documento. Por ejemplo, pueden producirse derivados mediante mutagénesis específica de sitio, incluyendo sustitución, inserción, o delección de uno, dos, tres, cinco, diez o más nucleótidos, de los ácidos nucleicos. Como alternativa, pueden producirse derivados mediante mutagénesis al azar. Un método para mutar al azar un ácido nucleico comprende amplificar el ácido nucleico en una reacción PCR en presencia de MnCl<sub>2</sub> 0,1 mM y concentraciones de nucleótidos desequilibradas. Estas condiciones aumentan la tasa de incorporación errónea de la polimerasa usada en la reacción PCR y dan como resultado la mutagénesis al azar del ácido nucleico amplificado. Preferentemente, los ácidos nucleicos derivados mantienen la capacidad para iniciar la transcripción de un gen unido operativamente a la secuencia de nucleótido. El ácido nucleico descrito en el presente documento comprende al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000 nucleótidos consecutivos de una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en: las SEC ID N°: 1-28. Preferentemente, el ácido nucleico comprende una secuencia que puede iniciar la transcripción de un gen unido operativamente a la secuencia de nucleótido en células caninas, y por lo tanto es un derivado funcional. El ácido nucleico puede comprender una secuencia que puede unirse a polipéptidos de pol I caninos e iniciar (*in vitro* o *in vivo*) la transcripción de un ARNv de la gripe en células caninas. Se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende al menos 250, o al menos 350, o al menos 450 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta como SEC ID N°: 26, en la que dicha secuencia de ácido nucleico cuando está unida operativamente a ADNc que codifica un ARNv de la gripe e introducida en una célula MDCK es capaz de dirigir la expresión de dicho ARNv de la gripe. Se proporciona en una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de nucleótidos expuesta como SEC ID N°: 26, en la que dicha secuencia de ácido nucleico cuando está unida operativamente a ADNc que codifica un ARNv de la gripe e introducida en una célula MDCK es capaz de dirigir la expresión de dicho ARNv de la gripe. Se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en: las SEC ID N°: 1-26, en la que dicha secuencia de ácido nucleico cuando está unida operativamente a ADNc que codifica un ARNv de la gripe e introducida en una célula MDCK es capaz de dirigir la expresión de dicho ARNv de la gripe. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden comprender al menos 400, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, o 3000 nucleótidos consecutivos de SEC ID N°: 29.

Una secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento puede comprender, o como alternativa consistir en los nucleótidos -469 a -1 (en relación al primer nucleótido transcrito a partir del promotor, también conocido como el nucleótido +1) de la secuencia presentada como SEC ID N°: 1, o un derivado funcional de la misma. Una

secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento puede comprender, o como alternativa consistir en los nucleótidos -250 a -1 (en relación al primer nucleótido transcrito a partir del promotor, también conocido como el nucleótido +1) de la secuencia presentada como SEC ID N°: 1, o un derivado funcional de la misma. El nucleótido +1 para el ARN ribosomal 18S expresado a partir de la secuencia reguladora de pol I canina encontrada en SEC ID N°: 1 es el nucleótido en la posición 1809 de SEC ID N°: 1. Se proporciona un ácido nucleico que comprende los nucleótidos 1-469 de SEC ID N°: 26, el complemento de los mismos, el complemento inverso de los mismos, o un fragmento funcionalmente activo de los mismos.

En el presente documento se proporcionan fragmentos funcionalmente activos de SEC ID N°: 1 (una subsecuencia de la secuencia de nucleótidos presentada en el clon depositado en la ATCC, con N° de registro PTA-7540). Por consiguiente, se proporcionan además en el presente documento polinucleótidos que tienen uno o más restos de ácidos nucleicos eliminados del extremo amino de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1. Las eliminaciones N-terminales de SEC ID N°: 1 pueden describirse mediante la fórmula general m-3537, donde m es un número entero de 2 a 3512, donde m corresponde a la posición del nucleótido identificado en SEC ID N°: 1, o la secuencia de nucleótidos presente en el clon depositado (ATCC, con N° de registro PTA-7540). También se proporcionan en el presente documento polinucleótidos que tienen uno o más restos de ácidos nucleicos eliminados del extremo carboxi de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1. Las eliminaciones C-terminales de SEC ID N°: 1 pueden describirse mediante la fórmula general 1 - n, donde n es un número entero de 2 a 3512, donde n corresponde a la posición del nucleótido identificado en SEC ID N°: 1, o la secuencia de nucleótidos presente en el clon depositado (ATCC, con N° de registro PTA-7540).

En el presente documento también se proporcionan fragmentos funcionalmente activos de SEC ID N°: 26 (una subsecuencia de la secuencia de nucleótidos presentada en el clon depositado en la ATCC, con N° de registro PTA-7540). Por consiguiente, se proporcionan además en el presente documento polinucleótidos que tienen uno o más restos de ácidos nucleicos eliminados del extremo amino de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 26. Las eliminaciones N-terminales de SEC ID N°: 26 pueden describirse mediante la fórmula general m-469, donde m es un número entero de 2 a 450, donde m corresponde a la posición del resto de ácido nucleico identificado en SEC ID N°: 26. También se proporcionan en el presente documento polinucleótidos que tienen uno o más restos de ácidos nucleicos eliminados del extremo carboxi de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 26. Las eliminaciones C-terminales de SEC ID N°: 26 pueden describirse mediante la fórmula general 1 - n, donde n es un número entero de 2 a 450, donde n corresponde a la posición del resto de ácido nucleico identificado en SEC ID N°: 26.

La secuencia reguladora de pol I canina descrita en el presente documento puede comprender, o como alternativa consistir en un ácido nucleico aislado (o la secuencia complementaria del mismo) que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en: las SEC ID N°: 1-28 y puede iniciar la transcripción de un gen unido operativamente a la secuencia reguladora en células caninas.

La secuencia reguladora de pol I canina descrita en el presente documento puede comprender una secuencia de ácido nucleico que puede unirse a un polipéptido de ARN pol I canino y puede iniciar la transcripción de un gen unido operativamente a la secuencia de nucleótido en células caninas. El ácido nucleico puede comprender una secuencia que puede unirse a un polipéptido de pol I de eucariota e iniciar la transcripción (*in vitro* o *in vivo*) de un ARNv de la gripe. Puede ensayarse la unión del polipéptido de ARN pol I canina a una secuencia reguladora de pol I canina con un ensayo de protección de nucleasa. La unión de un polipéptido de ARN pol I canino a una secuencia reguladora de pol I canina puede ensayarse con un sistema BIACORE para ensayar interacciones de proteínas (Biacore International AG, Uppsala, Suecia).

El ácido nucleico puede comprender una secuencia que se une a ARN pol I canina. La secuencia puede unirse a ARN pol I canina con mayor afinidad que una ARN polimerasa seleccionada del grupo que consiste en ARN pol I de primate, una pol I humana, y una pol I de ratón. La secuencia puede unirse a ARN pol I canina con mayor afinidad que a ARN pol II canina. La secuencia puede unirse a ARN pol I canina con mayor afinidad que a ARN pol III canina. La unión a una secuencia reguladora de pol I canina puede ensayarse con un sistema BIACORE para ensayar interacciones de proteínas (Biacore International AG, Uppsala, Suecia).

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

ATTCCCGGTGAGGCTGCCTCTGCCGCGGTGGCCCTCCACCTCCCCTGGCCCGAG  
CCGGGGTTGGGGACGGCGGTAGGCACGGGGCGGTCTGAGGGCCGCGGGGGAC  
GGCCTCCGCACGGTGCCTGCCTCCGGAGAACTTTGATGATTTTTCAAAGTCTCCT  
5 CCOGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCG  
GCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCGCGTATCGCCCCCTCCTCCCCTCCCCC  
CCCCCCCCGTTCCCTGGGTCCGACCAGATAGCCCTGGGGGCTCCGTGGGGTGGGGG  
TGGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTGTCACGGTCCCG  
GGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTTCTTG  
CCCGAGATGAACATTTTTTGTGTCAGGTAGGT (SEC ID N°: 26),

5 que es una subsecuencia de la secuencia de nucleótidos presentada en el clon depositado en la ATCC, con N° de registro PTA-7540.

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

TTGATGATTTTTCAAAGTCTCCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCGT  
GGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCCGTATC  
GCCCCCTCCTCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTCCGACCAGATAGCCCTGG  
GGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGT  
TGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGC  
AGGCGCGGTTATTTCTTGCCCCGAGATGAACATTTTTTGTGTCAGGTAGGTGCT  
10 GACA (SEC ID N°:2).

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

TTGATGATTTTTCAAAGTCTCCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGC  
GTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCGCGT  
ATCGCCCCCTCCTCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTCCGACCAGATAGCCC  
TGGGGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGAC  
AGTTGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCC  
GGCAGGCGCGGTTATTTCTTGCCCCGAGATGAACATTTTTTGTGTCAGGTAGGT  
15 GCTGACA (SEC ID N°:20).

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

GGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGT  
TGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGC  
AGGCGCGGTTATTTCTTGCCCCGAGATGAACATTTTTTGTGTCAGGTAGGTGCT  
20 GACA (SEC ID N°:3).

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

GCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTTCG  
GGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTCTTGCCCCGAGATG  
AACATTTTTTGTGTCAGGTAGGTGCTGACA (SEC ID N°:4).

25

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**TGGCCGTGTACGGTCCCGGGAGGTGCGGGTACCTGTGGCTGGTCCCGCCGGC  
AGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCCGAGATGAACATTTTTTGTGCCAGGTAGGTGCT  
GACA (SEC ID N°: 5)**

5 El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**GTGACCTGTGGCTGGTCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCCGAGATGA  
ACATTTTTTGTGCCAGGTAGGTGCTGACA (SEC ID N°: 6)**

10 El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**AGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCCGAGATGAACATTTTTTGTGCCAGGTAGGTGCT  
GACA (SEC ID N°: 7)**

15 El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**TTGATGATTTTTCAAAGTCTCCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCGT  
GGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCCGTATC  
GCCCCCTCCTCCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTGACACAGATAGCCCTG  
(SEC ID N°: 8)**

20 El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**TTGATGATTTTTCAAAGTCTCCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCG  
GTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCGCGT  
ATCGCCCCCTCCTCCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTGACACAGATAGCCC  
TG (SEC ID N°: 21)**

25 El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**TTGATGATTTTTCAAAGTCTCCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCGT  
GGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCCGTATC  
GCCCCCTCCTCCCCCTCCCCCCCCCCCCCCC (SEC ID N°: 9)**

30 El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**TTGATGATTTTTCAAAGTCTCCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCG  
GTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCGCGT  
ATCGCCCCCTCCTCCCCCTCCCCCCCCCCCCCCC (SEC ID N°: 22)**

35 El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**TTGATGATTTTTCAAAGTCTCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCGT  
GGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCCGTATC  
(SEC ID N°: 10)**

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

5

**TTGATGATTTTTCAAAGTCTCTCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCG  
GTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCCGCGT  
ATC (SEC ID N°: 23)**

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

10

**TTGATGATTTTTCAAAGTCTCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCGT  
(SEC ID N°: 11).**

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

15

**TTGATGATTTTTCAAAGTCTCTCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGC  
GT (SEC ID N°: 24)**

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

20

**TTGATGATTTTTCAAAGTCTCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCGT  
GGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCCGTATC  
GCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTCGACCAGATAGCCCTGG  
GGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGT  
TGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGC  
AGGCGCGGTTATTTCTTGCCCGAG (SEC ID N°: 12)**

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

25

**TTGATGATTTTTCAAAGTCTCTCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGC  
GTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCGCGT  
ATCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTCGACCAGATAGCCC  
TGGGGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGAC  
AGTTGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCC  
GGCAGGCGCGGTTATTTCTTGCCCGAG (SEC ID N°: 25)**

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

30

**GGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCCGTATC  
GCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTCGACCAGATAGCCCTGG  
GGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGT  
TGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGC  
AGGCGCGGTTATTTCTTGCCCGAG (SEC ID N°: 13)**

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**GGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCGCGTAT  
CGCCCTCCTCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTGACAGATAGCCCTG  
GGGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAG  
TTGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTGCGGGTACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGG  
CAGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG (SEC ID N°: 27)**

5

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**GCCCTCCTCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTGACAGATAGCCCTGG  
GGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGT  
TGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTGCGGGTACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGC  
AGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG (SEC ID N°: 14)**

10

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**GGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGT  
TGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTGCGGGTACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGC  
AGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG ((SEC ID N°: 15)**

15

El promotor de ADN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**GCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTGCG  
GGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG  
(SEC ID N°: 16)**

20

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**TGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTGCGGGTACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGC  
AGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG (SEC ID N°: 17)**

25

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

**GGCGTGGCGTCTCCACCGACCGTATCGCCCTCCTCCCCTCCCCCCCCCCCCCG  
TTCCCTGGGTGACAGATAGCCCTGGGGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGG  
CGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTGTCACGGTCCCGGGAGGTGCG  
CGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG  
(SEC ID N°: 18)**

30

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

GGCGTGGCGTCTCCACCGACCGCGTATCGCCCCTCCTCCCCTCCCCCCCCCCCCC  
 GTTCCCTGGGTCGACCAGATAGCCCTGGGGGCTCCGTGGGGTGGGGGTGGGGGG  
 GCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTGTACGGTCCCGGGAGGTC  
 GCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG  
 (SEC ID N°: 28)

El promotor de ARN pol I canina puede comprender, o como alternativa consistir en, la siguiente secuencia de nucleótido:

5

TCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGA  
 G (SEC ID N°: 19)

### 5.3 Vectores y vectores de expresión

10 En el presente documento se proporcionan vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención, incluyendo vectores de expresión útiles para rescatar de manera recombinante un virus de un cultivo celular. En general, los vectores de expresión son útiles para rescatar cualquier virus conocido para un experto en la materia para requerir producción de ARN con límites definidos durante su ciclo vital. Por ejemplo, como ya se ha discutido anteriormente, el ARN genómico del virus de la gripe debe tener un extremo 5' y 3' definido para replicarse y empaquetarse eficazmente en un sistema recombinante. Véase, también la revisión en Neumann et al., (2002), 83:2635-2662. La siguiente discusión se enfoca en vectores de expresión adecuados para su uso con la gripe; sin embargo, cabe destacar que también pueden rescatarse otros virus usando los vectores descritos en el presente documento.

15

20 De acuerdo con la presente divulgación, puede transferirse ADNc que codifica ARN genómico viral correspondiente a cada uno de los ocho segmentos genómicos de la gripe (los segmentos pueden ser de diferentes virus de la gripe, *por ejemplo*, 6 de la cepa X y 2 de la cepa Y) en un vector recombinante para la manipulación y producción de virus de la gripe. Una variedad de vectores, incluyendo vectores virales, plásmidos, cósmidos, fagos, y cromosomas artificiales, pueden emplearse en el contexto descrito en el presente documento. Típicamente, por facilidad de manipulación, el ADNc se inserta en un vector plasmídico, proporcionando uno o más orígenes de replicación funcionales en células bacterianas y eucariotas, y, opcionalmente, un marcador conveniente para explorar o seleccionar células que incorporan la secuencia plasmídica. Véase, *por ejemplo*, Neumann et al., 1999, PNAS. EE.UU. 96:9345-9350.

20

25

30 Los vectores descritos en el presente documento pueden ser vectores de expresión bidireccionales capaces de iniciar la transcripción de un segmento genómico viral a partir del ADNc insertado en cualquier dirección, es decir, dando lugar a moléculas de ARN viral tanto de hebra (+) como de hebra (-). Para efectuar la transcripción bidireccional, cada uno de los segmentos genómicos virales se inserta en un vector de expresión que tiene al menos dos promotores independientes, de tal forma que se transcriben copias de ARN genómico viral por un primer promotor de ARN polimerasa (por ejemplo, un promotor de ARN pol I canina), de una hebra, y se sintetizan ARNm virales a partir de un segundo promotor de ARN polimerasa (por ejemplo, un promotor de ARN pol II canina u otro promotor que inicie la transcripción por ARN pol II en células caninas). Por consiguiente, los dos promotores pueden disponerse en orientaciones opuestas flanqueando al menos un sitio de clonación (es decir, una secuencia de reconocimiento por enzima de restricción), preferentemente un sitio de clonación único, adecuados para la inserción de segmentos de ARN genómico viral. Como alternativa, puede emplearse un vector de expresión "ambisentido" en el que el ARNm de hebra (+) y el ARN viral de hebra (-) (como un ARNc) se transcriben a partir de la misma hebra del vector. Como ya se ha discutido anteriormente, el promotor de pol I para transcribir el ARN genómico viral es preferentemente un promotor de pol I canino.

30

35

40

45 Para asegurar el extremo 3' correcto de cada ARNv o ARNc expresado, cada vector de expresión de ARNv o ARNc puede incorporar una secuencia de ribozima o una secuencia de terminación adecuada (por ejemplo, una secuencia de terminación de ARN polimerasa I humana, de ratón, de primate o canina) cadena abajo de la secuencia codificante de ARN. Esta puede ser, por ejemplo, la secuencia de ribozima genómica del virus de la hepatitis delta o un derivado funcional de la misma, o la secuencia de terminación de ADNr murino (Número de registro de GenBank M12074). Como alternativa, por ejemplo, puede emplearse una secuencia de terminación de pol I (Neumann et al., 1994, Virology 202:477-479). Los vectores de expresión de ARN pueden construirse del mismo modo que los vectores de expresión de ARNv descritos en Plesckka et al., 1996, J. Virol. 70:4188-4192; Hoffmann y Webster, 2000, J. Gen Virol. 81:2843-2847; Hoffmann et al., 2002, Vaccine 20:3165-3170; Fodor et al., 1999, J. Virol. 73:9679-9682; Neumann et al., 1999, P.N.A.S. EE.UU. 96:9345-9350; y Hofmann et al., 2000, Virology 267:310-317.

50

55 En otros sistemas, las secuencias virales transcritas por los promotores de pol I y pol II pueden transcribirse a partir de vectores de expresión diferentes. En el presente documento, pueden usarse vectores que codifican cada uno de los segmentos genómicos bajo el control de una secuencia reguladora canina de la invención, *por ejemplo*, un



promotor de pol I canino ("vectores de expresión de ARNv") y vectores que codifican uno o más polipéptidos virales, *por ejemplo*, los polipéptidos PA, PB1, PB2, y NP de la gripe ("vectores de expresión de proteínas") bajo el control de un promotor de pol II.

5 En cada caso, en referencia al promotor de pol II, el segmento genómico del virus de la gripe que va a expresarse puede unirse operativamente a una secuencia de control de la transcripción adecuada (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Una variedad de promotores son adecuados para su uso en vectores de expresión para regular la transcripción de segmentos genómicos del virus de la gripe. Puede utilizarse el promotor de ARN polimerasa II (pol II) dependiente de ADN de citomegalovirus (CMV). Si se desea, *por ejemplo*, para regular la expresión condicional, pueden sustituirse otros promotores que inducen la transcripción de ARN en condiciones especificadas, o en los tejidos o células especificadas. Hay disponibles numerosos promotores virales y de mamífero, por ejemplo, humanos, o pueden aislarse de acuerdo con la aplicación específica contemplada. Por ejemplo, los promotores alternativos obtenidos a partir de los genomas de virus de animales y seres humanos incluyen promotores tales como los promotores de adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma, virus de la hepatitis B, y virus de polio, y varios promotores retrovirales. Los promotores de mamífero incluyen, entre otros muchos, el promotor de actina, promotores de inmunoglobulina, promotores de choque por calor, y similares. La secuencia reguladora puede comprender el promotor tardío principal de Adenovirus 2 unido a la secuencia líder tripartita empalmada de Adenovirus 2 humano, tal como se describe por Berg et al., *Bio Techniques* 14:972-978. Además, pueden emplearse promotores de bacteriófagos en conjunción con la ARN polimerasa afín, *por ejemplo*, el promotor T7.

Los vectores de expresión usados para expresar proteínas virales, en particular proteínas virales para la formación de complejos de RNP, expresarán preferentemente proteínas virales homólogas a las del virus deseado. La expresión de proteínas virales mediante estos vectores de expresión puede estar regulada por cualquier secuencia reguladora conocida por los expertos en la materia. La secuencia reguladora puede ser un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de tejido. Los ejemplos adicionales de promotores que pueden usarse para controlar la expresión de proteínas virales en vectores de expresión de proteínas incluyen, pero sin limitación, la región del promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310), el promotor contenido en la repetición larga 3' terminal del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, et al., 1980, *Cell* 22:787-797), el promotor de timidin cinasa de herpes (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); vectores de expresión procariotas, tales como el promotor de  $\beta$ -lactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3727-3731), o el promotor de *tac* (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25); véase también "Useful proteins from recombinant bacteria" en *Scientific American*, 1980, 242:74-94; vectores de expresión en plantas que comprenden la región promotora de nopalina sintasa (Herrera-Estrella et al., *Nature* 303:209-213) o el promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner et al., 1981, *Nucl. Acids Res.* 9:2871), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., 1984, *Nature* 310:115-120); elementos promotores de levadura u otros hongos, tales como el promotor de Gal 4, el promotor de ADC (alcohol deshidrogenasa), el promotor de PGK (fosfoglicerol cinasa), el promotor de fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de control transcripcional animal, que muestran especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: región de control del gen de elastasa I, que es activo en células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Omitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); la región de control del gen de insulina, que está activa en las células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122), la región de control del gen de inmunoglobulina, que está activa en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444), región de control del virus de tumor mamario de ratón, que está activa en células testiculares, mamarías, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495), región de control del gen de albúmina que está activa en el hígado (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276), región de control del gen de alfa-fetoproteína, que está activa en el hígado (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 235:53-58; región de control del gen de alfa-antitripsina, que está activa en el hígado (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171), región de control del gen de beta-globina, que está activa en células mieloides (Mogam et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94; región de control del gen de proteína básica de mielina, que está activa en células oligodendrocíticas en el cerebro (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712), región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina, que está activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286), y la región de control del gen de hormona de liberación gonadotrópica, que está activa en el hipotálamo (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Los vectores de expresión de proteínas descritos en el presente documento pueden comprender un promotor unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico, a uno o más orígenes de replicación, y, opcionalmente, a uno o más marcadores de selección (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Un vector de expresión de proteínas descrito en el presente documento que es capaz de producir ARNm bicistrónico puede producirse insertando secuencias de ARNm bicistrónico. Pueden utilizarse determinadas secuencias de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Los elementos IRES preferidos incluyen, pero sin limitación, el IRES BiP de mamífero y el IRES del virus de la hepatitis C.

65 Un ácido nucleico descrito en el presente documento puede insertarse en el plásmido pAD3000 o en un derivado del mismo. Véase, la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos 20050266026 y la Figura 10. Por lo

tanto, el vector de expresión puede ser un vector de expresión bidireccional. El vector de expresión puede comprender una señal de poliadenilación de SV40 flanqueando un segmento del genoma del virus de la gripe interno para los dos promotores. El vector de expresión puede comprender el promotor de ARN pol II dependiente de ADN de citomegalovirus (CMV). Un ácido nucleico descrito en el presente documento puede insertarse en el plásmido pAD4000 o en un derivado del mismo. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden comprender o como alternativa consistir en la secuencia de pAD4000 presentada como SEC ID N°: 29.

Los vectores que contienen inserciones génicas pueden identificarse mediante, *por ejemplo*, tres estrategias generales: (a) hibridación de ácido nucleico; (b) presencia o ausencia de funciones de gen "marcador"; y, en el caso de vectores de expresión, (c) expresión de la secuencias insertadas. En la primera estrategia, la presencia del gen viral insertado en un vector (o vectores) puede detectarse mediante hibridación de ácido nucleico usando sondas que comprenden secuencias que son homólogas para el gen insertado (o los genes insertados). En la segunda estrategia, el vector recombinante/sistema hospedador puede identificarse y seleccionarse basándose en la presencia o ausencia de determinadas funciones de gen "marcador" (por ejemplo, resistencia a antibióticos o transformación de fenotipo) causadas por la inserción del gen (o los genes) en el vector (o vectores). En la tercera estrategia, los vectores de expresión puede identificarse ensayando el producto génico expresado. Dichos ensayos pueden estar basados, por ejemplo, en las propiedades físicas o funcionales de la proteína viral en sistemas de ensayo *in vitro*, *por ejemplo*, unión de proteínas virales a anticuerpos.

Uno o más vectores de expresión de proteínas pueden codificar y expresar las proteínas virales necesarias para la formación de complejos de RNP. Uno o más vectores de expresión de proteínas pueden codificar y expresar las proteínas necesarias para formar partículas virales. Uno o más vectores de expresión de proteínas pueden codificar y expresar la totalidad de las proteínas virales de un virus de ARN de cadena negativa concreto.

La transcripción a partir de vectores de expresión puede aumentarse opcionalmente incluyendo una secuencia potenciadora. Los potenciadores son elementos de ADN típicamente cortos, *por ejemplo*, de 10-500 pb, de acción que actúan en concierto con un promotor para aumentar la transcripción. Se han aislado muchas secuencias potenciadoras a partir de genes de mamífero (hemoglobina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína, e insulina), y virus de células eucariotas. El potenciador puede empalmarse en el vector a una posición 5' o 3' de la secuencia codificante heteróloga, pero se inserta típicamente en un sitio 5' del promotor. Típicamente, el promotor, y si se desea, secuencias potenciadoras de la transcripción adicional se seleccionan para optimizar la expresión en el tipo de célula hospedadora en la que se va a introducir el ADN heterólogo (Scharf et al., (1994) Heat stress promoters and transcription factors Results Probl Cell Differ 20:125-62; Kriegler et al. (1990) Assembly of enhancers, promoters, and splice signals to control expression of transferred genes Methods in Enzymol 185: 512-27). Opcionalmente, el amplicón puede contener también un sitio de unión a ribosoma o un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para el inicio de la traducción.

Los vectores de expresión descritos en el presente documento también pueden incluir secuencias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm, tales como un sitio de poliadenilación o una secuencia de terminación (por ejemplo, una secuencia de terminación de ARN polimerasa I humana, de ratón, de primate o canina). Dichas secuencias están fácilmente disponibles a partir de las regiones 5' y en ocasiones 3' no traducidas de ADN o ADNc eucarióticos o virales. Las secuencias de poliadenilación de SV40 pueden proporcionar una señal de poliadenilación.

Además, tal como se describe anteriormente, los vectores incluyen opcionalmente uno o más genes de marcador de selección para proporcionar una característica fenotípica para la selección de células transformadas, además de los genes listados anteriormente, marcadores, tales como la dihidrofolato reductasa o la resistencia a neomicina son adecuados para la selección en cultivo de célula eucariotas.

El vector de expresión que contiene la secuencia de ADN adecuada tal como se describe anteriormente, así como un promotor o secuencia de control adecuada, pueden emplearse para transformar una célula hospedadora, permitiendo la expresión de la proteína. Aunque los vectores de expresión de la invención pueden replicarse en células bacterianas, será más frecuentemente deseable introducirlos en células de mamífero, *por ejemplo*, células Vero, células BHK, células MDCK, células 293, células COS, más preferentemente células MDCK, para el fin de la expresión.

Los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden usarse para dirigir la expresión de ARNv genómicos o los correspondientes ARNc que tienen una o más mutaciones (por ejemplo, retirada o inactivación de un sitio de escisión polibásico en el gen HA de cepas pandémicas particulares del virus de la gripe, tales como H5N1). Estas mutaciones pueden dar como resultado la atenuación del virus. Por ejemplo, los segmentos de ARNv pueden ser los segmentos de ARNv de un virus de la gripe A que tiene una sustitución de par de bases atenuadas en una región promotora de dúplex saliente, en particular, por ejemplo, la sustitución atenuante de par de bases de A por C y U por G en la posición 11-12' de la región dúplex del ARNv específico de NA (Fodor et al., 1998, J. Virol. 69:23-6290). Al usar los métodos descritos en el presente documento para producir virus de ARN recombinante de hebra negativa, pueden detectarse nuevas mutaciones atenuantes.

Además, puede usarse cualquiera de los vectores de expresión descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 6.951.754, 6.887.699, 6.649.372, 6.544.785, 6.001.634, 5.854.037, 5.824.536, 5.840.520, 5.820.871, 5.786.199, y 5.166.057 y las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 20060019350, 20050158342, 20050037487, 20050266026, 20050186563, 20050221489, 20050032043, 20040142003, 20030035814, y 20020164770 de acuerdo con la presente divulgación. En general, los vectores descritos en el estas publicaciones pueden adaptarse para su uso de acuerdo con la presente divulgación introduciendo un ácido nucleico descrito en el presente documento (por ejemplo, una secuencia reguladora canina descrita en el presente documento, tal como una secuencia promotora de pol I canina) tal como se describe en el presente documento en los vectores de expresión para dirigir la síntesis de ARNv o ARNc viral.

### 5.3.1 Elementos de expresión adicionales

Más comúnmente, el segmento genómico que codifica la proteína del virus de la gripe incluye cualquier secuencia adicional necesaria para su expresión, incluyendo la traducción en una proteína viral funcional. En otras situaciones, puede emplearse un minigen, u otra construcción artificial que codifica las proteínas virales, *por ejemplo*, una proteína HA o NA. En este caso, a menudo es deseable incluir señales de iniciación específicas que ayudan a la traducción eficaz de la secuencia codificante heteróloga. Estas señales pueden incluir, *por ejemplo*, el codon de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Para asegurar la traducción de la inserción completa, se inserta el codon de iniciación en el marco de lectura correcto en relación a la proteína viral. Los elementos transcripcionales exógenos y los codones de iniciación pueden ser de varios orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores adecuados para el sistema celular que se esté usando.

Si se desea, pueden incorporarse secuencias de polinucleótido que codifican elementos expresados adicionales, tales como secuencias de señal, secuencias de secreción o localización, y similares en el vector, generalmente, en marco con la secuencia del polinucleótido de interés, *por ejemplo*, para dirigir la expresión del polipéptido a un compartimento celular, membrana, u orgánulo deseado, o en el medio de cultivo celular. Dichas secuencias se conocen por los expertos, e incluyen péptidos líderes de secreción, secuencias de dirección a orgánulos (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, señales de retención en el RE, secuencias de tránsito mitocondrial), secuencias de localización/anclaje en membrana (por ejemplo, secuencias de detención de la transferencia, señales de ancla de GPI), y similares.

### 5.4 Vectores de expresión para preparar virus quiméricos

Los vectores de expresión descritos en el presente documento también pueden usarse para preparar virus quiméricos que expresan secuencias heterólogas para un genoma viral. Los vectores de expresión que dirigen la expresión de los ARNv o los correspondientes ARNc introducidos en células hospedadoras junto con vectores de expresión dirigen la expresión de proteínas virales para generar nuevos virus infecciosos de ARN de cadena negativa recombinantes o virus quiméricos. Véase, *por ejemplo*, la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° US20040002061. Las secuencias heterólogas que pueden diseñarse en estos virus incluyen ácidos nucleicos antisentido y ácidos nucleicos, tales como una ribozima. Como alternativa, pueden diseñarse en estos virus secuencias heterólogas que expresan un péptido o polipéptido. Las secuencias heterólogas que codifican los siguientes péptidos o polipéptidos que pueden diseñarse en estos virus incluyen: 1) antígenos que son característicos de un patógeno; 2) antígenos que son característicos de enfermedades autoinmunes; 3) antígenos que son característicos de un alérgeno; y 4) antígenos que son característicos de un tumor. Por ejemplo, las secuencias génicas heterólogas que pueden diseñarse en los virus quiméricos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, epítomos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tales como gp160; antígenos de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg); las glucoproteínas del virus del herpes (por ejemplo, gD, gE); VP1 de poliovirus; y determinantes antigénicos de patógenos no virales, tales como bacterias y parásitos, por nombrar solo algunos.

Los antígenos que son característicos de enfermedades autoinmunes se derivarán típicamente de la superficie celular, el citoplasma, el núcleo, las mitocondrias o similares de tejidos de mamífero, incluyendo antígenos característicos de la diabetes mellitus, la esclerosis múltiple, el lupus sistémico eritematoso, la artritis reumatoide, la anemia perniciosa, la enfermedad de Addison, el escleroderma, la gastritis autoinmune atrófica, la diabetes juvenil, y el lupus discoide eritromatoso.

Los antígenos que son alérgenos son generalmente proteínas o glucoproteínas, incluyendo antígenos derivados de pólenes, polvo, mohos, esporas, caspa, insectos y alimentos.

Los antígenos que son característicos de antígenos tumorales se derivarán típicamente de la superficie celular, el citoplasma, el núcleo, los orgánulos o similares de las células del tejido tumoral. Los ejemplos incluyen antígenos característicos de proteínas tumorales, incluyendo proteínas codificadas por oncogenes mutados; proteínas virales asociadas a tumores y glucoproteínas. Los tumores incluyen, pero sin limitación, aquellos derivados de los cáncer de tipo: de labio, de nasofaringe, de faringe o de la cavidad oral, de esófago, de estómago, de colon, de recto, de hígado, de vesícula biliar, de páncreas, de laringe, de pulmón y bronquios, melanoma de la piel, mamarías, de cuello

de útero, uterino, de ovario, de vejiga, de riñón, de útero, de cerebro y otras partes del sistema nervioso, de tiroides, de próstata, de testículo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, mieloma múltiple y leucemia.

Las secuencias heterólogas pueden derivarse del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), preferentemente el virus de la inmunodeficiencia humana 1 o el virus de la inmunodeficiencia humana 2. Las secuencias codificantes heterólogas pueden insertarse con una secuencia codificante de gen de virus de ARN de cadena negativa de tal forma que se expresa un producto génico quimérico que contiene la secuencia peptídica heteróloga en la proteína viral. En el presente documento, las secuencias heterólogas también pueden derivarse del genoma de un virus de la inmunodeficiencia humana, preferentemente del virus de la inmunodeficiencia humana 1 o del virus de la inmunodeficiencia humana 2.

En los casos donde las secuencias heterólogas se derivan del VIH, dichas secuencias pueden incluir, pero sin limitación, secuencias derivadas del gen env (es decir, secuencias que codifican todas o parte de gp160, gp120, y/o gp41), del gen pol (es decir, secuencias que codifican todas o parte de la transcriptasa inversa, la endonucleasa, la proteasa, y/o la integrasa), del gen gag (es decir, secuencias que codifican todas o parte de p7, p6, p55, p17/18, p24/25) tat, rev, nef, vif, vpu, vpr, y/o vpx.

Una estrategia para construir estas moléculas híbridas es insertar la secuencia codificante heteróloga en un complemento de ADN de un gen de virus de ARN de hebra negativa de tal forma que la secuencia heteróloga está flanqueada por las secuencias virales necesarias para la actividad de la polimerasa viral; *por ejemplo*, un promotor de ARN pol I canina y un sitio de poliadenilación. En una estrategia alternativa, los oligonucleótidos que codifican un promotor de ARN pol I canina, *por ejemplo*, el complemento del extremo 3' terminal o ambos extremos de los segmentos genómicos del virus pueden ligarse a la secuencia codificante heteróloga para construir la molécula híbrida. Colocar un gen exógeno o un segmento de un gen exógeno en una secuencia diana estaba antes dictado por la presencia de sitios de enzima de restricción adecuados en la secuencia diana. Sin embargo, los avances recientes en la biología molecular han reducido este problema en gran medida. Los sitios de enzimas de restricción pueden colocarse fácilmente en cualquier parte de una secuencia diana mediante el uso de mutagénesis dirigida a sitios (por ejemplo, véase, por ejemplo, las técnicas descritas por Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:488). Las variaciones en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se han descrito también permiten la inserción específica de secuencias (es decir, sitios de enzimas de restricción) y permiten la construcción fácil de moléculas híbridas. Como alternativa, las reacciones PCR pueden usarse para preparar plantillas recombinantes sin necesidad de clonación. Por ejemplo, las reacciones PCR pueden usarse para preparar moléculas de ADN bicatenario que contienen un promotor de ARN polimerasa dirigido por ADN (por ejemplo, bacteriófago T3, T7 o SP6) y la secuencia híbrida que contiene el gen heterólogo y un promotor de ARN pol I canino. Las plantillas de ARN pueden entonces transcribirse directamente a partir de este ADN recombinante. Los ARNv recombinantes o los ARNc correspondientes pueden prepararse ligando ARN especificando la polaridad negativa del gen heterólogo y el promotor de ARN pol I canina usando una ARN ligasa.

Puede construirse ARNm bicistrónico para permitir la iniciación interna de la traducción de secuencias virales y permitir la expresión de secuencias codificantes de proteínas exógenas a partir del sitio de iniciación terminal regular. Como alternativa, puede construirse una secuencia de ARNm bicistrónico en la que la secuencia viral se traduce a partir del marco de lectura abierto terminal regular, mientras que la secuencia exógena se inicia a partir de un sitio interno. Pueden utilizarse determinadas secuencias de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Las secuencias IRES seleccionadas deben ser lo suficientemente cortas como para no interferir con las limitaciones de empaquetado del virus. Por lo tanto, es preferible que el IRES elegido para dicha estrategia bicistrónica sea de no más de 500 nucleótidos de longitud, prefiriéndose de menos de 250 nucleótidos. Además, es preferible que el IRES utilizado no comparta homología de secuencia o estructural con elementos picornavirales. Los elementos IRES preferidos incluyen, pero sin limitación, el FRES BiP de mamífero y el IRES del virus de la hepatitis C.

Como alternativa, puede expresarse una proteína exógena a partir de una unidad transcripcional interna en la que la unidad transcripcional tiene un sitio de iniciación y un sitio de poliadenilación. El gen exógeno puede insertarse en un gen de virus de ARN de hebra negativa de tal forma que la proteína expresada resultante es una proteína de fusión.

#### 5.5 Métodos para generar virus recombinantes

En el presente documento se proporcionan métodos para generar virus de ARN de hebra negativa recombinantes infecciosos introduciendo vectores de expresión de proteínas y ARNv o los correspondientes vectores de expresión que expresan ARNc descritos en el presente documento en células hospedadoras en ausencia de virus auxiliares. Preferentemente, las células hospedadoras son células caninas, *por ejemplo*, células MDCK. También se proporcionan en el presente documento métodos para generar virus de ARN de hebra negativa recombinantes infecciosos introduciendo vectores de expresión de proteínas y ARNv o los correspondientes vectores de expresión que expresan ARNc descritos en el presente documento en presencia de virus auxiliares. Las células hospedadoras pueden ser, por ejemplo, células caninas (tales como células MDCK), células Vero, células Per.C6, células BHK, células PCK, células MDCK, células MDBK, células 293 (por ejemplo, células 293T), y células COS.

Los vectores de expresión de proteínas y los vectores de expresión que dirigen la expresión de ARNv o los correspondientes ARNc pueden introducirse en células hospedadoras usando cualquier técnica conocida para los expertos en la materia, sin limitación. Por ejemplo, los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden introducirse en células hospedadoras empleando electroporación, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, liposomas, microinyección, y bombardeo de micropartículas (véase, *por ejemplo*, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed.; 1989, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden introducirse en células hospedadoras de manera simultánea o de manera secuencial.

Pueden introducirse uno o más vectores de expresión que dirigen la expresión de el o los ARNv o el o los correspondientes ARNc en células hospedadoras antes de la introducción de vectores de expresión que dirigen la expresión de proteínas virales. Pueden introducirse uno o más vectores de expresión que dirigen la expresión de proteínas virales en células hospedadoras antes de la introducción de uno o más vectores de expresión que dirigen la expresión de el o los ARNv o el o los correspondientes ARNc. En el presente documento, los vectores de expresión que dirigen la expresión de el o los ARNv o el o los correspondientes ARNc pueden introducirse juntos o por separado en diferentes transfecciones. Además, los vectores de expresión que dirigen la expresión de las proteínas virales pueden introducirse juntos o por separado en diferentes transfecciones.

Se introducen uno o más vectores de expresión que dirigen la expresión de el o los ARNv o el o los correspondientes ARNc y uno o más vectores de expresión que dirigen la expresión de proteínas virales en células hospedadoras de manera simultánea. Todos los vectores de expresión pueden introducirse en células hospedadoras usando liposomas.

Se proporciona en el presente documento un método para producir un virus de la gripe recombinante que comprende introducir en una población de células caninas vectores de expresión capaces de expresar en dichas células segmentos de ARNv genómico para proporcionar los segmentos de ARNv genómico completos de dicho virus, en el que dichos vectores de expresión comprenden los nucleótidos 1-469 de SEC ID N°: 26, o un fragmento funcionalmente activo de los mismos; (b) introducir en dichas células vectores de expresión capaces de expresar ARNm que codifica uno o más polipéptidos de dicho virus; y (c) cultivar dichas células, produciéndose de este modo partículas virales de la gripe. Los títulos de las partículas virales de la gripe producidas tras cultivar dichas células durante 48-72 horas pueden ser de al menos  $1,0 \times 10^4$  UFP/ml o de al menos  $1,0 \times 10^5$  UFP/ml.

Se proporciona en el presente documento un método para producir virus de la gripe recombinantes en el que el método comprende introducir en una población de células caninas vectores de expresión capaces de expresar en dichas células segmentos de ARNv genómicos para proporcionar los segmentos de ARNv genómico completos de dicho virus, en el que dichos vectores de expresión comprenden los nucleótidos 1-469 de SEC ID N°: 26, o un fragmento funcionalmente activo de los mismos; (b) introducir en dichas células vectores de expresión capaces de expresar ARNm que codifica uno o más polipéptidos de dicho virus; y (c) cultivar dichas células, produciéndose de este modo partículas virales de la gripe. Los títulos de las partículas virales de la gripe producidas tras cultivar dichas células durante 48-72 horas pueden ser de al menos  $1,0 \times 10^4$  UFP/ml o de al menos  $1,0 \times 10^5$  UFP/ml.

Pueden determinarse las cantidades y proporciones adecuadas de los vectores de expresión para llevar a cabo un método de la invención mediante experimentación rutinaria. Como orientación, en el caso de transfección liposomal o precipitación de calcio de plásmidos en las células hospedadoras, se prevé que se empleen solo unos pocos  $\mu\text{g}$  de cada plásmido, *por ejemplo*, de 1 a 10  $\mu\text{g}$ , por ejemplo, diluidos a una concentración de ADN total final de aproximadamente 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  antes de mezclar con reactivo de transfección de manera convencional. Puede preferirse usar vectores que expresan NP y/o subunidades de ARN polimerasa dependiente de ARN a una mayor concentración que la de aquellos que expresan segmentos de ARNv. Un experto en la materia apreciará que las cantidades y proporciones de los vectores de expresión pueden variar dependiendo de las células hospedadoras.

Pueden introducirse al menos 0,5  $\mu\text{g}$ , preferentemente al menos 1  $\mu\text{g}$ , al menos 2,5  $\mu\text{g}$ , al menos 5  $\mu\text{g}$ , al menos 8  $\mu\text{g}$ , al menos 10  $\mu\text{g}$ , al menos 15  $\mu\text{g}$ , al menos 20  $\mu\text{g}$ , al menos 25  $\mu\text{g}$  o al menos 50  $\mu\text{g}$  de uno o más vectores de expresión de proteínas descritos en el presente documento en células hospedadoras para generar virus de ARN de hebra negativa recombinantes infecciosos. Pueden introducirse al menos 0,5  $\mu\text{g}$ , preferentemente al menos 1  $\mu\text{g}$ , al menos 2,5  $\mu\text{g}$ , al menos 5  $\mu\text{g}$ , al menos 8  $\mu\text{g}$ , al menos 10  $\mu\text{g}$ , al menos 15  $\mu\text{g}$ , al menos 20  $\mu\text{g}$ , al menos 25  $\mu\text{g}$  o al menos 50  $\mu\text{g}$  de uno o más vectores de expresión descritos en el presente documento que pueden dirigir la expresión de ARNv o ARNc en células hospedadoras para generar virus de ARN de hebra negativa recombinantes infecciosos.

Las células hospedadoras que pueden usarse para generar los virus de ARN de hebra negativa descritos en el presente documento incluyen células primarias, cultivadas o células secundarias, y células transformadas o inmortalizadas (por ejemplo, células 293, células 293T, células CHO, células Vero, células PK, MDBK, OMK y MDCK). Las células hospedadoras son preferentemente células animales, más preferentemente células de mamífero, y lo más preferentemente células caninas. Los virus de ARN de hebra negativa recombinantes infecciosos descritos en el presente documento pueden generarse en células MDCK.

La presente divulgación proporciona métodos para generar virus de ARN de hebra negativa recombinantes infecciosos en líneas celulares hospedadoras transducidas de manera estable. Las líneas celulares hospedadoras transducidas de manera estable descritas en el presente documento pueden producirse introduciendo ADN controlado por elementos de control de la expresión adecuados (por ejemplo, secuencias promotoras, potenciadoras, secuencias de terminación de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador de selección en las células hospedadoras. Después de la introducción del ADN exógeno, las células transducidas pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio de selección. El marcador de selección confiere resistencia a las células y permite que las células integren el ADN de manera estable en sus cromosomas. Las células hospedadoras transducidas con el ADN integrado de manera estable pueden clonarse y expresarse en líneas celulares.

Puede usarse una serie de sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitación, los genes de la timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler, et al., 1977, Cell 11:223), de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), y de adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., 1980, Cell 22:817) que pueden emplearse en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También, puede usarse genes de resistencia a antimetabolitos como base de selección para dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30:147).

Los virus de ARN de hebra negativa recombinantes infecciosos generados por los métodos descritos en el presente documento que no están atenuados, pueden atenuarse o matarse, por ejemplo, mediante métodos clásicos. Por ejemplo, los virus de ARN de hebra negativa recombinantes descritos en el presente documento pueden matarse por calor o por tratamiento con formalina, de tal forma que el virus no es capaz de replicarse. Los virus de ARN de hebra negativa recombinantes descritos en el presente documento que no están atenuados pueden atenuarse, *por ejemplo*, mediante pase a través de hospedadores no naturales para producir virus descendientes que son inmunogénicos, pero no patogénicos.

Los virus atenuados, vivos o muertos producidos de acuerdo con la divulgación en el presente documento pueden incorporarse posteriormente a una composición de vacuna de manera convencional o usarse para producir virus adicionales, *por ejemplo*, en huevos. En los casos donde dicho virus tiene un segmento de ARNv quimérico tal como se ha discutido anteriormente que codifica un antígeno exógeno, puede formularse para lograr vacunación contra más de un patógeno simultáneamente. Los virus recombinantes atenuados producidos de acuerdo con la divulgación en el presente documento que poseen un segmento de ARNv quimérico también pueden diseñarse para otros usos terapéuticos, *por ejemplo*, un agente antitumoral o una herramienta de terapia génica, en cuyo caso la producción del virus estará seguida de su incorporación en una composición farmacéutica adecuada junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

El rescate sin virus auxiliar descrito en el presente documento es particularmente favorable para la generación de virus reorganizados, especialmente virus de la gripe reorganizados deseados para uso en vacunas, especialmente ya que no se necesitan métodos de selección para eliminar los virus auxiliares del cultivo.

Los métodos descritos en el presente documento pueden modificarse para incorporar aspectos de métodos conocidos para los expertos en la materia, para mejorar la eficiencia del rescate de partículas virales infecciosas. Por ejemplo, la técnica de genética inversa implica la preparación de ARN virales recombinantes sintéticos que contienen las regiones no codificantes del ARN del virus de hebra negativa que son esenciales para el reconocimiento por la polimerasa viral y para las señales de empaquetamiento necesarias para generar los viriones maduros. Los ARN recombinantes se sintetizan a partir de un molde de ADN recombinante y se reconstituyen *in vitro* con complejo de polimerasa viral purificado para formar ribonucleoproteína recombinante (RNP) que puede usarse para transfectar células. Se logra una transfección más eficaz si las proteínas polimerasas virales están presentes durante la transcripción de los ARN sintéticos *in vitro* o *in vivo*. Las RNP recombinantes sintéticas pueden rescatarse en partículas de virus infecciosas. Las técnicas anteriores se describen en la Patente de los Estados Unidos N° 5.166.057 publicada el 24 de noviembre de 1992; en la Patente de Estados Unidos N° 5.854.037 publicada el 29 de diciembre de 1998; en la Patente de Estados Unidos N° 5.789.229 publicada el 4 de agosto de 1998; en la Publicación de Patente Europea EP 0702085A1, publicada el 20 de febrero de 1996; en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con Número de Serie 09/152.845, en las Publicaciones Internacionales de Patente PCR WO97/12032 publicada el 3 de abril de 1997; WO96/34625 publicada el 7 de noviembre de 1996; en la Publicación de Patente Europea EP-A780475; WO99/02657 publicada el 21 de enero de 1999; WO98/53078 publicada el 26 de noviembre de 1998; WO99/02530 publicada el 22 de enero de 1998; WO99/15672 publicada el 1 de abril de 1999; WO98/1351 publicada el 2 de abril de 1998; WO97/06720 publicada el 20 de febrero de 1997; y EPO 780 47SA1 publicada el 25 de junio de 1997.

#### 5.5.1 Realizaciones específicas de virus de ARN de hebra negativa segmentados

La presente divulgación proporciona un método para generar en células cultivadas partículas virales recombinantes infecciosas de un virus de ARN de hebra negativa segmentado que tiene más de 3 segmentos de ARNv genómico, por ejemplo, un virus de la gripe, tal como un virus de la gripe A, comprendiendo dicho método: (a) introducir en una población de células capaces de soportar el crecimiento de dicho virus un primer conjunto de vectores de expresión capaces de expresar en dichas células segmentos de ARNv genómico para proporcionar los segmentos de ARNv genómicos completos de dicho virus; (b) introducir en dichas células un segundo conjunto de vectores de expresión capaces de expresar ARNm que codifica uno o más polipéptidos de dicho virus; y (c) cultivar dichas células, produciéndose de este modo dichas partículas virales. Las células pueden ser células caninas. Las células pueden ser células MDCK. El virus recombinante puede ser virus de la gripe A o B. El primer conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-8 plásmidos. El primer conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en un plásmido. El segundo conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-8 plásmidos. El segundo conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en un plásmido. El primero, el segundo, o ambos conjuntos de vectores de expresión pueden introducirse por electroporación. El primer conjunto de vectores de expresión puede codificar cada segmento de ARNv de un virus de la gripe. El segundo conjunto de vectores de expresión puede codificar el ARNm de uno o más de todos los polipéptidos de la gripe. El primer conjunto o el segundo conjunto de vectores de expresión (o ambos conjuntos) pueden comprender un ácido nucleico descrito en el presente documento, por ejemplo, una secuencia reguladora de ARN pol I canina descrita en el presente documento (por ejemplo, un promotor de ARN pol I canina). El primer conjunto o el segundo conjunto de vectores de expresión (o ambos conjuntos) pueden codificar un ARNv o ARNm de un segundo virus. Por ejemplo, un conjunto de vectores comprende uno o más vectores que codifican el ARNm y/o ARNv de HA y/o NA de un segundo virus de la gripe. Puede usarse un virus auxiliar en el método. Las células cultivadas usadas en el método pueden ser células caninas.

En el presente documento se proporciona un método para generar partículas virales recombinantes infecciosas en células cultivadas de un virus de ARN de cadena negativa segmentado que tienen más de 3 segmentos de ARNv genómico, por ejemplo, un virus de la gripe, tal como un virus de la gripe A, comprendiendo dicho método: (a) introducir en una población de células capaces de soportar el crecimiento de dicho virus un conjunto de vectores de expresión capaces tanto de expresar en dichas células segmentos de ARNv genómico para proporcionar los segmentos de ARNv genómicos completos de dicho virus y capaces de expresar ARNm que codifica uno o más polipéptidos de dicho virus; (b) cultivar dichas células, produciéndose de este modo dichas partículas virales. Las células pueden ser células caninas. Las células pueden ser células MDCK. El virus puede ser virus de la gripe A o B. El conjunto de vectores de expresión puede estar comprendido en 1-17 plásmidos. El conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-8 plásmidos. El conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-3 plásmidos. El conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en un plásmido. El conjunto de vectores de expresión puede introducirse mediante electroporación. El conjunto de vectores de expresión puede codificar cada segmento de ARNv de un virus de la gripe. El conjunto de vectores de expresión puede codificar el ARNm de uno o más polipéptidos de la gripe. El conjunto de vectores de expresión puede codificar cada segmento de ARNv de un virus de la gripe y el ARNm de uno o más polipéptidos de la gripe. El conjunto de vectores de expresión puede comprender un ácido nucleico descrito en el presente documento, por ejemplo, una secuencia reguladora de ARN pol I canina descrita en el presente documento (por ejemplo, un promotor de ARN pol I canina). El conjunto de vectores de expresión puede codificar un ARNv o ARNm de un segundo virus. Por ejemplo, el conjunto de vectores comprende uno o más vectores que codifican el ARNm y/o ARNv de HA y/o NA de un segundo virus de la gripe. El primer conjunto o el segundo conjunto de vectores de expresión (o ambos conjuntos) pueden codificar un ARNv o ARNm de un segundo virus. Por ejemplo, un conjunto de vectores comprende uno o más vectores que codifican el ARNm y/o ARNv de HA y/o NA de un segundo virus de la gripe. Puede usarse un virus auxiliar en el método. Las células cultivadas usadas en el método pueden ser células caninas.

En el presente documento se proporciona un método para generar en células cultivadas partículas virales recombinantes infecciosas de un virus de ARN de hebra negativa, comprendiendo dicho método: (a) introducir en una población de células capaces de soportar el crecimiento de dicho virus un primer conjunto de vectores de expresión capaces de expresar en dichas células ARNv genómico para proporcionar el ARNv genómico completo de dicho virus; (b) introducir en dichas células un segundo conjunto de vectores de expresión capaces de expresar ARNm que codifica uno o más polipéptidos de dicho virus; y (c) cultivar dichas células, produciéndose de este modo dichas partículas virales. Las células pueden ser células caninas. Las células pueden ser células MDCK. El virus puede ser el virus de la gripe B. El primer conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-8 plásmidos. El primer conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en un plásmido. El segundo conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-8 plásmidos. El segundo conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en un plásmido. El primero, el segundo, o ambos conjuntos de vectores de expresión pueden introducirse por electroporación. El primer conjunto de vectores de expresión puede codificar cada segmento de ARNv de un virus de la gripe. El segundo conjunto de vectores de expresión puede codificar el ARNm de uno o más polipéptidos de la gripe. El primer conjunto o el segundo conjunto de vectores de expresión (o ambos conjuntos) pueden comprender un ácido nucleico descrito en el presente documento, por ejemplo, una secuencia reguladora de ARN pol I canina descrita en el presente documento (por ejemplo, un promotor de ARN pol I canina). Puede usarse un virus auxiliar en el método. Las células cultivadas usadas en el método pueden ser células caninas.

En el presente documento se proporciona un método para generar en células cultivadas partículas virales infecciosas de un virus de ARN de hebra negativa, comprendiendo dicho método: (a) introducir en una población de células capaces de soportar el crecimiento de dicho virus un conjunto de vectores de expresión capaces tanto de expresar en dichas células ARNv genómico para proporcionar el ARNv genómico completo de dicho virus y capaz de expresar ARNm que codifica uno o más polipéptidos de dicho virus; (b) cultivar dichas células, produciéndose de este modo dichas partículas virales. Las células pueden ser células caninas. Las células pueden ser células MDCK. El virus puede ser el virus de la gripe B. El conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-17 plásmidos. El conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-8 plásmidos. El conjunto de vectores de expresión puede estar contenido en 1-3 plásmidos. El conjunto de vectores de expresión puede introducirse mediante electroporación. El conjunto de vectores de expresión puede codificar cada segmento de ARNv de un virus de la gripe. El conjunto de vectores de expresión puede codificar el ARNm de uno o más polipéptidos de la gripe. El conjunto de vectores de expresión puede codificar cada segmento de ARNv de un virus de la gripe y el ARNm de uno o más polipéptidos de la gripe. El conjunto de vectores de expresión puede comprender un ácido nucleico descrito en el presente documento, por ejemplo, una secuencia reguladora de ARN pol I canina descrita en el presente documento (por ejemplo, un promotor de ARN pol I canina). El conjunto de vectores de expresión puede codificar un ARNv o ARNm de un segundo virus. Por ejemplo, el conjunto de vectores comprende uno o más vectores que codifican el ARNm y/o ARNv de HA y/o NA de un segundo virus de la gripe. Puede usarse un virus auxiliar en el método. Las células cultivadas usadas en el método pueden ser células caninas.

En el presente documento se proporciona un método para generar partículas virales infecciosas en células caninas cultivadas de un virus de ARN de cadena negativa segmentado que tienen más de 3 segmentos de ARNv genómico, por ejemplo, un virus de la gripe, tal como un virus de la gripe A, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar una primera población de células caninas capaces de soportar el crecimiento de dicho virus y a las que se les ha introducido un primer conjunto de vectores de expresión capaces de expresar directamente en dichas células caninas segmentos de ARNv genómicos para proporcionar los segmentos completos de ARNv genómico de dicho virus, o los correspondientes ARNc, en ausencia de un virus auxiliar para proporcionar cualquiera de dichos segmentos de ARN, siendo dichas células caninas capaces también de proporcionar una nucleoproteína y una ARN polimerasa dependiente de ARN en la que pueden formarse complejos de RNP que contienen los segmentos de ARNv genómico de dicho virus y pudiéndose ensamblar dichas partículas virales en dichas células caninas; y (b) cultivar dichas células caninas, produciéndose de este modo dichas partículas virales. Las células caninas pueden ser células MDCK.

En el presente documento se proporciona un método para generar en células caninas cultivadas partículas virales infecciosas de un virus de ARN de hebra negativa segmentada, comprendiendo dicho método: (i) proporcionar una primera población de células caninas que son capaces de soportar el crecimiento de dicho virus y que se modifican para ser capaces de proporcionar (a) los ARNv genómicos de dicho virus en ausencia de un virus auxiliar y (b) una nucleoproteína y una ARN polimerasa dependiente de ARN mediante la que pueden formarse complejos de ARN que contienen dichos ARNv y pueden ensamblarse dichas partículas virales, expresándose directamente dichos ARNv genómicos en dichas células bajo el control de una secuencia reguladora de ARN pol I canina, o un derivado funcional de la misma; y (ii) cultivar dichas células caninas, produciéndose de este modo dichas partículas virales.

La presente memoria descriptiva también proporciona un método para generar en células cultivadas partículas virales infecciosas de un virus de ARN de hebra negativa segmentada, comprendiendo dicho método: (i) proporcionar una población de células caninas que son capaces de soportar el crecimiento de dicho virus y que se modifican para ser capaces de proporcionar (a) los ARNv genómicos de dicho virus en ausencia de un virus auxiliar y (b) una nucleoproteína y una ARN polimerasa dependiente de ARN mediante la que puede formarse un complejo o complejos de ARN que contienen dichos ARNv y pueden ensamblarse dichas partículas virales, expresándose dichos ARN genómicos directamente en dichas células caninas bajo el control de una secuencia reguladora de ARN pol I canina o un derivado funcional de la misma, por ejemplo, un promotor de ARN pol I canina, tal como se describe anteriormente; y (ii) cultivar dichas células caninas, produciéndose de este modo dichas partículas virales.

Un virus de ARN de hebra negativa recombinante infeccioso que tiene al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, o al menos 8 segmentos de ARNv genómico en una célula hospedadora canina puede generarse usando los métodos descritos en el presente documento.

También se proporcionan en el presente documento métodos para generar virus de la gripe recombinantes infecciosos en células hospedadoras usando vectores de expresión para expresar los segmentos de ARNv o los correspondientes ARNc y proteínas del virus de la gripe, en particular PB1, PB2, PA y NA. En el presente documento, puede incluirse o no un virus auxiliar para generar los virus de la gripe recombinantes infecciosos.

Los virus de la gripe recombinantes infecciosos descritos en el presente documento pueden replicarse y producir descendencia, o no. Preferentemente, los virus de la gripe recombinantes infecciosos descritos en el presente documento están atenuados. Los virus de la gripe recombinantes infecciosos atenuados pueden, por ejemplo, tener una mutación en el gen de NS1.



Un virus recombinante infeccioso descrito en el presente documento puede usarse para producir otros virus útiles para preparar una composición de vacuna descrita en el presente documento. Los virus recombinantes o reorganizados producidos mediante un método descrito en el presente documento se usan para la producción de virus adicionales para su uso como una vacuna. Por ejemplo, una población de virus recombinantes o reorganizados producidos mediante los métodos descritos en el presente documento que incorporan una secuencia reguladora de ARN pol I canina descrita en el presente documento (por ejemplo, un promotor de ARN pol I canina). Posteriormente, se hace crecer la población de virus en huevos u otro cultivo de tal forma que se producen virus adicionales para la preparación de vacunas o una composición inmunogénica.

Los virus de la gripe recombinantes infecciosos descritos en el presente documento expresan secuencias heterólogas (es decir, no del virus de la gripe). Los virus de la gripe recombinantes infecciosos descritos en el presente documento expresan proteínas del virus de la gripe de diferentes cepas de gripe. Los virus de la gripe recombinantes infecciosos descritos en el presente documento expresan proteínas de fusión.

### 5.5.2 Introducción de vectores en células hospedadoras

Pueden introducirse (por ejemplo, transfectarse) vectores que comprenden segmentos del genoma de la gripe en células hospedadoras de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (véase, *por ejemplo*, las Publicaciones de solicitud de Patente de los Estados Unidos N° US20050266026 y 20050158342) para introducir ácidos nucleicos heterólogos en células eucariotas, incluyendo, por ejemplo, co-precipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección y transfección empleando reactivos de transfección de poliamina. Por ejemplo, pueden transfectarse vectores, por ejemplo, plásmidos en células hospedadoras, tales como, por ejemplo, células MDCK, células COS, células 293T, o combinaciones de las mismas, usando un reactivo de transfección de poliamina TransIT-LT1 (Mirus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Puede combinarse aproximadamente 1 µg de cada vector que se va a introducir en la población de células hospedadoras con aproximadamente 2 µl de TransIT-LT1 diluido en 160 µl de medio, preferentemente medio sin suero, en un volumen total de 200 µl. Las mezclas de ADN:reactivo de transfección pueden incubarse a temperatura ambiente durante 45 min seguido de la adición de 800 µl de medio. Entonces se añade la mezcla de transfección a las células hospedadoras, y se cultivan las células como se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, para la producción de virus recombinantes o reorganizados en cultivo celular, se mezclan vectores que incorporan cada uno de los 8 segmentos de genoma (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA y NA) con aproximadamente 20 µl de TransIT-LT1 y se transfectan en las células hospedadoras. Opcionalmente, se reemplaza el medio que contiene suero antes de la transfección por medio sin suero, por ejemplo, Opti-MEM I, y se incuba durante 4-6 horas.

Como alternativa, puede emplearse electroporación para introducir vectores que incorporan segmentos genómicos de la gripe en células hospedadoras. Véase, *por ejemplo*, las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos US20050266026 y 20050158342. Por ejemplo, se introducen vectores de plásmido que incorporan un virus de la gripe A o de la gripe B en células MDCK usando electroporación de acuerdo con el siguiente procedimiento. En resumen, 5 x 10<sup>6</sup> células MDCK, por ejemplo, crecidas en medio Eagle modificado (MEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % se resuspenden en 0,3 ml de OptiMEM y se ponen en una cubeta de electroporación. Se añaden veinte microgramos de ADN en un volumen de hasta 25 µl a las células en la cubeta, que a continuación se mezcla suavemente dando unos golpecitos suaves. La electroporación se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por ejemplo, un dispositivo Gene Pulser II de BioRad con un dispositivo Capacitance Extender Plus conectado) a 300 voltios, 950 microfaradios con una constante de tiempo de entre 35-45 milisegundos. Entonces se vuelven a mezclar las células dando golpecitos suaves y aproximadamente 1-2 minutos después de la electroporación se añaden 0,7 ml de OPTI-MEM directamente a la cubeta. Las células se transfectan entonces a dos pocillos de una placa de cultivo tisular estándar de 6 pocillos que contiene 2 ml de OPTI-MEM sin suero. La cubeta se lava para recuperar cualquier célula restante y la suspensión de lavado se divide entre dos pocillos. El volumen final es de aproximadamente 3,5 ml. Las células se incuban entonces en condiciones permisivas para el crecimiento viral, *por ejemplo*, a aproximadamente 33 °C para las cepas adaptadas al frío.

Puede encontrarse orientación adicional relativa a la introducción de vectores en células hospedadoras, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos N° 6.951.754, 6.887.699, 6.649.372, 6.544.785, 6.001.634, 5.854.037, 5.824.536, 5.840.520, 5.820.871, 5.786.199, y 5.166.057 y las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 20060019350, 20050158342, 20050037487, 20050266026, 20050186563, 20050221489, 20050032043, 20040142003, 20030035814, y 20020164770.

### 5.6 Cultivo celular

Típicamente, la propagación del virus se logra en las composiciones de medio en las que se cultivan normalmente las células hospedadoras. Las células adecuadas para la replicación del virus de la gripe incluyen, por ejemplo, células Vero, células Per.C6, células BHK, células MDCK, células 293 y células COS, incluyendo células 293T y células COS7. Se prefieren las células MDCK en el contexto descrito en el presente documento. El uso de células MDCK no tumorigénicas como células hospedadoras también se describe en el presente documento. Los co-cultivos que incluyen dos de las líneas celulares anteriores, por ejemplo, células MDCK y células 293T o COS también pueden emplearse a una relación, *por ejemplo*, de 1:1, para mejorar la eficacia de la replicación. Véase, *por ejemplo*,

20050158342. Típicamente, las células se cultivan en un medio de cultivo comercial estándar, tal como medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero (por ejemplo, suero fetal bovino al 10 %), o en medio sin suero, con humedad controlada y una concentración de CO<sub>2</sub> adecuada para mantener un pH tamponado neutro (por ejemplo, a un pH entre 7,0 y 7,2). Opcionalmente, el medio contiene antibióticos para prevenir el crecimiento bacteriano, por ejemplo, penicilina, estreptomina, etc., y/o nutrientes adicionales, tales como L-glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, suplementos adicionales para promover características de crecimiento favorables, por ejemplo, tripsina, β-mercaptoetanol, y similares.

Los procedimientos para mantener a las células de mamífero en cultivo se han comunicado de manera extensiva, y son conocidos para los expertos en la materia. Se proporcionan protocolos generales, por ejemplo, en Freshney (1983) *Culture of Animal Cells: Manual of Basic Technique*, Alan R. Liss, Nueva York; Paul (1975) *Cell and Tissue Culture*, 5ª ed., Livingston, Edimburgo; Adams (1980) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists*, Work y Burdon (eds.) Elsevier, Ámsterdam. Los detalles adicionales referentes a los procedimientos de cultivo tisular de interés particular en la producción de virus de la gripe *in vivo* incluyen, por ejemplo, Merten et al. (1996) *Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation*. en Cohen y Shafferman (eds) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines*. Además, se determinan fácilmente variaciones en dichos procedimientos adaptados para la presente invención mediante experimentación rutinaria.

Las células para la producción de virus de la gripe pueden cultivarse en medio con suero o sin suero. En algunos casos, por ejemplo, para la preparación de virus purificados, es deseable crecer las células hospedadoras en condiciones sin suero. Las células pueden cultivarse a pequeña escala, por ejemplo, en menos de 25 ml de medio, tubos o matraces de cultivo, o en grandes matraces con agitación, en botellas rotatorias, o en perlas microtransportadoras (por ejemplo, perlas microtransportadoras de DEAE-dextrano, tales como Dormacell, Pfeifer & Langen; Superbead, Flow Laboratories; perlas de copolímero de estireno-trimetilamina, tales como Hillex, SoloHill, Ann Arbor) en matraces, botes o cultivos en reactor. Las perlas microtransportadoras son pequeñas esferas (en el intervalo de 100-200 micras de diámetro) que proporcionan una gran área superficial para crecimiento celular adherente por volumen de cultivo celular. Por ejemplo, un solo litro de medio puede incluir más de 20 millones de perlas microtransportadoras que proporcionan más de 8000 centímetros cuadrados de superficie de crecimiento. Para la producción comercial de virus, *por ejemplo*, para la producción de vacunas, a menudo es deseable cultivar las células en un biorreactor o en un fermentador. Los biorreactores están disponibles en volúmenes desde menos de 1 litro hasta más de 100 litros, por ejemplo, Biorreactor Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, MN); biorreactores NBS (New Brunswick Scientific, Edison, N.J.); biorreactores a escala de laboratorio o comercial de B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania).

Independientemente del volumen de cultivo, en el contexto descrito en el presente documento, los cultivos pueden mantenerse a una temperatura menor o igual a 35 °C, para asegurar una recuperación eficaz de virus de la gripe recombinante y/o reorganizado, particularmente un virus de la gripe adaptado al frío, sensible a la temperatura atenuado recombinante y/o reorganizado. Por ejemplo, las células se cultivan a una temperatura entre aproximadamente 32 °C y 35 °C, típicamente a una temperatura entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 34 °C, normalmente a aproximadamente 33 °C.

Típicamente, se emplea un regulador, por ejemplo, un termostato u otro dispositivo para detectar y mantener la temperatura del sistema de cultivo celular para asegurar que la temperatura no sobrepase los 35 °C durante el periodo de replicación del virus.

### 5.7 Recuperación de virus

Los virus se recuperan típicamente del medio de cultivo, en el que han crecido las células infectadas (transfectadas). Típicamente, se aclara el medio antes de la concentración de los virus de la gripe. Los métodos comunes incluyen filtración, ultrafiltración, adsorción en sulfato de bario y elución, y centrifugación. Por ejemplo, el medio en bruto de cultivos infectados puede aclararse primeramente mediante centrifugación a, *por ejemplo*, 1000-2000 x g durante un tiempo suficiente para eliminar los restos de células y otra materia en partículas grandes, por ejemplo, entre 10 y 30 minutos. Como alternativa, el medio se filtra a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,8 μm para eliminar a las células intactas y otra materia en partículas grandes. Opcionalmente, el sobrenadante del medio aclarado se centrifuga para precipitar los virus de la gripe, por ejemplo, a 15.000 x g, durante aproximadamente 3-5 horas. Después de la resuspensión del precipitado de virus en un tampón adecuado, tal como STE (Tris-HCl 0,01 M; NaCl 0,15 M; EDTA 0,0001 M) o suero salino tamponado con fosfato (PBS) a pH 7,4, el virus se concentra mediante centrifugación de gradiente de densidad en sacarosa (60 %-12 %) o tartrato de potasio (50 %-10 %). Los gradientes continuos o escalonados, por ejemplo, un gradiente de sacarosa entre el 12 % y el 60 % en cuatro etapas de 12 %, son adecuados. Los gradientes se centrifugan a una velocidad y durante un tiempo suficiente para concentrar los virus en una banda visible para su recuperación. Como alternativa, y para la mayoría de aplicaciones comerciales a gran escala, el virus se elutria a partir de gradientes de densidad usando un rotor de centrifugación zonal que opera en modo continuo. Se proporcionan detalles adicionales suficientes para orientar a un experto a lo largo de la preparación de virus de la gripe a partir de cultivo tisular, por ejemplo, en Furminger. *Vaccine Production*, en Nicholson et al. (eds) *Textbook of Influenza* págs. 324-332; Merten et al. (1996) *Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation*, en Cohen & Shafferman (eds) *Novel Strategies in Design and Production of*

Vaccines págs. 141-151, y en las Patentes de Estados Unidos N° 5.690.937, Publicaciones de Solicitudes de los Estados Unidos N° 20040265987, 20050266026 y 20050158342. Si se desea, los virus recuperados pueden almacenarse a -80 °C en presencia de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) como estabilizante.

#### 5 5.8 Virus de la gripe

El genoma del virus de la gripe está compuesto de ocho segmentos de ácido ribonucleico (ARN) de hebra lineal (-), que codifica las proteínas inmunogénicas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), y seis polipéptidos de núcleo internos: la proteína de la nucleocápsida (NP); proteínas de matriz (M); proteínas no estructurales (NS); y 3 proteínas ARN polimerasas (PA, PB1, PB2). Durante la replicación, el ARN genómico viral se transcribe en ARN mensajero de hebra (+) y en ARNc genómico de hebra (-) en el núcleo de la célula hospedadora. Cada uno de los ocho segmentos genómicos se empaqueta en complejos de ribonucleoproteínas que contienen, además del ARN, NP y un complejo de polimerasa (PB1, PB2, y PA).

Los virus de la gripe que pueden producirse mediante los procesos descritos en el presente documento en las células MDCK descritas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, virus reorganizados que incorporan antígenos seleccionados de hemaglutinina y/o neuraminidasa en el contexto de una cepa maestra aprobada, atenuada y sensible a la temperatura. Por ejemplo, los virus pueden comprender cepas maestras que son una o más de, *por ejemplo*, sensible a la temperatura (*ts*), adaptada al frío (*ca*), o atenuada (*att*) (por ejemplo, A/Ann Arbor/6/60, B/Ann Arbor/1/66, PR8, B/Leningrado/14/17/55, B/14/5/1, B/USSR/60/69, B/Leningrado/179/86, B/Leningrado/14/55, B/Inglaterra/2608/76, A/Puerto Rico/8/34 (es decir, PR8), etc. o variantes antigénicas de las mismas).

#### 5.9 Vacunas del virus de la gripe

Históricamente, se han producido las vacunas para el virus de la gripe en huevos de gallina embrionados usando cepas de virus seleccionadas basándose en predicciones empíricas de cepas relevantes. Más recientemente, se han producido virus reorganizados que incorporan antígenos de hemaglutinina y neuraminidasa seleccionados en el contexto de una cepa maestra aprobada, atenuada y sensible a la temperatura. Después de cultivar el virus mediante pases múltiples en huevos de gallina, se recuperan los virus de la gripe y, opcionalmente, se inactivan, por ejemplo, usando formaldehído y/o β-propiolactona. Sin embargo, producir la vacuna de la gripe de este modo tiene varios inconvenientes significativos. Los contaminantes que quedan de los huevos de gallina son elevadamente antigénicos, pirogénicos, y frecuentemente dan como resultado efectos secundarios significativos tras su administración. De manera más importante, las cepas designadas para producción deben seleccionarse y distribuirse, típicamente con meses de antelación a la siguiente temporada de gripe para dar tiempo a producir e inactivar la vacuna de la gripe. Los intentos para producir vacunas recombinantes y reorganizadas en cultivo celular se han visto dificultados por la incapacidad de ninguna de las cepas aprobadas para la producción de vacunas de crecer de manera eficaz en condiciones de cultivo convencionales.

En el presente documento se proporciona un sistema de vector, composiciones, y métodos para producir virus recombinantes y reorganizados en cultivo que hacen posible producir vacunas rápidamente correspondientes a una o varias cepas antigénicas seleccionadas de virus. En particular, se proporcionan condiciones y cepas que dan como resultado la producción eficaz de virus a partir de un sistema multi-plásmido en cultivo celular. Opcionalmente, si se desea, los virus pueden amplificarse adicionalmente en huevos de gallina o en cultivos celulares diferentes de los cultivos usados para rescatar el virus.

Por ejemplo, no ha sido posible crecer la cepa maestra de gripe B, B/Ann Arbor/1/66, en condiciones estándar de cultivo celular, *por ejemplo*, a 37 °C. En los métodos descritos en el presente documento, se introducen múltiples plásmidos, incorporando cada uno un segmento de un genoma de virus de la gripe en células adecuadas, y se mantienen en cultivo a una temperatura menor o igual a 35 °C. Típicamente, los cultivos se mantienen a entre aproximadamente 32 °C y 35 °C, preferentemente entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 34 °C, *por ejemplo*, a aproximadamente 33 °C.

Típicamente, los cultivos se mantienen en un sistema, tal como un cultivador celular, con humedad y CO<sub>2</sub> controlados, a una temperatura constante usando un regulador de temperatura, tal como un termostato para asegurar que la temperatura no exceda los 35 °C.

Los virus de la gripe reorganizados pueden obtenerse fácilmente introduciendo un subconjunto de vectores que comprenden ADNc que codifica segmentos genómicos de un virus de la gripe maestro, en combinación con segmentos complementarios derivados de cepas de interés (por ejemplo, variantes antigénicas de interés). Típicamente, las cepas maestras se seleccionan basándose en las propiedades deseables relevantes para la administración de vacunas. Por ejemplo, para la producción de vacunas, por ejemplo, para la producción de una vacuna viva atenuada, el virus donante maestro puede seleccionarse por un fenotipo atenuado, adaptación al frío y/o sensibilidad a la temperatura. En este contexto, la hebra de gripe A, ca A/Ann Arbor/6/60; la hebra de gripe B, ca B/Ann Arbor/1/66; u otra cepa seleccionada por sus propiedades fenotípicas deseables, *por ejemplo*, una cepa atenuada, adaptada al frío y/o sensible a la temperatura, se seleccionan favorablemente como cepas donantes maestras.

Los plásmidos que comprenden ADNc que codifica los seis segmentos de ARNv internos de la cepa maestra de virus de la gripe (es decir, PB1, PB2, PA, NP, NB, M1, BM2, NS1 y NS2) pueden transfectarse en células hospedadoras adecuadas en combinación con ADNc que codifica segmentos de ARNv de hemaglutinina y neuraminidasa a partir de una cepa antigénicamente deseable, *por ejemplo*, una cepa que se predice que causa una infección local o global de gripe significativa. Después de la replicación del virus reorganizado en cultivo celular a temperaturas adecuadas para una recuperación eficaz, por ejemplo, igual o menor a 35 °C, tal como entre aproximadamente 32 °C y 35 °C, por ejemplo, entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 34 °C, o a aproximadamente 33 °C, se recupera el virus reorganizado. Opcionalmente, el virus reorganizado puede inactivarse usando un agente desnaturante, tal como formaldehído o β-propiolactona.

#### 5.10 Métodos y composiciones para la administración profiláctica de vacunas

Los virus recombinantes y reorganizados descritos en el presente documento pueden administrarse profilácticamente en un vehículo o excipiente adecuado para estimular una respuesta inmunitaria específica para una o más cepas del virus de la gripe. Típicamente, el vehículo o excipiente es un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril, solución acuosa salina, solución acuosa salina tamponada, solución acuosa de dextrosa, solución acuosa de glicerol, etanol, fluido alantoico de huevos de gallina no infectados (es decir, fluido alantoico normal "NAF") o combinaciones de los mismos. La preparación de dichas soluciones que asegura la estabilidad, el pH, la isotonicidad, y la estabilidad se lleva a cabo de acuerdo con protocolos establecidos en la técnica. En general, se selecciona un vehículo o excipiente para minimizar reacciones alérgicas y otros efectos no deseados, y para ajustarse a la ruta de administración particular, *por ejemplo*, subcutánea, intramuscular, intranasal, etc.

En general, los virus de la gripe descritos en el presente documento se administran en una cantidad suficiente como para estimular una respuesta inmunitaria específica para una o más cepas del virus de la gripe. Preferentemente, la administración de los virus de la gripe provoca una respuesta inmunitaria protectora. Las dosis y métodos para provocar una respuesta inmunitaria protectora que responde contra una o más cepas de la gripe son conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, los virus de la gripe inactivados se proporcionan en un intervalo de aproximadamente 1-1000 DIH<sub>50</sub> (dosis infecciosa en humanos), es decir, aproximadamente de 10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> ufo (unidades formadoras de placa) por dosis administrada. Como alternativa, se administran aproximadamente 10-50 µg, por ejemplo, aproximadamente 15 µg de HA sin un adyuvante, administrándose dosis más pequeñas con un adyuvante. Típicamente, la dosis se ajustará dentro de este intervalo basándose en, *por ejemplo*, la edad, el estado físico, el peso corporal, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, y de otros factores clínicos. La formulación de vacuna profiláctica se administra por vía sistémica, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o intramuscular usando una aguja y jeringuilla, o un dispositivo de inyección sin aguja. Como alternativa, la formulación de vacuna se administra por vía intranasal, bien en gotas, aerosol de partículas grandes (mayores de aproximadamente 10 micras), o en pulverizador en el tracto respiratorio superior. Aunque cualquiera de las rutas anteriores de administración da como resultado una respuesta inmune sistémica protectora, la administración intranasal confiere el beneficio añadido de provocar inmunidad mucosal en el sitio de entrada del virus de la gripe. Para administración intranasal, se prefieren a menudo vacunas de virus vivo atenuado, *por ejemplo*, un virus de la gripe recombinante o reorganizado atenuado, adaptado al frío y/o sensible a la temperatura. Aunque se prefiere la estimulación de una respuesta inmune protectora con una sola dosis, pueden administrarse dosis adicionales, por la misma o por distintas rutas, para lograr el efecto profiláctico deseado.

Como alternativa, puede estimularse una respuesta inmunitaria dirigiendo *ex vivo* o *in vivo* a las células dendríticas con virus de la gripe. Por ejemplo, se exponen células dendríticas en proliferación a virus en una cantidad suficiente o durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir la captura de los antígenos de la gripe por parte de las células dendríticas. Las células entonces se transfieren a un sujeto que se va a vacunar mediante métodos de trasplante intravenoso convencionales.

Opcionalmente, la formulación para administración profiláctica de los virus de la gripe, o subunidades de los mismos, también contiene uno o más adyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria a los antígenos de la gripe. Los adyuvantes adecuados incluyen: saponina, geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensoactivas, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburo, bacilo Calmette-Guerin (BCG), *Corynebacterium parvum*, y los adyuvantes sintéticos QS-21 y MF59.

Si se desea, la administración de vacuna profiláctica de virus de la gripe puede efectuarse de manera conjunta con la administración de una o más moléculas inmunoestimuladoras. Las moléculas inmunoestimuladoras incluyen varias citocinas, linfocinas y quimiocinas con actividades inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras y proinflamatorias, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)); y otras moléculas inmunoestimuladoras, tales como factor inflamatorio de macrófagos, ligando Flt3, B7.1, B7.2, etc. Las moléculas inmunoestimuladoras pueden administrarse en la misma formulación que los virus de la gripe, o pueden administrarse por separado. Pueden administrarse la proteína o un vector de expresión que codifica la proteína para producir un efecto inmunoestimulador.

Los vectores descritos en el presente documento que incluyen segmentos del genoma de la gripe pueden emplearse para introducir ácidos nucleicos heterólogos en un organismo hospedador o célula hospedadora, tal como una célula de mamífero, por ejemplo, células derivadas de un sujeto humano, en combinación con un vehículo o excipiente farmacéutico adecuado tal como se ha descrito anteriormente. Típicamente, el ácido nucleico heterólogo se inserta en una región no esencial de un gen o segmento génico, *por ejemplo*, el gen M del segmento 7. La secuencia de polinucleótido heterólogo puede codificar un polipéptido o péptido, o un ARN, tal como un ARN antisentido o ribozima. Los ácidos nucleicos heterólogos se introduce entonces en un hospedador o células hospedadoras produciendo virus recombinantes que incorporan los ácidos nucleicos heterólogos, y los virus se administran como se ha descrito anteriormente. La secuencia de polinucleótido heteróloga puede no derivarse de un virus de la gripe.

Como alternativa, puede introducirse un vector descrito en el presente documento que incluyen un ácido nucleico heterólogo y expresarse en células hospedadoras co-transfectando el vector en una célula infectada con un virus de la gripe. Opcionalmente, las células entonces se devuelven o administran al sujeto, típicamente al sitio del que se obtuvieron. En algunas aplicaciones, las células se injertan en un tejido, órgano, o sitio de sistema (tal como se describe anteriormente) de interés, usando procedimientos de transferencia de células o injerto establecidos. Por ejemplo, pueden administrarse células madre de linaje hematopoyético, tales como médula ósea, sangre de cordón umbilical, o sangre periférica derivada de células madre hematopoyéticas a un sujeto usando técnicas de administración o transfusión convencionales.

Como alternativa, los virus que comprenden un ácido nucleico heterólogo pueden administrarse a las células de un sujeto *in vivo*. Típicamente, dichos métodos implican la administración de partículas de vector a una población de células diana (por ejemplo, células sanguíneas, células de la piel, células hepáticas, células neurales (incluyendo del cerebro), células renales, células uterinas, células musculares, células intestinales, células de cuello de útero, células vaginales, células de próstata, etc., así como células tumorales derivadas de una variedad de células, tejidos y/o órganos. La administración puede ser bien sistémica, por ejemplo, mediante administración intravenosa de partículas virales, o administrando las partículas virales directamente a un sitio o sitios de interés mediante una diversidad de métodos, incluyendo inyección (por ejemplo, usando una aguja o jeringuilla), administración de vacuna sin aguja, administración tópica, o presionándolo al interior de un tejido, órgano o sitio de la piel. Por ejemplo, las partículas de vector viral pueden administrarse por inhalación, por vía oral, intravenosa, subcutánea, subdérmica, intradérmica, intramuscular, Intraperitoneal, intratecal, mediante administración vaginal o rectal, o poniendo las partículas virales en una cavidad u otro sitio del organismo, por ejemplo, durante una cirugía.

Los métodos anteriormente descritos son útiles para tratar terapéutica y/o profilácticamente una enfermedad o trastorno introduciendo un vector de la invención que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido (o péptido) o ARN terapéutica o profilácticamente eficaz (por ejemplo, un ARN antisentido o ribozima) en una población de células diana *in vitro ex vivo* o *in vivo*. Típicamente, el polinucleótido que codifica el polipéptido (o péptido), o ARN de interés está unido operativamente a secuencias reguladoras adecuadas tal como se describe anteriormente en las secciones tituladas "Vectores de expresión" y "Elementos de expresión adicionales". Opcionalmente, más de una secuencia codificante heteróloga se incorpora en un solo vector o virus. Por ejemplo, además de un polinucleótido que codifica un polipéptido o ARN terapéutica o profilácticamente activo, el vector también puede incluir polipéptidos adicionales terapéuticos o profilácticos, por ejemplo, antígenos, moléculas coestimuladoras, citocinas, anticuerpos, etc., y/o marcadores y similares.

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden virus reorganizados y recombinantes de la invención (o porciones de los mismos) que se han tratado con un agente, tal como benzopirone, para eliminar oncogenes potenciales. Por consiguiente, se incluye específicamente en la presente divulgación una composición de vacuna libre de oncogenes.

Los métodos y vectores descritos en el presente documento pueden usarse para tratar terapéutica o profilácticamente una amplia variedad de trastornos, incluyendo trastornos genéticos y adquiridos, *por ejemplo*, como vacunas para enfermedades infecciosas, debidas a virus, bacterias, y similares.

#### 5.11 Kits

Para facilitar el uso de los vectores y sistemas de vectores descritos en el presente documento, cualquiera de los vectores, por ejemplo, plásmidos consenso del virus de la gripe, plásmidos de polipéptidos de la gripe variantes, plásmidos de bibliotecas de polipéptidos de la gripe, etc., y componentes adicionales, tales como, tampón, células, medio de cultivo, útiles para empaquetar y para la infección por virus de la gripe para fines experimentales o terapéuticos, pueden empaquetarse en forma de un kit. Típicamente, el kit contiene, además de los componentes anteriores, materiales adicionales que pueden incluir, por ejemplo, instrucciones para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento, material de envasado, y un envase.

#### 5.12 Manipulación de ácidos nucleicos y proteínas virales

En el contexto de la invención, los ácidos nucleicos que comprenden secuencias reguladoras de ARN pol I canina u otros ácidos nucleicos descritos en el presente documento, vectores de expresión, ácidos nucleicos del virus de la

gripe y/o proteínas y similares se manipulan de acuerdo con técnicas de biología molecular bien conocidas. Los protocolos detallados para numerosos de dichos procedimientos, incluyendo amplificación, clonación, mutagénesis, transformación, y similares, se describen, *por ejemplo*, en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (suplementado a partir de 2000) John Wiley & Sons, Nueva York ("Ausubel"); Sambrook et al., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 ("Sambrook"), y Berger y Kimmel *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA ("Berger").

Además de las referencias anteriores, los protocolos para las técnicas de amplificación *in vitro*, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación de Q $\beta$ -replicasa, y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA), útiles, por ejemplo, para amplificar sondas de ADNc de la invención, y encontrados en Mullis et al., (1987) Patente de Estados Unidos N° 4.683.202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. ed.) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) ("Innis"); Amheim y Levinson (1990) C&EN. 36; The Journal Of NIH Research (1991) 3:81; Kwoh et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86, 1173; Guatelli et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:1874; Lomell et al. (1989) J Clin Chem 35:1826; Landegren et al. (1988) Science 241:1077; Van Brunt (1990) Biotechnology 8:291; Wu y Wallace (1989) Gene 4: 560; Barringer et al. (1990) Gene 89:117, y Sooknanan y Malek (1995) Biotechnology 13:563. Los métodos adicionales, útiles para clonar ácidos nucleicos en el contexto descrito en el presente documento, incluyen Wallace et al. Patente de Estados Unidos N° 5.426.039. Los métodos mejorados para amplificar ácidos nucleicos grandes mediante PCR se resumen en Cheng et al., (1994) Nature 369:684 y las referencias en este.

Determinados polinucleótidos descritos en el presente documento, por ejemplo, oligonucleótidos, pueden sintetizarse utilizando varias estrategias de fase sólida, incluyendo química de acoplamiento de fosforamidita basada en mononucleótidos y/o trinucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos pueden sintetizarse por la adición secuencial de monómeros activados y/o trímeros a una cadena de polinucleótidos en elongación. Véase, *por ejemplo*, Caruthers, M.H. et al. (1992) Meth Enzymol 211:3.

En lugar de sintetizar las secuencias deseadas, puede encargarse esencialmente cualquier ácido nucleico a medida a través de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company (mrc@oligos.com), The Great American Gene Company (www.genco.com), ExpressGen, Inc. (www.expressgen.com), Operon Technologies, Inc. (www.operon.com), y muchos otros.

Además, pueden lograrse sustituciones de aminoácidos seleccionados en polipéptidos virales mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio. Por ejemplo, los polipéptidos virales con sustituciones de aminoácidos se correlacionan funcionalmente con características fenotípicas deseables, por ejemplo, un fenotipo atenuado, adaptación al frío, sensibilidad a la temperatura, pueden producirse introduciendo mutaciones específicas en un segmento de ácido nucleico viral que codifica el polipéptido. Los métodos para la mutagénesis dirigida a sitio se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Ausubel, Sambrook, y Berger, *anteriormente citados*. Hay disponibles comercialmente numerosos kits para llevar a cabo mutagénesis dirigida a sitio, por ejemplo, el kit de mutagénesis dirigida a sitio Chameleon (Stratagene, La Jolla), y pueden usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante para introducir, por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos, en un segmento de genoma que codifica un polipéptido de gripe A o B, respectivamente.

### 5.13 Otros virus

Los ácidos nucleicos, vectores, y métodos descritos en el presente documento también pueden usarse para la expresión y purificación de otros virus recombinantes. La siguiente discusión proporciona orientación para consideraciones importantes en la adaptación de vectores para su uso con otros tales virus.

Si el virus diana comprende un genoma de ARN segmentado de cadena positiva, se localiza preferentemente un promotor de ARN pol I canina cadena arriba del ADNc en la unidad de transcripción interna (sistema unidireccional). En el presente documento se genera ARN de cadena positiva para su incorporación en nuevos virus. Sin embargo, los ejemplos en los que se producen virus diana que comprenden genomas de ARN segmentados de cadena negativa usando el sistema unidireccional se encuentran dentro del ámbito descrito en el presente documento.

Si el virus diana comprende un genoma de ARN segmentado de cadena negativa, se localiza preferentemente el promotor de ARN pol I canina cadena abajo del ADNc en la unidad de transcripción interna (sistema bidireccional). En el presente documento, se genera ARN de hebra negativa para su incorporación directa en nuevos virus. Los ejemplos en los que se producen virus diana que comprenden genomas de ARN segmentados de hebra positiva con el sistema bidireccional se encuentran dentro del ámbito descrito en el presente documento.

La presente divulgación puede usarse también para producir virus que comprenden genomas de ARN no segmentados infecciosos o no infecciosos (monocatenario o bicatenario). En general, la introducción simple de ARN genómico viral infeccioso en una célula hospedadora es suficiente para causar el inicio del ciclo vital viral en la célula y la eventual producción de virus completos. Por ejemplo, la simple introducción de ARN genómico picornaviral en una célula hospedadora es suficiente para causar la generación de picornavirus completos. La iniciación del ciclo

vital de un virus que comprende ARN genómico no infeccioso, típicamente, requiere la introducción adicional de otras proteínas virales que normalmente se portan en la partícula viral junto con el genoma. Por ejemplo, el virus parainfluenza III porta una ARN polimerasa dependiente de ARN cuya presencia es necesaria en una nueva célula hospedadora para la iniciación de la replicación del ARN genómico viral y la transcripción de ARNm virales; en ausencia de la polimerasa, el ARN genómico de parainfluenza III no es infeccioso. Si se generan virus infecciosos que comprenden ARN genómicos no segmentados, la simple introducción de un plásmido de expresión dual descrito en el presente documento, que porta un ácido nucleico que incluye el genoma viral en una célula hospedadora adecuada es suficiente para causar la generación de virus completos. Si se generan virus no infecciosos que comprenden ARN genómico no segmentado, también se puede tener que introducir plásmidos de expresión adicionales en una célula hospedadora junto con el plásmido de expresión dual que porta el genoma viral. El plásmido adicional debe expresar la proteína necesaria (o las proteínas necesarias) para la iniciación del ciclo vital viral que normalmente se introduce en una célula hospedadora tras la infección (por ejemplo, ARN polimerasas dependientes de ARN).

Si se produce picornavirus, que comprende un genoma de ARN no segmentado infeccioso, el ADNc que comprende el genoma viral completo se inserta en un plásmido de expresión de promotor dual de la invención. Un promotor cadena arriba en una unidad de transcripción externa, preferentemente un promotor de pol II, dirige la producción de un ARNm de cadena positiva que comprende el genoma viral completo, se traduce una poliproteína a partir del ARNm y se escinden y liberan proteínas individuales a partir de la poliproteína (por ejemplo, por una proteasa dentro de la poliproteína). Ya que el genoma viral comprende ARN de cadena positiva, un segundo promotor cadena arriba en una unidad de transcripción interna (sistema unidireccional), preferentemente una ARN pol I canina, dirige la producción de una copia de cadena positiva del genoma. Si el genoma viral comprende ARN de cadena negativa, un segundo promotor cadena abajo, en una unidad interna de transcripción (sistema bidireccional), preferentemente una ARN pol I canina, dirigiría la producción de una copia de cadena negativa del genoma. Los ejemplos en los que se producen virus de ARN no segmentado de cadena negativa usando el sistema unidireccional se encuentran dentro del ámbito descrito en el presente documento. De manera similar, los ejemplos en los que se producen virus de ARN no segmentado de cadena positiva usando el sistema bidireccional se encuentran dentro del ámbito descrito en el presente documento.

Los virus que comprenden genomas de ARN no segmentados no infecciosos en los que no se produce una poliproteína también pueden generarse con la presente divulgación. Por ejemplo, el presente sistema puede usarse para producir virus *rhabdoviridae* o virus *paramyxoviridae*, preferentemente virus de parainfluenza III, cuyo ciclo vital incluye normalmente la producción de múltiples ARNm monocistrónicos a partir de ARN genómico de hebra negativa por una ARN polimerasa dependiente de ARN derivada de virus; las proteínas individuales se expresan a partir de los ARNm monocistrónicos. En estos ejemplos, una unidad externa de transcripción que comprende un promotor, preferentemente un promotor de pol II, dirige la producción de una copia policistrónica de cadena positiva del genoma viral a partir de la cual, en general, se traduce únicamente el primer gen (NP). Además, una unidad interna de transcripción que comprende un promotor, preferentemente un promotor de pol I canina, dirige la expresión de una copia de ARN del genoma para su incorporación en nuevos virus. Ya que el genoma viral de parainfluenza III comprende ARN de cadena negativa, el promotor de la unidad interna de transcripción está localizado preferentemente cadena abajo del ADNc (sistema bidireccional). Si el genoma viral comprende ARN de cadena positiva, el promotor de la unidad interna de transcripción está localizado preferentemente cadena arriba del ADNc (sistema unidireccional). Los ejemplos en los que se producen virus que comprenden un genoma de ARN de hebra positiva usando el sistema bidireccional y los ejemplos en los que se producen virus que comprenden un genoma de ARN de cadena negativa usando el sistema unidireccional se encuentran dentro del ámbito de la divulgación. Se necesitan proteínas virales adicionales (distintas de la proteína expresada a partir del ARNm policistrónico) para la transcripción y replicación viral (L y P), y estas proteínas se proporcionan individualmente en plásmidos de expresión separados.

También se describen métodos en el presente documento en los que se generan virus que comprenden genomas de ARN bicatenario segmentado. En el presente documento, puede insertarse un plásmido que comprende cada gen en el genoma viral diana en un plásmido de expresión de promotor dual descrito en el presente documento. El plásmido puede ser tanto un plásmido unidireccional como un plásmido bidireccional. Un promotor en una unidad transcripcional externa, preferentemente un promotor de pol II, dirige la expresión de un transcrito de ARNm de cada gen que se traduce en la proteína codificada. Un promotor en una unidad de transcripción interna, preferentemente un promotor de pol I canina, dirige la transcripción de una hebra positiva (sistema unidireccional) o de una hebra negativa (sistema bidireccional). Posteriormente, la primera hebra que se produce puede actuar como un molde para la producción de la hebra complementaria por la ARN polimerasa viral. El producto resultante de ARN bicatenario se incorpora a nuevos virus.

## 6. Ejemplos específicos

La presente invención está definida por las reivindicaciones. También se describen en el presente documento los siguientes ejemplos.

1. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia reguladora de ARN polimerasa I canina.

2. El ácido nucleico del ejemplo 1, en el que la secuencia reguladora es un promotor.
3. El ácido nucleico del ejemplo 1, en el que la secuencia reguladora es un potenciador.
- 5 4. El ácido nucleico del ejemplo 1, en el que la secuencia reguladora es tanto un potenciador como un promotor.
5. El ácido nucleico del ejemplo 1, donde la secuencia reguladora de la ARN polimerasa comprende los nucleótidos 1 a 1808 de SEC ID N°: 1 o un fragmento funcionalmente activo del mismo.
- 10 6. El ácido nucleico del ejemplo 1, 2, 3, 4, o 5, en el que la secuencia reguladora está unida operativamente a ADNc que codifica un ARN genómico viral de hebra negativa o el correspondiente ARNc.
7. El ácido nucleico del ejemplo 6, en el que el ARN genómico viral de hebra negativa es un ARN genómico de la gripe.
- 15 8. El ácido nucleico del ejemplo 6 o 7, en el que el ácido nucleico comprende además una secuencia de terminación de la transcripción.
9. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico del ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8.
- 20 10. El vector de expresión del ejemplo 9, en el que el vector de expresión comprende un origen de replicación bacteriano.
11. El vector de expresión del ejemplo 9, en el que el vector de expresión comprende un marcador de selección que puede seleccionarse en una célula procariota.
- 25 12. El vector de expresión del ejemplo 9, en el que el vector de expresión comprende un marcador de selección que puede seleccionarse en una célula eucariota.
13. El vector de expresión del ejemplo 9, en el que el vector de expresión comprende un sitio de clonación múltiple.
- 30 14. El vector de expresión del ejemplo 13, en el que el sitio de clonación múltiple está orientado en relación a la secuencia reguladora de la ARN polimerasa I canina para permitir la expresión de una secuencia codificante introducida en el sitio de clonación múltiple a partir de la secuencia reguladora.
- 35 15. Un método para producir un ARN genómico de la gripe, que comprende transcribir el ácido nucleico del ejemplo 7, produciendo de este modo un ARN genómico de la gripe.
- 40 16. Un método para producir un virus de la gripe recombinante, que comprende cultivar una célula canina que comprende el vector de expresión del ejemplo 9, 10, 11, 12, 13, o 14 y uno o más vectores de expresión que expresan un ARNm que codifica uno o más polipéptidos de la gripe seleccionados del grupo que consiste en: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1, y NS2; y aislar el virus de la gripe recombinante.
- 45 17. El método del ejemplo 16, en el que se usa un virus auxiliar.
18. El método del ejemplo 16, en el que el virus de la gripe producido es infeccioso.
- 50 19. El método del ejemplo 16, 17 o 18, en el que el método da como resultado la producción de al menos  $1 \times 10^3$  UFP/ml de virus de la gripe.
20. Una célula que comprende el ácido nucleico del ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.
21. Una célula que comprende el vector de expresión del ejemplo 9, 10, 11, 12, 13 u 14.
- 55 22. La célula del ejemplo 20 o 21, en el que la célula es una célula canina.
23. La célula canina del ejemplo 22, en el que la célula canina es una célula de riñón.
- 60 24. La célula de riñón canina del ejemplo 23, en el que la célula de riñón canina es una célula MDCK.
25. Un método para generar en células cultivadas caninas un virus de ARN de hebra negativa segmentado recombinante que tiene más de 3 segmentos de ARNv genómico, comprendiendo dicho método: (a) introducir en una población de células caninas un primer conjunto de vectores de expresión capaces de expresar en dichas células segmentos de ARNv genómico para proporcionar los segmentos de ARNv genómicos completos de dicho virus; (b) introducir en dichas células un segundo conjunto de vectores de expresión capaces de expresar ARNm
- 65



que codifica uno o más polipéptidos de dicho virus; y (c) cultivar dichas células, produciéndose de este modo partículas virales.

26. El método del ejemplo 25, en el que se producen partículas virales de la gripe infecciosas.

27. El método del ejemplo 25 o 26, en el que se usa virus auxiliar.

28. Un método para generar en células cultivadas caninas partículas virales de la gripe infecciosas, comprendiendo dicho método: (a) introducir en una población de células caninas un conjunto de vectores de expresión capaces de expresar en dichas células i) segmentos de ARNv genómico para proporcionar los segmentos completos de ARNv genómico de dicho virus y (ii) ARNm que codifica uno o más polipéptidos de dicho virus; (b) cultivar dichas células, produciéndose de este modo dichas partículas virales.

29. Un método para transcribir un segmento de ARNv de un virus de la gripe, que comprende poner en contacto un polipéptido de polimerasa pol I canina con un polinucleótido que comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en: las SEC ID N°: 1-28, en el que dicho ácido nucleico está unido operativamente a una molécula de ADNc que codifica dicho segmento de ARNv de dicho virus de hebra negativa; y aislar un segmento de ARNv transcrito.

30. El método del ejemplo 29, en el que el ARNv se transcribe en una célula hospedadora.

31. El método del ejemplo 16, 17, 18, 19, 25, 26, 27 o 28, en el que cada vector de expresión está en un plásmido separado.

32. Una composición que comprende una variedad de vectores, en la que la variedad de vectores comprenden un vector que comprende un promotor de pol I canina unido operativamente a un ADNc de PA de virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor de pol I canina unido operativamente a un ADNc de PB1 de virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor de pol I canina unido operativamente a un ADNc de PB2 de virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor de pol I canina unido operativamente a un ADNc de HA de virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor de pol I canina unido operativamente a un ADNc de NP de virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor de pol I canina unido operativamente a un ADNc de NA de virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor de pol I canina unido operativamente a un ADNc de M de virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, y un vector que comprende un promotor de pol I canina unido operativamente a un ADNc de NS de virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción.

33. La composición del ejemplo 32, que además comprende uno o más vectores de expresión que expresan un ARNm que codifica uno o más polipéptidos de la gripe seleccionados del grupo que consiste en: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1, y NS2.

34. Una célula hospedadora que comprende la composición del ejemplo 32 o 33.

35. Una vacuna que comprende un virus producido mediante el método del ejemplo 16, 17, 18, 19, 25, 26, 27 u 28.

36. Una vacuna que comprende una composición inmunogénica preparada a partir de un virus producido a partir del método del ejemplo 16, 17, 18, 19, 25, 26, 27 o 28.

37. La composición del ejemplo 35 o 36, en el que cada vector de expresión está en un plásmido separado.

## 7. Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven únicamente para ilustrar la invención y no pretenden limitar la invención de modo alguno.

### 7.1 Ejemplo 1: Crecimiento de cepas de gripe en células MDCK

Este ejemplo describe la caracterización de varias líneas celulares para cultivar virus de la gripe. Se evaluaron varias líneas celulares y células primarias diferentes para la producción de cepas de gripe tanto de tipo silvestre (ts) como reorganizados genéticos derivados de cepas adaptadas de laboratorio, por ejemplo, adaptadas al frío (ca), de tipo A y de tipo B, incluyendo MRC-5, WI-38, FRhL-2, PerC6, 293, NIH 3T3, CEF, CEK, DF-1, Vero, y MDCK. Aunque muchos tipos celulares soportaron la replicación de algunas cepas de la gripe adaptadas al frío en un alcance limitado, solo MDCK produjeron de manera consistente elevados títulos de virus tanto de tipo A como de tipo B. Por

ejemplo, se descubrió que las células PerC6 soportaron la replicación de determinados virus de tipo B de ts y ca a un nivel similar al observado en células MDCK, aunque las cinéticas de crecimiento son diferentes (véase la Figura 1). Por el contrario, PerC6 fue incapaz de soportar la replicación de una serie de virus de tipo A ca. La Figura 2 muestra las curvas de crecimiento para virus A/Sidney/05/97 y A/Pekín/262/95 de ts y ca. En ambos casos, la cepa ca no se replica bien en células PerC6. Del mismo modo, la Figura 3 muestra las curvas de crecimiento para A/Ann Arbor/6/60 de ts y ca, lo que demuestra que la cepa ca no se replica eficazmente en células PerC6 y la replicación de A/Ann Arbor/6/60 de ts no es tan robusta como en células MDCK. Los análisis de PCR en tiempo real de la replicación del virus de la gripe en células PerC6 demostró que el ARN viral (ARNv) de las cepas de virus de la gripe A tato ca como ts aumentó durante las primeras 24 horas después de la infección, aunque solo las cepas ts continuaron aumentando hasta las 120 horas, las cepas ca no. Por el contrario, el ARNv tanto ts como ca aumentó y alcanzó un máximo en el día 3 en células MDCK. Véase la Figura 4.

También se ensayó la capacidad de las células MDCK para soportar la replicación de una vacuna pandémica potencial, ca A/Vietnam/1203/2004. Las células MDCK se infectaron a una baja multiplicidad de infección con ca A/Vietnam/1203/2004 y el virus en el sobrenadante se cuantificó en varios momentos después de la infección. A las 48 horas después de la infección, los títulos de ca A/Vietnam/1203/2004 alcanzaron aproximadamente 8 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml y permanecieron estables durante los siguientes 3 a 4 días. Véase la Figura 5.

En los experimentos, las células MDCK obtenidas de la ATCC (Nº de referencia CCL-34) se expandieron un número limitado de veces en medio que contenía suero fetal bovino al 10 % procedente de los Estados Unidos o en un medio sin suero adecuado (por ejemplo, SFMV 100) para producir soluciones madre pre-maestras para los estudios iniciales de caracterización. Los medios sin suero adecuados se describen en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nº 60/638.166, presentada el 23 de diciembre de 2004; la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nº 60/641.139, presentada el 5 de enero de 2005; y la Solicitud de los Estados Unidos Nº 11/304.589 presentada el 16 de diciembre de 2005. Las células se crecieron fácilmente en ambos tipos de medio y ambas soluciones madre de células soportaron la replicación de cepas de vacuna adaptadas al frío y cepas pandémicas, tal como se muestra en la Tabla 1, a continuación, y en la Figura 5, respectivamente.

Tabla 1

Comparación de la productividad de cepas de gripe adaptadas al frío en células MDCK crecidas con suero y sin suero.		
Cepa de virus (reorganizado 6:2)	TCID <sub>50</sub> /ml (log <sub>10</sub> )	
	MDCK con suero	MDCK sin suero
A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1)	8,1	7,8
A/Panamá/20/99 (H3N2)	6,8	6,4
A/Sidney/05/97 (H3N2)	7,0	6,5
B/Brisbane/32/2002	7,2	7,5
B/Hong Kong/330/2001	7,2	7,4
B/Victoria/504/2000	6,9	7,5

Para investigar los segmentos génicos responsables del crecimiento restringido en células PerC6, se empleó la técnica de rescate de ocho plásmidos para generar un reorganizado 7:1 para cada segmento génico de la cepa A/AA/6/60 de la gripe. Véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos 6.951.754 para una descripción representativa del sistema de rescate de gripe de ocho plásmidos. La Figura 6 muestra un diagrama esquemático y la estrategia de nombramiento para cada reorganizado 7:1. Se ensayó entonces la capacidad de los reorganizados resultantes para replicarse en células PerC6. Véase la Figura 7. El fenotipo de restricción de crecimiento parece mapearse en los segmentos génicos PB2 y PB1. Puede llevarse a cabo un mapeo de detalle fino de la localización exacta responsable de este fenotipo usando métodos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, una comparación de secuencia de cepas ts o ca en los segmentos génicos identificados permitirá la identificación de diferencias específicas que después pueden retromutarse en una cepa ts o ca. Posteriormente se analiza la capacidad de dichos mutantes para crecer en células PerC6. Cualquier mutación que bien previene el crecimiento de una cepa ts o permite el crecimiento de una cepa ca se identifica como una que contribuye al fenotipo de restricción de crecimiento.

### 7.2 Ejemplo 2: Tumorigenicidad de líneas celulares MDCK

La tumorigenicidad potencial de las dos soluciones madre pre-maestras de células MDCK, una crecida en medio que contenía suero y la otra en medio sin suero, se evaluaron en el modelo de ratón desnudo atímico en un estado que podría representar 5 pases celulares después de los que se espera poder usarlas para producción de vacuna. Para evaluar la tumorigenicidad, se inyectaron por vía subcutánea 10<sup>7</sup> células en grupos de 10 ratones, y después de 84 días se sacrificó y examinó a los animales. Se observaron neoplasias en seis de los 10 animales inoculados con las células pasadas en medio sin suero. Por el contrario, no hubo muestras de neoplasias en ninguno de los animales inoculados con células pasadas en medio suplementado con suero fetal bovino al 10 %; aunque se observaron

algunos fibrosarcomas en el sitio de inoculación, las células pasadas en suero no fueron tumorigénicas, tal como se demuestra en la Tabla 2.

Tabla 2

5

Tumorigenicidad y cariólogía de células MDCK pasadas en dos medios diferentes				
	Sin suero		Suero al 10 %	
	Pase 4	Pase 20	Pase 4	Pase 20
Tumorigenicidad	ND	Neoplasias anotadas	ND	Sin neoplasias Fibrosarcomas en el sitio de inyección
TP <sub>50</sub> estimada* (número de animales con tumores / animales totales)	ND	~10 <sup>7</sup> (6/10)	ND	No estimable (>10 <sup>7</sup> ) (0/10)
Número mediano de cariólogía; comentarios	78; Gran distribución de células con número de cromosomas de 52 a 82	78; Gran distribución de células con número de cromosomas de 52-82	78; Pocas células con número anómalo de cromosomas (70 a 82)	78; Pocas células con número anómalo de cromosomas (70 a 82)
*TP <sub>50</sub> : Número de células necesarias para inducir tumores en el 50 % de animales ND: No efectuado				

Como se muestra en la Tabla 2 también se llevaron a cabo análisis de cariotipo en estas dos soluciones madre pre-maestras tanto en el cuarto como en el vigésimo pase en su medio respectivo. Las células no tumorigénicas pasadas en FCS al 10 % tuvieron un número mediano de 78 cromosomas de metafase con una distribución relativamente limitada de células con otro número de cromosomas (70 a 82). Aunque las células pasadas en medio sin suero tenían también un número mediano de 78 cromosomas de metafase, se observaron significativamente más células con un número de cromosomas aneuploide en el intervalo de 52 a 82 cromosomas de metafase. En ambos casos, la cariólogía no cambió el pase posterior.

### 15 7.3 Ejemplo 3: Adaptación de las células MDCK para crecer en medio sin suero

Las células MDCK de la ATCC se pasan en medio que contiene FBS irradiado con radiación gamma. Estas células se pasan entonces un número limitado de veces en una formulación sin suero seleccionada para soportar la producción de banco de células. Los medios sin suero se describen en las Solicitudes Provisionales de los Estados Unidos N° 60/638.166 y 60/641.139, y en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 11/304.589. Estos pases adicionales pueden llevarse a cabo a 37 °C o 33 °C. El pase de células MDCK en tres medios que contenían suplementos derivados de planta en vez de suero produjo células con cariotipos similares a los de células MDCK pasadas en medio que contenía FCS (datos no mostrados).

### 25 7.4 Ejemplo 4: Clonación de células MDCK

Las células se clonaron biológicamente mediante dilución limitante para asegurar que las células de producción se derivan de una constelación genética única. Los clones se exploraron para varias propiedades fenotípicas, incluyendo tiempo de duplicación y tumorigenicidad relativa, así como producción viral. En un experimento inicial de prueba de concepto, se obtuvieron cincuenta y cuatro clones de MDCK en medio que contenía FCS. Estos clones se pasaron y cada uno se infectó con una baja multiplicidad de ca A/Nueva Caledonia/20/99. Varios días después de la infección, se retiró el sobrenadante y se midió la cantidad de virus en el sobrenadante mediante TCID<sub>50</sub>. Una minoría de los clones produjo títulos de virus relativamente altos, mayores de que los producidos en las células progenitoras no clonadas. Los clones con propiedades biológicas y fisiológicas superiores se usan para establecer un Banco de Células Maestras (MCB) tal como se describe a continuación.

### 7.5 Ejemplo 5: Prueba y caracterización de un Banco de Células Maestras

El MCB se ensaya extensivamente para asegurar que no hay evidencias de agentes adventicios. Por ejemplo, se llevan a cabo uno o más de varias pruebas PCR y/o específicas de anticuerpo para agentes virales disponibles, como se muestra en la Tabla 3, más adelante.

Tabla 3

Régimen de ensayo para el MCB	
Pruebas generales	PCR* / Específico de Ac
Esterilidad	AAV Tipos 1 y 2
Micoplasma	HCMV
Agentes adventicios <i>in vitro</i> (múltiples líneas celulares)	EBV
Agentes adventicios <i>in vivo</i>	HSV
PERT	Hepatitis B, C y E
Co-cultivo	HHV 6, 7 y 8
Cariología	VIH 1 y 2
Microscopía electrónica	HPV
Tumorigenicidad de células intactas (TP50)	HTLV I y II
Oncogenicidad de ADN celular	Polioma (virus BK y JC)
Oncogenicidad de lisado celular	Circovirus
Virus bovinos por 9CFR	Parvovirus canino
Virus porcinos por 9CFR	Moquillo canino
	Adenovirus
	SV40

5 7.6 Ejemplo 6: Caracterización preclínica de virus de la gripe derivado de cultivo

Este ejemplo describe la caracterización de cepas de gripe producidas a partir de cultivo celular así como a partir de huevos y compara los virus producidos a partir de los sistemas. En general, los virus de la gripe son adecuados para su uso como vacunas en seres humanos, y tienen propiedades biológicas que hacen a los virus adecuados para dicho uso. En este ejemplo, los virus de la gripe están adaptados al frío (*ca*; tienen la capacidad de replicarse eficazmente a temperaturas más bajas), son sensibles a la temperatura (*ts*), tienen replicación *in vitro* restringida a temperaturas mayores), y están atenuados (*att*, replicación no detectable en tejidos pulmonares de hurones), y se citan en el presente documento como cepas *catsatt*. La comparación incluye: evaluación bioquímica, antigénica, y genética (secuenciación) del producto viral; caracterización biológica y bioquímica del virus después de la replicación en células humanas; replicación en un modelo animal permisivo; e inmunogenicidad en un modelo animal permisivo.

7.6.1 Comparabilidad genética, bioquímica y antigénica

Las cepas *Ca ts att* de tipo A/H1N1, A/H5N1, A/H3N2 y B se replicaron a títulos relativamente altos en células MDCK. Además, el paso de estas cepas *ca ts att* en células MDCK no alteró su secuencia genómica. Se pasaron tres cepas *ca ts att*, *ca A/Sidney/05/97*, *ca A/Pekín/262/95*, y *ca B/Ann Arbor/1/94* una o dos veces en células MDCK y se secuenciaron las regiones codificantes completas de todos los 6 genes internos y se compararon con el material de partida. No se observaron cambios de nucleótidos, lo que demuestra que este pase a través de este sustrato no cambió la composición genética de estas cepas. Se llevaron a cabo caracterizaciones de secuencia adicionales de diferentes cepas de vacuna en células MDCK en condiciones que se espera que imiten el proceso de producción, incluyendo composición de los medios, dosis de entrada (*moi*), temperatura de incubación y tiempo de recogida. Basándose en los datos preliminares, se espera que no haya cambios en la secuencia genómica de virus producidos en MDCK.

Debido a que el genoma era estable genéticamente después del pase en células MDCK, se espera que las características biológicas de la vacuna producida en huevos o células MDCK sean indistinguibles. Sin embargo, el producto viral primario del cultivo celular puede tener algunas diferencias sutiles en comparación con el producto basado en huevos, particularmente respecto de la modificación postraduccional de las proteínas virales, incluyendo HA y NA, o la composición de lípidos en la membrana viral; pudiendo ambas cambiar potencialmente las propiedades físicas generales del virión. Los datos preclínicos preliminares referentes a la antigenicidad de la vacuna producida en cultivo celular y la vacuna producida en huevo demostraron que no había diferencias detectables en este parámetro importante. Las existencias de huevos de varias cepas de la vacuna se pasaron a través de células MDCK y se determinó la antigenicidad de ambos productos midiendo los títulos de HAI usando antisueros de referencia. Como se muestra en la Tabla 4, todos los títulos de HAI se encontraban dentro de 2 veces entre sí, lo que indica que la replicación de la vacuna en células no cambió la antigenicidad de la vacuna en comparación con el material derivado de huevo.

Tabla 4

Títulos de HAI de cepas producidas en huevos y células MDCK		
Cepa	Título de HAI	
	Derivado de huevo	Derivado de MDCK
A/Panamá/20/99	256	256
A/Wuhan/359/95	1024	2048
A/Wyoming/03/2003	512	1024
B/Jilin/20/2003	64	32
B/Hong Kong/330/01	64	64
B/Jiangsu/10/2003	128	128

7.7 Ejemplo 7: Infección de células epiteliales humanas en cultivo

5 En un ejemplo, para evaluar las similitudes bioquímicas, biológicas y estructurales después de la replicación de las vacunas producidas en MDCK y huevo en células de origen humano, pueden pasarse las vacunas una vez en células humanas diploides relevantes, tales como células epiteliales bronquiales humanas (NHBE). Este pase  
 10 servirá para imitar un solo evento de infección en las vías aéreas humanas y después permitir la comparación de los virus descendientes, el virus que es en última instancia responsable de provocar una respuesta inmunitaria eficaz. Los estudios de las actividades de la hemaglutinina y la neuraminidasa (unión y fusión) de las vacunas pueden medirse en estos materiales, así como pueden evaluarse otros estudios bioquímicos y estructurales, incluyendo microscopía electrónica, proporciones de partículas infecciosas a totales, y equivalentes de genoma viral. En su conjunto, estas comparaciones servirán para demostrar la comparabilidad de la vacuna derivada de células con la  
 15 vacuna eficaz y segura producida en huevo. Se resume un sumario de estudios analíticos en la Tabla 5.

Tabla 5

Estudios preclínicos para comparar vacunas producidas en células y huevo	
<i>In vivo</i> (hurones)	<i>In vitro</i> *
Atenuación / replicación	Unión del virus
Alcance de la replicación en la vía aérea superior	Título de hemaglutinina
Cinética de la replicación en la vía aérea superior	Unión de diferentes ácidos siálicos
Inmunogenicidad	Propiedades físicas
Reactividad cruzada	Morfología mediante ME
Cinética	Infecciosas: Partículas totales (genomas)
Infectividad	Actividad de fusión
Dosis necesaria para replicación detectable	pH óptimo
Dosis necesaria para respuesta de anticuerpos	Temperatura óptima
	Secuencia genómica
	Actividad de neuraminidasa
*Se comparan productos primarios y después de un pase en células humanas	

20 7.8 Ejemplo 8: Modelos animales preclínicos

El hurón es un modelo animal robusto usado para evaluar la atenuación e inmunogenicidad de las vacunas de la gripe atenuadas y cepas de vacuna componentes. El rendimiento de las cepas de gripe derivadas de células producidas a partir del MCB se comparan con las mismas cepas producidas en huevos. Una comparación directa de  
 25 estos materiales en estudios controlados permite un nivel elevado de seguridad de la comparabilidad de estos productos virales.

Para evaluar la capacidad de las dos vacunas para infectar o lograr una "toma" en el hurón, se anestesia ligeramente a los animales y se les inocula por vía intranasal con las preparaciones producidas en células o en  
 30 huevo. Se recoge material de lavado nasal en varios puntos temporales después de la inoculación y se evalúa la cantidad de virus mediante uno de varios métodos disponibles para evaluar la cinética y el alcance de la replicación viral en el tracto respiratorio superior de los animales. Los experimentos se llevan a cabo con un intervalo de dosis, e incluyen múltiples cepas y diferentes mezclas trivalentes para generalizar la infectividad relativa de cepas crecidas en cultivo celular con la de cepas producidas en huevo. También se usan estos mismos estudios para evaluar la  
 35 inmunogenicidad de las cepas de la gripe, una propiedad que está relacionada inherentemente con la capacidad del virus para iniciar la infección. Se extrae sangre de los animales y se recogen lavados nasales en varios puntos (semanas) después de la inoculación; estos especímenes se usan para evaluar las respuestas de anticuerpos en suero y de IgA nasales a la infección. La culminación de estos datos, infectividad, anticuerpos en suero y respuestas de anticuerpo mucosales, se usarán para comparar y evaluar la infectividad relativa de la vacuna producida en  
 40 células con la de la vacuna producida en huevo. Se predice que el resultado más probable sea que las cepas de vacuna producidas en células y huevo tienen infectividad e inmunogenicidad similares. Si pareció que la vacuna

derivada de células era más infectiva o más inmunogénica que el producto derivado de huevo, se llevan a cabo estudios adicionales que evalúan la posibilidad de dosis menores.

Se llevan a cabo una serie de estudios de inmunogenicidad y replicación en el modelo de hurón para evaluar las vacunas derivadas de cultivo celular con una dosis humana de una sola unidad. La infección con cepas *ca ts att* provoca generalmente una fuerte y rápida respuesta de anticuerpos en los hurones. Además, se ensayan de manera rutinaria cepas *ca ts att* y se demuestra que expresan el fenotipo atenuado (*att*) replicando a títulos relativamente altos en la nasofaringe, pero a niveles indetectables en los pulmones de estos animales. También se evalúa el impacto del crecimiento en cultivo celular en estas características biológicas. Sin embargo, es improbable que se observe cualquier diferencia, ya que el fenotipo *att* es una parte integral de la composición genética de estas cepas. La cinética de crecimiento y reactividad cruzada de estas cepas se evalúa después de la administración de una sola dosis humana en estos animales. Esto provoca anticuerpos en suero que reaccionan de manera cruzada con múltiples cepas de un linaje genético; y se espera que una vacuna derivada de células tengan la misma capacidad.

Estas evaluaciones de comparabilidad deben proporcionar una visión significativa de las diferencias bioquímicas y/o biofísicas potenciales del producto de virus primario y demuestran el impacto de estas diferencias epigenéticas en el rendimiento de las cepas *ca ts att* medido pasando primero el virus en células humanas o estudios animales. Basándose en la información de secuencia hasta la fecha, no se espera que haya impacto en el rendimiento inmunogénico de las cepas *ca ts att* como resultado de la producción en células MDCK.

Los hurones son un modelo animal bien documentado para la gripe y se usan de manera rutinaria para evaluar el fenotipo de atenuación y la inmunogenicidad de cepas *ca ts att*. En general, se usan animales de 8-10 semanas de edad para evaluar la atenuación; los diseños de estudio evalúan típicamente  $n = 3-5$  animales por grupo de ensayo o de control. Los estudios de inmunogenicidad se evalúan en animales de 8 semanas a 6 meses de edad y generalmente necesitan  $n = 3-5$  animales por artículo de ensayo o grupo de control. Estos números proporcionan información suficiente para obtener comparaciones estadísticamente válidas u observacionalmente importantes entre grupos. Durante la mayoría de los estudios pueden percibirse signos similares a la gripe, pero no son probables. Los hurones no muestran signos de disminución del apetito o peso, de descarga nasal u ocular; la observación de signos de enfermedad similar a la gripe es una parte necesaria del estudio y no están permitidas intervenciones tales como analgésicos. Otros signos de incomodidad, tales como heridas abiertas o pérdida significativa de peso, darán como resultado la disposición adecuada del animal después de discutirlo con el veterinario tratante.

#### 7.9 Ejemplo 9: Desarrollo de siembra de virus maestra (MSV)

Actualmente, las cepas de vacuna de la gripe se generan coinfectando células aviares con un virus de tipo silvestre y con MDV de tipo A o de tipo B y aislando y explorando la progenie para la constelación genética 6:2 deseada. Este proceso requiere varios pases del virus a través de cultivos celulares aviares y/o huevos SPF. Recientemente, se ha introducido el rescate de plásmidos para producir una preparación viral de la gripe. En este proceso, se electroporan células Vero (mono verde africano) de un banco celular ensayado y caracterizado extensivamente con, por ejemplo, 8 plásmidos de ADN, conteniendo cada uno una copia de ADNc de uno de los 8 segmentos de ARN de la gripe. Varios días después de la electroporación el sobrenadante de estas células electroporadas contiene virus de la gripe. Los sobrenadantes se inoculan entonces en huevos SPD para amplificar y clonar biológicamente la cepa de vacuna. Ambos procedimientos dan como resultado una cepa de vacuna que se inocula en huevos SPF para producir los MVS. Aunque el rescate de plásmido tiene varias ventajas, incluyendo una temporización más fiable, segmentos génicos más precisos genéticamente y menos contaminación potencial con agentes adventicios a partir del aislado de tipo silvestre, los MVS individuales generados por estos dos métodos son indistinguibles entre sí y pueden usarse para iniciar la producción de vacuna en bruto. Usando los métodos y composiciones descritas en el presente documento, se adapta este método para usar células MDCK en lugar de las células Vero para el rescate de plásmidos.

La amplificación final de las cepas de vacuna se lleva a cabo en células derivadas de los bancos de células MDCK. Esta amplificación final puede ser obtenible con cultivos a pequeña escala (< 20 l) de células MDCK. Se recoge el sobrenadante de estas células, se conserva y se caracteriza/ensaya para producir los MVS.

#### 7.10 Ejemplo 10: Clonación de secuencias reguladoras de ARN pol I canina

Este ejemplo describe la clonación del gen de ARN ribosomal 18S y de las secuencias de ácido nucleico 5' a este gen.

Primeramente, se aisló el ADN genómico de células MDCK (Nº de referencia ATCC CCL-34) usando un kit de purificación de ADN MasterPure (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI). El alineamiento de secuencias indica que el gen de ARNr 18S es aproximadamente un 90 % idéntico en perro, ser humano, ratón, rata, y pollo. Se diseñaron un par de cebadoras basándose en las secuencias en la región conservada próxima al extremo 5' del gen de ARNr 18S para PCR para amplificar una región de ~500 pb a partir de ADN genómico de MDCK como sonda para detectar los fragmentos de digestión en la membrana que tiene secuencias complementarias mediante

hibridación de Southern. Se identificó un solo fragmento de restricción en el ADN genómico digerido por separado con BamH I (~2,2 kb) y EcoR I (~7,4 kb). Ambos fragmentos se clonaron en el vector pGEM 7 (Promega Corp.; Madison, WI) para análisis posterior. El plásmido que contenía el fragmento de EcoR I se remitió para depósito en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 19 de abril de 2006, y se le asignó el N° de registro de la ATCC PTA-7540 y la fecha de depósito de 20 de abril de 2006.

Los dos clones obtenidos mediante análisis de digestión de restricción se alinearon y se confirmó la orientación de los dos clones secuenciando ambos extremos de los dos clones. Se presenta un mapa de restricción del fragmento EcoR I como Figura 8. A continuación, se determinaron las secuencias completas de ácido nucleico del fragmento entre el sitio de EcoR I 5' y el siguiente sitio de BamH I en la dirección 3' y se montaron en una secuencia de nucleótidos que contenía aproximadamente 3536 bases. Esta secuencia se presenta como Figuras 9A-C (SEC ID N°: 1).

A continuación, se llevaron a cabo experimentos de extensión de cebador para identificar el nucleótido inicial o los transcritos expresados a partir de los elementos reguladores de ARN pol I canina. En resumen, se aisló el ARN total de células MDCK. Se hibridó un cebador de oligonucleótido marcado al ARN y se usó para cebar la síntesis de ADN hacia el extremo 5' del ARNr 18S. Para identificar el primer nucleótido en el transcrito, se usó el mismo cebador para secuenciar el ARNr usando un protocolo convencional basado en dideoxinucleótido. Comparando la longitud del ácido nucleico obtenido en la extensión del cebador con los varios ácidos nucleicos obtenidos en la reacción de secuenciación, pudo identificarse la primera base del ARNr 18S. El primer nucleótido transcrito (la posición +1) está en la base 1809 de la secuencia de nucleótidos presentada como Figuras 9A-C.

Para confirmar que las secuencias cadena arriba de este nucleótido contienen elementos reguladores suficientes para dirigir la transcripción de genes cadena abajo, se construyó una construcción que comprendía un gen EGFP bajo el control de las secuencias reguladoras usando técnicas estándar. El gen EGFP usado en esta construcción es el gen EGFP descrito en Hoffmann et al., (2000) "Ambisense" approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template *Virology* 15:267(2):310-7]. Esta construcción se transfectó entonces a células MDCK usando técnicas convencionales. 24 horas después de la transfección, se aisló el ARN a partir de las células transfectadas y se sometió a análisis de transferencia de Northern con un ADN marcado que codificaba un gen de EGFP. La detección de transcritos del tamaño adecuado confirmó que los plásmidos transfectados en las células MDCK contenía secuencias reguladoras que dirigían la transcripción de las secuencias 3' a los elementos reguladores.

#### 7.11 Ejemplo 11: Identificación de elementos reguladores de ARN polimerasa I canina

Este ejemplo describe la identificación y caracterización de un elemento regulador de ARN polimerasa I canina, el promotor de ARN polimerasa I canina.

Los promotores de ARN pol I canina y otras regiones reguladoras se identifican inspeccionando secuencias 5' al inicio de la transcripción del ARNr 18S para secuencias promotoras canónicas. Además, se llevan a cabo experimentos de deleción simple para identificar las secuencias necesarias para el inicio transcripcional eficaz. En uno de dichos experimentos de deleción, se introduce un sitio de restricción en o se identifica en un plásmido que contiene la secuencia de nucleótidos de las Figuras 9A-C mediante mutagénesis dirigida a sitio. El sitio de restricción se introduce a aproximadamente 50 nucleótidos 3' del nucleótido +1 identificado anteriormente, el nucleótido 1809 en la secuencia presentada como Figuras 9A-C. Otro sitio de restricción 5' a la secuencia de nucleótidos de las Figuras 9A-C en relación a la posición +1 se identifica o introduce mediante mutagénesis dirigida a sitios.

Los vectores que contienen estos sitios de restricción se linealizan mediante digestión con la enzima de restricción adecuada. A continuación, se usa una nucleasa adecuada (por ejemplo, Exonucleasa I, Exonucleasa III y similares) para digerir los ácidos nucleicos lineales. Al detener la reacción en diferentes puntos temporales, pueden obtenerse diferentes tamaños de deleciones en las regiones 5' al inicio de la transcripción. A continuación, los plásmidos lineales se recircularizan y transforman en células hospedadoras adecuadas, después se exploran para identificar plásmidos que contienen las deleciones deseadas. Como alternativa, pueden sintetizarse oligonucleótidos adecuados que contienen secuencias que flanquean una deleción que se va a introducir. Dichos oligonucleótidos después se usan para producir derivados que contienen deleciones de salida de bucle usando técnicas convencionales. Los oligonucleótidos también pueden usarse para producir sustituciones dirigidas a sitio usando técnicas convencionales.

Se determina la capacidad de los diferentes mutantes de deleción o sustitución para iniciar la transcripción transfectando los plásmidos en células MDCK y detectando el ARN transcrito de los plásmidos mediante transferencia de Northern, tal como se describe anteriormente. Al comparar las secuencias de plásmidos que permiten la transcripción con aquellos que no permiten la transcripción, se identifica la secuencia del promotor de la ARN polimerasa I canina. Se usan entonces técnicas convencionales para clonar un ácido nucleico que codifica esta secuencia.

Como alternativa, puede mapearse el promotor de ARN pol I canina a partir del ácido nucleico proporcionado como SEC ID N°: 1 mediante otros métodos conocidos en la materia, por ejemplo, usando una estrategia de minigen. Véase, *por ejemplo*, la solicitud Publicada de los Estados Unidos 20050266026 para el uso de un indicador de minigen de gripe denominado pFlu-CAT, que contenía el gen CAT de sentido negativo clonado bajo el control del promotor de pol I. Véase también el minigenoma de EGFPen Hoffmann et al., (2000) "Ambisense" approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template *Virology* 15:267(2):310-7). y el sistema de minigenoma CAT pPOLI-CAT-RT en Pleschka et al., (1996) *J. Virol.* 70(6):4188-4192.

Para usar estos sistemas para identificar y caracterizar las secuencias necesarias para un inicio transcripcional eficaz, se introducen los diferentes mutantes de delección/sustitución descritos anteriormente u otras subsecuencias de SEC ID N°: 1 en el plásmido indicador seleccionado (por ejemplo, PFlu-CAT, el minigenoma de EGFP) de tal forma que la transcripción de una copia de sentido negativo del gen indicador depende de la iniciación de la transcripción por el mutante de delección o sustitución. Puede usarse de manera conveniente la construcción que contiene EGFP anterior para producir dichos mutantes de delección o sustitución. A continuación, la ARN polimerasa dependiente de ARN sintetiza ARNm de hebra positiva a partir del ARN de hebra negativa transcrito a partir del plásmido indicador. Este ARNm de hebra positiva se traduce entonces mediante la maquinaria celular para que pueda detectarse la actividad de la proteína indicadora (bien EGFP o CAT).

En los ensayos, se transfecta un conjunto de plásmidos de expresión que contiene los ADNc de PB1, PB2, PA y NP o PB1, PA, NP (PB2 como control negativo) en células MDCK junto con un plásmido que comprende un minigen de EGFP de virus de la gripe A o el indicador pFlu-CAT bajo el control de una secuencia reguladora de pol I putativa. Después se cultivan las células en condiciones que permiten la transcripción y traducción de la secuencia indicadora.

La actividad de la proteína indicadora se detecta usando técnicas convencionales. En el caso de EGFP, las células transfectadas se observan en el microscopio de contraste de fase o en el microscopio de fluorescencia a las 48 horas después de la infección. Como alternativa, se emplea citometría de flujo para detectar la expresión de EGFP. En los ensayos con un minigenoma que comprende el gen de CAT, se usa el denominado pFlu-CAT para medir la actividad de polimerasa. En dicho ensayo, la expresión de CAT se mide detectando directamente la proteína CAT (por ejemplo, mediante ELISA), detectando el ARNm que codifica CAT (por ejemplo, mediante transferencia de Northern), o detectando la actividad de CAT (por ejemplo, detectando la transferencia de grupos acetilo radiomarcados a un sustrato adecuado) como un indicador de la actividad del indicador.

Por ejemplo, los fragmentos de ADN a partir del clon de MDCK que han mostrado actividad de promotor (véanse los ensayos de extensión y transcripción de cebador anteriores) se clonaron cadena arriba de una inserción que contenía regiones 5' y 3' no traducidas de la gripe fusionadas a los extremos 5' y 3', respectivamente, de un gen de EGFP de sentido negativo seguido de un terminador de pol I murino (véase, Figura 11). Se prepararon tres construcciones separadas que diferían en las secuencias de MDCK insertadas: Secuencias 1-1807 (-1), 1-1808 (+1) y 1-1809 (+2) de MDCK de SEC ID N°: 1. Cada una de estas construcciones se combinó por separado con plásmidos de expresión para proteínas de replicación de la gripe (PB1, PB2, PA y NP) y se electroporaron en células MDCK. A las 24 horas después de la electroporación, se examinaron las células mediante microscopía de fluorescencia. Tal como se muestra en la Figura 12, todos los tres fragmentos de MDCK, -1, +1 y +2 (superior izquierda, intermedio y derecha, respectivamente) dieron como resultado fluorescencia de EGFP a la vez que la actividad de la construcción que carece de actividad de promotor mostró solo fluorescencia de fondo (parte inferior izquierda). El fragmento 1-1808 (+1) dio como resultado el nivel máximo de fluorescencia. Se usa un plásmido con un promotor de CMV que dirige la expresión de EGFP como un control positivo (parte inferior derecha).

Las proteínas de replicación de la gripe solo replicarán extremos de ARNv de influenza auténticos. La señal de EGFP de cada uno de los plásmidos que contienen una secuencia de pol I de MDCK indica que los fragmentos de secuencia reguladora canina contenían actividad de promotor que producían un ARN con extremos de ARNv de gripe correctos capaces de soportar la replicación la gripe.

Otros ensayos útiles para identificar y caracterizar las secuencias reguladoras de ARN pol I canina incluyen experimentos de huella de ARN. En dichos procedimientos, las secuencias de ARN que comprenden, *por ejemplo*, la secuencia presentada en las Figuras 9A-C, se ponen en contacto con una o más subunidades de ARN polimerasa I canina. Las una o más subunidades de ARN pol I canina se unen a secuencias de ARN adecuadas de acuerdo con sus afinidades particulares. A continuación, se usa una RNasa, *por ejemplo*, RNasa I, para degradar el ARN no protegido por las una o más subunidades de ARN polimerasa canina. La RNasa se inactiva entonces y los fragmentos de ARN protegidos se aíslan de la protección de una o más subunidades de ARN polimerasa I. Los fragmentos aislados contienen secuencias unidas por las una o más subunidades de ARN polimerasa I y son candidatos excelentes para secuencias que tienen actividad de promotor/potenciador. Además, estos experimentos de impronta pueden llevarse a cabo en presencia de diferentes subunidades de ARN polimerasa I canina para identificar qué subunidades se unen a qué secuencia de ARN. Estos experimentos pueden ayudar a determinar la actividad de las diferentes secuencias unidas, por ejemplo, comparando las secuencias de las diferentes subunidades de polimerasa pol I canina con las subunidades de ARN polimerasa I de otras especies con secuencias y especificidades de unión conocidas.



También pueden usarse técnicas *in vitro* para controlar la transcripción a partir de secuencias reguladoras de pol I caninas putativas. En estas técnicas, se unen operativamente los diferentes mutantes de delección/sustitución descritos anteriormente u otras subsecuencias de SEC ID N°: 1 o 26 a un transcrito de interés. El conjunto de proteínas de ARN polimerasa I canina necesarias para la transcripción se añaden entonces a los transcritos. La transcripción eficaz se detecta detectando el transcrito de ARN producido por las proteínas de ARN polimerasa I canina, por ejemplo, mediante transferencia de Northern.

Pueden usarse ensayos similares para identificar otros elementos reguladores de ARN pol I canina, por ejemplo, potenciadores, represores, u otros elementos que afectan a la transcripción por ARN pol I. Generalmente, en dichos ensayos, se comparan los niveles de expresión de construcciones indicadoras que comprenden delecciones, sustituciones, o subsecuencias de SEC ID N°: 1 con los niveles de expresión de un promotor de ARN pol I mínimo identificado tal como se describe anteriormente. Al comparar los niveles de expresión, puede identificarse la presencia de un elemento asociado con la transcripción potenciada o disminuida.

7.12 Ejemplo 12: Rescate de virus de gripe en células MDCK

Este ejemplo describe el uso de los elementos reguladores de ARN pol I canina clonados en el Ejemplo 10 para rescatar el virus de la gripe en cultivo de células MDCK.

Se construyeron ocho vectores de expresión que codificaban ARN genómicos virales bajo el control del promotor de ARN pol I canina usando técnicas convencionales de biología molecular. En particular, se construyó el vector de expresión de plásmido pAD4000 (SEC ID N°: 29, Figura 14) a partir de un vector pAD3000 (Hoffmann et al., PNAS (2002), 99(17): 11411-11416, Figura 10) reemplazando las secuencias promotoras de pol I humana de 213 pb en pAD3000 con un fragmento de 469 pb (bases 1-469 de pAD4000) a partir del subclon *EcoRI-BamHI* de MDCK (bases 1808-130 de SEC ID N°: 1). Nota: el fragmento de 469 pb en la Figura 12 se muestra como bases 1-469, pero en orientación de complemento inverso. El fragmento de MDCK de 469 pb contiene un promotor funcional de pol I canina. Además, la secuencia enlazadora de 18 pb en pAD3000 AGGAGACGGTACCGTCTC (SEC ID N°: 30) se reemplazó con la secuencia enlazadora de 24 pb AGAGTCTTCTCGAGTAGAAGACCG (SEC ID N°: 31) en pAD4000.

Ocho segmentos de gripe que codifican el genoma de MDV B, dos de los cuales (el NS, SEC ID N°: 32 y PB1, SEC ID N°: 40) contenían mutaciones silentes (SEC ID N°: 33 y 41, respectivamente, y la Figura 16) se clonaron en ocho vectores de expresión de pAD4000 separados (bajo el control de un promotor de pol I canina funcional). Los ocho vectores de expresión se electroporaron entonces en células MOCK en medio sin suero Opti-MEM® I (Invitrogen) y se usaron los sobrenadantes de las células para inocular huevos. Después de 72 horas de incubación a 33 °C se recogió el virus de los huevos positivos a HA. Se llevaron a cabo reacciones RT-PCR (véase, secuencias de cebadores (SEC ID N°: 34-39) y posiciones de hibridación en las Figuras 14 y 15) en ARN extraído del virus seguido de análisis de secuencia de nucleótidos de los productos de la PCR. Basándose en la presencia de los segmentos PB1 y NS que contenían las mutaciones silentes, se determinó que se habían rescatado virus de la gripe infecciosos en células MDCK.

Sorprendentemente, se encontraron títulos elevados de virus rescatados (tanto de MDV-B como de MDV-Bm [MDV-B con mutaciones silentes]) en los sobrenadantes. Véase, Tabla 6. Por ejemplo, se midieron 4-5 log<sub>10</sub> UFP/ml de virus en el día 3. Típicamente, los títulos de virus rescatados usando sistemas de promotor de pol I humana basados en células Vero son de solo ≤ 100 ufp en los días 2 a 3. Por consiguiente, el sistema de rescate de plásmido de pol I canina descrito en el presente documento parece mucho más eficaz que la tecnología de rescate de plásmido descrita por otros.

Tabla 6

	Título de HAI UFP/ml	
	MDV-B	MDV-Bm
Día 2	1,48E+03	2,22E+02
Día 3	6,60E+05	9,80E+04
Día 4	2,28E+07	5,20E+06
Día 5	1,90E+07	1,80E+07
Día 6	3,60E+06	3,20E+06
Día 7	2,62E+06	2,96E+06

La robustez del sistema de rescate de plásmido de pol I canina se demostró mediante el rescate de un virus donante maestro (MDV) ca tanto de una cepa B como de una cepa A, así como numerosos reorganizados de cepa A y B. Para los reorganizados, se combinaron los seis segmentos génicos internos del MDV adecuado (cepa A o B) con los

5 segmentos de HA y NA de una cepa A de los siguientes subtipos: H1N1, H2N2, H3N2, H5N1 o una cepa B de los  
 linajes Yamagata o B/Victoria. Las cepas y reorganizados de MDV rescatados se resumen en la Tabla 7. Estos virus  
 se rescataron esencialmente tal como se describe anteriormente. Los segmentos de gripe que codifican los  
 genomas de la cepa A o B se clonaron en vectores de expresión pAD4000 separados (que comprendían el promotor  
 de pol I canina funcional descrito anteriormente). Los ocho vectores de expresión que codificaban todos los ocho  
 10 segmentos de la gripe que se iban a rescatar se transfectaron en células MDCK en medio sin suero Opti-MEM® I  
 (Invitrogen) y se usaron los sobrenadantes de las células para inocular huevos. En estos experimentos, la  
 transfección se llevó a cabo usando un reactivo de transfección no liposomal (PromoFectin, Nº de Cat. PK-CT-2000,  
 PromoKine, Alemania), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Después de 72 horas de  
 incubación a 33 °C se recogió el virus de los huevos positivos a HA.

Tabla 7

Cepas A	Cepas B
H1N1 ca A Nueva Caledonia/20/1999	ca B Malasia/2506/2004 ca B Florida/07/2004
H2N2 MDV A (A/Ann Arbor/6/1960)	ca B Jiangsu/10/2003 ca B Hong Kong/330/2001
H3N2 ca A Wisconsin/67/2005 ca A California/7/2004 ca A Panamá/2007/1999	MDV B (B/Ann Arbor/1/1966)
H5N1 ca A Hong Kong/213/2003 ca A Hong Kong/67/1997 (491H5/486N1)	

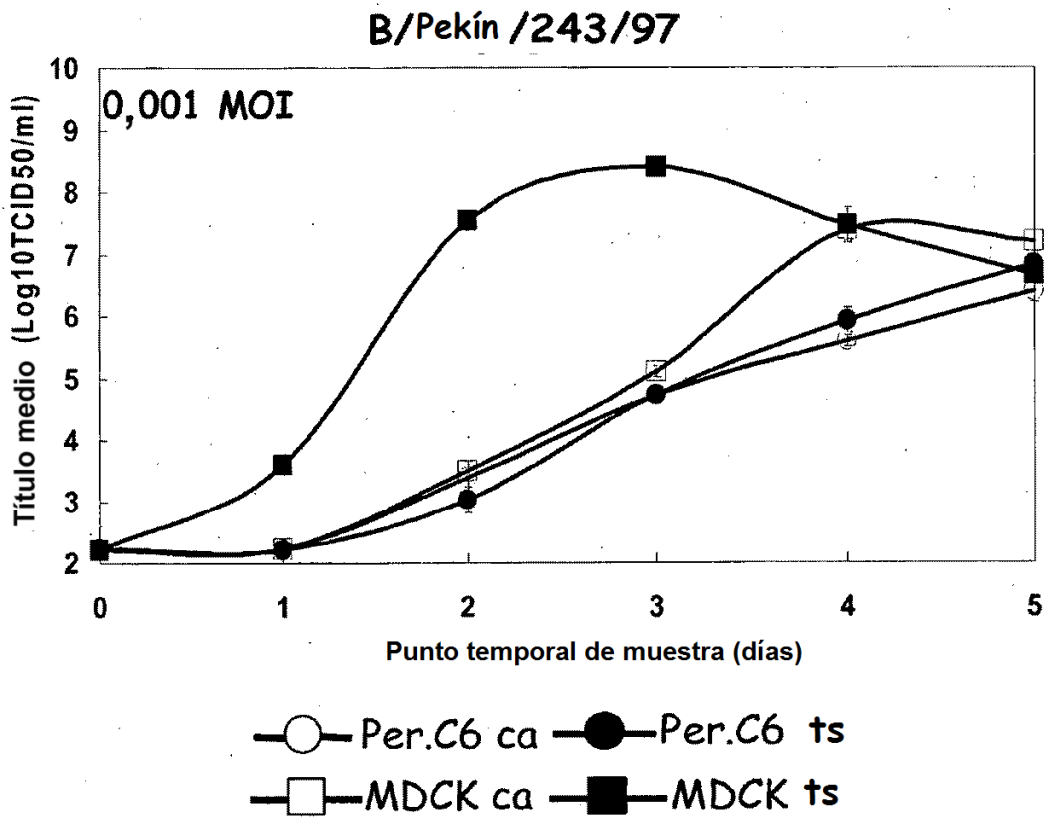
15

**REIVINDICACIONES**

1. Un ácido nucleico aislado que comprende un promotor de ARN polimerasa I canina, en el que el ácido nucleico comprende
- 5 (a) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 26,  
 (b) un fragmento funcionalmente activo del polinucleótido definido en (a) que comprende al menos 250, o al menos 350, o al menos 450 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 26, o  
 (c) un polinucleótido que tiene al menos un 99 % de identidad con el polinucleótido definido en (a).
- 10 2. Una secuencia de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1 unida operativamente a ADNc que codifica un ARN genómico viral de cadena negativa o el ARNc correspondiente.
- 15 3. Un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el ARN genómico viral de hebra negativa es un ARN genómico de la gripe.
4. Un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el ácido nucleico comprende además una secuencia de terminación de la transcripción.
- 20 5. Un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 2, 3, o 4, en el que el ADNc es un ADNc del virus de la gripe seleccionado del grupo que consiste en: ADNc de proteína básica de polimerasa 2 (PB2), ADNc de proteína básica de polimerasa 1 (PB1), ADNc de proteína ácida de polimerasa (PA), ADNc de hemaglutinina (HA), ADNc de nucleoproteína (NP), ADNc de neuraminidasa (NA), ADNc de proteína de matriz 1 (M1), ADNc de proteína de matriz 2 (M2), ADNc de proteína no estructural 1 (NS1) y de proteína no estructural 2 (NS2).
- 25 6. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 30 7. Un método para producir un virus de la gripe recombinante, que comprende cultivar una célula canina que comprende un vector de expresión de la reivindicación 6 y uno o más vectores de expresión que expresan un ARNm que codifica uno o más polipéptidos de la gripe seleccionados del grupo que consisten en proteína básica de polimerasa 2 (PB2), proteína básica de polimerasa 1 (PB1), proteína ácida de polimerasa (PA), hemaglutinina (HA), nucleoproteína (NP), neuraminidasa (NA), proteína de matriz 1 (M1), proteína de matriz 2 (M2), proteína no estructural 1 (NS1), y proteína no estructural 2 (NS2), en el que al menos ocho vectores de expresión, incorporando  
 35 cada uno un segmento diferente del genoma de la gripe, se usan para introducir un genoma de la gripe completo en la célula canina; y aislar el virus de la gripe recombinante.
8. Una célula que comprende un vector de expresión de la realización 6.
- 40 9. Un método para producir un ARN genómico de la gripe, que comprende introducir el vector de expresión de la realización 6 en células caninas, produciendo de este modo un ARN genómico de la gripe.
10. Un método para producir un virus de la gripe recombinante, que comprende
- 45 i) introducir en una población de células caninas vectores de expresión
- a) expresar en dichas células segmentos de ARNv genómico para proporcionar los segmentos completos de ARNv de dicho virus, en el que uno o más de dichos vectores de expresión comprenden un ácido nucleico promotor de la ARN polimerasa I canina de acuerdo con la reivindicación 1, y  
 50 b) también en dichas células ARNm que codifica uno o más polipéptidos de la gripe seleccionados del grupo que consiste en: proteína básica de polimerasa 2 (PB2), proteína básica de polimerasa 1 (PB1), proteína ácida de polimerasa (PA), hemaglutinina (HA), nucleoproteína (NP), neuraminidasa (NA), proteína de matriz 1 (M1), proteína de matriz 2 (M2), proteína no estructural 1 (NS1), y proteína no estructural 2 (NS2); y
- 55 ii) cultivar dichas células produciéndose de este modo partículas virales de la gripe.
11. Un método de la reivindicación 9 o 10, en el que las células caninas son células de riñón.
12. Un método de la reivindicación 10 u 11, en el que el virus de la gripe recombinante es un virus reorganizado.
- 60 13. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que las partículas de la gripe producidas son infecciosas.
14. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el ARNm codifica la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) de una cepa de gripe patogénica.
- 65

## ES 2 539 514 T3

15. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que el ARNm codifica la proteína básica de polimerasa 2 (PB2), proteína básica de polimerasa 1 (PB1), proteína ácida de polimerasa (PA), hemaglutinina (RA), nucleoproteína (NP), neuraminidasa (NA), proteína de matriz 1 (M1), proteína de matriz 2 (M2), proteína no estructural 1 (NS1) y proteína no estructural 2 (NS2) de una cepa de gripe atenuada.
- 5
16. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que el virus recombinante se selecciona del grupo que consiste en: un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe sensible a la temperatura, y un virus de la gripe atenuado, sensible a la temperatura y adaptado al frío.
- 10
17. Un método de la reivindicación 16, en el que la cepa de gripe atenuada se selecciona del grupo que consiste en A/Ann Arbor/6/60, B/Ann Arbor/1/66, B/Leningrado/14/17/55, B14/5/1, B/USSR/60/69, B/Leningrado/179/86, B/Leningrado/14/55, B/Inglaterra/2608/76, y A/Puerto Rico/8/34.
- 15
18. El vector de expresión pAD4000 expuesto como SEC ID N°: 29.



**Fig. 1**

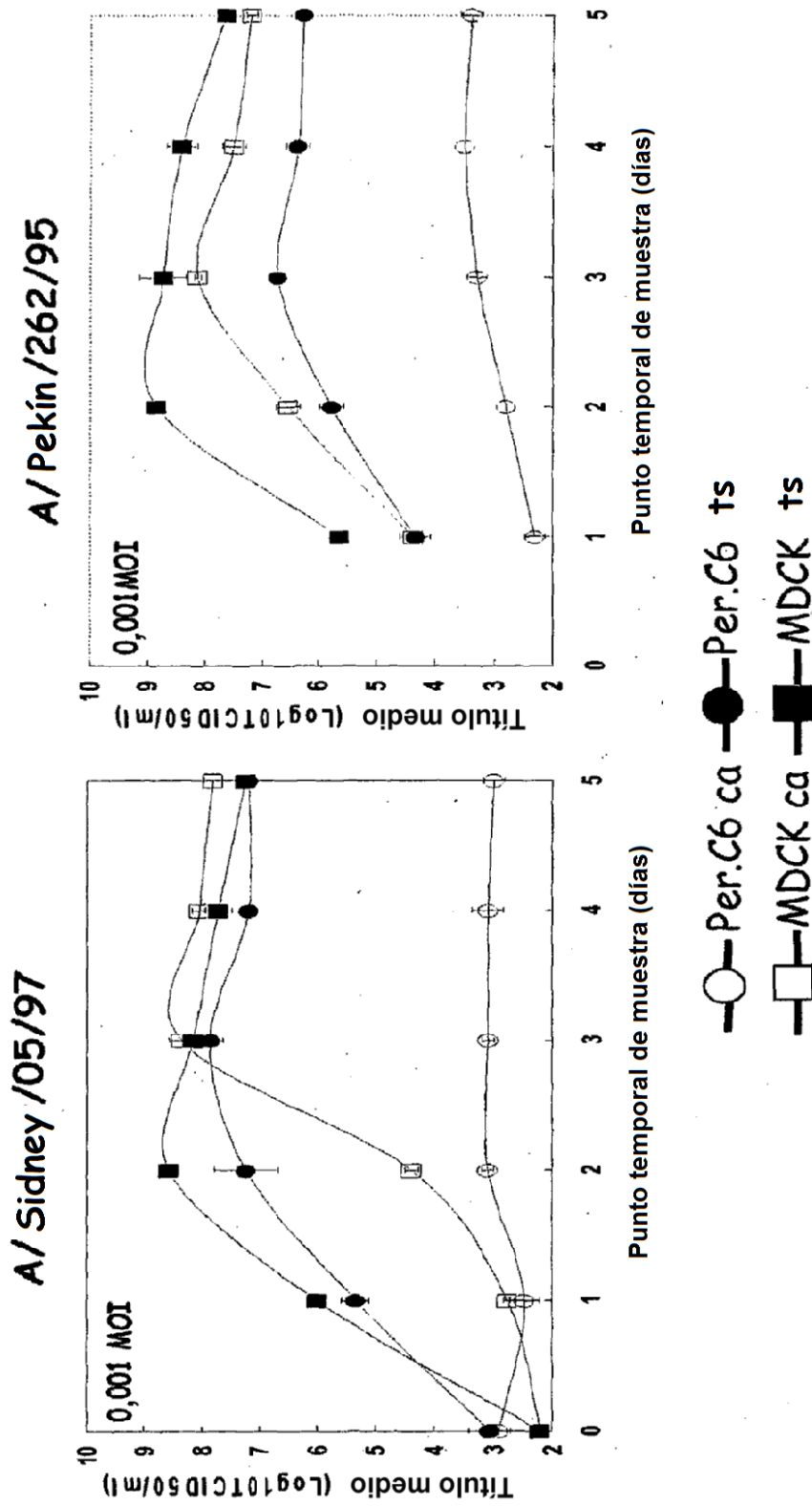
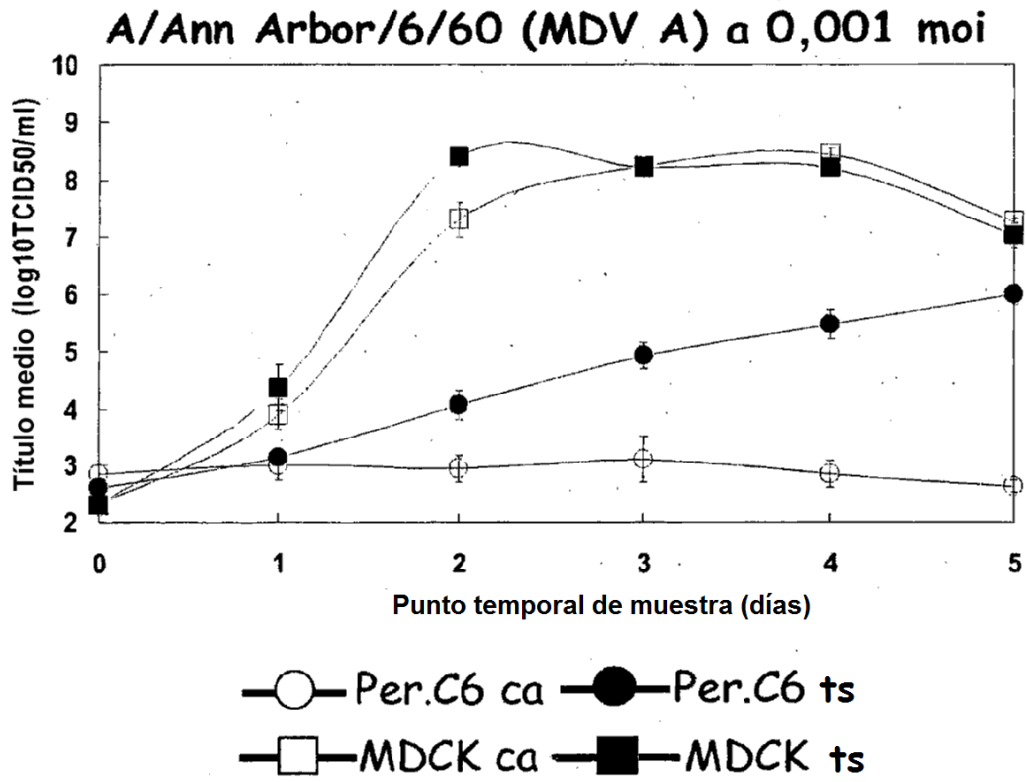


Fig. 2



**Fig. 3**

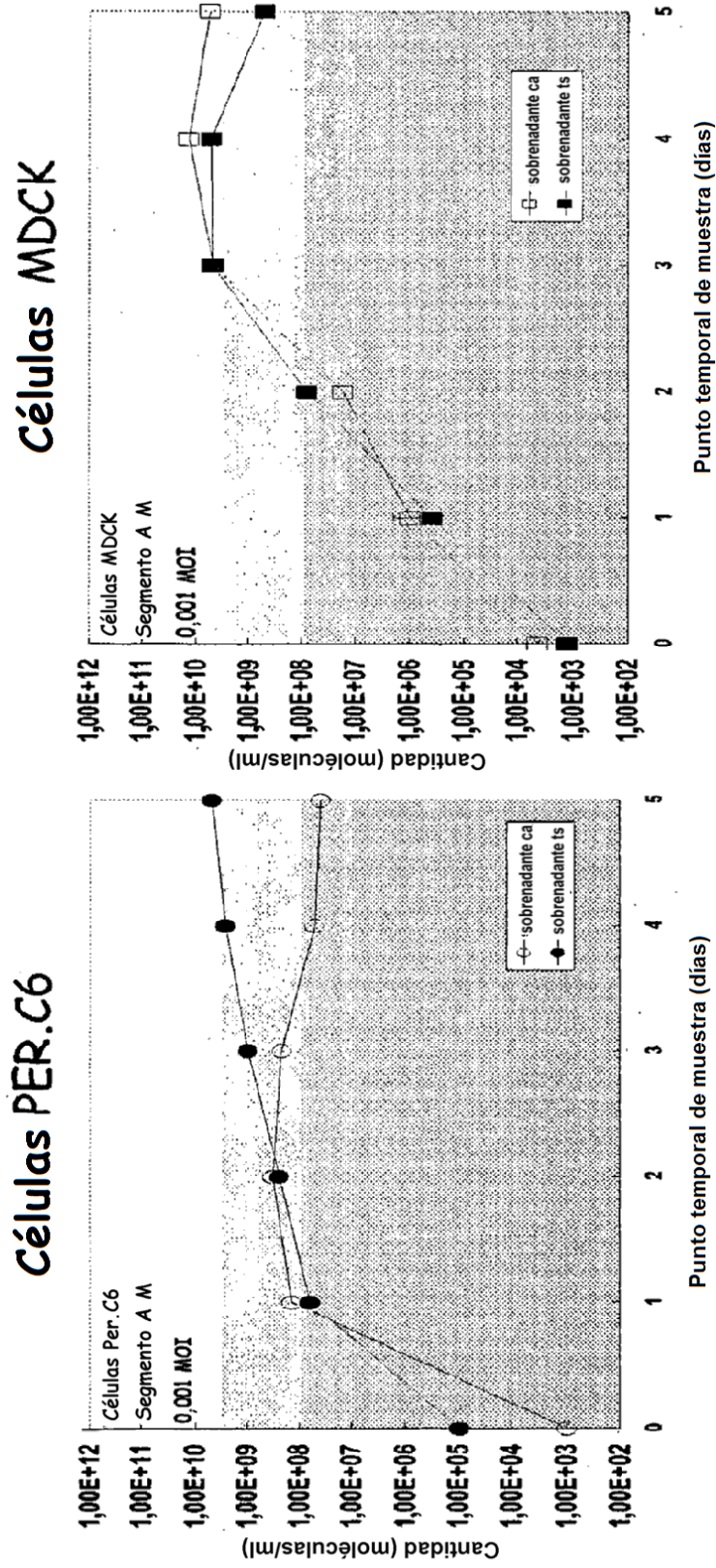
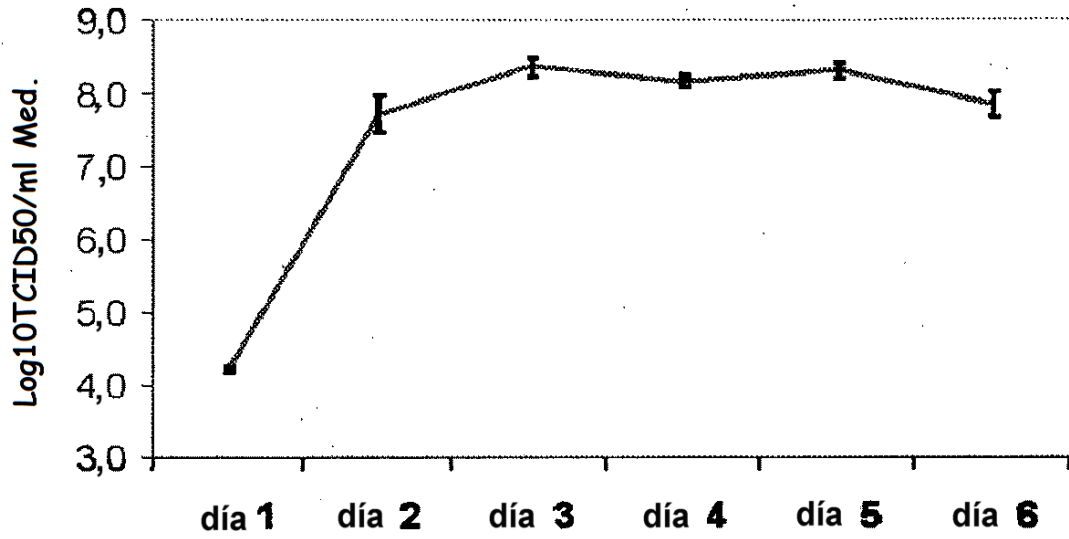


Fig. 4





Replicación de ca A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) en células MDCK

**Fig. 5**

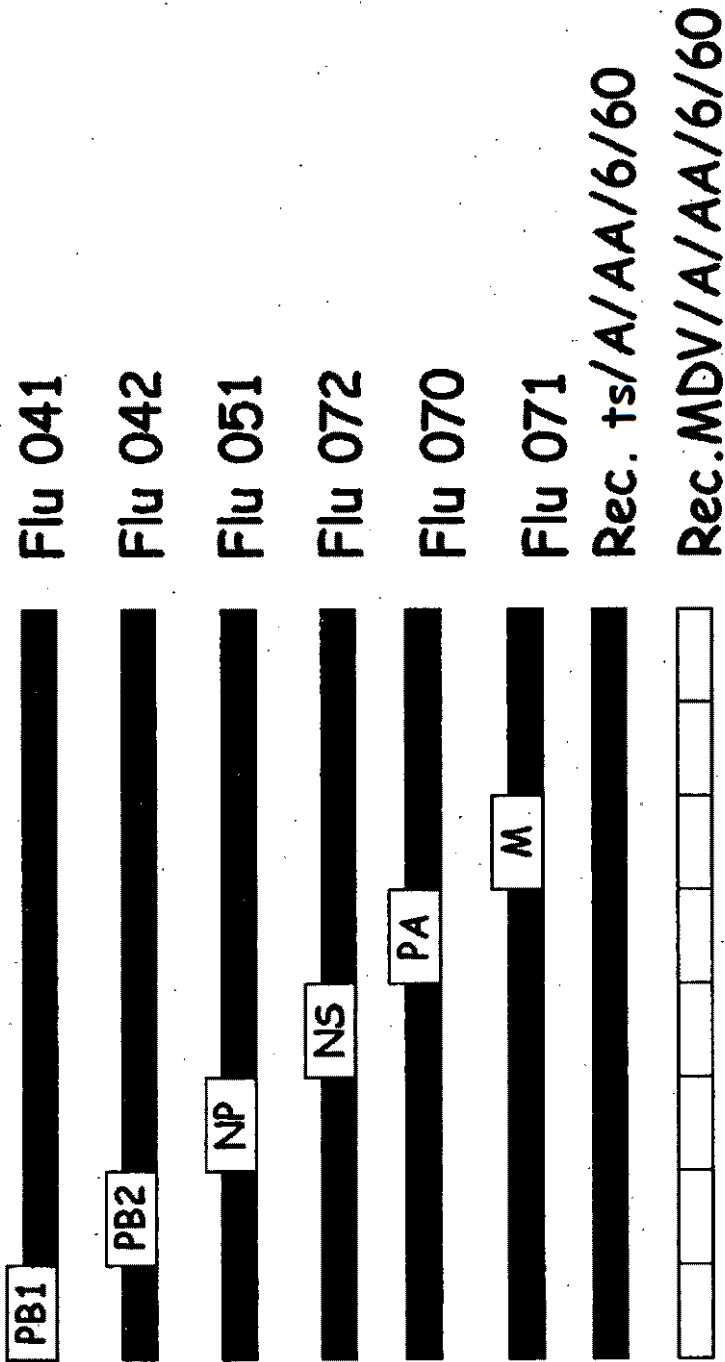


Fig. 6

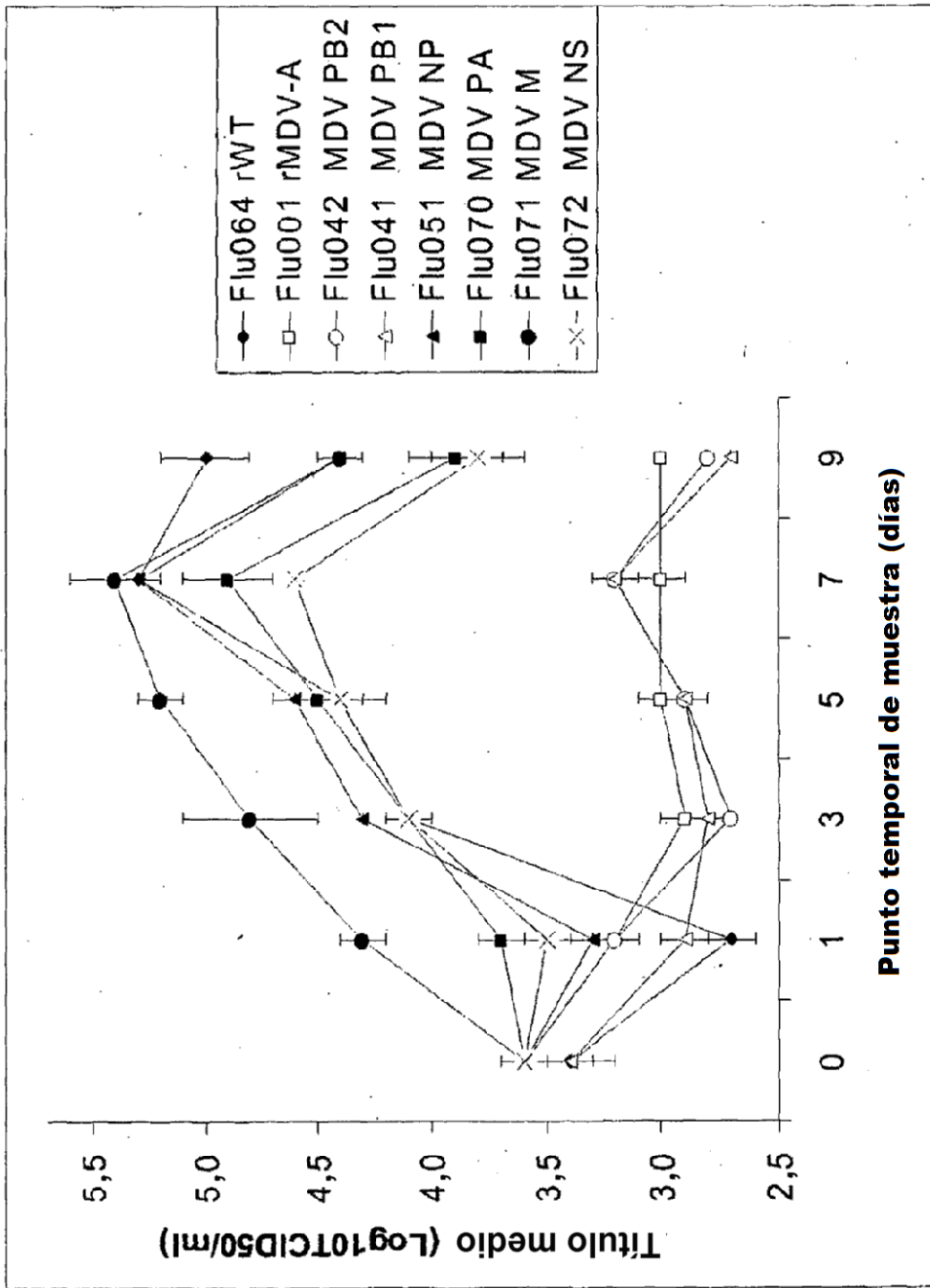


Fig. 7

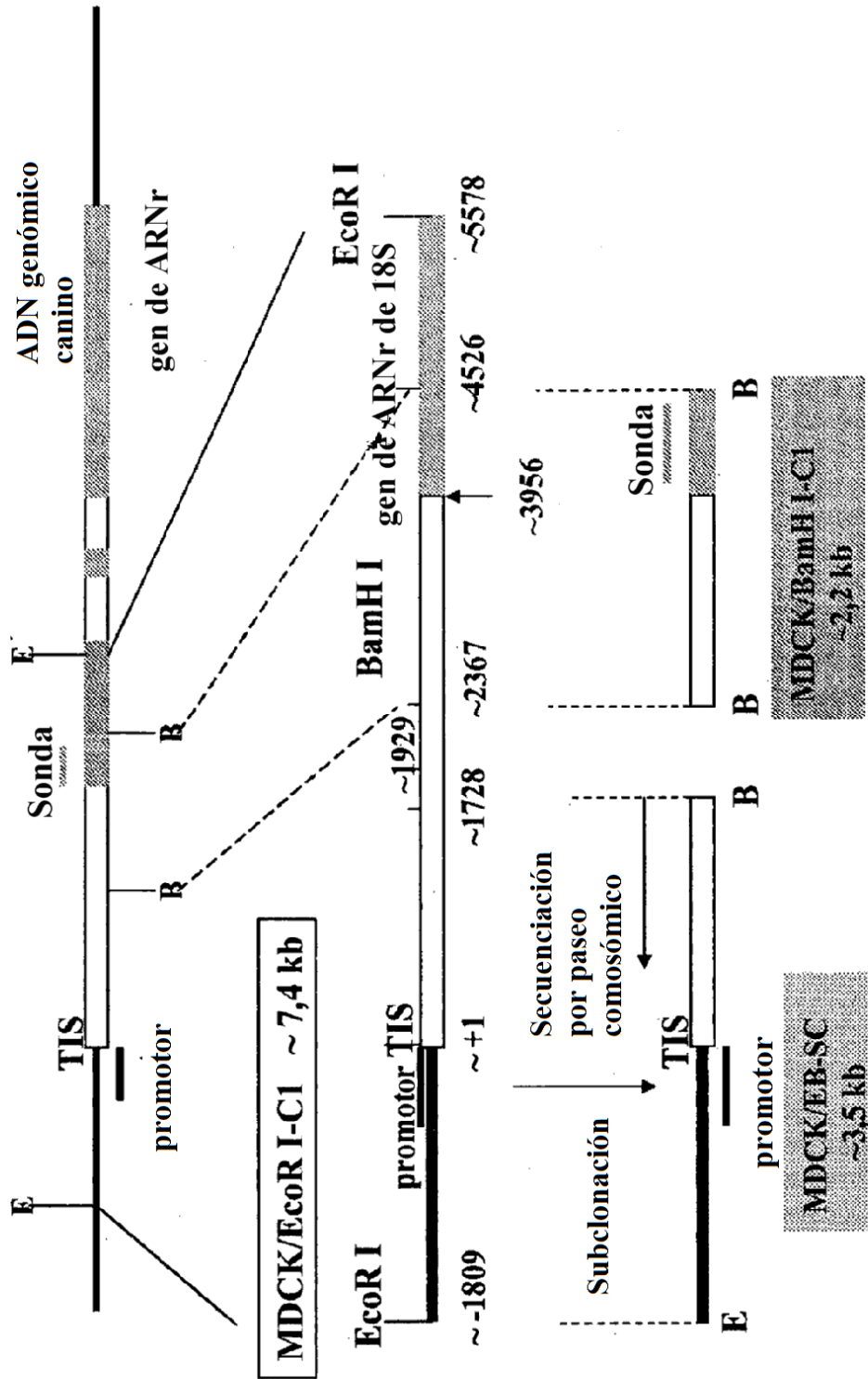


Fig. 8

(SEC ID N°: 1)

aattctggag aacagattg tgttataaga aagaaagaaa gaaagaaaaga aagaagaaaa 60  
gagaaaaatcc ttatgttctt tgagcctccc ctccccccca gaattgagtt cctcttccac 120  
gacctttct cattcaacc aatagacaag tatttggggg ggggggtcag gtcccagacg 180  
ctgagaggtt ggaggtgaag gtgggtcggg gggggggggg cacaccgtcc tctccagcgc 240  
ctttggttca gacctcttc gtgacctccc tccctccctc cctccctcct cctcctcct 300  
cctcctccct ctctgtctta taaatatata aataaaatcc taaagaaaag aaaaagaaaa 360  
aaaaaaaag gaaggacaag agaaaaaacg gtgcatcctg tgccgtcctg agagtccctg 420  
cctggtttcg gctctaegt cctcctctga cctcggaaac gtgacctgagt cgtccccgga 480  
gccccgcgcg gcgagcgcga ccccccttcg ggcggcagcg gcccgggacg gacggacgga 540  
cggacggacg ggttttccaa ggtcccccg cccccggag acgggggttc gcggtgcgcg 600  
gccgtgtct cggggccct ccgcctccc cgggccgaga ggcgagatcc gaggcctg 660  
acggcctgc cggccgata tgtccctg tgctccctg cgtttctcgg gtgccactgg 720  
cggccgttt tatagagct gtccctccg aggtctggcg gcgacaggca aggaacagct 780  
ttggtgtcgg ttccccggg ccgagttcca ggaggagggc ggctccggcg cgagcgtctg 840  
tcgccccggc ctgggcgga tgcgctcgc ggagattgga ctccggagct gcgagggagt 900  
gtcgcctgc cccgtgtcgc ccgtgtcgc tccgcctcgc tccggagga ggcctgctgg 960  
gcccctctgg tgggtcgacc agcaccgcg gtggctctc ctgcccccg cggaccgacc 1020  
tgggcgcctc gggggcgggg gacagggtgt gtcgccctgt cctccctgtg gctccggggc 1080  
atcttcggc ctctctccg tgtcactcgg ttgtctccc tggtcacgcc ctggcgacgg 1140  
ggaccgtct gacctggag gggaaagccc tgggtggcg gacagaccg gctgccccga 1200

**Fig. 9A**

(SEC ID N°: 1 continuación)

cgtgtggggg tcccgggcgt cggacgcgat ttctcccct ttttccgagg cccgctgcgg 1260  
 aggtgggtcc cgggcggtcg gaccgggtgc caccgggggg tggcgggcc gtcggttcgg 1320  
 gegtccggcc ccggtggcga ttcccgggtga ggtgcctct gccgcgctg gccctccacc 1380  
 tcccctggcc cgagccgggg ttggggacgg cgttaggcac gggcggtcc tgaggggccg 1440  
 gggggacggc ctccgcacgg tgcctgcctc cggagaactt tgatgattt tcaaatctc 1500  
 ctcccggaga tcactggctt ggcggcgtgg cggcgtggcg gcgtggcggc gtggcgggcgt 1560  
 gggggcgtgg cgtctccacc gaccgcgtat cgcctctct cccctcccc ccccccccc 1620  
 ttcctgggt cgaccagata gccctggggg ctccgtgggg tgggggtggg gggggcgcgt 1680  
 ggggcaggtt ttggggacag ttggccgtgt caccgtcccc gtaggtcgcg gtgacctgtg 1740  
 gctgggtccc gccggcaggc gcggttattt tcttgcccga gatgaacatt tttgttgcc 1800  
 aggtaggtgc tgacacgttg tgtttcggcg acaggcagac agacgacagg cagacgtaaa 1860  
 agacagccgg tccgtccgtc gctcgcctta gagatgtgg cctctggcg cgggtgggggt 1920  
 tccgggcttg accgcgcgcg cgagccggtc cctgtcctcg ctgcctggag cctgagccgt 1980  
 ccgcctgggc ctgcgcgcg gctctcgtgc tggactccag gtggcccggg tcgcggtgtc 2040  
 gccctcgggt ctccggcacc cgaggggagg cgtgtggtggc aggtggcgggt gggctcttta 2100  
 ccccctggc ctccatgccc tgggcacccc gccgttgccc gtgacaaccc ctgtctcgca 2160  
 aggtcctcgt ccgctgtca ggcgtcccc cctgtgtctg ggttctccg gtcgctcctg 2220  
 cccccccc cccgggggtc gaggggcttg ccgtgagcc ggaagcaggt cccccggtc 2280  
 gccgtcctcg ctgggctttt gctcctcggg aagccccctc ggggcgcag ctgtctgcc 2340  
 atcgatcgat gtggtgatct cgtgctctcc tgggcggggc ctaagcccg tcagacgagg 2400  
 gacgggcgtc caccggcggat gcgaccgctc ttctgttct gcccggggc cctccctcc 2460

Fig. 9B

(SEC ID N°: 1 continuación)

cggctcctc cgcgccggc cgtcgtggcg ggtgcgcggg gggcgcgcg cggggttggg 2520  
 ggtggtgcg actccggccc gacccggcc tcccgcttc ttgcctcgcg gcgctggcgg 2580  
 gaccggggtc ctcggaacg gcgacactc tcgcccgcct ttcccgaagg ccctgggtcc 2640  
 gtggcgagcg gccctcccc cctccgcggg ggaggggcgg ccgacgccc cgctgctcac 2700  
 cgcccggcct gggcgcgctt gagcggttg cgcccggccc tccgtggtgc ccctggagcg 2760  
 ctccaggteg cctcaggtgc ctgaggccga gcggtggcgt cgttctcttc cccggcgact 2820  
 cccctcgggc tgcgcccgc gtcgtcgcg tgtccgagga gcgggtggtg gaagaagtgc 2880  
 gcaagggagg cgcaccggtg cccctggcg gggcgcgggc gcctcgtctt ccttccccctc 2940  
 tctctcctc cccctcggc gcggcgcggg ggggtgggtg cgtggggcgg tgtgactcgg 3000  
 aggacttggc ggggctcgtg aggcggcggc gggcgggccc acgcccggc gcttgccagc 3060  
 cgaggggctg cccctctctc cggcacgggt cgtgtcccc cctccgtccc tctctctcgc 3120  
 gctcgcggga ggcggggagc tctctctct gggcggtgac gtgaccacgc cgtgcgcggg 3180  
 cgaggggggg gtggcgtcct cgagggggca ccggcccgga gcgctcgggg ttgccctgtg 3240  
 cctgtccctt gccggagatc cgccccccgc cccgcgagcc tgtcggcccc ggagcgccgc 3300  
 ctggtggggc ccgtttgga ggacgaacgg gtggggcgat gcgccctcgg tgagaaagcc 3360  
 ttctctagcg atccgagagg gtgccttggg gtaccggagc ccccgccgc tgccccctct 3420  
 ctgcgcgtgt agtgtggcca gcgacgcggg gttggactcc cgtcgcgacg tgtttgggca 3480  
 gagtgcgct ctttgcctac ctaccgcgc tgcgtcccc cctccgagac ggggggag 3537

**Fig. 9C**

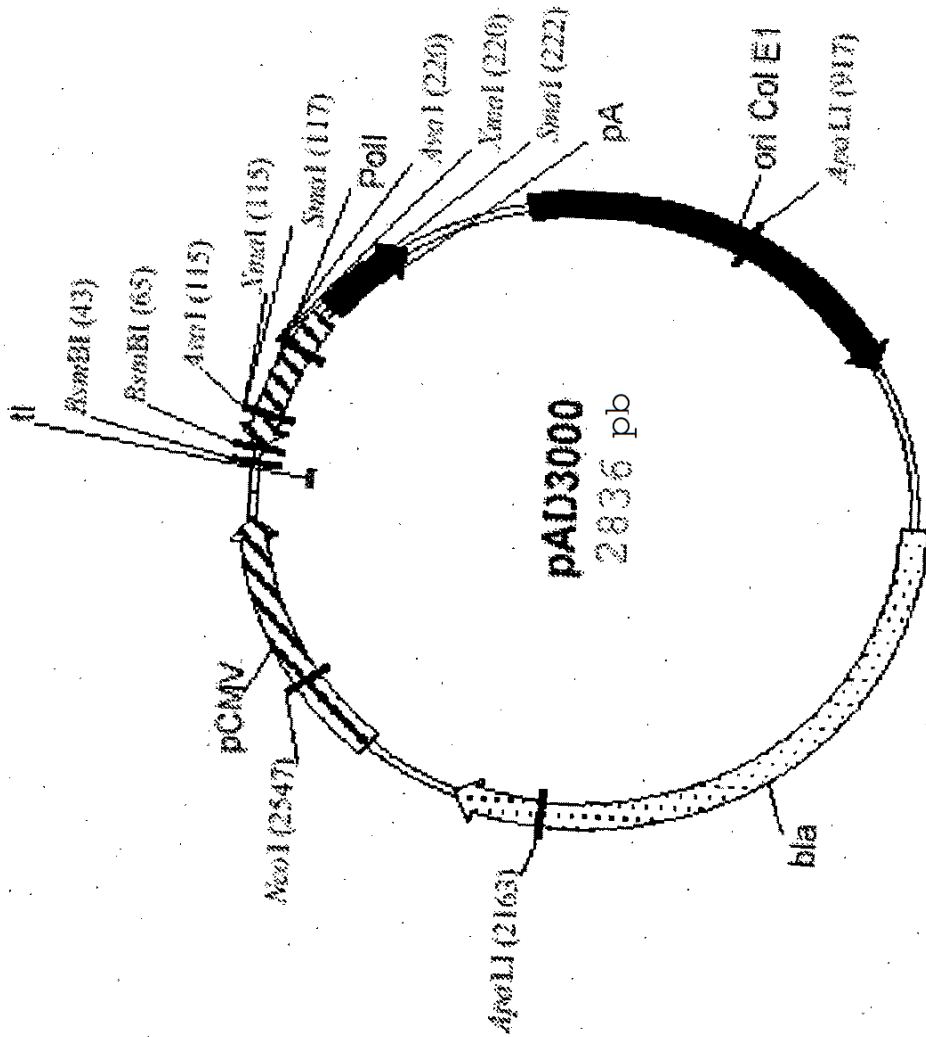
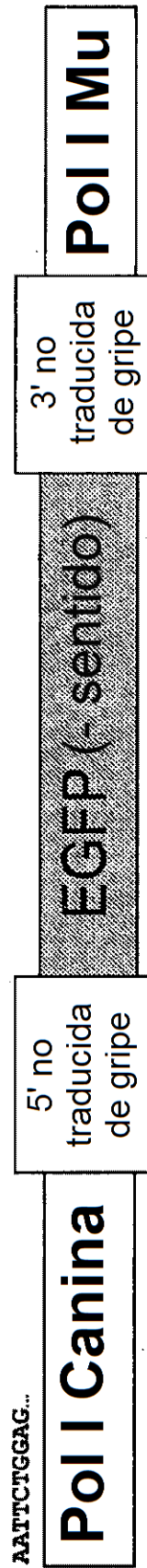


Fig. 10



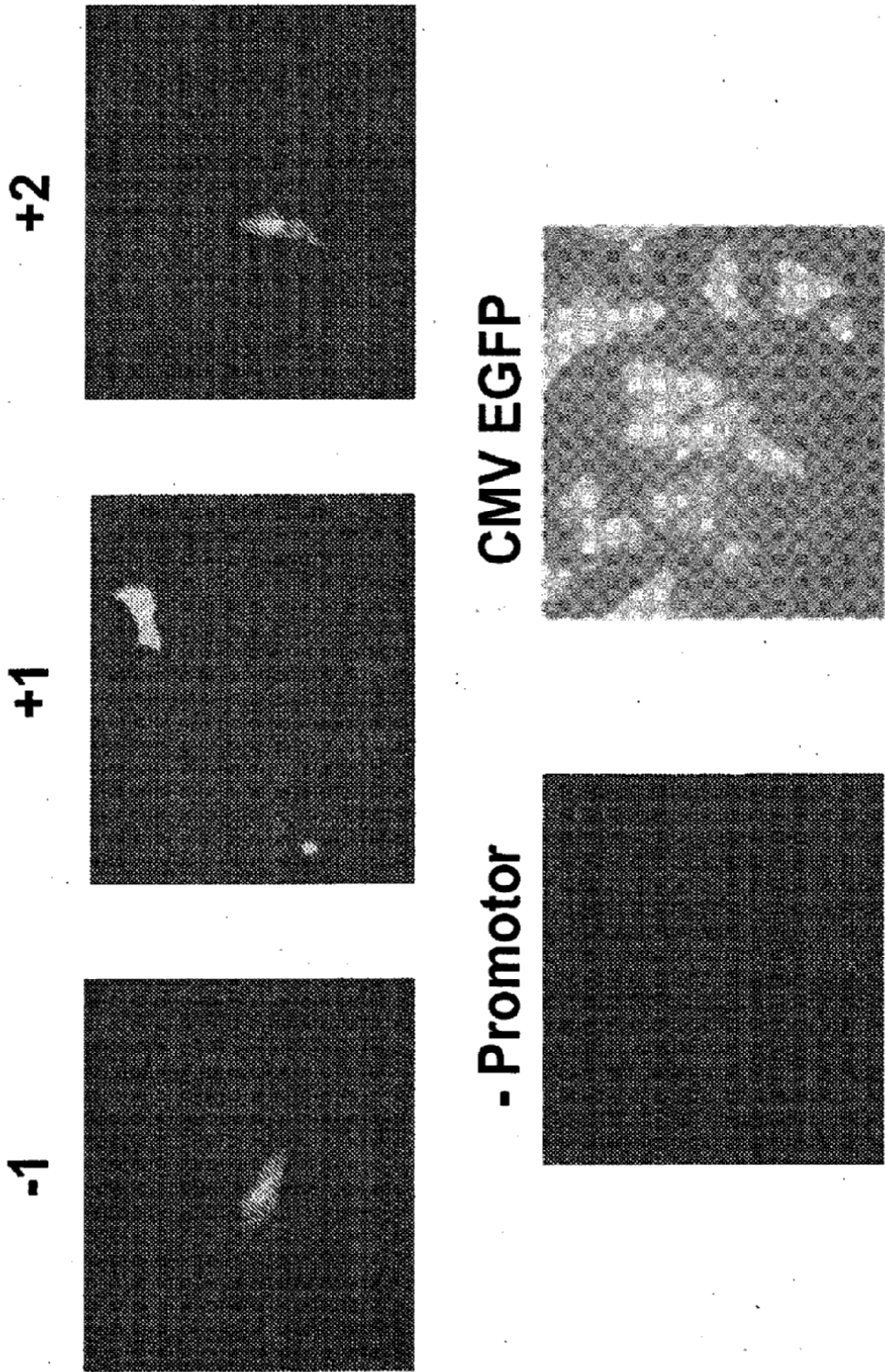


**1-1807**

**1-1808, o**

**1-1809**

**Fig. 11**



**Fig. 12**

**vector pAD4000**

(SEC ID N°: 29)

```

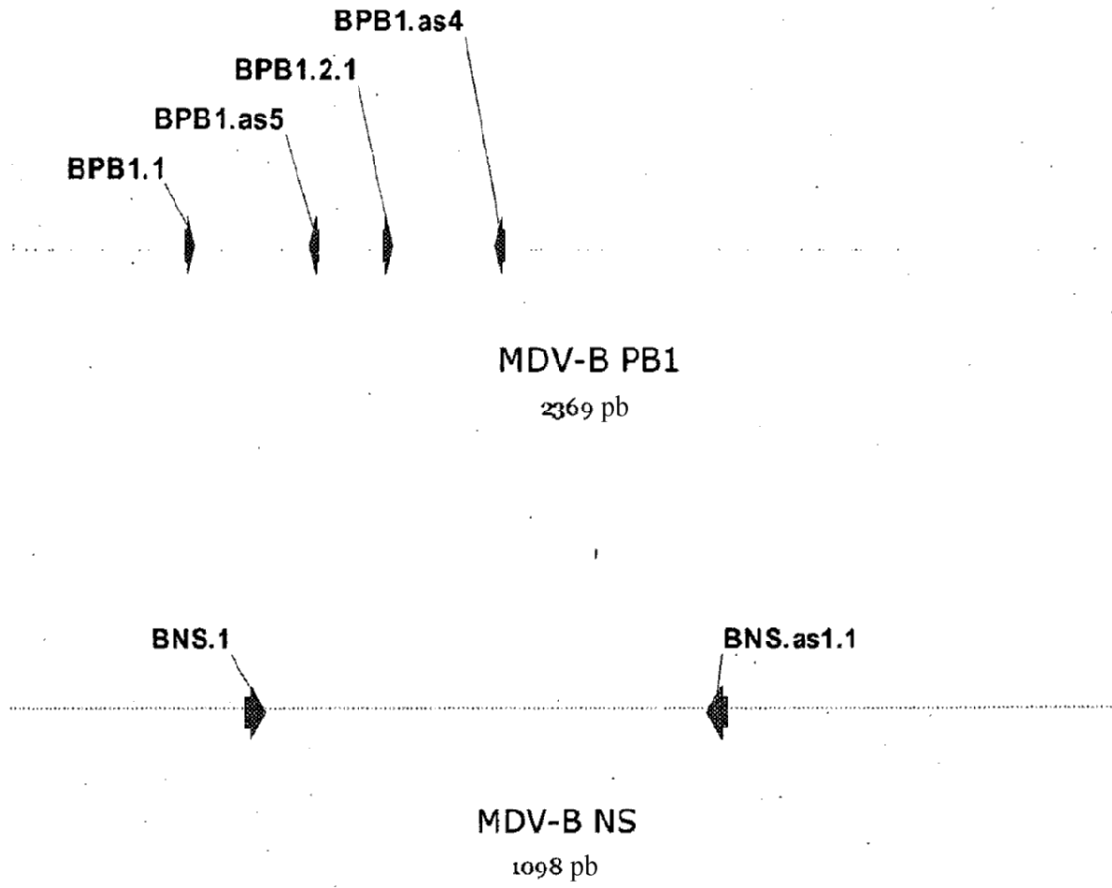
1   ACCTA CCTGG CAACA AAAAA TGTTT ATCTC GGGCA AGAAA ATAAC CGCGC
51  CTGCC GCGCG GGACC AGCCA CAGGT CACCG CGACC TCCCG GGACC GTGAC
101 ACGGC CAACT GTCCC CAAAA CCTGC CCCAC GCGCG CCCCC CACCC CCACC
151 CCACG GAGCC CCCAG GGCTA TCTGG TCGAC CCAGG GAACG GGGGG GGGGG
201 GGGAG GGGAG GAGGG GCGAT ACGCG GTCGG TGGAG ACGCC ACGCC GCCAC
251 GCCGC CACGC CGCCA CGCCG CCACG CCGCC ACGCC GCCAA GCCAG TGATC
301 TCCGG GAGGA GACTT TGAAA AATCA TCAAA GTTCT CCGGA GGCAG GCACC
351 GTGCG GAGGC CGTCC CCCGC GGCCC TCAGG ACCGC CCCGT GCCTA CCGCC
401 GTCCC CAACC CCGGC TCGGG CCAGG GGAGG TGGAG GGCCA CGCGC GGCAG
451 AGGCA GCCTC ACCGG GAATA TCGGG CCCGT CACCT CAGAC ATGAT AAGAT
501 ACATT GATGA GTTTG GACAA ACCAC AACTA GAATG CAGTG AAAAA AATGC
551 TTTAT TTGTG AAATT TGTGA TGCTA TTGCT TTATT TGTA CCATT ATAAG
601 CTGCA ATAAA CAAGG ATCTG CATTG ATGAA TCGGC CAACC CCGGG GGAGA
651 GCGCG TTTGC GTATT GGGCG CTCTT CCGCT TCCTC GCTCA CTGAC TCGCT
701 GCGCT CGGTC GTTCG GCTGC GGCGA GCGGT ATCAG CTCAC TCAAA GCGCG
751 TAATA CGGTT ATCCA CAGAA TCAGG GGATA ACGCA GGAAA GAACA TGTGA
801 GCAAA AGGCC AGCAA AAGGC CAGGA ACCGT AAAAA GGCCG CGTTG CTGGC
851 GTTTT TCCAT AGGCT CCGCC CCCCT GACGA GCATC ACAA AATCG ACGCT
901 CAAGT CAGAG GTGGC GAAAC CCGAC AGGAC TATAA AGATA CCAGG CGTTT
951 CCCCC TGGAA GCTCC CTCGT GCGCT CTCTT GTTCC GACCC TGCCG CTTAC
1001 CGGAT ACCTG TCCGC CTTTC TCCCT TCGGG AAGCG TGGCG CTTTC TCAAT
1051 GCTCA CGCTG TAGGT ATCTC AGTTC GGTGT AGGTC GTTCG CTCCA AGCTG
1101 GGCTG TGTGC ACGAA CCCCC CGTTC AGCCC GACCG TCGCG CCTTA TCCGG
1151 TAACT ATCGT CTGTA GTCCA ACCCG GTAAG ACACG ACTTA TCGCC ACTGG
1201 CAGCA GCCAC TGGTA ACAGG ATTAG CAGAG CGAGG TATGT AGGCG GTGCT
1251 ACAGA GTTCT TGAAG TGGTG GCCTA ACTAC GGCTA CACTA GAAGG ACAGT
1301 ATTTG GTATC TGCGC TCTGC TGAAG CCAGT TACCT TCGGA AAAAG AGTTG
1351 GTAGC TCTTG ATCCG GCAAA CAAAC CACCG CTGGT AGCGG TGTTT TTTTT
1401 GTTTG CAAGC AGCAG ATTAC GCGCA GAAAA AAAGG ATCTC AAGAA GATCC
1451 TTTGA TCTTT TCTAC GGGGT CTGAC GCTCA GTGGA ACGAA AACTC ACGTT
1501 AAGGG ATTTT GGTC A TGAGA TTATC AAAAA GGATC TTCAC CTAGA TCCTT
1551 TTAAA TTAAA AATGA AGTTT TAAAT CAATC TAAAG TATAT ATGAG TAAAC
1601 TTGGT CTGAC AGTTA CCAAT GCTTA ATCAG TGAGG CACCT ATCTC AGCGA
1651 TCTGT CTATT TCGTT CATCC ATAGT TGCCT GACTC CCCGT CGTGT AGATA
1701 ACTAC GATAC GGGAG GGCTT ACCAT CTGGC CCCAG TGCTG CAATG ATACC
1751 GCGAG ACCCA CGCTC ACCGG CTCCA GATTT ATCAG CAATA AACCA GCCAG
1801 CCGGA AGGGC CGAGC GCAGA AGTGG TCCGT CAACT TTATC CGCCT CCATC
1851 CAGTC TATTA ATTGT TGCCG GGAAG CTAGA GTAAG TAGTT CGCCA GTTAA
1901 TAGTT TGCGC AACGT TGTTG CCATT GCTAC AGGCA TCGTG GTGTC ACGCT
1951 CGTCG TTTGG TATGG CTTCA TTCAG CTCCG GTTCC CAACG ATCAA GGCGA
2001 GTTAC ATGAT CCCCC ATGTT GTGCA AAAAA GCGGT TAGCT CCTTC GTTCC
2051 TCCGA TCGTT GTCAG AAGTA AGTTG GCCGC AGTGT TATCA CTCAT GGTTA
2101 TGGCA GCACT GCATA ATCTT CTTAC TGTC A TGCCA TCCGT AAGAT GCTTT
2151 TCTGT GACTG GTGAG TACTC AACCA AGTCA TTCTG AGAAT AGTGT ATGCG
2201 GCGAC CGAGT TGCTC TTGCC CGGCG TCAAT ACGGG ATAAT ACCCG GCCAC

```

**Fig. 13A**

2251 ATAGC AGAAC TTTAA AAGTG CTCAT CATTG GAAAA CGTTC TTCGG GCGGA  
 2301 AAACCT CTCAA GGATC TTACC GCTGT TGAGA TCCAG TTCGA TGTAAT CCCAC  
 2351 TCGTG CACCC AACTG ATCTT CAGCA TCTTT TACTT TCACC AGCGT TTCTG  
 2401 GGTGA GCAAA AACAG GAAGG CAAAA TGCCG CAAAA AAGGG AATAA GGGCG  
 2451 ACACG GAAAT GTTGA ATACT CATA CATT CTTTT TCAAT ATTAT TGAAG  
 2501 CATT ATCAG GGTTA TTGTC TCATG AGCGG ATACA TATT GAATG TATTT  
 2551 AGAAA AATAA ACAA TAGGG GTTCC GCGCA CATT CCCC AAAAG TGCCA  
 2601 CCTGA CGTCG ATATG CCAAG TACGC CCCCT ATTGA CGTCA ATGAC GGTA  
 2651 ATGGC CCGCC TGGCA TTATG CCCAG TACAT GACCT TATGG GACTT TCCTA  
 2701 CTTGG CAGTA CATCT ACGTA TTAGT CATCG CTATT ACCAT GGTGA TGCGG  
 2751 TTTTG GCAGT ACATC AATGG GCGTG GATAG CGGTT TGACT CACGG GGATT  
 2801 TCCAA GTCTC CACCC CATTG ACGTC AATGG GAGTT TGTTT TGGCA CCAA  
 2851 ATCAA CGGGA CTTTC CAAAA TGTCG TAACA ACTCC GCCCC ATTGA CGCAA  
 2901 ATGGG CGGTA GCGGT GTACG GTGGG AGGTC TATAT AAGCA GAGCT CTCTG  
 2951 GCTAA CTAGA GAACC CACTG CTTAC TGGCT TATCG AAATT AATAC GACTC  
 3001 ACTAT AGGGA GACCC AAGCT GTTAA CGCTA GCTAG CAGTT AACCG GAGTA  
 3051 CTGGT CGACC TCCGA AGTTG GGGGG GAGAG TCTTC TCGAG TAGAA GACCG  
 3101

**Fig. 13B**



**Fig. 14**

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Posición</b>	
BPB1.1	GGCACTAATGGTCACAACCTG	357-346	(SEC ID N° : 34)
BPB1.2.1	ATCAGAGGGTTTGTATTAGTAG	763-784	(SEC ID N° : 35)
BPB1.as4	TGGGCTGTCTCTGGTTATTC	992-1011	(SEC ID N° : 36)
BPB1.as5	TCTCTTTATGAGGAAACCCT	611-630	(SEC ID N° : 37)

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Posición</b>	
BNS.1	GTGAGCCTGAAAGTAAAAGG	238-257	(SEC ID N° : 38)
BNS.as1.1	GCAACAAGTTTAGCAACAAG	696-715	(SEC ID N° : 39)

**Fig. 15**

360 429  
MDV-B NS (SEC ID N° :32)  
AAAAATTCCTCAAATAGCAACTGTCCAACTGCAATTGGACCGATTACCCTCCAAC<sup>A</sup>CCAGGAAAGTGCC  
MDV-B NS rescatado con mutaciones silentes (SEC ID N°: 33)  
AAAAATTCCTCAAATAGCAACTGTCCAACTGCAATTGGACCGATTACCCTCCAAC<sup>G</sup>CCAGGAAAGTGCC

430 478  
MDV-B NS  
TTGATGACATAGAAGAAGAACCGGAGAATGTTGATGACCCA<sup>A</sup>ACTGAAAT  
MDV-B NS rescatado con mutaciones silentes  
TTGATGACATAGAAGAAGAACCGGAGAATGTTGATGACCCA<sup>A</sup>ACTGAAAT

**Fig. 16A**

# ES 2 539 514 T3

530 599  
MDV-B PB1 (SEC ID N°: 40)  
TCATTGATTCATTTGGACAAACCTGAAATGACTTTCTTCTCGGTAAAGAATATAAAGAAAAAATTGCCTGC

MDV-B PB1 rescatado con mutaciones silentes (SEC ID N°: 41)  
TCATTGATTCATTTGGACAAACCTGAAATGACCTTCTTCTCGGTAAAGAATATAAAGAAAAAATTGCCTGC

600 669  
MDV-B PB1  
TAAAAACAGAAAGGGTTTCTTCATAAAGAGAATACCAATGAAGGTAAAAGACAGAATAACCAGAGTGGAA

MDV-B PB1 rescatado con mutaciones silentes  
TAAAAACAGAAAGGGTTTCTTCATAAAGAGAATACCAATGAAGGTAAAAGACAGAATAACCAGAGTGGAA

670 739  
MDV-B PB1  
TACATCAAAAGAGCATTATCATTAAACACAATGACAAAAGATGCTGAAAGAGGC AAAC TAAAAAGAAGAG

MDV-B PB1 rescatado con mutaciones silentes  
TACATCAAAAGAGCATTATCATTAAACACAATGACAAAAGATGCTGAAAGAGGC AAAC TAAAAAGAAGAG

740 809  
MDV-B PB1  
CAATTGCCACCGCTGGGATACAAATCAGAGGGTTTGTATTAGTAGTTGAAAACCTGGCTAAAAATATCTG

MDV-B PB1 rescatado con mutaciones silentes  
CAATTGCCACCGCTGGGATACAAATCAGAGGGTTTGTATTAGTAGTTGAAAACCTGGCTAAAAATATCTG

810 879  
MDV-B PB1  
TGAAAATCTAGAACAAAGTGGTTTGCCAGTAGGTGGGAACGAGAAGAAGGCCAAACTGTCAAATGCAGTG

MDV-B PB1 rescatado con mutaciones silentes  
TGAAAATCTAGAACAAAGTGGTTTGCCAGTAGGTGGGAACGAGAAGAAGGCCAAACTGTCAAATGCAGTG

880 949  
MDV-B PB1  
GCCAAAATGCTCAGTAACTGCCACCAGGAGGGATCAGCATGACAGTGACAGGAGACAATACTAAATGGA

MDV-B PB1 rescatado con mutaciones silentes  
GCCAAAATGCTCAGTAACTGCCACCAGGAGGGATCAGCATGACGGTGACAGGAGACAATACTAAATGGA

950  
MDV-B PB1  
ATG

MDV-B PB1 rescatado con mutaciones silentes  
ATG

**Fig. 16B**