(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 618 490**

(51) Int. CI.:

C12N 5/071 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2008 PCT/EP2008/058472**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2009 WO09004016**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2008 E 08785896 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2176398**

(54) Título: **Estirpes celulares aviares inmortalizadas**

(30) Prioridad:

03.07.2007 EP 07360030

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2017

(73) Titular/es:

TRANSGENE SA (100.0%)
Parc d'Innovation Boulevard Gonthier d`Andernach
67400 Illkirch Graffenstaden, FR

(72) Inventor/es:

ERBS, PHILIPPE;
KAPFER, MARINA y
SILVESTRE, NATHALIE

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Estirpes celulares aviares inmortalizadas.

La presente invención se refiere a células aviares inmortalizadas, y a la utilización de estas células para la producción de virus. Las células según la invención son particularmente útiles para la producción de vectores virales recombinantes que se pueden utilizar para la preparación de composiciones terapéuticas y/o profilácticas para el tratamiento de animales, y más particularmente seres humanos.

Las estirpes celulares eucarióticas son fundamentales para la fabricación de vacunas virales y muchos productos de biotecnología. Los productos biológicos producidos en cultivos celulares incluyen enzimas, hormonas, productos inmunobiológicos (anticuerpos monoclonales, interleucinas, linfocinas), y agentes contra el cáncer. Aunque muchas proteínas más simples se pueden producir usando células bacterianas, actualmente muchas proteínas complejas que están glicosiladas deben realizarse en células eucarióticas.

Las células aviares se han usado durante años para la producción de vectores virales. Por ejemplo, el virus vaccinia usado para preparar una composición profiláctica para el tratamiento de la viruela se cultivó en fibroblastos embionarios de pollo (CEF). Las células aviares son particularmente útiles puesto que muchos virus usados en una composición farmacéutica pueden replicarse en las mismas. De forma más evidente, diversos virus pueden únicamente crecer en células aviares. Este es, por ejemplo, el caso del virus Ankara (MVA) de mamíferos, que no puede crecer en células de mamífero. Este poxvirus, que procede de un virus vaccinia mediante más de 500 pases sobre CEF, se usó a principios de los setenta para vacunar a personas inmunodeficientes contra la viruela. Actualmente, el MVA se usa principalmente como un vector en el contexto de la terapia génica. Por ejemplo, el MVA se usa como un vector para el gen MUC1 para vacunar a pacientes contra un tumor que expresa este antígeno (Scholl *et al.*, 2003, J Biomed Biotechnol., 2003, 3, 194-201). Los MVA portadores del gen que codifica antígenos del HPV también se usan como un vector para el tratamiento terapéutico del carcinoma ovárico. Más recientemente, el MVA ha sido el vector de elección para preparar un tratamiento profiláctico contra nuevas enfermedades emergentes o probables armas biológicas tales como el virus del Nilo Occidental y el ántrax.

A este respecto, existe una necesidad creciente para la producción de virus. Por ahora, el procedimiento de producción de MVA más utilizado comprende una etapa de replicación del virus en CEF. Sin embargo, la utilización de CEF está relacionada con diversas dificultades. En primer lugar, la preparación de CEF comprendió muchas etapas que se han realizado manualmente.

Además, este procedimiento de producción del virus depende de la disponibilidad de huevos, que se pueden destruir totalmente en caso de contaminación de las crías. Este problema cada vez más relevante con la diseminación de la gripe aviar.

Además, muchos CEF presentan una actividad de transcriptasa inversa (RT). La RT es una enzima necesaria para que los retrovirus se reproduzcan. Los retrovirus se encuentran en muchas especies diferentes. La RT no es infecciosa en seres humanos ni en animales, y no se ha demostrado que provoque efectos adversos sobre la salud en personas. Usando un ensayo basado en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) altamente sensible, la actividad de RT se ha detectado en cantidades minúsculas en vacunas fabricadas con fibroblastos de embrión de pollo. La fuente de la enzima es probablemente un genoma viral parcial que codifica RT, que se cree que está integrado en las células del pollo hace cientos o miles de años. No se conoce que los retrovirus aviares que producen esta RT afecten a seres humanos. Aunque el virus de inmunodeficiencia humana (VIH, el virus que conduce al SIDA) es un retrovirus, la actividad de RT detectada en vacunas no deriva definitivamente del VIH. Además, la presencia de RT no confirma la presencia de un retrovirus. No obstante, sería interesante una estirpe celular sin ninguna actividad de RT endógena.

Para emancipar el procedimiento de producción de virus de la utilización de CEF, existe una necesidad creciente de una estirpe celular aviar que permita la replicación y la reproducción del virus. Las estirpes celulares inmortalizadas se pueden mantener o congelar de lote a lote en el sitio de producción, y siempre están disponibles para un nuevo procedimiento de producción. Además, puesto que están confinadas en la planta de producción, están menos expuestas a la contaminación por contaminantes exógenos. Su utilización permite una reducción drástica de la manipulación manual necesaria para el procedimiento de producción. Todas estas propiedades conducen a una reducción del precio y de la duración del procedimiento de producción, así como a una disminución de la contaminación potencial.

Finalmente, las estirpes celulares se pueden caracterizar completamente y de este modo cumplen totalmente con la buena práctica de laboratorio y los requisitos de las diferentes agencias médicas.

Ya se han descrito diferentes estirpes celulares aviares. Por ejemplo, DF1 (patente US nº 5.879.924) es una estirpe celular de pollo inmortalizada espontáneamente derivada de huevos de la estirpe East Lansing (ELL-0) de 10 días de edad. Las células son útiles como sustratos para la propagación del virus, la expresión de proteínas recombinantes y la producción de virus recombinantes. Sin embargo, esta estirpe celular es susceptible a diversos

virus tales como el herpesvirus 1 de meleágridos (virus del herpes del pavo), virus de la viruela aviar, reovirus, el virus del sarcoma y la leucemia aviar, y el virus del sarcoma de Rous.

Las células aviares inmortales también pueden derivar de células madre embrionarias mediante separación progresiva de factores de crecimiento y de la capa alimentadora, manteniendo así los rasgos de crecimiento y una característica de tiempo de vida infinito de la célula madre no diferenciada. La única estirpe celular aviar disponible derivada mediante este procedimiento es la estirpe celular de pollo Ebx (documento WO 2005007840) que ha estado en contacto con capas alimentadoras de origen murino, provocando cuestiones reguladoras adicionales como la contaminación con virus de murino y la presencia de secuencias retrovirales endógenas en células de pollo. Además, estas estirpes celulares se han descrito en algunas condiciones como inestables y tendentes a la diferenciación.

También se ha establecido una estirpe celular permanente de embrión de pato, libre de retrovirus aviares endógenos. La estirpe celular, denominada DEC 99 (Ivanov *et al*. Experimental Pathology And Parasitology, 4/2000 Bulgarian Academy of Sciences) se ha cultivado a lo largo de 140 pases consecutivos, y no es tumorígena para las aves. La estirpe celular DEC 99 es un sistema de cultivo celular estándar que se ha usado para investigación, y se puede aplicar para las necesidades de biotecnología. Esta estirpe celular es un modelo adecuado para estudios en el campo de la biología celular, virología, inmunología, toxicología y para la producción de diagnósticos y vacunas. Se ha estudiado la susceptibilidad de la estirpe celular (CL) permanente de embrión de pato DEC 99 a la infección con cepas de vacuna del poxvirus aviar (APV) adaptadas a embriones (Ivanov *et al*. Experimental Pathology And Parasitology, 4/6 2001 Bulgarian Academy of Sciences). Se han usado las cepas de vacuna FK y Dessau procedentes de aves de corral y de paloma. Las cepas virales se hicieron pasar (13 pases) consecutivamente sobre cultivos celulares (CC) primarios de embrión de pato. Las cepas virales adaptadas se hicieron pasar (12 pases) adicionalmente en los CC de la estirpe celular DEC 99, en la que se observó un efecto citopático (CPE) típico. La producción de viriones infecciosos se comprobó mediante inoculación de embriones de gallinas Leghorn blancas de 11 días, en los que se formaron proliferaciones pustulosas típicas en las membranas corioalantoideas (CAM). En las células DEC 99, la cepa FK provocó un CPE temprano, en comparación con la cepa Dessau, y alcanzó un título de 106,25 CCID50/ml. Las cepas virales adaptadas en DEC 99 indujeron “tomas” cutáneas tras la vacunación de pollos de dos meses. De este modo, parece que DEC 99, como un sistema de CC estándar, es adecuada para la producción de vacunas frente a la viruela aviar. No obstante, esta estirpe celular particular crece lentamente después del pase 40, y es incapaz de crecer en suspensión.

Ya se han usado secuencias de ácido nucleico a partir de la región temprana del adenovirus 5 de humano para transformar *in vitro* algunas células humanas específicas (estirpes celulares 293 y PER. C6; Fallaux, F. J. *et al*., Hum. Gene Ther. 9: 1909-17 (1998); Graham, F. L. *et al*., J. Gen. Virol. 36: 59-74 (1977)).

En términos generales, el genoma adenoviral consiste en una molécula de ADN lineal de cadena doble de aproximadamente 36 kb de longitud, que contiene las secuencias que codifican más de 30 proteínas. En cada uno de sus extremos se encuentra una secuencia invertida corta de 100 a 150 nucleótidos, dependiendo de los serotipos, denominada ITR (repetición terminal invertida). Las ITR están implicadas en la replicación del genoma adenoviral. La región de encapsidación de aproximadamente 300 nucleótidos está localizada en el extremo 5’ del genoma, inmediatamente después de la ITR 5’.

Los genes tempranos se distribuyen en 4 regiones que están dispersas en el genoma adenoviral, denominadas E1 a E4 (E denotando “temprana”). Las regiones tempranas comprenden por lo menos seis unidades de transcripción que presentan sus propios promotores. La expresión de los genes tempranos está regulada por sí misma, expresándose algunos genes antes que otros. Tres regiones, E1, E2 y E4, respectivamente, son esenciales para la replicación viral. De este modo, si un adenovirus es defectuoso para una de estas funciones, es decir, si no puede producir por lo menos una proteína codificada por una de estas regiones, esta proteína se deberá suministrar en trans.

La región temprana E1 está situada en el extremo 5’ del genoma adenoviral, y contiene 2 unidades de transcripción virales, E1A y E1B, respectivamente. Esta región codifica proteínas que participan de forma muy temprana en el ciclo viral y son esenciales para la expresión de casi todos los otros genes del adenovirus. En particular, la unidad de transcripción E1A codifica una proteína que activa en trans la transcripción de los otros genes virales, induciendo la transcripción a partir de los promotores de las regiones E1B, E2A, E2B y E4.

Guilhot *et al*. (Guilhot, C. *et al*., Oncogene 8: 619-24(1993)) demostraron que la transducción retroviral de la proteína 12S de E1A a partir de Ad5 puede conducir a la inmortalización de células de codorniz. Sin embargo, el documento WO200504272 describió que es imposible inmortalizar células aviares cuando el gen E1A se introduce mediante transfección de ADN desnudo en lugar de mediante infección retroviral. El documento WO2005042728 afirma además: “que la transducción extremadamente eficiente y estable vía infección retroviral crea un conjunto celular suficientemente grande para contener células individuales con cambios genómicos espontáneos que tienen apoptosis bloqueada, que normalmente es inducida después de la inactivación retinoblastómica” (página 10).

La presencia de secuencias retrovirales en las células obtenidas por Guilhot *et al*. impide la utilización de dichas células para la producción del producto biológico, y más particularmente para compuestos terapéuticos.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que las células aviares, y más particularmente las células de *Cairina moschata*, se pueden inmortalizar eficientemente mediante transfección de E1A con un vector no viral.

Para resolver los diferentes problemas relacionados con la utilización de CEF y/o con la utilización de estirpes celulares previamente disponibles, la presente invención proporciona una célula aviar inmortalizada que comprende una secuencia de ácido nucleico de E1A caracterizada por que dicha célula se obtiene mediante un procedimiento que comprende la etapa de transfectar la célula con un vector no viral que comprende dicha secuencia de ácido nucleico de E1A, y en la que dicha célula no comprende una secuencia de ácido nucleico de E1B.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para inmortalizar una célula aviar, que comprende la etapa de transfectar dicha célula con un vector no viral que comprende una secuencia de ácido nucleico de E1A, y en el que dicho procedimiento no comprende una etapa de transfectar dicha célula con una secuencia de ácido nucleico de E1B.

Una célula inmortalizada, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una célula que puede crecer en cultivo durante más de 35 pases.

El témino número de pases se refiere al número de veces que se ha retirado una población celular a partir del recipiente de cultivo y se ha sometido a un procedimiento de subcultivo (pase) a fin de mantener las células a una densidad suficientemente baja para estimular el crecimiento adicional.

Como se usa a lo largo de la presente solicitud, los términos “un” y “uno” se usan en el sentido de que significan “por lo menos uno”, “por lo menos un primer”, “uno o más” o “una pluralidad” de los componentes o etapas mencionados, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, incluyendo las mezclas de las mismas.

El término “y/o”, siempre que se use en la presente memoria, incluye el significado de “y”, “o” y “todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados mediante dicho término”.

Como se usa en la presente memoria, el término “que comprende” pretende referirse a que los productos, las composiciones y los métodos incluyen los componentes o etapas mencionados, pero sin excluir otros. “Que consiste esencialmente en”, cuando se usa para definir productos, composiciones y métodos, debe significar que excluye otros componentes o etapas de cualquier importancia esencial. De este modo, una composición que consiste en los componentes mencionados no excluiría contaminantes traza y vehículos farmacéuticamente aceptables. “Que consiste en” debe significar que excluye más que los elementos traza de los otros componentes o etapas.

Como se usa en la presente memoria, el término “secuencia de ácido nucleico de E1A” se refiere a la secuencia de ácido nucleico de todos los productos génicos de la región E1A del adenovirus, incluyendo la secuencia de ácido nucleico que codifica los dos ARN principales: 13S y 12S.

Preferentemente, el término “secuencia de ácido nucleico de E1A” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos 60% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID nº: 1. En una forma de realización más preferida de la invención, E1A se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que presenta por lo menos 70%, preferentemente por lo menos 80% e incluso más preferentemente por lo menos 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico con SEC ID nº: 1. En una forma de realización más preferida, E1A se refiere a la secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID nº: 1.

Como se usa en la presente memoria, el término “secuencia de ácido nucleico de E1B” se refiere a toda secuencia de ácido nucleico de la región E1B del adenovirus, incluyendo la secuencia de ácido nucleico que codifica los 3 polipéptidos principales, de 19 kd y 55 kd.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “sustancialmente la misma secuencia de ácido nucleico” se refiere a una molécula de ácido nucleico que presenta una identidad suficiente con el polinucleótido de referencia, de forma que hibridará con el nucleótido de referencia bajo unas condiciones de hibridación moderadamente severas. En una forma de realización, la molécula de ácido nucleico presenta sustancialmente la misma secuencia nucleotídica que la secuencia nucleotídica de referencia establecida en SEC ID nº: 1.

Hibridación se refiere a la unión de cadenas complementarias de ácido nucleico (es decir, cadenas sentido:antisentido o sonda:ADN diana) entre sí mediante enlaces de hidrógeno similares a los enlaces que se producen de forma natural en el ADN cromosómico. Los niveles de severidad usados para hibridar una sonda dada con un ADN blanco se pueden modificar fácilmente por el experto en la materia.

La frase “hibridación severa” se usa en la presente memoria para referirse a unas condiciones bajo las cuales los híbridos de ácidos polinucleicos son estables. Como resulta conocido por el experto en la materia, la estabilidad de

los híbridos se refleja en la temperatura de fusión (Tm) de los híbridos. En general, la estabilidad de un híbrido es una función de la concentración del ión de sodio y de la temperatura. Típicamente, la reacción de hibridación se lleva a cabo bajo unas condiciones de baja severidad, seguido de lavados de severidad variable pero más elevada. La referencia a la severidad de la hibridación se refiere a dichas condiciones de lavado.

Como se usa en la presente memoria, la frase “hibridación moderadamente severa” se refiere a unas condiciones que permiten que el ADN blanco se una a un ácido nucleico complementario que presenta una identidad de aproximadamente 60%, preferentemente una identidad de aproximadamente 75%, más preferentemente una identidad de aproximadamente 85% con el ADN diana, siendo especialmente preferida una identidad superior a aproximadamente 90% con el ADN diana. Preferentemente, las condiciones moderadamente severas son condiciones equivalentes a la hibridación en formamida al 50%, disolución 5* de Denhart, SSPE 5*, SDS al 0.2% a 42ºC, seguido del lavado en SSPE 0.2*, SDS al 0.2%, a 65 grados C.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “vector no viral” se refiere de forma evidente a un vector de origen plasmídico, y opcionalmente a un vector tal combinado con una o más sustancias que mejoran la eficiencia transfeccional y/o la estabilidad de dicho vector y/o la protección de dicho vector *in vivo* con respecto al sistema inmunitario del organismo hospedador. Estas sustancias están ampliamente documentadas en la bibliografía, que resulta accesible para el experto en la materia (véase, por ejemplo, Feigner *et al*., 1987, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121; Hodgson y Solaiman, 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342; Remy *et al*., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654). De manera ilustrativa y no limitativa, éstos pueden ser polímeros, lípidos, en particular lípidos catiónicos, liposomas, proteínas nucleares o lípidos neutros. Estas sustancias se pueden usar solas o en combinación. Los ejemplos de dichos compuestos están disponibles en particular en las solicitudes de patente WO 98/08489, WO 98/17693, WO 98/34910, WO 98/37916, WO 98/53853, EP 890362 o WO 99/05183. Una combinación que se puede prever es un vector recombinante plasmídico combinado con lípidos catiónicos (DOGS, DC-COL, espermina-col, espermidina-col y similares) y lípidos neutros (DOPE).

La elección de los plásmidos que se pueden usar en el contexto de la presente invención es amplia. Pueden ser vectores de clonación y/o de expresión. En general, son conocidos por el experto en la materia, y un número de ellos están comercialmente disponibles, pero también es posible construirlos o modificarlos mediante técnicas de ingeniería genética. Se pueden mencionar, a manera de ejemplos, los plásmidos derivados de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagene), pREP4, pCEP4 (Invitrogene) o p Poly (Lathe *et al*., 1987, Gene 57, 193-201). Preferentemente, un plásmido usado en el contexto de la presente invención contiene un origen de replicación que asegura el inicio de la replicación en una célula productora y/o una célula hospedadora (por ejemplo, se puede seleccionar el origen ColE1 para un plásmido destinado a ser producido en *E. coli*, y se puede seleccionar el sistema oriP/EBNA1 si se desea que se autorreplique en una célula hospedadora de mamífero, Lupton y Levine, 1985, Mol. Cell. Biol. 5, 2533-2542; Yates *et al*., Nature 313, 812-815). Puede comprender elementos adicionales que mejoran su mantenimiento y/o su estabilidad en una célula dada (secuencia cer que promueve el mantenimiento monomérico de un plásmido (Summers y Sherrat, 1984, Cell 36, 1097-1103, secuencias para la integración dentro del genoma celular).

El término “vector no viral” excluye vectores virales, tales como, por ejemplo, vectores que derivan de un poxvirus (virus vaccinia, en particular MVA, virus de la viruela del canario, y similares), de un adenovirus, de un retrovirus, de un herpesvirus, de un alfavirus, de un espumavirus o de un virus asociado a adenovirus.

La presente invención se refiere asimismo a células que derivan de la célula según la invención. Como se utiliza en la presente memoria, el término “derivada” se refiere a células que se desarrollan o se diferencian a partir de, o tienen como ancestro a una célula según la invención.

El término número de pases se refiere al número de veces que una población celular se ha retirado del recipiente de cultivo y se ha sometido a un procedimiento de subcultivo (pase), a fin de mantener las células a una densidad suficientemente baja para estimular el crecimiento adicional.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “transfectada” se refiere a la transfección estable o a la transfección transitoria de la célula de la invención.

El término “transfección estable” o “transfectado de forma estable” se refiere a la introducción e integración de una secuencia de ácido nucleico externo en el genoma de la célula transfectada. El término “transfectante estable” se refiere a una célula que presenta integrado de manera estable ADN externo en el ADN genómico.

Según una forma de realización preferida de la invención, la célula aviar de la invención deriva de una célula de la familia *Anatidae* o de la familia *Phasianidae*. Entre las *Anatidae*, se prefieren particularmente las células que pertenecen al género *Cairina* o *Anas*. Incluso más preferentemente, las células según la invención pertenecen a la especie *Cairina moschata* o a la especie *Anas platyrhynchos*.

Preferentemente, la célula según la invención se toma de un organismo embionario. Los métodos que permiten el aislamiento de células a partir de un organismo vivo son bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, se

pueden usar los métodos descritos en el ejemplo 2. Según una forma de realización preferida de la invención, la célula primaria se aísla de un embrión que pertenece a la familia de *Anatidae* que tiene entre 0 y 20 días de edad, más preferentemente entre 5 y 15 días de edad, e incluso más preferentemente entre 11 y 14 días de edad.

Según una forma de realización preferida de la invención, la secuencia de ácido nucleico de E1A se inserta dentro de una secuencia de ADN diana de la célula según la invención.

Como se usa en la presente memoria, una "secuencia de ADN diana" es una región predeterminada dentro del genoma de una célula que es dianizada ("targeted") para la modificación mediante recombinación homóloga con el vector. Las secuencias de ADN diana incluyen genes estructurales (es decir, secuencias de ADN que codifican polipéptidos que incluyen, en el caso de eucariontes, intrones y exones), secuencias reguladoras tales como secuencias potenciadoras, promotores y similares, y otras regiones en el genoma de interés. Una secuencia de ADN diana también puede ser una secuencia que, cuando es dianizada por un vector, no tiene efecto sobre la función del genoma hospedador.

Como se utiliza en la presente memoria, "insertado en una secuencia de ADN diana" significa ampliamente que el procedimiento de recombinación homóloga que conduce a la inserción del gen inmortalizante introduce una deleción o una interrupción en la secuencia de ADN dianizada.

Para producir una célula aviar inmortalizada en la que la secuencia de ácido nucleico de E1A se inserta en una secuencia de ADN diana, el vector usado en el procedimiento según la invención puede comprender además dos secuencias homólogas capaces de una recombinación homóloga con una región de una secuencia de ADN diana natural al genoma de dicho genoma celular.

La presencia de dichas secuencias homólogas permite la inserción, específica del sitio, de la molécula de ácido nucleico de la invención en la secuencia de ADN diana mediante recombinación homóloga.

El término "recombinación homóloga" se refiere al intercambio de fragmentos de ADN entre dos moléculas de ADN en el sitio de secuencias nucleotídicas esencialmente idénticas. Según esta forma de realización particular de la invención, en el vector se encuentran unas secuencias que son homólogas con porciones de secuencias contenidas en la secuencia de ADN diana. En una forma de realización preferida de la invención, las secuencias homólogas en el vector de transferencia son cien por ciento homólogas con la región de la secuencia diana. Sin embargo, se puede usar una menor homología de secuencias. De este modo, se puede usar una homología de secuencias tan baja como aproximadamente 80%.

Las secuencias homólogas en el vector de transferencia comprenden por lo menos 25 pb. Se prefieren regiones más largas, de por lo menos 500 pb, y más preferentemente de por lo menos 5000 pb.

Según una forma de realización más preferida de la invención, la molécula de ácido nucleico está rodeada por las secuencias homólogas en el vector.

Como se utiliza en la presente memoria, "rodeada" significa que una de las secuencias homólogas está situada en dirección 5' de la molécula de ácido nucleico de la invención, y que una de las secuencias homólogas está situada en dirección 3' de la molécula de ácido nucleico de la invención. Como se usa en la presente memoria, "rodeada" no significa necesariamente que las dos secuencias homólogas están enlazadas directamente al extremo 3' o al extremo 5' del gen inmortalizante; el gen inmortalizante y las secuencias homólogas pueden estar separados por un número ilimitado de nucleótidos.

El experto en la materia puede seleccionar las secuencias homólogas apropiadas a fin de dianizar una secuencia de ADN específica en el genoma de la célula que debe ser inmortalizada. Por ejemplo, una secuencia homóloga puede ser homóloga a una parte de la secuencia dianizada, en donde la otra secuencia homóloga es homóloga a una secuencia de ADN localizada en dirección 5' o en dirección 3' de la secuencia dianizada. Según otro ejemplo, una de las secuencias homólogas puede ser homóloga a una secuencia de ADN situada en dirección 5' de la secuencia de ADN dianizada, en donde la otra secuencia homóloga es homóloga a una secuencia de ADN situada en dirección 3' de la secuencia de ADN diana. En otro ejemplo, ambas secuencias homólogas son homólogas a las secuencias situadas en la secuencia de ADN diana.

Según una forma de realización preferida de la invención, la secuencia de ADN diana es el gen de HPRT (hipoxantina fosforribosil transferasa).

La secuencia genómica que comprende el promotor de HPRT y el gen de HPRT de *Cairina moschata* se establece en SEC ID nº: 2. La secuencia que codifica la HPRT comienza en el codón ATG en la posición 8695 de la secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID nº: 2, la secuencia en dirección 5' de este codón ATG es la secuencia del promotor de HPRT.

El experto en la materia puede seleccionar las secuencias homólogas necesarias para la integración de la secuencia

de ácido nucleico de E1A en el gen de HPRT. Al igual que entre los diversos miembros de una familia, las secuencias genómicas que codifican HPRT son muy homólogas, el experto en la materia puede asimismo diseñar las secuencias homólogas necesarias para dianizar el gen de HPRT de cada una de las células aviares.

Según una forma de realización más preferida de la invención, las secuencias homólogas se personalizan a fin de insertar la secuencia de ácido nucleico de E1A en dirección 3' del promotor de HPRT de la célula. En esta forma de realización particular, la molécula de ácido nucleico de la invención está enlazada funcionalmente al promotor de HPRT endógeno de la célula. "Enlaza funcionalmente" hace referencia a que la secuencia de ácido nucleico de E1A está enlazada al promotor de una manera que permite su expresión en la célula.

Según esta forma de realización particular, la secuencia homóloga, en dirección 5' de la molécula de ácido nucleico de la invención, presenta preferentemente una secuencia de ácido nucleico que es homóloga con por lo menos 500 pb contiguas, y más preferentemente con por lo menos 5000 pb contiguas, de la secuencia de ácido nucleico que empieza desde el nucleótido en la posición 1 y que finaliza con el nucleótido en la posición 8694 de la secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID nº: 2, con la condición de que dicha secuencia homóloga no sea homóloga con la secuencia de ácido nucleico que empieza con el nucleótido en la posición 8695 y que finaliza con el nucleótido en la posición 26916 de la secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID nº: 2. Además, esta secuencia homóloga en dirección 5' está preferentemente enlazada directamente al codón de partida de la secuencia de ácido nucleico de E1A. Según una forma de realización incluso más preferida de la invención, la secuencia homóloga en dirección 5' de la molécula de ácido nucleico de la invención consiste en la secuencia de ácido nucleico que empieza desde el nucleótido en la posición 1 y que termina con el nucleótido en la posición 8694 de la secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID nº: 2. La secuencia homóloga, en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico de E1A, presenta preferentemente una secuencia de ácido nucleico que es homóloga con por lo menos 500 pb contiguas, y más preferentemente con por lo menos 5000 pb contiguas, de la secuencia de ácido nucleico que empieza desde el nucleótido en la posición 10580 y que termina con el nucleótido en la posición 18009 de la secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID nº: 2. Y más preferentemente, dicha secuencia homóloga, en dirección 3' de la secuencia de ácido nucleico de E1A, consiste en la secuencia de ácido nucleico que empieza desde el nucleótido en la posición 10580 y que termina con el nucleótido en la posición 18009 de la secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID nº: 2.

En consecuencia, la presente invención se refiere asimismo a una célula aviar que comprende una secuencia de ácido nucleico de E1A caracterizada por que dicha célula se obtiene mediante un procedimiento que comprende la etapa de transfectar la célula con un vector no vírico que comprende dicha secuencia de ácido nucleico de E1A, en la que dicha célula no comprende una secuencia de ácido nucleico de E1B, y en la que dicha secuencia de ácido nucleico de E1A está enlazada funcionalmente al promotor de HPRT endógeno de la célula.

Según una forma de realización preferida, el vector usado en el procedimiento según la invención comprende un primer marcador de selección, en el que este primer marcador de selección es un marcador de selección positivo, y en el que dicho primer marcador de selección está rodeado por las secuencias homólogas comprendidas en el vector. A este respecto, el procedimiento de recombinación homóloga que se produce entre el vector y el genoma de la célula conduce a la integración de la secuencia de ácido nucleico de E1A y del primer marcador de selección. Cuando el vector de transferencia es circular, "rodeado" significa que el primer marcador de selección y la secuencia de ácido nucleico de E1A están situados en la misma sección del vector, estando dicha sección delimitada por las secuencias homólogas.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión marcador de selección positivo se refiere de forma evidente a un gen que codifica un producto que permite que únicamente las células que presentan el gen sobrevivan y/o crezcan en ciertas condiciones. Los marcadores de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexano, o tetraciclina, complementan deficiencias auxotróficas, o suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de un medio complejo. En una forma de realización preferida según la invención, el primer marcador de selección codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos.

La integración del primer marcador de selección permite la selección de las células que han incorporado la secuencia de ácido nucleico de E1A. En consecuencia, el procedimiento según la invención puede comprender además una etapa en la que dichas células se cultivan en un medio que únicamente permite el crecimiento de las células que han incorporado el primer marcador de selección. Por ejemplo, en un medio que comprende un antibiótico.

Según una forma de realización más preferida de la invención, el primer marcador de selección, en el vector, está rodeado por secuencias que permiten su supresión. Dichas secuencias que permiten la supresión del primer marcador de selección no rodean a la secuencia de ácido nucleico de E1A. Cuando el vector es circular, las secuencias que permiten la supresión del primer marcador de selección, el primer marcador de selección y la secuencia de ácido nucleico de E1A están situados en la misma sección del vector de transferencia, estando dicha sección delimitada por las secuencias homólogas.

Las secuencias que permiten la supresión de un fragmento de ácido nucleico son bien conocidas por el experto en la materia (Nunes-Duby, S. *et al* (1998) Nucleic Acids Res. 26: 391-406). Estas secuencias pueden ser reconocidas por una o más enzimas específicas que inducen la supresión del ácido nucleico comprendido entre dichas secuencias, denominándose estas enzimas "recombinasas". Por ejemplo, tres recombinasas bien conocidas, que permiten la supresión de un fragmento de ácido nucleico, son las recombinasas FLP, ISCE1 y Cre.

Una recombinasa típica específica del sitio es la Cre recombinasa. Cre es un producto de 38 kDa del gen cre (recombinación por ciclación) del bacteriófago P1, y es una ADN recombinasa específica del sitio de la familia Int. Sternberg, N. *et al*. (1986) J. Mol. Biol. 187: 197-212. Cre reconoce un sitio de 34 pb en el genoma de P1 denominado loxP (locus de cruzamiento de P1), y cataliza eficientemente la recombinación recíproca conservadora de ADN entre pares de sitios loxP. El sitio loxP consiste en dos repeticiones invertidas de 13 pb que flanquean una región central no palindrómica de 8 pb. La recombinación mediada por Cre entre dos sitios de loxP directamente repetidos da como resultado la escisión de ADN entre ellos como un círculo cerrado covalentemente. La recombinación mediada por Cre entre pares de sitios de loxP en orientación invertida dará como resultado la inversión del ADN que interviene, en lugar de la escisión. La ruptura y unión de ADN están confinadas a posiciones discretas en la región central, y transcurre en una cadena cada vez mediante enlace fosfotirosínico transitorio entre la proteína y ADN con la enzima.

Otra recombinasa específica del sitio es la I-SceI. También se puede sustituir I-SceI en el procedimiento según la invención por otra endonucleasa dirigida por intrones, por ejemplo I-TliI, I-CeuI, I-CreI, I-PpoI y PI-PspI. Muchas están enumeradas por Belfort y Roberts ((1997) Nucleic Acids Research 25: 3379-3388). Muchas de estas endonucleasas derivan de genomas de organelos en los que la utilización del codón difiere del uso del codón nuclear estándar. Para usar dichos genes para la expresión nuclear de sus endonucleasas, puede ser necesario alterar la secuencia codificante para que concuerde con la de los genes nucleares. I-SceI es una endonucleasa de doble cadena que escinde el ADN en su sitio de reconocimiento. I-SceI genera un corte escalonado de 4pb con salientes de 3'OH.

La enzima I-SceI presenta un sitio de reconocimiento conocido. El sitio de reconocimiento de I-SceI es una secuencia no simétrica que se extiende a lo largo de 18 pb.

5' TAGGGATAACAGGGTAAT3'
3' ATCCCTATTGTCCCATTA5'

Otra recombinasa específica del sitio es la recombinasa FLP. La recombinasa Flp reconoce un sitio mínimo de 34 pb bien diferenciado que tolera únicamente una degeneración limitada de su secuencia de reconocimiento (Jayaram, 1985; Senecoff *et al*., 1988). Se ha examinado la interacción entre la recombinasa Flp y una secuencia FRT (Panigrahi *et al*., 1992). Los ejemplos de secuencias FRT variantes se proporcionan en Jayaram (1985) y Senecoff *et al*. (1988), y en Snaith *et al*. (1996) se describe un ensayo para la recombinación, mediada por Flp, en diferentes sustratos.

En consecuencia, el procedimiento según la invención puede comprender además una etapa que consiste en suprimir el primer marcador de selección del genoma de dicha célula primaria. Para suprimir dicho primer marcador de selección, la célula se transfecta mediante el gen que codifica la recombinasa específica para las secuencias que permiten la supresión del primer marcador de selección. Los métodos y el vector que pueden transferir dicho gen a la célula son bien conocidos por un experto en la materia, por ejemplo se puede utilizar el método descrito en el ejemplo 4 de la presente solicitud. También se pueden utilizar los vectores descritos anteriormente.

Según una forma de realización preferida, el vector utilizado en el procedimiento según la invención comprende un segundo marcador de selección que no está rodeado por dichas secuencias homólogas, en el que dicho segundo marcador de selección es un marcador de selección negativo. Dicho segundo marcador de selección es particularmente útil cuando el vector, utilizado en el procedimiento según la invención, es circular. La presencia de dicho segundo marcador de selección permite la destrucción de las células en las que el procedimiento de recombinación homóloga ha conducido a la introducción de la sección del vector de transferencia que no comprende la secuencia de ácido nucleico de E1A. Cuando el vector es circular, el hecho de que el segundo marcador de selección no esté rodeado por dichas secuencias homólogas significa que el segundo marcador de selección y la secuencia de ácido nucleico de E1A no están situados en la misma posición del vector de transferencia, estando dicha sección delimitada por las secuencias homólogas.

Por lo tanto, el procedimiento según la invención puede comprender además una etapa en la que las células se cultivan en un medio que únicamente permite el crecimiento de las células que no han incorporado el segundo marcador de selección. Dicha etapa se puede realizar simultáneamente con o por separado de la etapa en la que dichas células primarias se cultivan en un medio que únicamente permite el crecimiento de las células que han incorporado el primer marcador de selección.

Según una forma de realización preferida de la invención, el vector comprende un tercer marcador de selección, en el que dicho tercer marcador de selección es un marcador de selección negativo, y en el que dicho tercer marcador de selección está situado entre las secuencias que permiten la supresión del primer marcador de selección. Esto

significa que la etapa que consiste en suprimir el primer marcador de selección también conducirá a la supresión del tercer marcador de selección. La presencia del tercer marcador de selección permite la destrucción de las células en las que está presente el primer marcador de selección. Cuando el vector es circular, el hecho de que el tercer marcador de selección esté situado entre las secuencias que permiten la supresión del primer marcador de selección significa que el tercer marcador de selección y el primer marcador de selección están situados en la misma sección del vector de transferencia, estando dicha sección delimitada por las secuencias que permiten la supresión del primer marcador de selección.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión marcador de selección negativo se refiere de forma evidente a un gen que codifica un producto que elimina las células que poseen el gen bajo ciertas condiciones. Estos genes comprenden de forma evidente un "gen suicida". Los productos codificados por estos genes pueden transformar un profármaco en un compuesto citotóxico. Actualmente están disponibles numerosos pares de genes suicidas/profármacos. Más particularmente, se pueden mencionar los pares:

- timidina cinasa del virus del herpes simple tipo I (HSV-1 TK) y aciclovir o ganciclovir (GCV) (Caruso *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7024-7028; Culver *et al.*, 1992, Science 256, 1550-1552; Ram *et al.*, 1997, Nat. Med. 3, 1354-1361);

- citocromo p450 y ciclofosfamida (Wei *et al.*, 1994, Human Gene Therapy 5, 969-978);

- purina nucleósido fosforilasa de *Escherichia coli* (E. coli) y 6-metilpurina desoxirribonucleósido (Sorscher *et al.*, 1994, Gene Therapy 1, 233-238);

- guanina fosforribosil transferasa de E. coli y 6-tioxantina (Mzoz y Moolten, 1993, Human Gene Therapy 4, 589-595) y

- citosina desaminasa (CDasa) y 5-fluorocitosina (5FC).

- FCU1 y 5-fluoro-citosina (5FC) (documento WO9954481).

- FCU1-8 y 5-fluoro-citosina (5FC) (documento WO2005007857).

Dicho tercer marcador de selección permite la selección de las células en la que se ha producido la supresión del primer marcador de selección. Por lo tanto, el procedimiento según la invención puede comprender además una etapa en la que dicha célula se cultiva en un medio que no permite el crecimiento de la célula que comprende el tercer marcador de selección. Por ejemplo, un medio, que no permite el crecimiento de las células que comprenden FCU1 como un tercer marcador de selección, comprende 5-fluorocitosina.

Los primer, segundo y tercer marcadores de selección se pueden utilizar por separado. Por ejemplo, el vector usado en el procedimiento según la invención puede comprender el primer y el tercer marcador de selección, pero no el segundo, o el segundo y el tercer marcador de selección, pero no el primero.

Según una forma de realización preferida de la invención, la secuencia de ácido nucleico de E1A, el primer, el segundo y/o el tercer marcador de selección se colocan bajo el control de los elementos necesarios para su expresión en la célula que debe inmortalizarse.

Los elementos necesarios para la expresión consisten en el conjunto de elementos que permiten la transcripción de la secuencia nucleotídica a ARN y la traducción del ARNm a un polipéptido, en particular las secuencias promotoras y/o secuencias reguladoras que son eficaces en dicha célula, y opcionalmente las secuencias requeridas para permitir la excreción o la expresión de dicho polipéptido en la superficie de las células blancos. Estos elementos pueden ser regulables o constitutivos. Por supuesto, el promotor está adaptado al vector seleccionado y a la célula hospedadora. A título de ejemplo, se pueden mencionar los promotores eucarióticos de los genes MGP (fosfoglicerato cinasa), MT (metalotioneína; Mclvor *et al.*, 1987, Mol. Cell Biol. 7, 838-848), α-1 antitripsina, CFTR, los promotores del gen que codifica creatina cinasa muscular, el agente tensoactivo pulmonar de actina, inmunoglobulina o β-actina (Tabin *et al.*, 1982, Mol. Cell Biol. 2, 416-436), SRα (Takebe *et al.*, 1988, Mol. Cell. 8, 466-472), el promotor temprano del virus SV40 (virus del simio), la LTR del RSV (virus del sarcoma de Rous), el promotor de MPSV, el promotor de TK-HSV-1, el promotor temprano del virus CMV (citomegalovirus). Se prefiere muy particularmente el promotor temprano del citomegalovirus (CMV).

La presente invención se refiere más particularmente, pero no se limita a, un procedimiento para inmortalizar una célula, que comprende las etapas:

- transferir a una célula aviar un vector que comprende:

  - Una secuencia de ácido nucleico de E1A rodeada por secuencias homólogas.

- Un primer marcador de selección en el que dicho primer marcador de selección es un marcador de selección positivo, y en el que dicho primer marcador de selección está rodeado por dichas secuencias homólogas.
- Unas secuencias que permiten la supresión del primer marcador de selección.
- Un segundo marcador de selección que no está rodeado por dichas secuencias homólogas, en el que dicho marcador de selección es un marcador de selección negativo.
- Un tercer marcador de selección, en el que dicho tercer marcador de selección es un marcador de selección negativo, y en el que dicho tercer marcador de selección está situado entre las secuencias que permiten la supresión del primer marcador de selección.

- cultivar dichas células en un medio que sólo permite el crecimiento de las células que han incorporado el primer marcador de selección.
- cultivar dichas células en un medio que no permite el crecimiento de las células que han incorporado el segundo marcador de selección.
- excluir el primer marcador de selección del genoma de dicha célula.
- cultivar dicha célula en un medio que no permite el crecimiento de las células que comprenden el tercer marcador de selección.

La célula según la invención puede comprender además una o más secuencias de ácido nucleico que permiten la propagación de un virus defectuoso. “Virus defectuoso” se refiere a un virus en el que uno o más genes virales necesarios para su replicación están eliminados o se han convertido en no funcionales. La expresión “secuencia de ácido nucleico que permite la propagación de un virus defectuoso” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que suministra en trans la función o las funciones que permiten la replicación del virus defectuoso. Es decir, dichas secuencia o secuencias de ácido nucleico codifican la proteína o proteínas necesarias para la replicación y la encapsidación de dicho virus defectuoso.

La célula según la invención también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustancia de interés. Como se utiliza en la presente memoria, una sustancia de interés puede incluir, de manera no limitativa, una proteína farmacéuticamente activa, por ejemplo factores de crecimiento, reguladores del crecimiento, anticuerpos, antígenos, sus derivados útiles para inmunización o vacunación y similares, interleucinas, insulina, G-CSF, GM-CSF, hPG-CSF, M-CSF o sus combinaciones, interferones, por ejemplo interferón-α, interferón-β, interferón-γ, factores de coagulación de la sangre, por ejemplo Factor VIII, Factor IX, o tPA o sus combinaciones. “Sustancia de interés” también se refiere a enzimas industriales, por ejemplo para la utilización en pasta de papel y papel, modificación textil, o producción de etanol. Finalmente, “sustancia de interés” también se refiere a un suplemento proteínico o a un producto de valor añadido para la alimentación de animales.

Según una forma de realización preferida de la invención, la célula según la invención comprende asimismo una secuencia de ácido nucleico que codifica una transcriptasa inversa de la telomerasa recombinante, y más preferentemente la transcriptasa inversa de la telomerasa recombinante descrita en el documento EP 06360047.2. En una forma de realización preferida de la invención descrita en el documento EP 06360047.2, la secuencia de ácido nucleico que codifica la transcriptasa inversa de la telomerasa recombinante presenta por lo menos 70%, más preferentemente por lo menos 90%, y más preferentemente por lo menos 95% de identidad de secuencia de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID nº: 2 del documento EP 06360047.2. La secuencia de ácido nucleico preferida que codifica la transcriptasa inversa de la telomerasa recombinante descrita en el documento EP 06360047.2 es como se expone en SEC ID nº: 2 del documento EP 06360047.2. La secuencia de ácido nucleico SEC ID nº: 2 de la transcriptasa inversa de la telomerasa descrita en el documento EP 06360047.2 corresponde a la secuencia de ácido nucleico SEC ID nº: 3 de la transcriptasa inversa de la telomerasa en la presente invención. Por lo tanto, según una forma de realización preferida de la invención, la célula según la invención comprende asimismo una secuencia de ácido nucleico que codifica una transcriptasa inversa de la telomerasa recombinante, y más preferentemente una secuencia de ácido nucleico que codifica una transcriptasa inversa de la telomerasa recombinante que presenta por lo menos 70%, más preferentemente por lo menos 90%, y más preferentemente por lo menos 95% de identidad de secuencia de ácido nucleico con SEC ID nº: 3. Más preferentemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica una transcriptasa inversa de la telomerasa recombinante es como se establece en SEC ID nº: 3 (dTERT).

Las células obtenidas mediante el procedimiento según la invención, la célula de la invención y las células derivadas de la misma, son útiles de forma evidente para la replicación de un virus. Dichos virus pueden estar vivos, atenuados, recombinantes o no. Más preferentemente, dichas células son particularmente útiles para la replicación de poxvirus (virus vaccinia, en particular MVA, virus de la viruela del canario, etc.), un adenovirus, un retrovirus, un

herpesvirus, un alfavirus, un espumavirus, o un virus asociado a un adenovirus.

Los retrovirus presentan la propiedad de infectar, y en la mayoría de los casos de integrarse dentro de, células en división, y a este respecto son particularmente apropiados para uso en relación con el cáncer. Un retrovirus recombinante contiene generalmente las secuencias de la LTR, una región de encapsidación y la secuencia nucleotídica según la invención, que se coloca bajo el control de la LTR retroviral o de un promotor interno tal como los descritos a continuación. Un vector retroviral puede contener modificaciones, en particular en las LTR (sustitución de la región promotora por un promotor eucariótico) o la región de encapsidación (sustitución con una región de encapsidación heteróloga, por ejemplo el tipo VL30) (ver las solicitudes francesas 94 08300 y 97 05203).

El vector adenoviral puede carecer de toda o de parte de por lo menos una región que es esencial para la replicación y que se selecciona de entre las regiones E1, E2, E4 y L1 L5. Resulta preferida una supresión de la región E1. Sin embargo, se puede combinar con otra u otras modificaciones/supresiones que afectan, en particular, a todas o a parte de las regiones E2, E4 y/o L1 L5. A título ilustrativo, la supresión de la parte principal de la región E1 y de la unidad de transcripción de E4 es particularmente muy ventajosa. Con el fin de incrementar las capacidades de clonación, el vector adenoviral puede carecer adicionalmente de toda o de parte de la región E3 no esencial. Según otra alternativa, es posible utilizar un vector adenoviral mínimo que retiene las secuencias que son esenciales para el encapsidación, es decir, las 5' y 3' ITR (repeticiones terminales invertidas), y la región de encapsidación. Los diversos vectores adenovirales, y las técnicas para prepararlos, son conocidos (véase, por ejemplo, Graham y Prevect, 1991, en Methods in Molecular Biology, Vol 7, p 109 128; Ed: E. J. Murey, The Human Press Inc).

La familia de poxvirus comprende virus de las subfamilias Chordopoxvirus y Entomopoxvirus. Entre éstas, el poxvirus según la invención se selecciona preferentemente de entre el grupo que comprende Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Avipoxvirus, Capripoxvirus, Leporipoxvirus, Suipoxvirus, Molluscipoxvirus, Yatapoxvirus. Según una forma de realización más preferida, el poxvirus de la invención es un orthopoxvirus.

El Orthopoxvirus es preferentemente un virus vaccinia, y más preferentemente un virus vaccinia modificado de Ankara (MVA), en particular MVA 575 (ECACC V00120707) y MVA-BN (ECACC V00083008).

El término "virus recombinante" se refiere a un virus que comprende una secuencia exógena insertada en su genoma. Como se utiliza en la presente memoria, una secuencia exógena se refiere a un ácido nucleico que no está presente de manera natural en el virus progenitor.

En una forma de realización, la secuencia exógena codifica una molécula que presenta una función directa o indirectamente citotóxica. Mediante "directa o indirectamente" citotóxica, se quiere hacer referencia a que la molécula codificada por la secuencia exógena puede ser tóxica por sí misma (por ejemplo ricina, factor de necrosis tumoral, interleucina-2, interferón-gamma, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, exotoxina A de *Pseudomonas*), o se puede metabolizar para formar un producto tóxico, o puede actuar sobre algo para formar un producto tóxico. La secuencia del ADNc de la ricina se describe en Lamb *et al* (Eur. J. Biochem., 1985, 148, 265-270), incorporado a la presente memoria como referencia.

En una forma de realización preferida de la invención, la secuencia exógena es un gen suicida. Un gen suicida codifica una proteína que puede convertir un profármaco relativamente no tóxico en un fármaco tóxico. Por ejemplo, la enzima citosina desaminasa convierte 5-fluorocitosina (5FC) en 5-fluorouracilo (5FU) (Mullen *et al* (1922) PNAS 89, 33); la enzima timidina cinasa del herpes simple sensibiliza a las células para el tratamiento con el agente antiviral ganciclovir (GCV) o aciclovir (Moolten (1986) Cancer Res. 46, 5276; Ezzedine *et al* (1991) New Biol 3, 608). Se puede usar la citosina desaminasa de cualquier organismo, por ejemplo *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*.

Así, en una forma de realización más preferida de la invención, el gen codifica una proteína que presenta una actividad de citosina desaminasa, e incluso más preferentemente una proteína como se describe en las solicitudes de patente WO 2005007857 y WO 9954481.

En una forma de realización adicional, el gen exógeno codifica una ribozima que puede escindir ARN o ADN dianizado. El ARN o ADN dianizado que se debe escindir puede ser ARN o ADN que es esencial para la función de la célula, y su escisión da como resultado la muerte de la célula, o el ARN o ADN que se debe escindir puede ser ARN o ADN que codifica una proteína indeseable, por ejemplo un producto oncógeno, y la escisión de este ARN o ADN puede evitar que la célula sea cancerosa.

En aún una forma de realización adicional, el gen exógeno codifica un ARN antisentido.

Mediante "ARN antisentido" se quiere hacer referencia a una molécula de ARN que se hibrida a, e interfiere con la expresión de una molécula de ARNm que codifica una proteína, o a otra molécula de ARN en la célula, tal como pre-ARNm o ARNt o ARNr, o se hibrida a, e interfiere con la expresión de un gen.

En otra forma de realización de la invención, la secuencia exógena sustituye la función de un gen defectuoso en una célula diana. Existen varios miles de enfermedades genéticas heredadas de mamíferos, incluyendo seres humanos,

que son provocadas por genes defectuosos. Los ejemplos de dichas enfermedades genéticas incluyen la fibrosis quística, en la que es conocido que existe una mutación en el gen de CFTR; la distrofia muscular de Duchenne, en la que es conocido que existe una mutación en el gen de la distrofina; anemia drepanocítica, en la que es conocido que existe una mutación en el gen de HbA. Muchos tipos de cáncer son provocados por genes defectuosos, especialmente protooncogenes, y genes supresores de tumores que han sufrido una mutación.

Los ejemplos de protooncogenes son ras, src, bcl, etc.; los ejemplos de genes supresores de tumores son p53 y Rb.

En una forma de realización adicional de la invención, la secuencia exógena codifica un antígeno asociado a tumor (TAA). TAA se refiere a una molécula que es detectada a una frecuencia o densidad en células tumorales mayor que en células no tumorales del mismo tipo de tejido. Los ejemplos de TAA incluyen de manera no limitativa CEA, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GP-100, MUC-1, MUC-2, el oncogén ras mutado puntualmente, p53 mutado normal o puntual, p53 sobreexpresado, CA-125, PSA, Cerb/B2, BRCA I, BRCA II, PSMA, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, NY-ESO-1, TAG72, KSA, HER-2/neu, bcr-abl, pax3-fkhr, ews-fli-1, superviviente y LRP. Según una forma de realización más preferida, el TAA es MUC1.

El virus recombinante puede comprender más de una secuencia exógena, y cada secuencia exógena puede codificar más de una molécula. Por ejemplo, puede ser útil asociar, en un mismo poxvirus recombinante, una secuencia exógena que codifica un TAA con una secuencia exógena que codifica una citocina.

En otra forma de realización de la invención, el gen exógeno codifica un antígeno. Como se utiliza en la presente memoria, “antígeno” se refiere a un ligando que se puede unir mediante un anticuerpo; un antígeno no necesita ser inmunógeno por sí mismo.

Preferentemente, el antígeno deriva de un virus tal como, por ejemplo, HIV-1, (tal como gp 120 o gp 160), cualquiera de un virus de la inmunodeficiencia felina, virus del herpes humanos o animales, tales como gD o sus derivados o la proteína temprana inmediata tal como ICP27 de HSV1 o HSV2, citomegalovirus (tal como gB o sus derivados), el virus zóster de la varicela (tal como gpI, II o III), o de un virus de la hepatitis tal como el virus de la hepatitis B, por ejemplo el antígeno de superficie de la hepatitis B o un derivado del mismo, el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis C (preferentemente una proteína no estructural de la cepa ja de genotipo 1b) y el virus de la hepatitis E, o de otros patógenos virales, tales como el virus sincitial respiratorio, el virus del papiloma humano (preferentemente la proteína E6 y E7 procedente de la cepa HPV16) o el virus de la gripe, o deriva de patógenos bacterianos tales como *Salmonella, Neisseria, Borrelia* (por ejemplo OspA u OspB o sus derivados), o *Chlamydia, o Bordetella*, por ejemplo P.69, PT y FHA, o deriva de parásitos tales como plasmodium o toxoplasma.

Figura 1: vector que comprende un gen que codifica la secuencia de ácido nucleico de E1A.

Figura 2: representación esquemática de la inserción, específica del sitio, de la secuencia de ácido nucleico de E1A en el gen de HPRT.

Figura 3: representación esquemática de la eliminación de los primer y tercer marcadores de selección a partir del genoma de la célula inmortalizada obtenida mediante el procedimiento de la invención.

Figura 4: vector que comprende un gen que codifica el gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa de *Cairina moschata* y la secuencia de ácido nucleico de E1A.

Ejemplos

Ejemplo 1: Establecimiento de una estirpe celular aviar inmortalizada que comprende una secuencia de ácido nucleico de E1A

A. Construcciones plasmídicas.

A-1. Construcciones plasmídicas para la inserción aleatoria.

Para este fin, se ha usado un plásmido que no comparte ninguna secuencia específica de homología con el genoma de *Cairina moschata* (E1A plasmídico) (figura 1).

A-2. Construcciones plasmídicas para la inserción dirigida.

Se construyó un plásmido que comprende dos fragmentos de 5 kb homólogos al gen de HPRT de *Cairina moschata* que rodean a la secuencia de ácido nucleico de E1A (SEC ID No:1) y dos marcadores de selección. El gen de HPRT que codifica la hipoxantina guaninafosforil transferasa se seleccionó como un sitio adecuado para la expresión constitutiva de la secuencia de ácido nucleico de E1A.

Estos dos marcadores de selección son el gen de FCU1 (Erbs *et al.* Cancer Res. 2000. 15. 60.: 3813-22) bajo el

control de un promotor de CMV (Thomsen *et al*. P.N.A.S. 1984. 81. 3: 659-63) y el gen de resistencia a neomicina (o puromicina) colocado bajo el control de un promotor de SV40. El casete de resistencia a neomicina (o puromicina) y de expresión de FCU-1 están rodeados por sitios de escisión de Sce1 que permiten la eliminación de los casetes de selección de la estirpe celular final. Fuera de los brazos del gen de HPRT se inserta un marcador de selección que codifica la HSVTK dirigida por un promotor de RSV (figura 2).

B. Preparación del lote de CEC a partir de huevos de *Cairina moschata* y descripción de las subpoblaciones.

B.1 Preparación del lote de CEC a partir de huevos de *Cairina moschata* de 12 días y descripción de las subpoblaciones.

Se incubaron 25 huevos SPF fertilizados a 37,5ºC. Los huevos se abrieron después de 12 días de incubación siguiendo el protocolo disponible.

Los 23 embriones se trituraron, se lavaron una vez en disolución salina con pH regulado con fosfato-Dulbecco (PBS) y se disociaron en TrypLE Select (Invitrogen) 5 horas a temperatura ambiente.

Después de la centrifugación a baja velocidad, las células se resuspendieron en medio Eagle basal (MBE) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (FCS), gentamicina 0,04 g/l, se sembraron en matraces triples de 500 cm^2, y se incubaron a 37ºC y 5% de CO_2.

Después de 24 horas, las células confluentes se retiraron de los matraces usando TrypLE Select (5 ml/matraz triple), parte de las células se volvieron a sembrar en matraces de 175 cm^2 para un segundo pase. Las células remanentes se concentraron a 10^7 células/ml en medio apropiado (60% de BME, 30% de FCS y 10% de DMSO), y se congelaron en un recipiente regulado con alcohol isopropílico (recipiente NALGENE® “Mr. Frosty” que congela a 1ºC) a -80ºC antes de transferir en nitrógeno líquido para el almacenamiento a largo plazo, constituyendo el banco inicial de células (5 x 1,5.10^7 células/vial, 44 x 1.10^7 células/vial).

Las células que permanecieron en el cultivo se hicieron pasar clásicamente por hasta 18 pases; durante los 3 primeros pases, las células no adheridas se recogieron centrifugando a baja velocidad el medio acondicionado, se volvieron a sembrar y se hicieron pasar adicionalmente de la misma manera como el cultivo inicial.

Las subpoblaciones, que presentan unos rasgos morfológicos diferentes característicos, se han aislado de forma reproducible durante el tiempo de vida del cultivo.

B.2. Preparación del lote de CEC a partir de huevos de *Cairina moschata* de 19 días y descripción de las subpoblaciones.

29 huevos de *Cairina moschata* SPF fertilizados, obtenidos de AFFSSA Ploufragan, se incubaron a 37,5ºC en atmósfera húmeda.

Los huevos se abrieron después de 19 días, y los embriones se extrajeron de forma estéril. Se decapitaron 20 embriones, las extremidades se retiraron así como el hígado se usó para otra preparación celular. Los torsos embrionarios se trituraron, se lavaron una vez en PBS Dulbecco (Sigma, Ref. D8537, Lote 46K2428) y se disociaron en 500 ml de TrypLE Select (Gibco, Ref. 12563, Lotes 1319986 y 1339844) 2 horas a 37ºC.

Después de una centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos, las células se resuspendieron en BME (medio de Eagle basal, Gibco, Ref. 41010, Lote 8270) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (JRH, Ref. 12003-1000M, Lote 5A0102, Código TG P4001 Q), gentamicina 0.04 g/l y L-glutamina 4 mM. Un volumen final de suspensión de 1,5 l (1,9.10^6 células/ml) se sembró en 10 matraces triples (500 cm^2), y se incubó a 37ºC y 5% de CO_2.

Después de 24 h, las células confluentes se lavaron con PBS y se retiraron de los matraces usando TrypLE Select. Las células se contaron y se centrifugaron 4-5 minutos a 2000 rpm. El concentrado se concentró a 5.10^6 o 10^7 células/ml en medio apropiado (60% de BME, 30% de FCS y 10% de DMSO). La suspensión se introdujo en crioviales (Nunc) y se congeló a -80ºC con una etapa de 2 h a -20ºC, antes de transferir a nitrógeno líquido para el almacenamiento a largo plazo, constituyendo el banco de células primarias (110 crioviales, 10^7 células/vial) de CETC19p1 (células embrionarias de torso de pato, embriones de 19 días, 1 pase).

En una forma de realización preferida de la presente invención, la preparación del lote de CEC a partir de huevos de *Cairina moschata* se llevó a cabo según el apartado B.2. alternativo (a partir de huevos de *Cairina moschata* de 19 días).

C. Métodos de transfección.

En la técnica se conoce un gran número de métodos de transfección para introducir un vector que puede dirigir la

expresión de una secuencia nucleotídica de interés. A continuación se enumera una lista no limitativa de estos métodos: precipitación mediante $CaPO_4$, electroporación, método de transfección con lipofectina. Un ejemplo dado se basa en el procedimiento de precipitación con $CaPO_4$.

Las células deberían de tener una confluencia de aproximadamente 80-50%. El medio se modifica dos horas antes de la adición de $CaPO_4$/ADN. Se resuspenden 30 μg de ADN en 31 μl de $CaCl_2$ 2 M – Tris 161.3 mM pH 7.6. Se añade H_2O hasta un volumen final de 0,5 ml.

A continuación, 2 alternativas:

a) por transfección, se distribuyen 0,5 ml de 2X HEBS en un tubo Falcon estéril de 15 ml, y se añade gota a gota una disolución de ADN mientras se hace girar suavemente en vórtex, o burbujeando la disolución de ADN en aquél. La disolución debería resultar lechosa. La mezcla se deja reposar a temperatura ambiente durante 10-30 min. Después se pipetea hacia dentro y hacia fuera una vez con una pipeta estéril en una campana para cultivo de tejidos, para romper los copos y aplicarlos gota a gota a las células. Las células se incuban entonces entre 6 horas hasta toda la noche a 37ºC. Un precipitado fino debería de cubrir la superficie celular. Para completar el procedimiento de transfección, calentar hasta 37ºC la disolución de choque de glicerol. El medio se separa por aspiración, se añaden 5 ml de BME para lavar la capa celular, el medio se separa entonces por aspiración y se añade 1 ml de disolución de choque de glicerol durante 2 min. o menos. A continuación, se añaden suavemente 10 ml de BME para diluir el glicerol, y el BME-glicerol se elimina completamente. Entonces se añaden 10 ml de medio deseado, y las placas se incuban a la temperatura apropiada, o

b) por transfección, se distribuyen 0,5 ml de 2X HEBS en un tubo Falcon estéril de 15 ml y la disolución de ADN se añade gota a gota mientras se hace girar suavemente, o burbujeando la disolución de ADN en aquél. La disolución debería resultar lechosa. La mezcla se deja reposar a temperatura ambiente durante 10-30 min. Después se pipeteó hacia dentro y hacia fuera una vez con una pipeta estéril en una campana para cultivo de tejidos, para romper los copos y aplicarlos gota a gota a las células. Un precipitado fino debería de cubrir la superficie celular. Las células se incubaron entonces entre 6 horas hasta toda la noche a 37ºC.

En una forma de realización preferida de la presente invención, la transfección (precipitación mediante $CaPO_4$) se lleva a cabo según la alternativa b).

D. Métodos de selección

D-1. Método de selección para la inserción aleatoria:

Se aplicó presión de selección 48 a 72 horas después de la transfección: las células se disociaron con TrypLE Select, se centrifugaron a baja velocidad y se volvieron a sembrar en BME con FCS al 10% y G418 800 μg/ml, preferentemente 500 μg/ml (y opcionalmente ganciclovir 25 μg/ml, preferentemente 10 μg/ml).

Las células se sometieron a pase en serie hasta que se pudieron aislar clones en crecimiento individuales.

D-2. Método de selección para la inserción dirigida:

Se aplicó presión de selección 48 a 72 horas después de la transfección: las células se disociaron con TrypLE Select, se centrifugaron a baja velocidad y se volvieron a sembrar en BME con FCS al 10%; ganciclovir 25 μg/ml, preferentemente 10 μg/ml; y G418 800 μg/ml, preferentemente 500 μg/ml (o puromicina 0,5 μg/ml).

Las células se hicieron pasar en serie hasta que se pudieron aislar clones en crecimiento individuales.

Los clones celulares se transfectaron a continuación con un plásmido de expresión de la meganucleasa I-SceI, siguiendo el método descrito a continuación.

Para seleccionar la eliminación de los marcadores de selección, se aplicó 5-fluorocitosina (5-FC) 48 horas después de la transfección: las células se disociaron con TrypLE Select, se centrifugaron a baja velocidad y se volvieron a sembrar en medio con una concentración de 5-FC que oscila desde 10^{-3} hasta 10^{-7} M y se mantuvieron con selección de G418 (o puromicina)/ganciclovir (BME con FCS al 10%; 5-FC ganciclovir 25 μg/ml, preferentemente 10 μg/ml; y G418 800 μg/ml, preferentemente 500 μg/ml (o puromicina 0.5 μg/ml) (figura 3).

Ejemplo 2: Establecimiento de una estirpe celular aviar inmortalizada que comprende una secuencia de ácido nucleico de E1A y una secuencia de ácido nucleico de transcriptasa inversa de la telomerasa recombinante

A. Construcciones plasmídicas.

A-1. Construcciones plasmídicas para inserción aleatoria.

Para este fin se utiliza un plásmido que no comparte secuencia específica de homología con el genoma de *Cairina moschata*.

A-2. Construcciones plasmídicas para inserción dirigida.

Se construyó un plásmido (plásmido dTERT-E1A) que comprende dos fragmentos de 5 kb homólogos al gen de HPRT de *Cairina moschata* que rodean al gen de transcriptasa inversa de la telomerasa de *Cairina moschata* (SEC ID nº: 3), la secuencia de ácido nucleico de E1A (SEC ID nº: 1) y dos marcadores de selección. El gen de HPRT que codifica la hipoxantina guaninafosforiltransferasa se seleccionó como un sitio adecuado para la expresión constitutiva de la secuencia de ácido nucleico de E1A.

Estos dos marcadores de selección son el gen de FCU1 (Erbs *et al*. Cancer Res. 2000. 15. 60: 3813-22) bajo el control de un promotor de CMV (Thomsen *et al*. P.N.A.S. 1984. 81. 3: 659-63) y el gen de resistencia a puromicina, colocado bajo el control de un promotor de SV40. El casete de resistencia a puromicina y el casete de expresión de FCU-1 están rodeados por sitios de escisión de Sce1 que permiten la eliminación de los casetes de selección de la estirpe celular final. Fuera de los brazos del gen de HPRT se inserta un marcador de selección que codifica la HSVTK dirigido por un promotor de RSV (figura 4).

B. Preparación del lote de CEC a partir de huevos de *Cairina moschata* de 19 días y descripción de las subpoblaciones.

Se incuban 29 huevos de *Cairina moschata* SPF fertilizados, obtenidos de AFFSSA Ploufragan, a 37,5ºC en atmósfera húmeda.

Los huevos se abrieron después de 19 días, y los embriones se extrajeron de forma estéril. Se decapitaron 20 embriones, se retiraron las extremidades mientras que el hígado se usó para otra preparación celular. Los torsos embionarios se trituraron, se lavaron una vez en PBS Dulbecco (Sigma, Ref. D8537, Lote 46K2428) y se disociaron en 500 ml de TrypLE Select (Gibco, Ref. 12563, Lotes 1319986 y 1339844) 2 horas a 37ºC.

Después de la centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos, las células se resuspendieron en BME medio de Eagle basal, Gibco, Ref. 41010, Lote 8270) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (JRH, Ref. 12003-1000M, Lote 5A0102, Código TG P4001Q), gentamicina 0.04 g/l y L-glutamina 4 mM. Se sembró un volumen final de suspensión de 1,5 l ($1{,}9.10^6$ células/ml) en 10 matraces triples (500 cm^2), y se incubó a 37ºC 5% de CO_2.

Después de 24 h, las células confluentes se lavaron con PBS y se retiraron de los matraces usando TrypLE Select. Las células se contaron y se centrifugaron 4-5 minutos a 2000 rpm. El concentrado se concentró a 5.10^6 o 10^7 células/ml en medio apropiado (60% de BME, 30% de FCS y 10% de DMSO). La suspensión se introdujo en crioviales (Nunc) y se congeló a -80ºC con una etapa de 2 h entre medias a -20ºC, antes de transferir a nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo, constituyendo el banco de células primarias (110 crioviales, 10^7 células/vial) de CETC19p1 (células embrionarias de torso de pato, embriones de 19 días, 1 pase).

C. Métodos de transfección.

En la técnica se conoce un gran número de métodos de transfección para introducir un vector que puede dirigir la expresión de una secuencia nucleotídica de interés. A continuación se enumera una lista no limitativa de estos métodos: precipitación mediante $CaPO_4$, electroporación, método de transfección mediante lipofectina. Un ejemplo dado se basa en la electroporación.

La transfección se lleva a cabo usando un dispositivo Amaxa's Nucleofector y el kit de fibroblastos básico (Amaxa, No. de catálogo VPI-1002). Las células se centrifugaron 10 min. a 700 rpm (100 g) y se resuspendieron en la disolución básica Nucleofector (100 µl por 10^6 células); se mezclan 100 µl de suspensión con 3 a 6 µg de ADN, y se transfieren a una cubeta colocada en el Nucleofector (programa U-12). Después de la electroporación, la muestra se transfirió a una cápsula de cultivo de 6 cm, se llenó con 5 ml de medio de cultivo, se preequilibró en el incubador a 37ºC/5% de CO_2. Tras la incubación toda la noche a 37ºC y 5% de CO_2, el medio de cultivo se renovó y se llevó a cabo la incubación.

D. Métodos de selección.

D-1. Método de selección para la inserción aleatoria:

Se aplicó una presión de selección 48 a 72 horas después de la transfección: las células se disociaron con TrypLE Select, se centrifugaron a baja velocidad y se volvieron a sembrar en BME con FCS al 10%, ganciclovir 25 μg/ml, preferentemente 10 μg/ml; y G418 800 μg/ml, preferentemente 500 μg/ml.

Las células se sometieron a pase en serie hasta que se pudieron aislar unos clones en crecimiento individuales.

D-2. Método de selección para la inserción dirigida:

Se aplicó una presión de selección 48 a 72 horas después de la transfección: las células se disociaron con TrypLE Select, se centrifugaron a baja velocidad y se volvieron a sembrar en BME con FCS al 10%; ganciclovir 25 μg/ml, preferentemente 10 μg/ml; y puromicina 0.5 μg/ml.

Las células se sometieron a pase en serie hasta que se pudieron aislar unos clones en crecimiento individuales.

Los clones celulares se transfectaron a continuación con un plásmido de expresión de la meganucleasa I-SceI, siguiendo el método descrito a continuación.

Para seleccionar la eliminación de los marcadores de selección, se aplicó 5-fluorocitosina (5-FC) 48 horas después de la transfección: las células se disociaron con TrypLE Select, se centrifugaron a baja velocidad y se volvieron a sembrar en medio con concentración de 5-FC con un intervalo de 10^{-3} a 10^{-7} M y se mantuvieron en selección con puromicina/ganciclovir (BME con FCS al 10%; 5-FC ganciclovir 25 μg/ml, preferentemente 10 μg/ml; y puromicina 0.5 μg/ml).

Bibliografía

Scholl *et al*., 2003, J Biomed Biotechnol., 2003, 3, 194-201
US 5.879.924
WO 2005007840
Ivanov *et al*. Experimental Pathology And Parasitology, 4/2000 Bulgarian Academy of Sciences
Ivanov *et al*. Experimental Pathology And Parasitology, 4/6 2001 Bulgarian Academy of Sciences
Fallaux, F. J. *et al*., Hum. Gene Ther. 9: 1909-17 (1998);
Graham, F. L. *et al*., J. Gen. Virol. 36: 59-74 (1977)
Guilhot, C. *et al*., Oncogene 8: 619-24(1993)
WO 98/08489,
WO 98/17693,
WO 98/34910,
WO 98/37916,
WO 98/53853,
EP 890362,
WO 99/05183
Lathe *et al*., 1987, Gene 57, 193-201
Lupton y Levine, 1985, Mol. Cell. Biol. 5, 2533-2542;
Yates *et al*., Nature 313, 812-815
Summers y Sherrat, 1984, Cell 36, 1097-1103
Nunes-Duby, S. *et al*. (1998) Nucleic Acids Res. 26: 391-406
Sternberg, N. *et al*. (1986) J. Mol. Biol. 187: 197-212
Belfort y Roberts (1997) Nucleic Acids Research 25: 3379-3388
Jayaram, Proc Natl Acad Sci U S A. Sep. 1985; 82(17): 5875-9;
Senecoff *et al*., J Mol Biol. Mayo 20 1988; 201(2): 405-21
Panigrahi *et al*., Nucleic Acids Res. Nov. 25 1992; 20(22): 5927-35
Snaith *et al*. Gene. Nov. 21 1996; 180(1-2): 225-7
Caruso *et al*., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7024-7028;
Culver *et al*., 1992, Science 256, 1550-1552;
Ram *et al*., 1997, Nat. Med. 3, 1354-1361;
Wei *et al*., 1994, Human Gene Therapy 5, 969-978
Sorscher *et al*., 1994, Gene Therapy 1, 233-238
Mzoz y Moolten, 1993, Human Gene Therapy 4, 589-595
WO9954481,
WO2005007857,
Mclvor *et al*., 1987, Mol. Cell Biol. 7, 838-848
Tabin *et al*., 1982, Mol. Cell Biol. 2, 416-436

Takebe *et al*., 1988, Mol. Cell. 8, 466-472
EP 06360047.2,
Solicitudes Francesas 94 08300 y 97 05203, publicadas bajo el No. FR2722208 y FR2762615, respectivamente,
Graham y Prevect, 1991, en Methods in Molecular Biology, Vol. 7, p. 109 128; Ed.: E. J. Murey, The Human Press Inc
Lamb *et al.*, Eur. J. Biochem., 1985, 148, 265-270
Mullen *et al.* (1922) PNAS 89, 33
Moolten (1986) Cancer Res. 46, 5276;
Ezzedine *et al.* (1991) New Biol. 3, 608
Erbs *et al*. Cancer Res. 2000. 15. 60: 3813-22
Thomsen *et al*. P.N.A.S. 1984. 81. 3: 659-63

Listado de secuencias

<110> TRANSGENE SA
ERBS, PHILIPPE
KAPFER, MARINA
SILVESTRE, NATHALIE

<120> Estirpes celulares aviares inmortalizadas

<130> 353142 D26692

<150> EP07360030
<151> 2007-07-03

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 1027
<212> ADN
<213> adenovirus

<400> 1

```
ccgggactga aaatgagaca tattatctgc cacggaggtg ttattaccga agaaatggcc      60
gccagtcttt tggaccagct gatcgaagag gtactggctg ataatcttcc acctcctagc     120
cattttgaac cacctaccct tcacgaactg tatgatttag acgtgacggc ccccgaagat     180
cccaacgagg aggcggtttc gcagattttt cccgactctg taatgttggc ggtgcaggaa     240
gggattgact tactcacttt tccgccggcg cccggttctc cggagccgcc tcacctttcc     300
cggcagcccg agcagccgga gcagagagcc ttgggtccgg tttctatgcc aaaccttgta     360
ccggaggtga tcgatcttac ctgccacgag gctggctttc cacccagtga cgacgaggat     420
gaagagggtg aggagtttgt gttagattat gtggagcacc ccgggcacgg ttgcaggtct     480
tgtcattatc accggaggaa tacgggggac ccagatatta tgtgttcgct ttgctatatg     540
aggacctgtg gcatgtttgt ctacagtaag tgaaaattat gggcagtggg tgatagagtg     600
gtgggtttgg tgtggtaatt tttttttaa ttttacagt tttgtggttt aaagaatttt     660
gtattgtgat ttttttaaaa ggtcctgtgt ctgaacctga gcctgagccc gagcagaacc     720
ggagcctgca agacctaccc gccgtcctaa aatggcgcct gctatcctga gacgcccgac     780
atcacctgtg tctagagaat gcaatagtag tacggatagc tgtgactccg gtccttctaa     840
cacacctcct gagatacacc cggtggtccc gctgtgcccc attaaaccag ttgccgtgag     900
agttggtggg cgtcgccagg ctgtggaatg tatcgaggac ttgcttaacg agcctgggca     960
acctttggac ttgagctgta aacgccccag gccataaggt gtaaacctgt gattgcgtgt    1020
gtggtta                                                             1027
```

<210> 2
<211> 26916
<212> ADN
<213> Cairina moschata

<400> 2

aagtaggatg aaatagatta ggtgaccaaa atatctgctt attcagcagg tgttgatcca 120
caggaggttc tacgataaag ctccagtagg agttgtacca gcgtaattcc tggagggcag 180
caataagtcc accatctaca ctccacaaag tctgatcttt aggtacaaag agctgtgctg 240
atctagaatg atgtggttag actgaatctg gctctaaatt tctgttatta gagtattatg 300
tattattaag taagaggcct tgcttcttac tgctgcctaa atgaagatta actttacagt 360
gaagcagagt gagagatgaa ggggtgataa tgtgtttgaa atatcagact taatctggca 420
ggtgataatc agttcattcc aaaaacgtta atgtgctgaa tcagattgac aagaaaatga 480
atcctaatta gttgaaatta atctgaagag aactgaaagt acatcatagc aaatagtaac 540
tcttcttcca catcacaagg aacagattcc actgtgttag tgatggaggt ttatacaaaa 600
aaaaaaaaaa aagaaaaacc agaacagctc ttaatttata tacttattga agcagattct 660
atatatgcat atgtatgcac attcattaat cagcagtaca tctcaaccct taaaagatcc 720
tggagaactg ttgcttgtca aaaagcactc aggttaggct aacatttgca gcttttgctc 780
tagcatacat ttacattagg tgtaaagaca aggaatgtgt aaaagagggt aaatgcattc 840
ctatctacaa tgttatgtat attttgttcc tgttatattg gctttacttc caaagttgta 900
gtttgcagta ttagtttctt tttattggta tccttgcata tatatatatt caataaatga 960
gttatgaatt tcatatttgc atatctgtcc tttttctgaa agtagaactt taaaactgac 1020
acttcagtgc ataaaagcag tgttccctat tgatgttaaa gtacctcgaa agttttacca 1080
gaagacaagt gagtgcatac ttaaagtatg ctacttactt ggtggtaact gcgtatttgt 1140
gcattgttcc tgactttgtg taatgggtaa gttgctttgt atttaccact tgctaataat 1200
gtgaagtggc tggctcacta aaggttgcca ttctcacctt tcaaggactt cttgaaggct 1260
gtgtcataat aatttagagt aagacagata ctgagagcgc agagtgtaat atagttatgt 1320
tgcagaagag cggatagaca caggatgcat gttagaacca tataaatgtg gtgtaaaaga 1380
tcagcaaaac gaagaattgc ttggaagatg cttggttttg tccaaataaa tagctgctga 1440
gagtgagaga gtgagtgagt aatattcagt atttttaaag tgtcgagaaa tgtaatgggg 1500
aaaaatttaa aataaatgtt ttttgtttgt tttaaaagga gctgtgtgct tttatgttga 1560
catgttgatt taattactgc ggtaggtatt tactgtgccc tgggaaacgg tatccccagt 1620
caacacagac ttatttgtca ggaaaaaaat tgtcatagat catcttcaaa taagagttga 1680
caaataatca aatcttgatg gagtataatt attaatactg tgattacata tccatctttg 1740
caagggtttc ctgaaaaggt cagttttaag tcttctattg tcaaatctga tgtttggagt 1800
agttcgctac atggtgtttg atgccatgta aatagttacc agatagacgt tttattttat 1860
gtgctgtatg tttttgtttt tcattcagtc agctggaatc attgaaacag agaaggtttc 1920
tcaagaaata tcctgaacct gttttgtgga tgtcttcatt gcaatagctg gtcactgaaa 1980
tcttggaata acgacagagg aatccatagg cacaggacca aacacctttc attgtcctca 2040
tatagcgtga tgttagggca gagtggtgag tacttcagtg gctcctgtgt ccatgcttta 2100
atgaactcta cttaatctac catatgtaag agacttgcag cacaggcaaa acaagggaag 2160

ttatctttgt gcctagataa tgtaccacat atggtaaaca attttcaagc ctcagagaca 2220
aaagaaggat gctgtaaagt ctcaagtctc agcttgtgtc tctgtttcca cctttctgtt 2280
ctttctgttc agacctctgg gccagtaatt taaactggaa aattaatgga acagagaaac 2340
tgtttgtgag cctatagaaa gatcaaattg tgtcagagta atgttgctcc ttctacaccc 2400
agataaactt tttgagcaga ggagaagcag tgaacagagc tttactttca tgactttgca 2460
taagaaaaca tgggaatgtg gtccgagacc aatttaaaaa tagaggtttt gaaaacttgt 2520
ttggaaaaca aaacttgctt ggaaaaccct attcagagct gtgaatcatt cacagacaac 2580
ctcttagggt tgtagccact catcagctga atatgattca acgatatgct gaaaaaaaaa 2640
aacacaaaca ttgttgtgga atgtatgaac aggaatgtag tctgtaagat gcgtgtcttg 2700
gtccttcttc tttaggtaat agtagaacac ctttctggga aaatggtatc cagctgttgt 2760
aggcactgca ctccatggaa aatgtgaaga aagtggaaat aatccagaga aaagcaatga 2820
gagggatgac aggataaaaa atgagccttg ctttaaggtg atgagagaaa agtgtttttc 2880
aaatctgtaa gagagccaca gagaagaaag aaagaaacag ttctcatcat tgcaggtagg 2940
acaagaaaaa taggtttaag ttgctgcagg aagcctttag cttagacatc agaatgggta 3000
attgtccttg acagtaggaa gaattaagct gtagcatgca cttcctggag aggtcgtgga 3060
atctcaggaa ttaggtttta aagggaatat ttgtaggcat cttttggggc tggtgcaatt 3120
gtaggttgga ggtgctgggg ataaggctaa tggaaatccc taccagccac tctaaggcct 3180
tctgcaagga gtcagaacca cttttcggaa gtaaaactct gtactggcag aggtcctgtg 3240
cttgacctta aggctcagag ccatgcattt ccgttttcat cttttcactt aaaatagcac 3300
ttgtggtagt aataacatgc tcttgcggag tggcacaggt ctgcatggtt atgaactttc 3360
tgtcaccacc cagcaaatgg cattttccac tcttctgttt cagattttcg ggagtacttc 3420
cttactccca aattcctgat tgaatacgac tgaaaacttc aacacgtttt tagtgcacga 3480
agtgtacttt atacaaatgt gtgggactat tgcacacaac ttactgattt tcttcactgt 3540
gtgcacatgt gctctgtgat gatacagagt ttggggtgac tgaactgtta cccagtcttt 3600
accgaattag ggcagcgatc ttaaaccttc atctgaactt ttgctagaga tgatcttcta 3660
ttttgtttag acagggttct ctgcttgctt gcatttgttc taaaacgaca gtctggatga 3720
gaagaaacca accagggctg gcactgccct acctttttatt ccctggatac tttacttggc 3780
acatcacttg gcacacatgc aataccctttt tttcaccccg gtacccaaag aaaagacgtg 3840
ctcctgcaca gactcagcca aattcctgcc tgccagtgga gggcgttaca gaggcttggg 3900
gcagagggag gaaactcact cccaaagcat atactaaaaa taggccaatg cattgcaaac 3960
agctttgctg tgagagcttc cttctggcat gtagccatgc agctgcctta tagttttgag 4020
cctagatacc tccaaaacaa aacaaaaagt cgctaaagtt aaatgcagcc agcagtgctt 4080
atagtcttga taatccctac agtgtatcaa ttttagtttc ttccagagtg caggtagttt 4140
actcaattta acttcaaatg tctgagttac accattgaca ccattgtcaa gactagtgct 4200

ggcaatccct gaagtctgcc aagttcaaag cagggaggag gcctttaaag ttgaaatact 4260
cgggtgacgt gtccaaaaag ttttcctgtg gctttcctgt ggagtaggaa ctgcagtagc 4320
taggttgcaa aaagttttta aactctccaa attgctgcta actaaacatc cttaaatcct 4380
gacatgagag tatgaaatga gaaagtcagt tccttgattt agactagctt gaaaagaata 4440
aacttttgc acaggactcc ctggacagtt gggctggata atagaagtga ttcattcagg 4500
tcttgatgcc tacaagtttc ttgggttttg ccatattttc cagtgatttg tgacatcatt 4560
tttgccctaa aataaatcgc atcatgtcct gccgtatgtt ttgactatga aaatggaggt 4620
ttcggtttga ataccaaact tcgttgttac ttctttcaga ggctgttgat aaaggaaaac 4680
gtgaagcttt tatgtaaatg atcatgattt ctcatttgca tcaagaatat tttccaaaat 4740
agtagttaaa tccctccaat gattttcagc tatgtcacat aaatcaccga aaacacggta 4800
attttgcacg ggtgtttttt ctccctttt ttattgtcta atactcagct tatatttgag 4860
tcttctgtat ccaattacct gatttgtgtg gcaattaaac agaagatcag cgtcattgta 4920
cttcacattc tttttaaact catcagtagt atgaccacac tagttggtct tgtaagtttg 4980
taatttaaga tgtgcctgga aggggttcaa agagacagga gcagtagtgt gtctcacttc 5040
cctttggaaa gcctttctga tactgtcaag caatatttac atcaaaaggg aactgaattc 5100
tggtaaactt ttccagactc caagtaaacc gaacaacctg agatttagat aaaccttggt 5160
ggatttaaaa acttgatggt atcactgtct aagacttgtg ttagcccatc agatattgca 5220
gacgtatatt ttgaggaaag gctttcagtt aattgataaa attaagagca gagttttggc 5280
aaaaaaaacc gccatctctg ctcagtactt catggcatct tgaatttctg cagttagagg 5340
tacaggtgct ctgttctgca attaacccgt gctgttaatt aaaatgtact gtttgctaaa 5400
tatgattagt gtctggagcc aggtagcttg aaaaagcttc aagattattt ctttttacca 5460
ggaccatcaa gtttttagcc ctccctttag aggaaggttc agaggaggtc ctatttaatc 5520
tgtcccagaa gaaaggctat ttctcccctt agaatggggc ttggcagtcc ttttcagagc 5580
acttttcatc cttgtctcat agggattttt aaggacagat ttctgaaagg attttccacc 5640
gggtaaagcg ggatcctgaa tgggtgacag ataatacgta ggaattctgg cttcctactg 5700
ccaggttgtt tatcttgaga tcttaaaaat ggacttattt ccctttttaa gtgtaaactg 5760
agttcttgag gcacctttc cactgaagta tctgactttg cccttactgc ccatctcagt 5820
cttgcacatt taacccaaat tcagatccag ggtgtggtgt tactcctaga acagctctta 5880
ctgtttgagg atctgaatga ctattttgcc agcttgtgcc atacaactcg agaggacctg 5940
caaaggggag gggagtcctg atgggcagtt ccctcccagc ctggcatgcg cttcgtgtct 6000
ccgcttccct tataatctgc ccagaaaaga tttctgaaat acttgagcag ctgccacaat 6060
ctgcatggga ggcagcagcc ttggcatgtg agctctgcca cctgatgccc ggtctgtact 6120
gaggcagtgc cagctggatc tgcaagcctc agcgaataca gccttcgtca gcgagttctc 6180
tgatcagatt gctgccttgg agccttttgc tggtcttcct cagctcttct cctgttactc 6240
agatagcctt accacctcct ctcatcatct tttgagtttc tatcctcacg ttacagccag 6300

gtaagcccat ttacccatgc tgatatcaac aggttccaga ttttttaaaa aacaatcctg 6360
tctggctcac agctagggag cctctagtga cacagctaag tcccctgcag ccatttagaa 6420
atgtttctgg agggatgcag gtacgtcttg cactcaggtg cctaatgaaa gcagattgac 6480
ctgttcattc cttcgaaagc aactaagcaa agtggggaat cccatgtctc tgccccactt 6540
ctgtgttcct gacggcaaga cctcctgcca gcaccaaccg cctgtgtttg gagtcagcca 6600
gccttccgtt ctgactgaag ttgaaggtac agtacaaact gctggctaaa agaagctgct 6660
tgacttgctt ttttaggagg cttgtcttgt ggggaaaaaa aaaaaaagta cagataaatt 6720
ctgctgattc cttctgagtc acccagcagc gatggcaaag ctaggagaaa aaatgggatc 6780
acagagggat tgatgaatgg acagtgagtg acctgaagat ctaactcaaa ggacgttact 6840
tcaagtgcaa gtgtcaacat ataaatgctg agttgttgtc tccaagtacc ccactgttgg 6900
ggtatcctgg ttaccaagca aggttttagt aagtctgttc gaaaagttac atacagctga 6960
cattcatgca ggccatgatt tgccaggcct gagctctgag gtattcctgg acggttagag 7020
aggataaaat aatttagaag tcaggaaacc actcagagac aaaccattat ttataaaatt 7080
attttgcctt ctaaaagatg tgcgttccag agaaatcaca acgttggctc caacctttt 7140
gcatcatcta gctagaaaat gtgcagcttc cagataccgc cagatcacct cccttgaccc 7200
tgccctggaa acatcaatgg ctcccatacc agtaagaaca aaactggtca tctactaaat 7260
ccgttgctga tctcagctaa ccaacttcct gtaatatcag caaatatttc tgcttttgta 7320
aatctgttct tccttccata atggggtgcc agcaggaatg cttgggatcc agaaatgcgc 7380
tggttggcag gaagaacaaa gaaattgttc acccagaagg gcaaaaaagg actaatgctt 7440
tcgtccgctt gggagaagtt gcacagaact tatgccaaca acttttgcac gcaatcagaa 7500
agatgccgct ggatgttact tttaatagca gacgttaata tcagttatta attagaaatg 7560
tcttcagtaa ccagactaaa agcagatcct gaaacactcc tgtggttgaa cagtctcttg 7620
acagacactg cccactgtcc agtaatgtca ggcgctctct gaacttgaca gggcagctgc 7680
tgtttttccc agccttctgg aaataggcca gctctgacat gtttctgata ttagctgggt 7740
gtatttcatt ctgctgccct aggcagtttg ataaaggctc cttcctcctg ctccagagct 7800
aacccaccca aactgtagcc gagcacctcg ctgcaacaaa actgcactcg ctagggttct 7860
gcctgtttgc ttcattaaga tctgcttaaa ttgtttcgta caaaggaaca ctcaaactga 7920
tttctgagcc caaagtagca gtgctaggtg tacatcagga gttgtttggc atgaagaaac 7980
attgccatgg cactgtatga ataaagttat ttttaagaat cattatccct tccttgatac 8040
caagtcttta tgcggcagaa aatcaaactt ggtctccacc cttacagaaa gcagaggaat 8100
gctttcagct gatagttgct taagctagaa tataagaaac catgaatttc tgtgtgcact 8160
gcggcattgc ccttcattcc agacctacag aaaaaaacga cacttttgtt actatttttt 8220
tccttcccat atgagaccag gggagctacc caggcatttc cattcttata attttacctc 8280
aagatcaaat tttctccagg cagttaaagg cagctgcacc cggagacctc gctcagcctc 8340

ccttgcatc ccacggagct gcgtttagtg agaaacctcc cccgaggtga cgggctgcag 8400
gggacccctt cccacacgcg tccccgtccc ttttctcagt gcaaacgcag ccaccgcccc 8460
ttgaaccctc ctccgggctc tctcggttcg gcggaggcag gaggggccg tgcccgccgc 8520
ccgggagctc ctcacagggc ccgggccccg gggcggagcg gccgcggcca tgttgagggc 8580
ggggagcgcg gaaggcggcg ccggggccgc tgcggggcgc ggcgcctccc cgctccccgc 8640
cgctcctcgc cgcccgcagc cgcaacaccg gccccggccc cggcgggccg cgccatggcg 8700
acccccagcc cctgcatcgt ggtgagtgcg ggcccggcgc tgcctcctcg gcctcccgct 8760
gggcccggcg tgcggtgaac ggggaggggg gaggcggctg cggggagccg gcgggggccg 8820
cccgtccccg tggggcgccc cgcgtggcgt ggagtcacct tgaggggctc gggctcccgc 8880
tgccctgcac ggccccgccc ggcccccagc gcccctcctc ggctgccggc tcggtctcgc 8940
ctcctgcccg gtgtcctgcc atggggccgg cggggtgttg gcaatttcgg ggcgctgctt 9000
gggcggctcg cggttgggag agccgcgggt gctgcctcag aaggcgccca gaaataactt 9060
ccaccagaaa taacttccac caggcaccga cccggcgtgg cacaacttcc tattcctgtt 9120
gctcctcaca gcgcgctcgg gaggtcgtgc tccgtgtacc aaaacctgcg agctcagcac 9180
ccgaactggg atgccttttg gaggaagacc ccgctgaggg tgtatttttc atcatcagtg 9240
tgctctgcta agaatccttt ttttttaat tattattttt tttaaaccca gccccgggtg 9300
ccgtgagcgg tagcgtgaca cgcatgtggc gcctcgcggc ccacggccat gcctgccgtc 9360
aggctgtgcc cgcgcgcctg cctgtacttt ctcgctaaaa atccatctgt aaaacccacc 9420
gaacagcccg ctcagtacca aacgtagcct gcaaggctta gtggatgtgc tagatgtagt 9480
tatggggctg aaccgtagga aatttccgta gctgctgaga gggacccagc tcctgacacg 9540
cagcaggtca cgggctcggt gcctggcctg ctgcgagcag gggttgtgca ggggctgctg 9600
tggctgggag ggcaggcctg gctcccggcc aaaatcctca ttaccgcttg cgcaaccaaa 9660
aaacatgtaa acagctggct gatcacaggc aaggtaagtg cttccttggg cactgaaatg 9720
gaagcgtgat ctgcaccggc agcggagctg aggtggatgc ttaccatgcc tgccccgctg 9780
cattgccagc agcaggcttc agtgttcccc acaaacttct ttttacactg agcagccttc 9840
agctgcgtaa ccaacaagtg aagcgattca aaatatattg tcattttcaa gtggcagcgg 9900
ggctaaggtt caggggaagt tttttcttgg tgcttttgga acaatatgcc ctgaaccaca 9960
gcagtggttg tataattacg tacataggca aacccccttgt cctaattaat acactcctgc 10020
taatgttgca agctgtttca tgtggaaaat ctgcccgtgc ggaacaggtt gctgaaacag 10080
ggctttaatt tctgattcta aagatcttga acctccactg tttccagatg gtggtcagag 10140
aaggcttgtt tcataggcac ataacttgtc ccgttaatat agctgtcttg tcttgtattg 10200
acagctggct tgtatgtttt gttgtgattc ggtgttgtgg agatttggaa gatgtccctg 10260
ttacaaggtc tgcttactta gttgcaaagg caggttttgc attacactgc tgaaatcaga 10320
gatgttgaaa agctgaaagc tgcttgatcc ttgtttattt atttattttt aaatgaaata 10380
agattatttg aggtgtagta atttcatttt ccccgctctc caatgggggg aaatgttgtt 10440

agggcttgaa atcatttccc ctccacatcg tgctgagcga cagctcatgt agcatttcag 10500
acaactcttg tgaactgtgg gttgtgcaag cttccacttt gtgctctgtt cagaaggaaa 10560
ataaggtgat cccaactagt gtaatggatt tggtagttta ttgagtaaag caaaggattg 10620
gcagtttctc actacaggct ttctataaga ctttgtagaa atctcacctt atttcctttt 10680
cagattgacg atgatgaaca aggttacgac ctggacttgt tctgcatacc taaacattat 10740
gcagatgatt tggaaaaagt ctatattcct catgggctca tcatggacag gtttgtttga 10800
cttcagacag tacactgctc cagctgattc catgacactg gaaaaaacaa tcttccagtg 10860
atagttttgc tgcctagtga ctgtctaaac agattacatt taattagaga ctaagaaata 10920
cacatgttaa ttaactctct cttgtttggc ttcaaagagt ttgtacattt gcagttacgc 10980
tattgtttgg aaatttgtca attctcaaag aaatttgtgg tacgtagcag tctgtgactt 11040
tctttacagt gtttctttga tgttttactt aaagtaatta gaacacatta cttgttgtgc 11100
tagttcaatc taaaaacagt tatagtctct caaacatctt taggatatta ataagagtag 11160
attattaatc acattatgat aagacttttt catgttcatg tggtagataa ctaacaccca 11220
attttcccct actgtctgcg aaagacatta gcctttgcaa ataccaatct gtcacttgtg 11280
gttgctgaaa tgtatgattt tctctggaag ttttatctcg tgatgagaaa tgggtacatg 11340
aacctataag gtgtttttgt tttactttgt gtaagtaaag tggaggagtt gctggagaca 11400
cagaaccact gaagagcggt tctgagtaga tcttgtgaat aggaatgctt ctagattttg 11460
catggtgctg tttgatcaga ttattacagt atttataata aaatgttttt taactttaca 11520
ctgaaagacc ctatatagga aagcattgga caaagtacag gtcattaagt agctgatgta 11580
aagtttgtaa tggcaggcat tctctgagaa acctgctgtc agctgctata ctgtaaatac 11640
ataccatgct ttctgaatta aattgcaaga taaatttaga aacaatgatc actgaaaaac 11700
tgttcagtgt tctcttgctc tgctttattg gcattatatt ttgcagtcag gacaaattta 11760
ttcagcaaaa cataacgcta tagttgataa tttgagagtt ttcttgctcc tcagttagtg 11820
agagctgttg tctttttggt tgtgctgatt tattttgctc tctgcatgga agctgaacct 11880
atctttggaa gaagaaaaca cccttatgtc tcttatctga cagtaaaaca attcagggtg 11940
ttcagatttg ctttggctga gtatgatgta tgaaaacaaa gaagtttggc agtgttactg 12000
ttagattaac cttggaacgc aaaactttgt tgaccaatag tgggttaaag tgactgaagc 12060
attaggcaaa tatttctgag caaaatatgc ttccgagttt gcatgtgttt gctgttgttg 12120
tttgcaatac aaaatactgc tgccatagta agcaaactaa atgtgttaca acagctaact 12180
ctctttttt ttttttgta taggacagag agactggcac gagaaattat gaagggcatg 12240
ggaggacatc acattgtagc tctctgtgta ctcaagggtg gctataaatt ttttgctgat 12300
ttattagact acatcaaagc actgaacaga aacagtgaca aatcaatccc catgactgta 12360
gacttcatta ggttgaagag ttactgtgta agtatctctg caataccatg caatttttct 12420
gtaaatttga ctaacttcaa attaacaaca gggatgattg agaattgcca acaaatgttg 12480

caaaagcttt gcctaagtac tgcctaaatt gtgctaattt tatacaaata gttaagacaa 12540
ttaaggggaa aaaagcagtc acaagctaac ttgttctttg tctatcttat atgatctggt 12600
ttctttcaga ctttatctcc tcggcccagt aaaatccaga gcaaagagac cctttccatg 12660
tcctttactt cttaaacaat ttcctctctg ccccctgtcc cacctctaaa actgtggttc 12720
tagaataata cagaggatag tcctacaaat cttattacaa aaacttaact ctaggaattt 12780
tcatgtggct tagacatcac tcaccagata ggaaaacttg aaaactgtga gcatggttat 12840
atttgggttc cctacctcat cttttgtttg gctcaactga acaatgaatg gaatgaattg 12900
catttggcca tgaggaaata ctagattcat aaaaacagat ttatggttag cggccactga 12960
atatggtgct acctttttaaa gcctaggtct aggttgcctt ggctttatgc ttttggaaaa 13020
gaatttattt tcattttgca cacaagtatt taactttaca gggaaatgga gcatgaggta 13080
gtatgtaaga tttttataag ggaagcatta gattacattg tgcaggtcaa aggaggaagc 13140
agatgtatgt tagtactgta tgcttcctga ctcagcaaca gcctagtcta gtgttttcaa 13200
gacagtattt gtgggtaatt tagatttttt ccataagatc acctgtagtg tggaaataat 13260
taagtttttt gatttcaatt tacggtgtca aaataaattg cttcttaagg tcatgctgtt 13320
agttctgtgt ctcgatgact gtgttttcca gtcagtagta taagctactt gtcatggttg 13380
tggagtagtg cctgctgcag tagaaaaaaa tagattacta agttggaaac tcaactgcat 13440
tgttcattta attaaaccag agataggggt acttgcagat ttaggttgga ctgtagaaga 13500
gcttcaaaaa tgcgctgctg ctgttgagcg atctgtaaaa atttcacctc gttgagtggc 13560
aaagctcaga ccagtcagag tttggccagg cctgtttgca gaaaagctgt gccagctccc 13620
aaggtgtgtg tgcagtgatg tcctggggct acctggaaac caccgtcatg tctgcagagc 13680
gtgctgcagt gactcagctg cactctttaa agagaaggca aggccaggca gaaagggaca 13740
tgccagcctt tcgttacatc ttgcaagggg agagctgctt gacacacttt gtttctgctc 13800
cccacaaaag attcaggctc cctctaccag tccattcaac cacaaagcca ctacgtgccc 13860
acatacgctg tctgtaaaag ccacaacaga aaggtgaatg tctctattag aggataatat 13920
ttgaaagaat aggaaataac tcccaccttt tttggcgagg aaatttgtat tttctgcttt 13980
cttcaaggaa cacatccaat aactttggtt tatttaaaat ataaggacta caccttctg 14040
ctctctccac cttccgagta acttggaaca agctatggga taagtgttgt gaaacacctg 14100
gaaaaaatac tacattgcaa agcaaggctt attgtacagc atgtttttat tgttcatctt 14160
tatgcattag gcatgtattg gttctgctgc ttttatttttt tacaccgccc ccccaaacta 14220
tagtgctttt atattaatag gaaactgaac agcaaaataa ttacggaagt tttaattctc 14280
tttttgtagt aagaaggagt aaacaaagag aaaagcagag aaatttacac agaaaggagt 14340
gtaagcagaa tgttttccat gaggtgttgg cttcagggtt ttggttttgt cagccaattc 14400
tgtaaaggaa tgttttcttg ttctatatga ccgaggagct ccagttactt gatggcccca 14460
ctagcagatt attacgagca tttcatttct gtcaactctc taaggtagtt attaatatcc 14520
agacttacgt tctttagatt gcataacttg atagactggg taagactgtc ctaacacaaa 14580

catgcgtgta attgattcac ttagttttcc attattaatg gtgctggaat gttaaatctg 14640
ctctgtagtt ttcattcgtg ctttactaaa cggaggagtc agcattctta atgatgggaa 14700
aaccatcaca aaccgtaatg gacagttgaa agtagagcta gctctcttgt gattgttgtt 14760
ggatgcaatt actagatcac gctgcctgcc tttacagact gggtgaaaga tgttaaaaat 14820
accgtcgttg cataaacaaa gcagctgaac tcgtataatg gttctaaaat tgatgcgatt 14880
gatgttctat tcctatttga aattgatcat ttaatatttt caagcttatg ggttatttgt 14940
ttcataatgc aaagttcata ctatgattgc acccaaaaat aattctctaa gaatactgag 15000
atgatgaagc tgtgattaaa tgttgcttat aattcctgct ttcggagtcc ttacaaatga 15060
gttttaatga tctggcaagc tgttaagaaa ttgaaagata gtgtttgtga acagaaccag 15120
atctctgtat tcttgacaaa tagtttattt ttcttgtgct agaagaatgg cttttcacca 15180
gtttcctgca tgtaaagtta gagttaagca aaagttgctt atgtagtcac aaagggcagc 15240
caaaacacaa tggacgtgtt gcattgtcac tcagggaaat agggcttttc ggaggagtac 15300
tgcagcttta aggcaaaatc tagttaggct ggttgagaca gtattctgaa agatctcatg 15360
ttaactgagc cttatagcaa ataccatgag gaacttaaaa tgccttgtca ggggttacga 15420
tcttgcagca tgttattatt ttccagcaat gacaatgagg cagtgaaaac agatctaaac 15480
agtaaatctc taatgtgtta aatcacaaag cattaaagtc ttaccagtac tgaaatcaga 15540
aataatgctc ctgaagataa ttaaagtgtt gcttaattat taaacaaagt tctttccaat 15600
ggaaatctgg ttaaaaccag tgttggaaat ttgttaacca tttttgatcc tttaattgct 15660
cagaaactca gtacctgcat aggcgtgtag gtttatatgc cagcgaaggt ttatgttttg 15720
tgttaaaaaa tgtagcaatt tgcagggtgc ttggtgggaa gaagaagggc agattttgtt 15780
ggttagattg tttttctctg ctgatcagtg tacttgagta tgcataaccc acagggttct 15840
gtagtgatct gtagttctgt gttgttattg tttgattata gtgtgttgct ttgtagccag 15900
agagatcacc aggaaactga tctgcatgca tgtactgaga ggactggtct atcatctgtg 15960
catggtgttt taatggaaca aatatctgta acatctttct ccatcttcct tctgtaagaa 16020
atggtgcttt ttacatcctt ccatggaaaa aggacgaaat tcttattagt gtaggaatag 16080
ataagagaga atcctgcaac ataaacaggg aaaagcttaa agctgtcatt taagataatt 16140
ttaagatatg atgaacgcag gaaatgcccc tcagcattac aaacacggtg cttaactgaa 16200
tcccattttc gtgattaatc taaccagtat ctctggcatt cagtagcagt ctgctgttta 16260
ctgggtcaag cagcagacat tttggacatc ctatttttgg acttttttcaa cacagtggta 16320
ttggttctgt tcactatagt tttctttaaa acatggggta aaactgtaaa ggcgcttttt 16380
ctaatgtgtt gtgcttgcct tttttttaat gttttgtcat gggaatctaa aatagaaagt 16440
atctgttagt ctcgttatct gcttttacat acctagagct gtcagcactt ctttatccta 16500
gagcattgac gtcactgtcc aagggatttt aatacatttt ctctttactg taatcccagt 16560
gtcacttatg gtgtgctcag tgtgtgtttc tctctaaacc atttacccct tttttgcatg 16620

tgataacact tctacttttt gtctgcaact ggtacagtat gaatatgtgt gtcagtgaaa 16680
acaggaagct gtatgtggcc gtctgttccc ctgtggtctc ctctctattg tatctgccat 16740
tttggggcgt ggggaaggaa ctgctctttt gctgcttgtc tgcatggtca tgcagtaagg 16800
ttgggcttca gactgaagcg gcaaaataat aaaggttttc taaagggaag atatgaagtg 16860
aagagctgtg agaatgaagt ttgaaaagtg gtatgaccct tcaaataaat gattaaattg 16920
taggataatg acatcatctg taagtagcac agtaatgagt atagcacaat taataagaac 16980
taggagacaa tgtcaaggtt taaagtcagc tgaatgactt taaataaact gcagagatct 17040
ggaggtaccc caggagttgt ttttaacttt cttatataac aaacagttca ctgatgctta 17100
catcaaagcc tagttttact aaagcaaaat gctgtacttc agtgatagga ttgtgtagct 17160
gtgtcgctgt ttaattacca caatgagtaa tttatcacta tttgtaaaat aggcaaaccc 17220
aagcttttct ggctattctt gtagcttata tttcttgttc ttaatctgtg ccttgtttgc 17280
tggctatttc attgttgtta tgattgctta tttttattca gagtaaggct ttctaaggca 17340
tcaaagttta aaatgtaaat taccagctat atagcagcgt acagcttgga aacttttttt 17400
ttttcctgtt ttccatacct ttaatgaata tgtaggaaat aatatttttt taatatacat 17460
gtgtgtatat ataatggtga cagatgagaa gtggtgcctg tatttatgta aatatttttt 17520
caaacaatct tttatctgaa ataccatctt tcagtttgat tacttgtaat ttcttagtta 17580
atagatgttg ctggtgcaat gcttctgaaa gctttggtat ttgtgggtta tgtactttgc 17640
agttttgata tttattagaa gaaaaattac tttaattctg gtaatactaa tgcttaccct 17700
gctctttctt gctagaatga tcagtcaact ggagatataa aagtcattgg tggggatgac 17760
ctttcaacct tgactggaaa ggtatggcat gtcatatgtt taaagcaacc ccctcccccg 17820
cagaaaaaaa aatcctaaaa aatcctaaaa aaaaacaaaa caaaaccaaa aaaaacaaaa 17880
caaaacaaaa ccaaaaaaaa aaaaaacacc aaagaaccaa ataattagag ttttagaaag 17940
gaaaaaaaaa aaaaaagaaa gaaaactgta gtgtttcatt taaaatttag gttagaggtt 18000
ggacttgatg atcttgaggt ctcttccaac ctagaaattc tgtgattctg tgattctgta 18060
aaatattcac cattgtagag tggtggggtg cataagcccc accagagcca tcagtttagt 18120
ttgaacttca taacatatgt atgtatattc actgtcttca gtatcaggaa gtgttagagt 18180
tgtttttctg cattgcctaa gaatagtctt gtcttggttg ttgttaacaa agtaccttta 18240
aaagagagta gcgttactta ttactgtgtt ggtgtttcat tgcaatagtg aacagagttg 18300
gtactgtcta gacatataac ttgcaggtta gggaataagg gtcctgttac aggcaatgaa 18360
gagacagaaa tgcagagaat gtaaattggg aatctgcttt tcttcagtgg ctgtgtagag 18420
atcattgagc tagatatctg tgggtaaaac atggatgcct cctgttctgt cagaacacat 18480
ggctttcccc ttctgattac acataaacag tctctgtccc atttcagtgt aagtgatgta 18540
ggtgtgacaa gacagtacat aactttatag tatgacattc tctgcattat aagaatttaa 18600
aggccacttt gtactcagca tgagatgttg aggcaagtct cattgtcaac taattgtcat 18660
tagagcatca gaaatgttaa ctaaatagaa ttcactgtta tgtgtcctaa catacataaa 18720

ccatggtaca aatatttaac tgcattgaaa aataaattat taagttatag gagacaatat 18780
atgtaagaaa tgctgtattc tttaaatgct aatggattct tctttttttt tttttctttc 18840
caccagaatg ttttaattgt agaagtaagt attatgtttc actttgaagt tctaacgtgt 18900
gactggcaaa agaccttaaa cagaagttgg ttttaagtca gaaatcctac agtttctggt 18960
ttcaaggttt ttagtttctg actctaggcc tgaattatgc aagtggtctc tgaatttgaa 19020
attacctgtg ttttgaattc tcacatagca ttcaactata ccaaatttaa caaggaaaat 19080
atctgtgtaa aattgcttgc tgtttgcatt tgatttcagt tttctgtgat tctgtcaatt 19140
cttaaatgtc ttttttttt ttttaataat tcttattaag aagtagcctg agcaaagtgg 19200
tactaagtgt gttattgttc tgagtttata acagcaaact aggaaattaa actggagggg 19260
tagaaagaag ttcctagtag gaatatccta aaatacatgg gaaaacagag ctaaggccaa 19320
catctctgtg tacagtttct ttacaggcat ggagaatgtt gattcctaat ttgcattttg 19380
ataatgctta attcccattt ctctatcttg tcgtggttct ttgatactag gtacaataca 19440
cttcagtctg atttcctagt agctactgtt gcttaaatct tgcttccata cctctttgat 19500
gaacgatgtt gcttacattc agtaagtatg acttttacaa aggatgatct agaataagat 19560
cgctaacttg aggttggcaa agcagaagta ctaaacagga aaaatgaatg tatagaagta 19620
ataatgtctt cagactccaa atagtggaaa tggctttgtc cataagctat ggcaactgat 19680
tcagacacca aatgaaagga tgtttccttc tgtcattaaa tgtgtttttt ttatgtacgt 19740
ctttttttaa tttgagaagg ttatattatt ccataggaaa cacttttgac ctaaactgtt 19800
ttagttcagt tctaaaactc ctaccaaact agtatgtata cagcagtcat ctgtgtgacc 19860
ggtggcgtcc tttgaagtgt atttgcttca gataggcaga tgcatttaat tacgtatctg 19920
ctccatttca gatgaatgta tgtcttcaaa gtcccaggca gctaagtagg ttagtttctc 19980
atctgttcag tgaatcatct ctccagtgcc ttatatataa ttatacattg tcaaatatga 20040
acccttttgac cagtcaccgt tttaactgtc aaacaatggg ggaaaacaaa caaacaaaac 20100
caaaaaacat tattataggc accagagcac ttaggttttc catacagaat ccctttgatg 20160
tataaaaaca aacaaacgaa aaagaagaaa agaatcccat ccctttctgt gcaggggatg 20220
ggattaagat ggtgtgtcaa acatcatttt agtgtatata aatagaaact ttagaactgc 20280
acccagatat tgccagtgca gcttctttgt ctttggattt ttttgggtct gtaatgtaag 20340
ttgcacttct ttttccttta attgcattga tgggttgttc tgaatgtttt cccgtcttat 20400
tttctttctg ttgtatacat ctctctctga gttcaactgc aagactaatg ttccatttat 20460
aatactggaa ttaaacaatg tttgtcaaat agctacaagg aacacaagcc ataaactctt 20520
cagagggagc ctagaaggtc atagttcagt aactgctttc aaagtagtag ttatctacag 20580
ttttgactgt tgtgatcact ttactgagca taattgctta agcacaatat agcgttatgt 20640
atcacctgta tttgattatg aacattattt tgtcatattt ttgtgctatt acggatgagc 20700
aatttctgca gtaaaaactt gaaaatgcta ctctgaaaat tttaatattc tcacttacat 20760

gacactttta ttttcaggat ataattgata ctggtaaaac aatgaaaaca ttgctgtctc 20820
tactcaagca gtacaatcca aagatggtga aagtagccag gtaaacttct aaatgtgatt 20880
atttgtgctg tatttcaact tcagaatgac acacagtgga ataaaaatat aatatagaat 20940
atattcccat agaagagaaa caggaaggaa catttctgca ggaatcatac atgatggagt 21000
tagagttcag tatttgttta aactcaactt ctgcttgttg tgggagcata tgttcattaa 21060
ggctaacaga aatgctcttc tttccagtcc tattgcttga aaaatatcag tgccttatat 21120
tctagtaata tttgtggggt tttaccactg atctttaact taggtttaaa agcatatgga 21180
agaatttaaa tattttgggc ataaaaaaac acaacaacct ctcaaggtgg caggggtatt 21240
ttcaacacaa atttagttca taaatataaa ctttataaat ataaagttta actagagatt 21300
gggattaaaa aaaaaagtca gtggttgacg tctatggaca tacagtatct gaacatgttt 21360
cagtttgcaa cttcattttt tttcagtggt gtatctgcaa tggagacctt tggtctgcca 21420
gctttacttg tagaattaaa ttagtttgca ctaaacatta ccgtttatat agagtatata 21480
gtgtagctga gcctcagagg tcattctgtg agtcacccag ccatatgctc ttttaggctt 21540
ttctacttag ttgcatcttt aatcagttag ttatgaaacg ttttctaatt aaataactta 21600
cagttagtaa gaaatgttga gggtaatatt aaccaatatc aacattcctc ctacttcttt 21660
ttaaattgca tcttttatgc tcctatgctg tgattgtgta ttttacaata aaagcataat 21720
gattgctggg gattagagat aaaccagaac tgtgtgtaaa atctaatcag ttgtgttgcc 21780
ataacaatgt caaggcagtt gttagatgta ctagagcagc tcttcttgat gataatgtgg 21840
ggatgacctg ctgaaggtga ggtttttgtt tttttttct ccgtggcctg cttaaatgta 21900
ccagatttta aatatttgtc actgaatagt accttaacgc tacagtgtac atcacaagta 21960
gaatgcagca tgaacaaagc ctagcttccg attgtttaaa cctgttgcag tttgggtctg 22020
ccgaagacct gagcaagtaa gcgtgatcgt gctggatagc tttaagtgtc atgctcttag 22080
ttcacttgcc tttcttttct taattttgtt ttctttctct ctgacaatta agcagttgta 22140
gcagggagat gtgaattaat gctaatgtga ttttgggttg gtttgatcaa gttttatgcc 22200
actactcaaa ttaagactct caactagaag tttcagaaac tgaatgtcta aagacagaca 22260
aatgtcagga tgatggggtc atcttctgaa agtgtgcaac tgaataatga gtgagtcaaa 22320
ttaaactaga aaggtatttc attctgctac agtaccccca actctgcatg tctatgcttt 22380
ttacacctct gactattaat tctgtgaaag tggagctggt ttatatcagc ttatgatcat 22440
caaaaccaat tacattttct gtatgggggt aattagtact accagtggaa aaacagctga 22500
ggacatgttg cacaagtgca attgaggtta catttaacca gctgaacttt tgcttcataa 22560
cactaacgct tttgaaaaga cctcagctgg tctggctaga tcccaagttg tcacctcttt 22620
acctgcgagc taaactgatt gcacctgagg tttctaaaaa cacataaaac ctaattaagt 22680
cacttctggc aatgaaaatc cttccagtaa agtatctcac agcctctttg ctgcaaacat 22740
tttgtttatc ccttaggctg taaaccattc atgattctag gaagttttga gtttgtctat 22800
atgatcagct gcacctgcaa atgaataata tgtttaaaat gtatatagtt atgctgtcaa 22860

ttatacacat gtagtctcac tgaagtggaa ttcagctaat cttcgtgttt catataagtg 22920
aacctggtgt ttttccacgt ttcagtttta cattgttttt atttgacagt ttgttggtaa 22980
aaagaactcc tcgaagcgtg ggatatcggc cagactgtaa gtgacttttt gacacccatt 23040
atcagttttt aaaaatatgt tgtatatatg ttgatgtatt gtgtactctt tggtcaaagt 23100
ccaagggtgt tccaagtaag ttttcatgaa tggtttttga tttattttgc tcttatttgg 23160
gaagtttaaa tatttggaat gtattttgac agagttaata cagatttggt ctagtccttt 23220
ttttcttaac tttttgtggc attttattat acaaaaagga aactttgata ttttagtcca 23280
agttaatccc tcttcatatg gaaattctcc tagcttgcac gttaatcaaa tggtttggtc 23340
agcagaagtg tcatctttga cacttttggg agtgttccag gtgcctaaac atagccaccc 23400
agtgccactc ggatgtcccc agaaatgtaa tgggaccaca cagggtaaca gatctgatca 23460
aagtttacag tggtaagatg ttcaaagtag cacaaacccc atcttgttta agcatctgga 23520
ttactcctgt catgtcttct tgtctgtccc aagaccataa aggaaggaag agcatccaaa 23580
gcacacgggg gtgtcagtga tagcccctct tggcttggaa agggctacgt gtgctatccc 23640
tgtgccagag gttatttcct gttcatgtgg actgtgcgct ttcacaatgg aagtttaaca 23700
gaattgcatc ttctttcccc tcctttccaa gtttgcacag tattcttaaa ttgaaatttc 23760
tcagtgcctt gaaagcttaa ttcaggtgtt tccctcactc gaggatgcct ctctttcctg 23820
agatcttatt atgggtttag ctgggttaac agtctgcctt tctgagcatc ttgcagcaga 23880
tgacttgttt tgccatctgt ccagagacga cctgttcagt gcagaacccg tgagctctga 23940
aggcaagaga caacgcagca gcagagcttg ggcctgcctt ctgtccttgt atcatgaggc 24000
caagtagact ctaaacattg ccttattttt tccagaagcg tacacagtct ttcactggaa 24060
ttgtgtgatt tatctccgtt tttttcatta ctgagcctcg ctgtaaccag ggagagagaa 24120
acagcacagc tcgggagtct ttcatgttta gcataagggg agaaagcctt ctggaaacgt 24180
ccttaggttg tcttacagtg tgtgtggatg gcttggactg atacttcttg actatccaag 24240
gactgttctg ctagagccat gtccacttgg actatctgtg gaacagctga tgtgtttttt 24300
ttaggcagct tctatgggaa aaaaaaaaaa cgaaacaaaa cacaacaaaa aacccgccgg 24360
tttctgaaaa gtgcaagtga caccgtaaat aagagagcgc cttttaccct gtggtcttca 24420
ctattctcta taccaagggc ttggcactta cagcgtgttg ctctgcagag ctgtcccgca 24480
gtcagagtat gtcctggtac accaggttgt tgtccacgag cagccagagg ggagtgaatt 24540
ttgtttggca ctgcctcaaa gacaaaggac tggttccccc gcggtaactc tggttcctcc 24600
tggtgttgac gtgttccatg cttactctcc cagctcttca caaagagccc agttgggctt 24660
gcacacctgt agttttgagg gagctgagag ctgaacctat ctgctcgtta tcccagaggt 24720
gaccttactt atagctgtgc ccaaggcgag ggcacactca cacaggtgcc acctttgaa 24780
taatactgtg agggtgacaa ctaaaacaaa ataaaatgct actgcttggg aaccagtaag 24840
taaatctatt tcattttgtt ttagttgaat taaatcaaca aatagagtta gaccattaac 24900

tagcttgaat attaatctcg ggatacttga atggaagaaa tgaaatgtta tgcttatatg 24960
tctataaaat tctagattct ctctgtaaaa aggtctagtg aactctagga agttcttttc 25020
taacatactg atgacttatg ttctttttca gttgttggat ttgaagtgcc agacaaattt 25080
gttgtgggat acgccctaga ttacaatgaa tacttcagag atttgaatgt aagtaacttt 25140
tcccgtatgt ttttgtccat ttaaaactag ggaggaggaa ggaagggaag tctcctcgca 25200
tcactctttc tcttctgtgt aaatcacagc tcatgtgcaa gcctgttcca ttagtgatgc 25260
aacgacgaga gcaaaggcta gaccagcaca acagtgtttt ggagctcata tgaaactaac 25320
ttttgttttg cttcatgcag aatggaggta ttctgcatga agctgtcagc tttgaaatac 25380
tgtggcagtc tgtatgaagt ttcttatctt accagacata tctgcaagaa acaagtgcat 25440
ttccttagtt acatcaaaat tagagaggag agaccttgga tgttgagatg tttgcatttt 25500
atgctaggtc attattaatt tttcatctgg gtctcactaa ccttataaca gacatagggt 25560
aggagagaga gagaaagtcc agtgttgaga tctgtagaca aaaaaaaaaa gaagctaaag 25620
tttttctgca taaacaatat cacaaggctc ttcggtactg aaatgtgtat agcatgcttt 25680
tatttttttc agaagtgcat tattgaatac atctgtaaac atcatcctac attactttct 25740
aacaggagct ttttattttg ttttgttaca gcatatctgt gtgatcagtg agacggggaa 25800
gcagaaatac aaagcatgaa agcatagttc aagtgctctg atagcagagc tttgaaatgt 25860
tttgtttact gagtcctatc tttcacaggc ttcaactctg gtacaccagc taaaattgta 25920
gaattatcca ccccccttgt catatgctta ctataactta ttgcatgtac aatatacaaa 25980
tcttgtcttg ttcatttata ttttagaaat gtaaacaatt agtgcaattc tgcactcctt 26040
attttgattt gcactatgac tctaccgact attgctgccc ctggttgggt tgtgctgttt 26100
gtgagctccg gagtctaact cttgcagtgg taaattgctt aaacctcatc aacccagaac 26160
tgaaatagtt caagtactgt aaatgtaaaa cactttatga tagggaagtc tattagtaat 26220
atttttaaaa tctgtaattt aagttttata ttttcatgaa caagtgtgat tgtgattaat 26280
ggatagttgc acctttgggt gttataaaac atgaggagca gccagttaca gtatctgtaa 26340
tcaccaagga gctgattcaa gcctcctgga gttgccttat cgctgtaaaa gtccgggtaa 26400
aaaaaatctt tttttttta attttttta ttttttgagc taaaaggaga tggaatgaca 26460
aagcagaatg tttaaaatct agtttaagtt gagctattca tttcttttgg attttttctt 26520
taaaaatacc catcagacag tgaaattgcc ttttaaattt aaacaatttt aatatatttt 26580
tgaagaagta ttgtaatgtt tactttataa gatctaaaaa acaaaaagta ctttaaataa 26640
aggctgtctc tttaaaataa gccccataca tctatgccac tcattctgta tattaaagtg 26700
ctcttgaaat tttcttagta atatttttca taagtgtttc tgacagtgaa ggcagactct 26760
acgtttgtta tctttgtaga gcctttagtc agtattgtgc catctacaag agatgataaa 26820
ggcctgaggg aaagctatcg aaatacttgc gtattctata accaaactgg atttcagaga 26880
aaatgcacta agtagtgtcc cgtattctgt tttggc 26916

<210> 3
<211> 3915
<212> ADN
<213> Cairina moschata

<400> 3

atggcgggcg cggagccctt cggcgccgtg ctgggcgccc tgcgggactg ctacgcgcag 60
gcggccccgc tggagacctt cctccggggg ctgggggaga gcggcgccga ggaagccgag 120
gtggtgcggg acgacgacgc cgcctgctac cgcaccttcg tgtcccagtg cgtggtgtgt 180
gtcccccacg gcgcccgcga catcccccgg cccttcagct tggagcagtt atctagtcag 240
agcgaagtca tctcaagagt catgcagagg ctgtgtggga aaaagaagaa gaacatcctc 300
acatatggat actccttgct ggatgaaaac agttctcact tccaaatcat gccgctctca 360
aacgtgtaca gctacctgcc caacaccgca acagaaacca tgcgtatcag tggcctctgg 420
gaaacgctgc tgagcaggat aggggatgac gtgatgatgt atttattgga gcactgtgca 480
atctttatgc tggttccccc tagtaactgt taccaagtct gtgggcaacc aatttatgaa 540
cttatttcgc aaaatgtaga atcagcccca gcgtttgtta aacaacggct ttcaaagcac 600
aaacgtagta gcttgcttaa gtatacgcag aaaaggctaa cgtttcacag acagtatctt 660
tcaaagtcac gtcagtcgaa acgcaggcaa agacttgaag ctaatgtctc cagcatgaga 720
aataaaacca gcaataatat acaaagccta gggtccgctg ctctggaaaa acagagtagc 780
tccaatgcag gtttgtcagc tacagcacca tccttaaaaa ggaagcttgc tagggaacaa 840
ctggaagtca cggctaagag agcaagatta gaagagaaag agagggagga acaggcttgt 900
aatactgctc ctaatgtaaa ccagagtatt cccaagaggt atggaaccag ctgtgtagca 960
tcacgttctg taagtcttat taaagaaaaa tacatttctc aaagaagtaa cagtgatatg 1020
tctcgtcctt ctttagttca caattctcat catgggaaga agtctgtggc agacaaaagc 1080
tctttcctgc aaggagctga gagtaacaga catttaaagc ccagcattga aatgcaagca 1140
ggatccagca ggaagagagt agagatacac aggcctatac ctcggttgga ttggatacca 1200
atcgaaccgg cggaaagtag ttcttcagga cacaaaaagc aggaaagtcc cctagctcat 1260
ctggcagagg agttaccaaa tagggttttg ccatctacaa tatacattga caggaagttt 1320
cttctgtatt ctcgcaggta ctgggggggaa cgtttcccaa aatccttcct attgaatcgc 1380
ctgaagggta gtgaggcagg tgtaaagcga ctaatagaaa cgatattctt aagccaaaat 1440
ccgtttgggc aaaagcgcaa ccaaggtctg ccacagaaaa aatggagaaa gaagaagctt 1500
cccaaacgct tctggagaat gagaagtacg tttcaaaaac tcttaaagaa tcatggaaag 1560
ttcccttacg tagctttctt gagacaaaat tgccctcttc ggatatctga aaccattttg 1620
ggaaaagcca agctgctcag tcgggcacct ttgcctgggc aagcagaggc tcacaagcaa 1680
gcagaacagc ttgggaagga gcctgctaag cgtgtggcaa gcagcagatg cgaatctggt 1740
cacaccaacg tgcccagcag cgtacgcgct cctctcgcag catctgcgtg cgtggagcca 1800
ggggggggagg agcagatccc tgcagaggcg tctgattcag tcctcaggga gcttctcaag 1860
gagcactgca gccacttcca ggtgtacctc tttgtgaggg agtgcgtgga gcgggtgatc 1920

cccgccgagc tctggggttc aaaccataac aagcgccggt tcttcaagaa cgtgaaagca 1980
ttcatttcca tggggaagta cgctaagctt tccttgcagg tgttgatgtg gaagatgaga 2040
gtaaatgact gcatgtggct tcgtctggcc aaaggtaatc actttgttcc tgcctctgaa 2100
caccgttacc gtgaagaaat tttggctaaa ttcctatact ggctgatgga tacgtatgtt 2160
gttgagttgc tcagatcatt tttctatatc accgagacca tgttccagaa aaatatgctt 2220
ttctactacc gaaagtgtat ttgggccaag ttacaggaca ttggaattag aaagcatttt 2280
gccaaagtac agctacgtcc tttaactgca gaggagatgg aagcgatcca tcagaaaaaa 2340
taccttccta tggcatcaaa gctccgtttc attcccaaag tcagtggact aagacccatc 2400
gtcagaatga gcggtgttgt tgaagcacaa acgttgagca aggaaagcag agcaaagaag 2460
atgaatcact acaacatgca actgaaaaat ctatttagtg tgttaaatta tgaacgaact 2520
ataaacacca gttacatcgg ctcttcagtg tttgggagag atgatatcta caagaagtgg 2580
aagacatttg ttaaaaaggt tcttaaatca gatggtgaaa ttcctcattt ctactatgta 2640
aaggccgatg tgtccagggc ttttgatagc attcctcacg ataaacttgt ggaagtgatt 2700
tcacaggtct taaaacctga gaaaaaaact gtctactgca tacggcgcta tgcagtggtt 2760
atgatcactg gaagtggaaa aaccaggaag ttatacagga gacatgtttc tactttcaag 2820
gattttatgc cagacatgaa gcagtttgtg tcccggcttc atgagagtac ctcattgcga 2880
gatgcaataa tagttgaaca gagcttaact ttcaatgaga caagtgccag tctatttaat 2940
ttttttcttc aaatgctaaa taataacatc ctggaaattg agcgcagcta ctacttacag 3000
tgctctggaa ttccacaggg ctccctttg tcaaccttgc tttgcagctt gtgctatgga 3060
gacatggaaa acaaattatt cagtggggta cagaaggatg gagtcctgat ccgtctcatt 3120
gatgactttt tgcttgttac accacactta acgcatgcaa gaactttcct aaggactcta 3180
gcaatgggca ttcctgagta tggctttttg ataaacccca aaaagacggt ggtgaatttt 3240
tctgttgacg atatcccaga gtgttccgaa tttaaacagc tgccaaactg tcgtttgatc 3300
ccatggtgtg gcttattatt ggatacacag acacttgagg tttactgtga ttactccagc 3360
tattcctgta cttctatcag atcaagtctt tccttcaatt caaacagaac agctgggaaa 3420
aacatgaaac acaaattggt tgcagtcctt aaactgaaat gccatggctt gtttcttgat 3480
ttacagatca atagcgttaa aacagttttc attaatgtct acaagatatt tttacttcag 3540
gcttacaggt tccatgcctg tgttattcaa cttccattca accagaaagt taggaacaat 3600
cctgatttct tcctcagagt catcgctgag aatgcatcgt gctgctattc tatgctgaaa 3660
gctaaaaatc cagggtttac tttaggtaac agaggtgcat ctggcatgtt cccttctgag 3720
gcagcagagt ggctctgcta tcatgccttc actgtcaaac tgtcaaacca caaagttgtt 3780
tacaaatgct tgcttaagcc cctgaagttc tgtatgacac agctattccg gaagatccca 3840
aaggatacta aggcactact gaagacagtg acagaaccat ctatttgtca agatttcaaa 3900
gctatcctgg actga 3915

REIVINDICACIONES

1. Célula aviar inmortalizada y células que derivan de dicha célula, caracterizadas por que dicha célula es obtenida mediante una transfección estable con un vector no vírico que comprende una secuencia de ácido nucleico de E1A y una secuencia de ácido nucleico que codifica una transcriptasa inversa de la telomerasa recombinante, en las que dicha célula no comprende una secuencia de ácido nucleico de E1B.

2. Célula inmortalizada según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de ácido nucleico de E1A se inserta en el gen de HPRT endógena de dicha célula aviar.

3. Célula inmortalizada según la reivindicación 2 en la que dicha secuencia de ácido nucleico de E1A está unida funcionalmente al promotor de dicha HPRT endógena de la célula.

4. Célula inmortalizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha secuencia de ácido nucleico de E1A incluye la secuencia que codifica los dos ARN principales 13S y 12S.

5. Célula inmortalizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la que dicha célula deriva de un animal que pertenece a la familia Anatidae, preferentemente dicho animal pertenece a la especie *Cairina moschata* o la especie *Anas platyrhynchos*.

6. Célula inmortalizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha secuencia de ácido nucleico de E1A presenta una identidad de secuencia de ácido nucleico de por lo menos 60%, preferentemente por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90% respecto a SEC ID nº: 1, todavía más preferentemente dicha secuencia de ácido nucleico de E1A es como se expone en SEC ID nº: 1.

7. Célula inmortalizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha secuencia de ácido nucleico que codifica una transcriptasa inversa de la telomerasa recombinante presenta una identidad de secuencia de ácido nucleico de por lo menos 70%, más preferentemente por lo menos 90%, y más preferentemente por lo menos 95% respecto a SEC ID nº: 3, todavía más preferentemente dicha secuencia de ácido nucleico que codifica una transcriptasa inversa de la telomerasa recombinante es como se expone en SEC ID nº: 3.

8. Célula inmortalizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una sustancia de interés.

9. Célula inmortalizada según la reivindicación 8, en la que dicha sustancia de interés es una proteína farmacéuticamente activa.

10. Célula inmortalizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que comprende además un casete de complementación que permite la propagación de un virus defectuoso.

11. Utilización de una célula inmortalizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la replicación de un virus, preferentemente para la replicación de un poxvirus, un adenovirus, un retrovirus, un herpesvirus, un alfavirus, un espumavirus o a partir de un virus asociado a adenovirus.

12. Utilización según la reivindicación 11, en la que dicho virus es seleccionado de entre el grupo que consiste en virus de viruela vacuna, virus de la ectromelia, virus de la viruela de los simios, virus vaccinia, virus de la viruela y MVA.

13. Utilización de una célula inmortalizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la producción de una sustancia de interés.

14. Utilización de una célula inmortalizada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la producción de un virus.

15. Utilización según la reivindicación 14, en la que dicho virus es un poxvirus o un virus vaccinia, preferentemente un MVA.

16. Utilización según la reivindicación 14 o 15, en la que dicho virus es un virus recombinante que comprende una secuencia exógena insertada en su genoma, en la que dicha secuencia exógena es seleccionada preferentemente de entre un gen suicida, un gen que codifica una ribozima, un gen que codifica un ARN antisentido, un gen que codifica un antígeno asociado a tumor (TAA), y un gen que codifica un antígeno.

17. Procedimiento para inmortalizar una célula aviar que comprende la etapa de transfectar de manera estable dicha célula con un vector no vírico que comprende una secuencia de ácido nucleico de E1A y una secuencia de ácido nucleico que codifica una transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) recombinante, en el que dicho procedimiento no comprende una etapa de transfectar dicha célula con una secuencia de ácido nucleico de E1B.

18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que dicho vector comprende dos secuencias homólogas a las secuencias presentes en dicho genoma celular, estando dichas secuencia de ácido nucleico de E1A y secuencia de TERT recombinante rodeadas preferentemente por dichas secuencias homólogas.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que dicho vector comprende además un primer marcador de selección en el que dicho primer marcador de selección es un marcador de selección positivo y en el que dicho primer marcador de selección está rodeado por dichas secuencias homólogas, estando dicho primer marcador de selección rodeado preferentemente por las secuencias que permiten su supresión.

20. Procedimiento según la reivindicación 18 o 19, en el que dicho vector comprende un segundo marcador de selección que no está rodeado por dichas secuencias homólogas, en el que dicho marcador de selección es un marcador de selección negativo.

21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, en el que dicho vector comprende un tercer marcador de selección en el que dicho tercer marcador de selección es un marcador de selección negativo y en el que dicho tercer marcador de selección está ubicado entre las secuencias que permiten la supresión del primer marcador de selección.

22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, caracterizado por que comprende además una etapa en la que dichas células son cultivadas en un medio que permite únicamente el crecimiento de las células que han incorporado el primer marcador de selección.

23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 caracterizado por que comprende además una etapa en la que dichas células son cultivadas en un medio que no permite el crecimiento de las células que han incorporado el segundo marcador de selección.

24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, en el que dicho procedimiento comprende además una etapa que consiste en excluir el primer marcador de selección del genoma de dicha célula.

25. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que las células, obtenidas tras dicha etapa que consiste en excluir el primer marcador de selección del genoma de dichas células, son cultivadas en un medio que no permite el crecimiento de las células que comprenden el tercer marcador de selección.

26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, en el que dicha célula es tomada de un organismo que pertenece a la familia Anatidae, preferentemente a la especie *Cairina moschata* o la especie *Anas platyrhynchos*.

27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26, en el que dicha secuencia de ácido nucleico de E1A es insertada en el gen de HPRT de dicha célula.

FIGURA 1

Inserción aleatoria

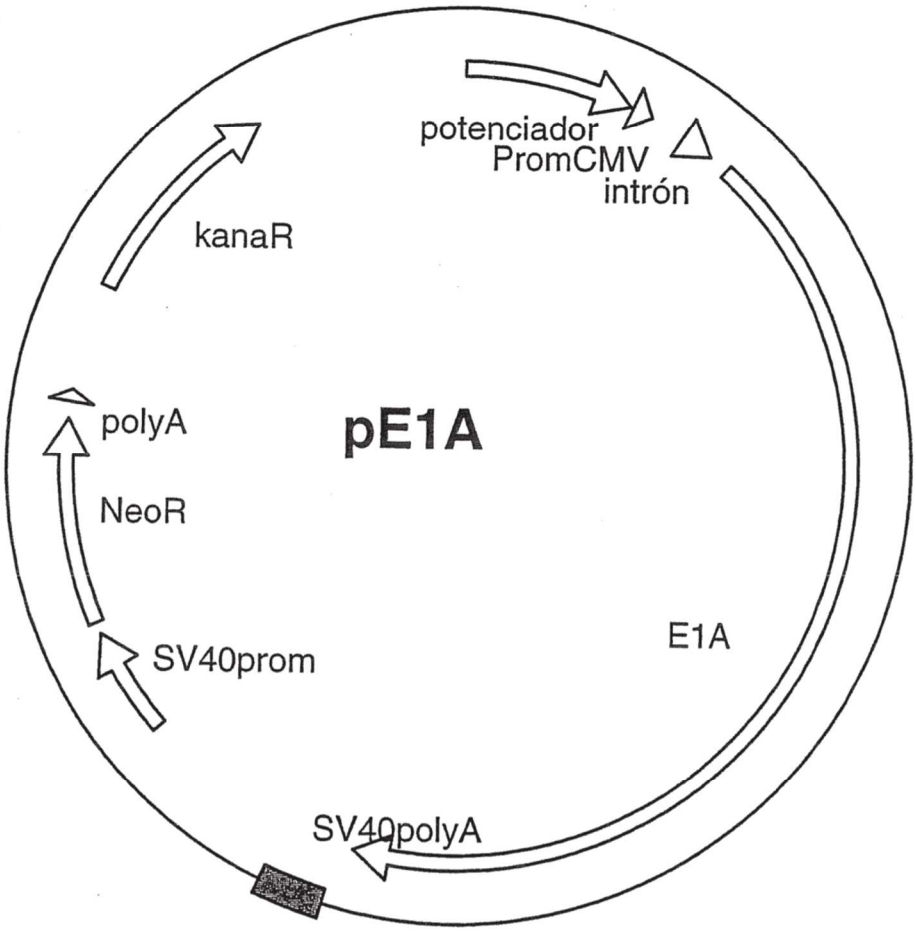


FIGURA 2

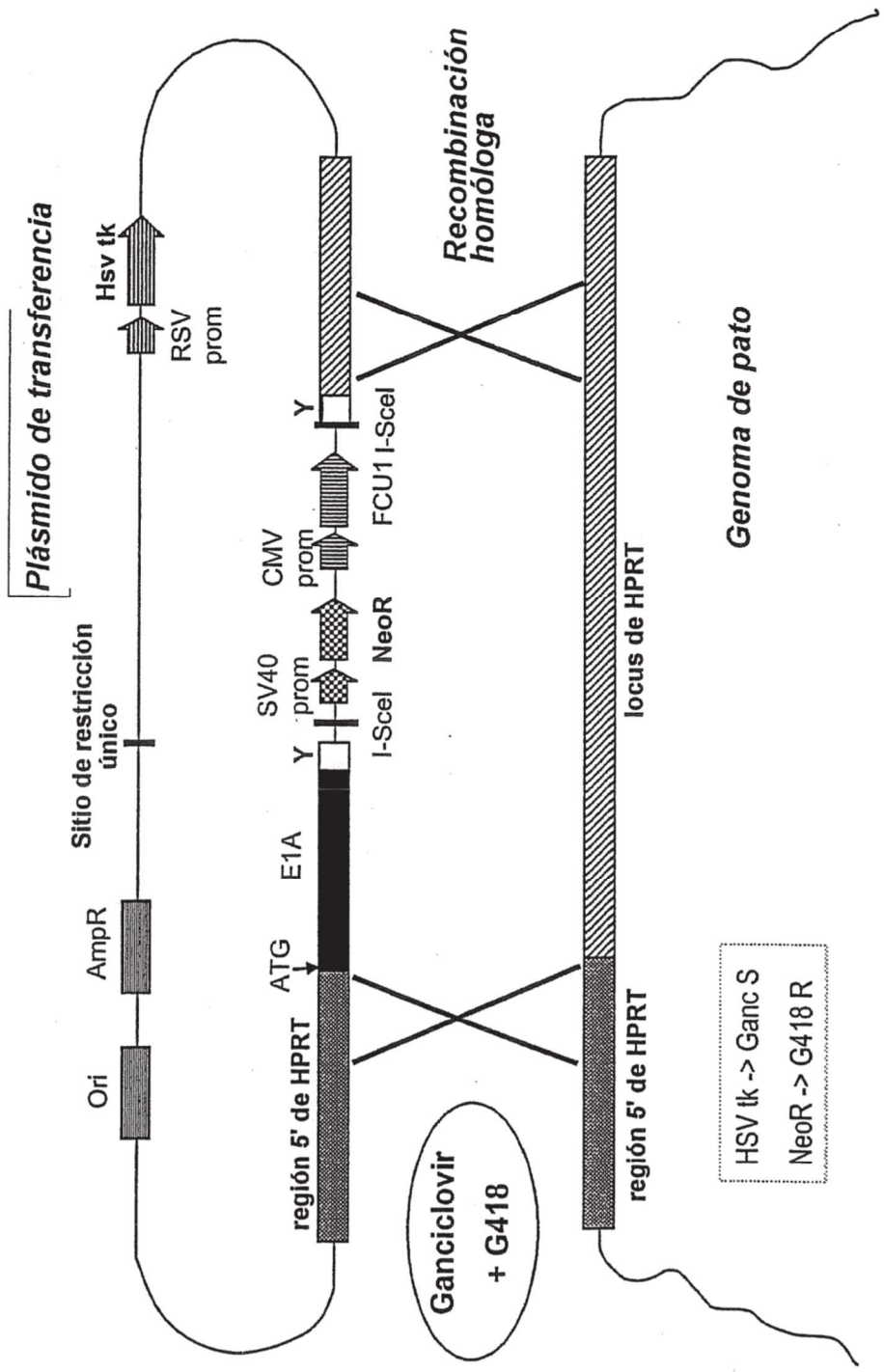

Plásmido de transferencia
Hsv tk
RSV prom
Sitio de restricción único
AmpR
Ori
ATG
E1A
Y
I-SceI
SV40 prom
NeoR
CMV prom
FCU1
I-SceI
Y
región 5' de HPRT
Recombinación homóloga
Ganciclovir + G418
locus de HPRT
Genoma de pato
región 5' de HPRT
HSV tk -> Ganc S
NeoR -> G418 R

FIGURA 3

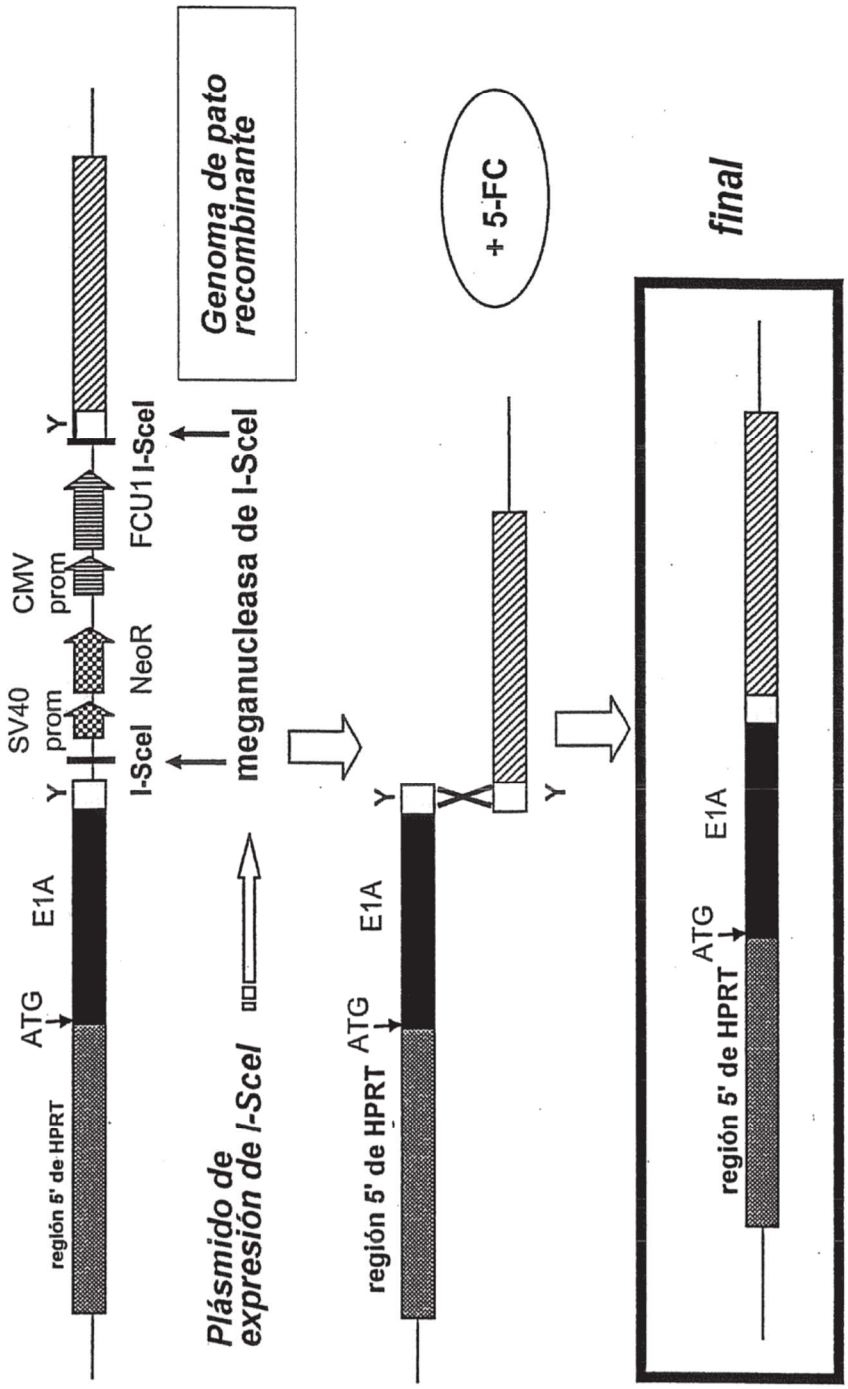
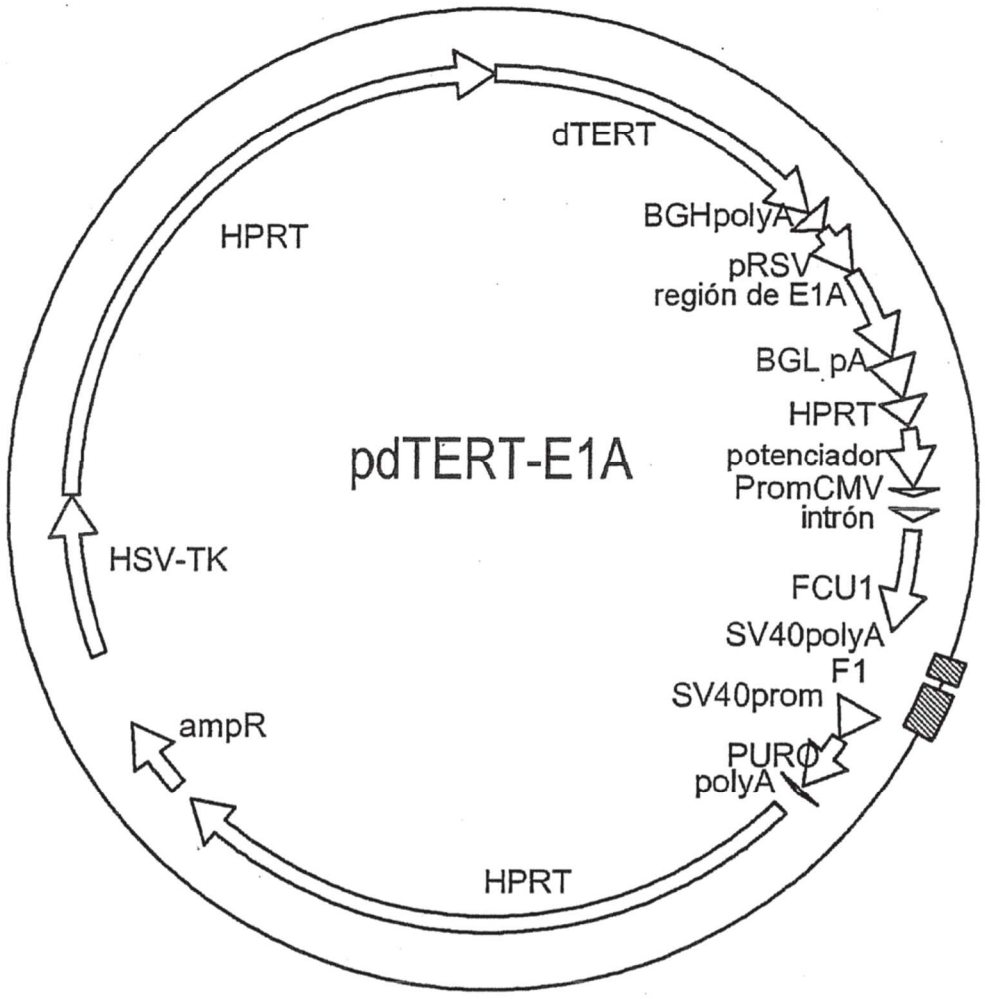

Genoma de pato recombinante
meganucleasa de I-SceI
I-SceI
FCU1
I-SceI
CMV prom
NeoR
SV40 prom
Y
E1A
ATG
región 5' de HPRT
Plásmido de expresión de I-SceI
+ 5-FC
final

FIGURA 4

Inserción dirigida