

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 018**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/15 (2006.01)

A61K 39/17 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2006 E 10173295 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2251034**

54 Título: **Virus quiméricos de la enfermedad de Newcastle que presentan proteínas de superficie no naturales y sus usos**

30 Prioridad:

02.12.2005 US 741833 P

22.05.2006 US 802864 P

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

16.05.2018

73 Titular/es:

**ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI
(100.0%)**

**One Gustave L. Levy Place
New York, NY 10029-6574, US**

72 Inventor/es:

**PALESE, PETER y
GARCIA-SASTRE, ADOLFO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 668 018 T3

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

DESCRIPCIÓN

Virus quiméricos de la enfermedad de Newcastle que presentan proteínas de superficie no naturales y sus usos

1. Campo de la invención

5 La presente descripción describe virus quiméricos de ARN de cadena negativa que permiten que un sujeto, por ejemplo, un ave, sea inmunizado contra dos agentes infecciosos usando un único virus quimérico descrito en este documento. Por ejemplo, se describen en este documento virus de la gripe quiméricos diseñados para expresar e incorporar en sus viriones una proteína de fusión que comprende un ectodominio de una proteína de un agente infeccioso y el dominio transmembrana y citoplásmico de una proteína del virus de la gripe. Dichos virus quiméricos inducen una respuesta inmune contra el virus de la gripe y el agente infeccioso. La presente invención se refiere de forma general a virus quiméricos de la Enfermedad de Newcastle (NDV) diseñados para expresar e incorporar en sus viriones una proteína de fusión que comprende el ectodominio de una proteína de un agente infeccioso y el dominio transmembrana y citoplasmático de una proteína NDV. Dichos virus quiméricos inducen una respuesta inmune contra NDV y el agente infeccioso.

2. Antecedentes de la invención

15 Se han modificado genéticamente varios virus de ADN para dirigir la expresión de proteínas heterólogas en sistemas de células hospedadoras (por ejemplo, virus vacuna, baculovirus, etc.). Recientemente, se han realizado avances similares con virus de ARN de cadena positiva (por ejemplo, poliovirus). Se cree que los productos de expresión de estos constructos, es decir, el producto génico heterólogo o el virus quimérico que expresa el producto del gen heterólogo, son potencialmente útiles en formulaciones de vacunas (vacunas de subunidades o virus completos). Un inconveniente del uso de virus, tales como vacuna, para construir virus recombinantes o quiméricos para usar en vacunas es la falta de variación en sus epítomos principales. Esta falta de variabilidad en las cepas víricas impone limitaciones estrictas sobre el uso repetido de vacunas quiméricas, ya que las vacunas múltiples generarán resistencia del huésped a la cepa de modo que el virus inoculado no pueda infectar al huésped. La inoculación de un individuo resistente con vacuna quimérica, por lo tanto, no inducirá la estimulación inmune.

25 Por el contrario, los virus de ARN de cadena negativa son candidatos atractivos para construir virus quiméricos para su uso en vacunas. Los virus de ARN de cadena negativa, por ejemplo, la gripe, son deseables porque su amplia variabilidad genética permite la construcción de un vasto repertorio de formulaciones de vacunas que estimulan la inmunidad sin riesgo de desarrollar una tolerancia.

2.1 Virus de ARN de cadena negativa

30 Las familias de virus que contienen ARN monocatenario con envoltura del genoma de sentido negativo se clasifican en grupos que tienen genomas no segmentados (Paramyxoviridae, Rhabdoviridae) o aquellos que tienen genomas segmentados (Orthomyxoviridae, Bunyaviridae y Arenaviridae). Las familias Paramyxoviridae y Orthomyxoviridae se describen con detalle a continuación y se usan en los ejemplos de este documento. La familia Paramyxoviridae contiene los virus del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus parainfluenza, el virus Sendai, el virus simio 5 y el virus de la parotiditis. La familia de Orthomyxoviridae contiene los virus de la gripe, los tipos A, B y C, así como los virus Thogoto y Dhori y el virus de la anemia infecciosa del salmón.

2.1.1 Virus de la gripe

40 Los viriones de la gripe comprenden un núcleo de ribonucleoproteína interno (una nucleocápside helicoidal) que contiene el genoma de ARN monocatenario, y una envoltura externa de lipoproteína forrada por una proteína de matriz (M1). El genoma segmentado del virus de la influenza A consta de ocho moléculas (siete para la gripe C) de ARN monocatenarios lineal de polaridad negativa que codifican diez polipéptidos, que incluyen: las proteínas ARN polimerasa dependientes de ARN (PB2, PB1 y PA) y nucleoproteína (NP) que forman la nucleocápside; las proteínas de membrana de matriz (M1, M2); dos glicoproteínas de superficie que sobresalen de la envoltura que contiene lípidos: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA); la proteína no estructural (NS1) y la proteína de exportación nuclear (NEP). La transcripción y la replicación del genoma tiene lugar en el núcleo y el ensamblaje ocurre a través de gemación en la membrana plasmática. Los virus pueden reordenar genes durante infecciones mixtas.

50 El virus de la gripe se adsorbe a las células a través de la actividad de unión de HA a los sialiloligosacáridos en glicoproteínas de la membrana celular y glicolípidos. Después de la endocitosis del virión, se produce un cambio conformacional en la molécula de HA dentro del endosoma celular que facilita la fusión de la membrana, lo que desencadena la desnaturalización. La nucleocápside migra al núcleo donde se transcribe el ARNm viral. El ARNm viral se transcribe mediante un mecanismo único en el que la endonucleasa viral escinde el extremo 5' terminal de los ARNm heterólogos celulares que a continuación sirven como cebadores para la transcripción de plantillas de ARN viral por la transcriptasa viral. Las transcripciones terminan en sitios de 15 a 22 bases desde los extremos de sus plantillas, donde las secuencias de oligo (U) actúan como señales para la adición de trectos de poli (A). Los transcritos de ARN viral luego migran a la membrana celular y se asocian con las proteínas virales transmembrana recién transcritas. NA luego escinde los restos sialy de los restos de carbohidratos de las glucoproteínas unidas a la

5 membrana, dando como resultado la encapsulación y la liberación celular del virus de la progenie. De las ocho moléculas del ARN viral así producidas, seis son mensajes monocistrónicos que se traducen directamente en las proteínas que representan HA, NA, NP y las proteínas de la polimerasa viral, PB2, PB1 y PA. Las otras dos transcripciones se someten a corte y empalme, cada una produciendo dos ARNm que se traducen en diferentes marcos de lectura para producir M1, M2, NS1 y NEP. En otras palabras, los ocho segmentos de ARN viral codifican diez proteínas: nueve estructurales y una no estructural. Un resumen de los genes del virus de la gripe y sus productos proteicos se muestra en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Segmentos de ARN del genoma del virus de la gripe y asignaciones de codificación^a

Segmento	Longitud ^b (Nucleótidos)	Polipéptido Codificado ^c	Longitud ^b (Aminoácidos)	Moléculas Por Virión	Comentarios
1	2341	PB2	759	30-60	componente de ARN transcriptasa; unión de la tapa del RNA de la célula huésped
2	2341	PB1	757	30-60	componente de ARN transcriptasa; inicio de la transcripción
3	2233	PA	716	30-60	componente de ARN transcriptasa Hemaglutinina; trímero;
4	1778	HA	566	500	glicoproteína de envoltura; media la unión a células
5	1565	NP	498	1000	Nucleoproteína; asociado con ARN; componente estructural de ARN transcriptasa
6	1413	NA	454	100	Neuraminidasa; tetrámero; glicoproteína de la envoltura
7	1027	M1	252	3000	Proteína de la matriz; líneas dentro de la envoltura
		M2	96	?	Proteína estructural en membrana plasmática; ARNm empalmado
8	890	NS ₁	230		Proteína no estructural;
		NEP	121	?	Proteína de exportación nuclear; ARNm empalmado

^a Adaptado de R.A. Lamb y P.W. Choppin (1983), Annual Review of Biochemistry, Volumen 52, 467- 506.

10 ^b Para la cepa A/PR/8/34

^c Determinado por enfoques bioquímicos y genéticos

^d Determinado por análisis de secuencia de nucleótidos y secuenciación de proteínas

15 La patogenicidad de los virus de la gripe está modulada por múltiples virus y factores del huésped. Entre los factores del hospedador que combaten las infecciones virales, el sistema de interferón tipo I (IFN α/β) representa un poderoso mecanismo de defensa innato antiviral que se estableció relativamente temprano en la evolución de los organismos eucarióticos (García-Sastre, 2002, Microbes Infect 4: 647- 55). El sistema antiviral IFN α/β implica tres pasos principales: (i) detección de la infección viral y secreción de IFN α/β , (ii) unión de IFN α/β a sus receptores e inducción transcripcional de genes estimulados por IFN α/β , y (iii) síntesis de enzimas y proteínas antivirales. La mayoría de los virus, sin embargo, han adquirido información genética específica que codifica moléculas antagonistas de IFN α/β , que bloquean eficazmente una o más etapas del sistema de IFN α/β antiviral. Los virus de la gripe A expresan una proteína no estructural en células infectadas, la proteína NS1 (descrita en detalle, más adelante), que contrarresta la respuesta celular de IFN α/β (García-Sastre et al., 1998, Virology 252: 324-30).

2.1.1.1 Gripe aviar de alta patogenicidad

En los últimos años, se han notificado brotes de gripe aviar altamente patógena (IAAP) en Asia y Europa (Kawaoka et al., 2005, Natl. Rev. Microbiol. 3:591-600; Koopmans et al., 2004, Lancet 363: 587 - 593). Los brotes que involucran al virus de la gripe A, subtipo H5N1 o H7N7, causaron infecciones letales en aves de corral domésticas y la muerte de un número limitado de casos humanos (Tweed et al., 2004, Emerg. Infec. Dis. 10:2196-2199). Los virus H5N1 actuales han estado circulando entre las aves de corral dentro de China en los últimos años (Chen et al., 2005, Nature 436: 191-192), y mientras que las aves migratorias se consideran el principal reservorio de estos virus, se cree que la transmisión de las aves infectadas de vuelta a las aves migratorias ha contribuido a su mayor distribución geográfica. Actualmente, el virus H5N1 ha surgido de Asia, extendiéndose por Europa y África (Enserink, 2006, Science, 311: 932). El sacrificio al por mayor de aves de corral ha demostrado ser una estrategia exitosa para erradicar los brotes de H5N1 en Hong Kong en 1997 y en los Países Bajos en 2003 (Lipatov et al., 2004, J. Virol. 78:8951-8959). Dado que las víctimas humanas de brotes recientes de gripe aviar altamente patógena han tenido contacto cercano con aves infectadas, se deduce que la prevención de la transmisión interespecie del virus de la gripe aviar (AIV) puede lograrse mediante la erradicación del virus de la gripe aviar en aves de corral a través del sacrificio. Sin embargo, por razones económicas y prácticas, la destrucción de las aves de corral infectadas en solitario ya no se considera el método de elección en el control de esta enfermedad. Además, por razones éticas y ecológicas, el sacrificio de aves silvestres migratorias se considera una práctica inaceptable. Recientemente, la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) y la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) recomendaron que se considerase la vacunación de aves de corral para el control de AIV. Además, se ha informado que la vacunación de pollos con la vacuna H5 inactivada tuvo éxito en la interrupción de la transmisión del virus en un estudio de campo (Ellis et al., 2004, Avian Pathol. 33:405-412). Recientemente, China ha aceptado la vacunación como un componente de su programa de control de AIV.

La posibilidad de que la cepa altamente patógena H5N1 pueda volverse transmisible entre humanos se menciona en términos de una pandemia global, y la OMS no está dispuesta a estimar la mortalidad global en caso de que el virus H5N1 se recombine a la forma humana. Por lo tanto, es clara la necesidad de un método de gestión de la infección por H5N1 en las poblaciones agrícolas, de la cual se cree que surgieron la mayoría de las transmisiones a humanos.

2.1.2 Virus de la enfermedad de Newcastle

El virus de la enfermedad de Newcastle es un virus con envoltura que contiene un genoma de ARN con sentido negativo lineal, monocatenario y no segmentado. El ARN genómico contiene genes del orden de 3'-N-P-M-F-HN-L, que se describen con más detalle a continuación. El ARN genómico también contiene una secuencia líder en el extremo 3'.

Los elementos estructurales del virión incluyen la envoltura del virus que es una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática celular. La glicoproteína, hemaglutinina-neuraminidasa (HN), sobresale de la envoltura proporcionando actividades de hemaglutinina (p. ej., la unión a receptor/fusogénico) y neuraminidasa. La glicoproteína de fusión (F), que también interactúa con la membrana viral, se produce primero como un precursor inactivo, luego se escinde postraduccionalmente para producir dos polipéptidos unidos por disulfuro. La proteína F activa está involucrada en la penetración de NDV en células hospedadoras facilitando la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped. La proteína de la matriz (M) está involucrada en el ensamblaje viral e interactúa tanto con la membrana viral como con las proteínas de la nucleocápside.

La principal subunidad proteica de la nucleocápside es la proteína nucleocápside (N) que confiere simetría helicoidal a la cápside. En asociación con la nucleocápside están las proteínas P y L. La fosfoproteína (P), que está sujeta a la fosforilación, se cree que desempeña un papel regulador en la transcripción, y también puede estar implicada en la metilación, fosforilación y poliadenilación. El gen L, que codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN, se requiere para la síntesis de ARN viral junto con la proteína P. La proteína L, que ocupa casi la mitad de la capacidad codificante del genoma viral, es la mayor de las proteínas virales, y desempeña un papel importante tanto en la transcripción como en la replicación.

La replicación de todos los virus de ARN de cadena negativa, incluido el NDV, se complica por la ausencia de la maquinaria celular requerida para replicar el ARN. Además, el genoma de cadena negativa no puede traducirse directamente en proteína, sino que primero debe transcribirse en una copia de cadena positiva (ARN_m). Por lo tanto, al ingresar en una célula hospedadora, el virus no puede sintetizar la ARN polimerasa dependiente de ARN requerida. Las proteínas L, P y N deben ingresar a la célula junto con el genoma en la infección.

Se piensa que la mayoría o todas las proteínas virales que transcriben el ARN_m de NDV también llevan a cabo su replicación. El mecanismo que regula los usos alternativos (es decir, la transcripción o la replicación) del mismo complemento de proteínas no se ha identificado claramente, pero parece implicar la abundancia de formas libres de una o más de las proteínas nucleocápsidas, en particular, la N. Directamente después de la penetración del virus, la transcripción se inicia con la proteína L usando el ARN de sentido negativo en la nucleocápside como molde. La síntesis del ARN viral está regulada de manera que produce ARN_m monocistrónicos durante la transcripción.

Después de la transcripción, la replicación del genoma del virus es el segundo evento esencial en la infección por el virus de ARN de cadena negativa. Al igual que con otros virus de ARN de cadena negativa, la replicación del genoma vírico en el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) está mediada por proteínas especificadas por virus.

Los primeros productos de la síntesis de ARN replicativo son copias complementarias (es decir, más polaridad) del ARN del genoma del NDV (ARNc). Estas copias de cadena positiva (anti-genomas) difieren de las transcripciones de ARNm de cadena positiva en la estructura de sus extremos. A diferencia de los transcritos de ARNm, los ARNc antigenómicos no están tapados ni metilados en los extremos 5', y no están truncados ni poliadenilados en los extremos 3'. Los ARNc son coterminales con sus plantillas de cadena negativa y contienen toda la información genética en cada segmento de ARN genómico en la forma complementaria. Los ARNc sirven como plantillas para la síntesis de genomas víricos de cadena negativa de NDV (ARNv).

Tanto los genomas de cadena negativa de NDV (ARNv) como los antigenomas (ARNc) están encapsidados por proteínas de nucleocápside; las únicas especies de ARN no encapsuladas son los ARNm de virus. Para el NDV, el citoplasma es el sitio de la replicación del ARN del virus, así como también es el sitio para la transcripción. El ensamblaje de los componentes virales parece tener lugar en la membrana plasmática de la célula huésped y el virus maduro se libera mediante gemación.

2.2 Formulaciones inmunogénicas

La tecnología del ADN recombinante y las técnicas de ingeniería de "genética inversa" proporcionan un enfoque único para la producción de virus recombinantes para el uso en formulaciones inmunogénicas. En particular, se describe en este documento un método para diseñar un virus de ARN de cadena negativa tal que expresa, o muestra, no solo antígenos víricos nativos, sino también cualquier antígeno que pueda diseñarse para incorporarse en el recubrimiento de proteína viral. De particular interés son los antígenos derivados de organismos infecciosos distintos de la gripe. De esta manera, un único virus puede ser diseñado como un compuesto inmunogénico útil para provocar, activar o inducir una respuesta inmune que proporcionaría protección contra al menos dos patógenos. Tal virus quimérico se puede diseñar adicionalmente cuando sea necesario para modificar su virulencia, es decir, de modo que puedan atenuarse o atenuarse adicionalmente. Los virus de la gripe atenuados son beneficiosos porque son inmunogénicos y capaces de replicarse, pero no son patógenos.

Se cree que las vacunas vivas inducen una citotoxicidad mediada por células con reactividad cruzada mejorada así como una respuesta de anticuerpos humorales, proporcionando una mejor protección que las vacunas inactivadas (Gorse y Belshe, 1990, J. Clin. Microbiol. 28: 2539 - 2550; y Gorse et al., 1995, J. Infect. Dis. 172:1-10). En segundo lugar, es probable que la inmunidad protectora frente a enfermedades víricas implique una respuesta de IgA en la mucosa que no se observa con las vacunas administradas por vía intramuscular tradicionales (Nelson et al., 1998, Vaccine 16: 1306-1313). Finalmente, las vacunas vivas también tienen la ventaja de la administración intranasal que evita la hinchazón y el dolor muscular ocasionalmente asociados con la administración intramuscular de vacunas adyuvadas inactivadas. Se ha informado que estas vacunas vivas inducen no solo respuestas humorales contra el virus de la gripe homotípico sino también una citotoxicidad mediada por células de reactividad cruzada. Por lo tanto, los inventores ofrecen el potencial para el desarrollo de formulaciones inmunes nuevas y más eficaces, por ejemplo, formulaciones de vacunas, para el diagnóstico, la prevención, el control o el tratamiento de patógenos virales y no virales.

3. Sumario de la invención

La presente invención proporciona virus quiméricos de la enfermedad de Newcastle (NDV), que comprenden un genoma empaquetado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F-fusión que tiene los dominios transmembrana y citoplásmicos de una proteína F y al menos un epítipo de un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso o un antígeno asociado con una enfermedad que está anclado por el extremo C-terminal, de manera que la proteína F-fusión se expresa y se incorpora en el NDV quimérico, en donde el antígeno no se deriva de un paramixovirus, y en el que la función de la proteína F es suministrada por la proteína F-fusión o por la proteína F nativa.

En una realización, el NDV quimérico de la presente invención tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F, de modo que la proteína F se expresa e incorpora en el NDV quimérico. En una realización adicional, la proteína F se modifica genéticamente en el sitio de corte para aumentar la actividad fusogénica, preferiblemente en la que el sitio de corte de la proteína F se reemplaza con un sitio de corte multibásico.

En otra realización del NDV quimérico de la presente invención, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión F reemplaza la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F de NDV y la proteína de F-fusión suministra la función de la proteína F.

En otras o adicionales realizaciones del NDV quimérico de la presente invención: (a) la secuencia que codifica la proteína de fusión F se inserta entre los genes P y M del genoma del NDV; y/o (b) los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína de fusión F son de la cepa LaSota de NDV.

En otras o adicionales realizaciones del NDV quimérico de la presente invención: (a) la proteína F-fusión contiene o bien residuos no aminoácidos del ectodominio de la proteína F, o contiene un fragmento del ectodominio de la proteína F que hace no retener la actividad del ectodominio de la proteína F; o (b) la proteína de fusión F comprende

entre 1 y 15 residuos del ectodominio de una proteína F del NDV que están inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de la proteína F.

En otras o adicionales realizaciones, el NDV quimérico de la presente invención se atenúa. En otra o adicional realización del NDV quimérico de la presente invención, el agente infeccioso es un patógeno infeccioso.

5 En algunas realizaciones, el antígeno del NDV quimérico de la presente invención es un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno protector asociado con un parásito o un antígeno fúngico; preferiblemente en el que el antígeno viral es un antígeno de adenoviridae, herpesviridae, Leviviridae, poxviridae, picornaviridae, papovaviridae, reoviridae, retroviridae, flaviridae, togaviridae, hepadnaviridae, rhabdoviridae, arenaviridae, o coronavirusidae; preferiblemente en el que el antígeno bacteriano es un antígeno de bacterias de la familia Aquaspirillum, familia
10 Azospirillum, familia Azotobacteraceae, familia Bacteroidaceae, especies de Bartonella, familia Bdellovibrio, especies Campylobacter, especies de Chlamydia, Clostridium, la familia Enterobacteriaceae, familia Gardinella, Haemophilus influenzae, familia Halobacteriaceae, Familia Helicobacter, familia Legionallaceae, especie Listeria, familia Methylococcaceae, familia Neisseriaceae, familia Oceanospirillum, familia Pasteurellaceae, especie Pneumococcus, especie Pseudomonas, familia Rhizobiaceae, familia Spirillum, familia Spirosomaceae, familia Staphylococcus, Streptococcus, Yersinia o familia Vampirovibrio; preferiblemente en donde el antígeno protector asociado con un
15 parásito es un antígeno de una ameba, un parásito de la malaria, Plasmodium o Trypanosoma cruzi; y preferiblemente en el que el antígeno fúngico es un antígeno de hongos de especies de Absidia, especies de Aspergillus, Ascomycetes, Basidiomycetes, Basidibolus ranarum, Blastomyces dermatitidis, especies de Candida, Coccidioides immitis, especies de Conidiobolus, Cryptococcus neoformans, especies de Cunninghamella, dermatofitos, Deuteromicetes, Histoplasma capsulatum, Microsporium gypseum, Mucor pusillus, Oomycetes, Paracoccidioides brasiliensis, Pseudallescheria boydii, Rhinosporidium seeberi, Pneumocystis carinii, especies de Rhizopus, especies de Saccharomyces, Sporothrix schenckii, o Zygomycetes.

25 En otra realización o adicional del NDV quimérico de la presente invención, el antígeno es el ectodominio de un antígeno de hemaglutinina de un virus de la gripe. En una realización, dicho virus de la gripe es un virus de la gripe aviar. En una realización del NDV quimérico de la presente invención, la cadena principal del NDV quimérico es la cepa LaSota de NDV.

La presente invención también proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden el NDV quimérico de la presente invención.

30 Además, se proporcionan los NDV quiméricos de la presente invención o las composiciones inmunogénicas de la presente invención para usar en un método para inducir una respuesta inmune a NDV y un agente infeccioso o enfermedad asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave, o para usar en la inducción de una respuesta inmune a un agente infeccioso o enfermedad asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave o un ser humano.

35 Por lo tanto, la presente invención también proporciona usos de los NDV quiméricos de la presente invención en la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmune a NDV y un agente infeccioso o enfermedad asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave, o para inducir una respuesta inmune a un agente infeccioso o una enfermedad asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave o un ser humano.

40 Además, se proporcionan NDV quiméricos de la presente invención o composiciones inmunogénicas de la presente invención para su uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad en un ser humano o en un ave, en donde la enfermedad está asociada con el antígeno de la proteína de fusión F.

En consecuencia, la presente invención también proporciona los usos de los NDV quiméricos de la presente invención en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad en un ser humano o en un ave, en donde la enfermedad está asociada con el antígeno de la proteína de fusión F.

45 La presente invención también proporciona métodos para producir una formulación inmunogénica, comprendiendo el método los pasos de: (a) propagar el NDV quimérico de la presente invención en un huevo embrionado o en una línea celular que es susceptible a una infección por NDV; y (b) recoger el virus progenie; en el que el virus se desarrolla en cantidades suficientes y en condiciones suficientes para que el virus esté libre de contaminación, de manera que la progenie del virus sea adecuada para su uso en una formulación inmunogénica.

50 La presente invención proporciona moléculas de ADN recombinante que codifican el NDV quimérico de la presente invención.

55 Se describen en este documento virus de ARN de cadena negativa quiméricos diseñados para expresar proteínas de fusión que incorporan al virión, métodos para producir tales virus quiméricos y el uso de tales virus, por ejemplo como inmunógenos, en formulaciones inmunogénicas, o en ensayos in vitro. Los virus quiméricos descritos en este documento se caracterizan por expresar, en la superficie del virión, no solo antígenos asociados con el virus sino también la proteína de fusión.

La presente invención proporciona NDV quiméricos que permiten inmunizar a un sujeto, por ejemplo, un ave o un ser humano, contra dos agentes infecciosos mediante la administración de un NDV quimérico. En un aspecto, el uso de un único virus para inducir una respuesta inmune reduce la frecuencia de administración de una formulación inmunizante. En otro aspecto, el uso de un solo virus para inducir una respuesta inmune reduce el coste de inmunizar a sujetos. El menor coste de inmunizar a sujetos aumenta la probabilidad de que más sujetos puedan permitirse inmunizarse y, por lo tanto, reduce los costes de salud asociados con el tratamiento de sujetos que padecen una infección.

La invención también se refiere a los NDV quiméricos de la invención comprendidos en composiciones (por ejemplo, formulaciones inmunogénicas) para seres humanos o animales. En particular, los NDV quiméricos de la invención pueden usarse como vacunas contra una amplia gama de virus y/o antígenos. Debido a que el NDV quimérico está diseñado para expresar epítopos extraños en el virión, las composiciones (por ejemplo, formulaciones de vacuna) que comprenden un NDV quimérico de la invención pueden diseñarse para la inmunización contra variantes de cepas múltiples, diferentes virus o contra agentes infecciosos o antígenos de enfermedad completamente diferentes (por ejemplo, bacterias, parásitos, hongos o antígenos específicos de tumores). Se pueden usar muchos métodos para introducir las formulaciones de virus vivos atenuados a un sujeto humano o animal para inducir una respuesta inmune o de citocina apropiada. Estos incluyen, pero no se limitan a, rutas intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea.

Los virus quiméricos descritos en este documento permiten que un sujeto (por ejemplo, aves) se inmunice para dos enfermedades infecciosas administrando los virus quiméricos. En una realización específica, los virus quiméricos NDV de la invención permiten que las aves se inmunicen para el virus de la gripe aviar y el virus de la enfermedad de Newcastle administrando un virus quimérico de la invención. Las aves pueden inmunizarse fácilmente pulverizándolas con el virus quimérico o administrando el virus quimérico en una solución acuosa, tal como el agua que beben.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de los solicitantes de que se puede lograr una respuesta inmune efectiva a dos agentes infecciosos diseñando un virus de la gripe para expresar e incorporar en su virión una proteína de fusión que comprende los dominios citoplásmico y transmembrana de al menos una glicoproteína esencial del virus y el ectodominio de una proteína de un segundo agente infeccioso, en el que la proteína de fusión reemplaza funcionalmente a la glicoproteína esencial. En un aspecto, la incorporación de la proteína de fusión en el virión da como resultado una respuesta inmune potenciada al ectodominio del segundo agente infeccioso. La ingeniería de los dominios citoplasmáticos y transmembrana de una glicoproteína esencial del virus en la proteína de fusión permite que la proteína de fusión se incorpore al virión. En un aspecto, la glicoproteína esencial es una o ambas proteínas del virus de la gripe HA y/o NA. En una realización, la glicoproteína esencial es la proteína F de NDV. El reemplazo funcional de al menos una glicoproteína esencial del virus elimina la preocupación sobre la limitación del tamaño del genoma del virus (por ejemplo, el genoma del virus de la gripe). En ciertas realizaciones, la sustitución funcional de al menos una glicoproteína esencial del virus con la proteína de fusión atenúa la replicación viral en sujetos.

Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico que comprende una proteína de fusión que tiene (i) un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, distinto del virus de la gripe fusionado a (ii) un dominio transmembrana y citoplasmático de una glicoproteína codificada por un gen esencial de un virus de la gripe, en el que la proteína de fusión se incorpora a un virus de la gripe aviar, en el que la función del gen esencial es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa del virus de la gripe aviar. En ciertos aspectos, el gen esencial de un virus de la gripe es un gen de hemaglutinina (HA). En otros aspectos, el gen esencial de un virus de la gripe es un gen de neuraminidasa (NA). En ciertos aspectos, el virus de la gripe aviar quimérico está atenuado. De acuerdo con estos aspectos, el virus de la gripe aviar quimérico se puede atenuar mediante mutaciones en el gen NS1.

Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico que comprende una proteína de fusión que tiene (i) un ectodominio de una proteína HN de NDV fusionada a (ii) un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático de una proteína NA del virus de la gripe, en donde se incorpora la proteína de fusión en un virus de la gripe aviar, en el que la función de la proteína NA es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa del virus de la gripe aviar. En ciertos aspectos, el virus de la gripe aviar quimérico está atenuado. De acuerdo con estos aspectos, el virus de la gripe aviar quimérico se puede atenuar mediante mutaciones en el gen NS1. De acuerdo con la descripción, se puede usar cualquier tipo, subtipo o cepa del virus de la gripe aviar.

Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico, que comprende un segmento NA del virus de la gripe empaquetado que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en el que el marco de lectura abierto NA se modifica de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA se reemplazan por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno de neuraminidasa de un agente infeccioso distinto de la gripe que está anclado por el extremo N, de modo que la proteína de fusión de neuraminidasa se expresa e incorpora en el virus de la gripe aviar quimérico.

Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico, que comprende un segmento de HA del virus de la gripe empaquetado que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en el que el marco de lectura abierto HA

se modifica de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio de HA se reemplazan por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno de unión a receptor/fusogénico de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe que está anclado por el extremo C, de modo que la proteína de fusión de la hemaglutinina se expresa e incorpora al virus de la gripe aviar quimérico.

5 Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico que comprende un segmento HA del virus de la gripe bicistrónico empaquetado, que comprende: (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína de hemaglutinina del virus de la gripe aviar, y (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en la que los nucleótidos que codifican el ectodominio de hemaglutinina se reemplazan por
10 nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe o que codifica un antígeno de enfermedad anclado por el extremo C, de modo que ambas, la hemaglutinina del virus de la gripe y la proteína de fusión, se expresan e incorporan en el virus de la gripe aviar quimérico. En ciertos aspectos, el primer marco de lectura abierto del segmento de HA del virus aviar quimérico se modifica para eliminar el sitio de escisión polibásico de hemaglutinina.

15 Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico que comprende un segmento NA del virus de la gripe bicistrónico empaquetado, que comprende: (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína de neuraminidasa del virus de la gripe aviar, y (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio de neuraminidasa son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso,
20 que ambas, la neuraminidasa del virus de la gripe y la proteína de fusión, se expresan e incorporan en el virus de la gripe aviar quimérico. En ciertos aspectos, el virus de la gripe aviar quimérico comprende un segmento de HA que tiene un marco de lectura abierto modificado para eliminar el sitio de escisión polibásico de la hemaglutinina.

25 Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico, que comprende un segmento NA del virus de la gripe empaquetado que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en el que el marco de lectura abierto NA se modifica de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA se reemplazan por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno HN de NDV, de modo que la proteína de fusión de neuraminidasa se expresa e incorpora en el virus de la gripe aviar quimérico. La proteína de fusión de neuraminidasa proporciona la actividad de neuraminidasa para el virus de la gripe aviar quimérico.

30 En ciertos aspectos, un virus de la gripe aviar quimérico de la descripción comprende un segmento del gen NS1 empaquetado que codifica una proteína NS1 modificada que reduce la actividad antagonista del interferón celular del virus. Ejemplos no limitantes de mutaciones en el gen NS1 que dan como resultado una proteína NS1 modificada se proporcionan en la Sección 5.1.2, más adelante.

35 Se describen en este documento moléculas de ácido nucleico recombinantes (por ejemplo, moléculas de ADN recombinante) que codifican el segmento NA de los virus de la gripe aviar quiméricos descritos. También se describen en este documento moléculas de ácido nucleico recombinantes (por ejemplo, moléculas de ADN recombinante) que codifican el segmento de HA de los virus de la gripe aviar quiméricos descritos. Además, se describen en este documento moléculas de ácido nucleico recombinantes (por ejemplo, moléculas de ARN recombinante) que codifican el segmento de NA o el segmento de HA de los virus de la gripe aviar quiméricos descritos.

40 Se describen en este documento métodos para propagar un virus de la gripe aviar quimérico de la descripción, que comprenden cultivar el virus de la gripe aviar quimérico en un huevo embrionado o una línea celular que es susceptible a la infección por el virus de la gripe aviar. También se describen en este documento métodos para producir una formulación inmunogénica, comprendiendo el método: (a) propagar un virus de la gripe aviar quimérico de la descripción en un huevo embrionado o una línea celular que es susceptible a la infección por el virus de la gripe aviar; y (b) recoger el virus de la progenie, en el que el virus se cultiva en cantidades suficientes y en
45 condiciones suficientes para que el virus esté libre de contaminación, de forma que el virus de la progenie sea adecuado para usar en formulaciones inmunogénicas, por ejemplo, formulaciones de vacunas.

Además, se describe en este documento un virus de la gripe quimérico atenuado, que comprende una proteína de fusión, que tiene (i) un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, distinto del virus de la gripe fusionado a (ii) un dominio transmembrana y citoplasmático de una glicoproteína codificada por un gen esencial de un virus de la gripe, en el que la proteína de fusión se incorpora en un virus de la gripe atenuado, en el que la función del gen esencial es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa al virus de la gripe atenuado. En ciertos aspectos, el gen esencial de un virus de la gripe es un gen de hemaglutinina (HA). En otros aspectos, el gen esencial de un virus de la gripe es un gen de neuraminidasa (NA). El virus de la gripe quimérico
50 atenuado puede ser de cualquier tipo, subtipo o cepa del virus de la gripe. Por ejemplo, el virus de la gripe quimérico atenuado puede ser un virus de la gripe A, un virus de la gripe B o un virus de la gripe C.

Se describe en este documento un virus de la gripe quimérico atenuado que comprende un segmento NA del virus de la gripe empaquetado que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en el que el marco de lectura abierto NA se modifica de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA se reemplazan por nucleótidos que

codifican un ectodominio de un antígeno de neuraminidasa de un agente infeccioso distinto de la gripe que está anclado por el extremo N, de modo que la proteína de fusión de neuraminidasa se expresa e incorpora en el virus de la gripe aviar quimérico atenuado. En ciertos aspectos, el virus de la gripe quimérico atenuado comprende un segmento de HA que tiene un marco de lectura abierto modificado para eliminar el sitio de escisión polibásico de la hemaglutinina.

Se describe en este documento un virus de la gripe quimérico atenuado que comprende un segmento de HA del virus de la gripe empaquetado que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en el que el marco de lectura abierta HA se modifica de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio de HA se reemplazan por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno de hemaglutinina de un agente infeccioso distinto de la gripe que está anclado por el extremo C, de modo que la proteína de fusión de hemaglutinina se expresa e incorpora en el virus de la gripe quimérico atenuado.

Se describe en este documento un virus de la gripe quimérico atenuado que comprende un segmento de HA del virus de la gripe bicistrónico empaquetado que comprende: (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína de hemaglutinina de la gripe, y (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína fusión de hemaglutinina, en la que los nucleótidos que codifican el ectodominio de hemaglutinina se reemplazan por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, distinto de la gripe, o que codifica un antígeno de enfermedad que está anclado por el extremo C, de modo que tanto la hemaglutinina de la gripe como la proteína de fusión se expresan e incorporan en el virus de la gripe quimérico atenuado. En ciertos aspectos, el primer marco de lectura abierto del segmento HA del virus de la gripe quimérico atenuado se modifica para eliminar el sitio de escisión polibásico de la hemaglutinina.

Se describe en este documento un virus de la gripe quimérico atenuado que comprende un segmento de NA del virus de la gripe bicistrónico empaquetado que comprende: (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína de neuraminidasa de la gripe, y (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio de neuraminidasa son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, distinto de la gripe, o que codifican un antígeno de enfermedad que está anclado por el extremo N, de modo que tanto la neuraminidasa de gripe como la proteína de fusión se expresan e incorporan en el virus de la gripe quimérico atenuado. En ciertos aspectos, el virus de la gripe quimérico atenuado comprende un segmento de HA que tiene un marco de lectura abierto modificado para eliminar el sitio de escisión polibásico de la hemaglutinina.

En ciertos aspectos, el virus de la gripe quimérico atenuado de la descripción comprende un segmento del gen NS1 empaquetado que codifica una proteína NS1 modificada que reduce la actividad antagonista del interferón celular del virus.

Se describen en este documento moléculas de ácido nucleico recombinantes (por ejemplo, moléculas de ADN recombinante) que codifican el segmento NA de los virus de la gripe quiméricos atenuados de la descripción. La presente descripción también describe moléculas de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, moléculas de ADN recombinante) que codifican para el segmento HA los virus de la gripe quiméricos atenuados de la descripción. Además se describen en este documento moléculas de ácido nucleico recombinantes (por ejemplo, moléculas de ARN recombinante) que codifican el segmento de NA o el segmento de HA de los virus de la gripe quiméricos atenuados.

Se describen en este documento métodos para propagar un virus de la gripe quimérico atenuado de la descripción, que comprenden cultivar el virus de la gripe quimérico atenuado en un huevo embrionado o una línea celular que es susceptible a la infección por el virus de la gripe. También se describen en este documento métodos para producir una formulación inmunogénica, comprendiendo el método: (a) propagar un virus de la gripe quimérico atenuado de la invención en un huevo embrionado o una línea celular que es susceptible a la infección atenuada del virus de la gripe; y (b) recoger el virus de la progenie, en el que el virus se cultiva en cantidades suficientes y en condiciones suficientes para que el virus esté libre de contaminación, de forma que el virus de la progenie sea adecuado para usar en formulaciones inmunogénicas, por ejemplo, formulaciones de vacunas.

La presente invención también proporciona virus NDV quiméricos específicos. De forma general, la presente invención proporciona un NDV quimérico que comprende una proteína de fusión que tiene (i) un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, distinto del NDV fusionado a (ii) un dominio transmembrana y citoplásmico de una glicoproteína codificada por un gen esencial de un NDV, en el que la proteína de fusión se incorpora a un NDV, en el que la función del gen esencial es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa al NDV. Específicamente, el gen de NDV esencial de NDV es el gen que codifica una proteína F. De acuerdo con la invención, se puede usar cualquier tipo, subtipo o cepa de NDV.

La presente invención proporciona un NDV quimérico que comprende un genoma empaquetado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F-proteína de fusión que tiene los dominios transmembrana y citoplásmico de una proteína F y el ectodominio de un antígeno de un agente infeccioso, distinto de NDV, o un antígeno de enfermedad que está anclado por el extremo C, de modo que la proteína F-proteína de fusión se expresa e incorpora en el NDV quimérico. En ciertas realizaciones, el genoma del NDV quimérico comprende una

secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F, de modo que la proteína F se expresa e incorpora en el NDV quimérico además de la proteína F-proteína de fusión de NDV. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F-proteína de fusión de NDV reemplaza la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F de NDV y la proteína F-proteína de fusión suministra la función de la proteína F para el NDV quimérico.

- 5 Se describe en este documento un NDV quimérico que comprende un genoma empaquetado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión HN que tiene los dominios transmembrana y citoplásmico de una proteína HN y el ectodominio de un antígeno de un agente infeccioso, distinto de NDV, o un antígeno de enfermedad que está anclado por el extremo N, de modo que la proteína de fusión HN se expresa e incorpora en el NDV quimérico. En ciertos aspectos, el genoma del NDV quimérico comprende una secuencia de
- 10 nucleótidos que codifica una proteína HN, de modo que la proteína HN se expresa e incorpora en el NDV quimérico además de la proteína de fusión HN de NDV. En otros aspectos, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión HN reemplaza la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína HN de NDV y la proteína de fusión HN suministra la función de la proteína HN para el NDV quimérico. Se describen en este documento moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican la proteína HN de NDV o la proteína F.
- 15 Se describen en este documento también métodos para la propagación de un NDV quimérico de la invención que comprenden cultivar el NDV quimérico en un huevo embrionado o en una línea celular que es susceptible a la infección por NDV. La presente invención también proporciona un método para producir una formulación inmunogénica, comprendiendo el método: (a) propagar un NDV quimérico de la invención en un huevo embrionado o una línea celular que es susceptible a la infección por NDV; y (b) recoger el virus de la progenie, en el que el virus se
- 20 cultiva en cantidades suficientes y en condiciones suficientes para que el virus esté libre de contaminación, de manera que el virus de la progenie sea adecuado para usar en formulaciones inmunogénicas, por ejemplo, formulaciones de vacunas.

25 Se describen en este documento huevos embrionados que comprenden los NDV quiméricos de la invención. También se describen en este documento líneas celulares que comprenden los NDV quiméricos de la invención. La presente invención proporciona además formulaciones inmunogénicas que comprenden los NDV quiméricos de la invención.

30 Se describen en este documento métodos para inducir una respuesta inmune a uno, dos o más agentes infecciosos en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un virus de la gripe quimérico descrito en este documento. En ciertos aspectos, el sujeto es un sujeto humano. En otros aspectos, el sujeto es un mamífero no humano (por ejemplo, un cerdo, caballo, perro o gato). En otros aspectos más, el sujeto es un sujeto aviar. En un aspecto, se describe en este documento un método para inducir una respuesta inmune a uno, dos o más agentes infecciosos en un ave, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un virus de la gripe aviar quimérico de la descripción.

35 La presente invención proporciona un NDV quimérico para usar en métodos para inducir una respuesta inmune a uno, dos o más agentes infecciosos en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un NDV quimérico de la invención. En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano. En otras realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano (por ejemplo, un cerdo, caballo, perro o gato). En otras realizaciones más, el sujeto es un sujeto aviar. En una realización específica, la presente invención proporciona un NDV quimérico para usar en métodos para inducir una respuesta inmune a uno, dos o más agentes infecciosos en un ave, comprendiendo el método administrar al ave una cantidad eficaz de un NDV quimérico de la invención.

40

45 Se describen en este documento métodos para inducir una respuesta inmune a uno, dos o más agentes infecciosos en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un virus de la gripe quimérico atenuado de la descripción. En ciertos aspectos, el sujeto es un sujeto humano. En otros aspectos, el sujeto es un mamífero no humano (por ejemplo, un cerdo, caballo, perro o gato). En otros aspectos más, el sujeto es un sujeto aviar. En un aspecto, se describen en este documento métodos para inducir una respuesta inmune a uno, dos o más agentes infecciosos en un ser humano, comprendiendo el método administrar a un humano que lo necesita una cantidad eficaz de un virus quimérico de la descripción.

50 La presente invención proporciona un NDV quimérico para usar en métodos para inducir una respuesta inmune a un antígeno de enfermedad, comprendiendo los métodos administrar al sujeto una cantidad eficaz de un NDV quimérico de la invención. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto es un ave.

3.1 Terminología

55 Como se usa en este documento, el término "animal" incluye, entre otros, animales de compañía (por ejemplo, perros y gatos), animales de zoológico, animales de granja (por ejemplo, rumiantes, no rumiantes, ganado y aves de corral), animales salvajes y animales de laboratorio (por ejemplo, roedores, tales como ratas, ratones y conejillos de Indias, y conejos), y animales que son clonados o modificados genéticamente o de otra forma (por ejemplo, animales transgénicos).

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" o la expresión "alrededor de", cuando se usa junto con un número, se refiere a cualquier número dentro del 1, 5 ó 10% del número al que se hace referencia.

Como se usa en este documento, la frase "extremo amino" de NS1 se refiere a los aminoácidos del resto de aminoácido amino terminal (residuo de aminoácido 1) al resto de aminoácido 115, restos de aminoácidos de 1 a 100, restos de aminoácidos de 1 a 75, restos de aminoácidos de 1 a 50, restos de aminoácidos de 1 a 25, o restos de aminoácidos de 1 a 10 de la proteína NS1 viral de la gripe. Las deleciones del extremo amino pueden incluir deleciones que consisten en 5, preferiblemente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 73, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 126, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170 ó 175 restos de aminoácidos del extremo amino de NS1.

Como se usa en este documento, la frase "extremo carboxi" de NS1 se refiere a los residuos de aminoácidos del 116 al residuo del aminoácido carboxi terminal, residuos de aminoácidos de 101 al residuo de aminoácido carboxi terminal, residuos de aminoácidos de 76 al residuo de aminoácido carboxi terminal, residuos de aminoácidos de 51 al residuo del aminoácido carboxi terminal, o residuos de aminoácidos de 26 al residuo de aminoácido carboxi terminal de la proteína NS1 viral de la gripe equina, cuando el extremo amino de NS1 es del residuo de aminoácido 1 al residuo de aminoácido 115, de los restos de aminoácidos 1 a 100, de los restos de aminoácidos 1 a 75, de los restos de aminoácidos 1 a 50, o de los restos de aminoácidos 1 a 25, respectivamente, de una proteína NS1 viral de la gripe. Las deleciones del término carboxi pueden incluir deleciones que consisten en 5, preferiblemente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 73, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 126, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170 ó 175 residuos de aminoácidos del extremo carboxi de NS1.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "enfermedad" y "trastorno" se usan indistintamente para referirse a una afección en un sujeto y abarcan, pero no se limitan a, trastornos proliferativos (por ejemplo, leucemia, fibrosis, carcinoma (incluidos carcinomas malignos, no malignos, metastásicos y no metastásicos) y linfomas)) e infecciones por un agente infeccioso (p. ej., un virus, bacteria, parásito) o una afección o síntoma asociado con el mismo.

Como se usa en el presente documento, el término "epítapos" se refiere a sitios, fragmentos o una región de una molécula (por ejemplo, un polipéptido o una proteína) que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un sujeto. Un epítopo que tiene actividad inmunogénica es un sitio, fragmento o región de una molécula (por ejemplo, polipéptido o proteína) que provoca una respuesta de anticuerpos en un sujeto. Un epítopo que tiene actividad antigénica es un sitio, fragmento o región de una molécula a la que un anticuerpo se une inmunoespecíficamente según se determina por cualquier método bien conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante inmunoensayos.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" en el contexto de un agente proteico se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 2 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de un péptido, polipéptido o proteína. En una realización, un fragmento de una proteína de longitud completa retiene la actividad de la proteína de longitud completa. En otra realización, el fragmento de la proteína de longitud completa no retiene la actividad de la proteína de longitud completa.

Como se usa en este documento, el término "fragmento" en el contexto de un ácido nucleico que codifica un polipéptido o proteína se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos 2 nucleótidos contiguos, al menos 5 nucleótidos contiguos, al menos 10 nucleótidos contiguos, al menos 15 nucleótidos contiguos, al menos 20 nucleótidos contiguos, al menos 25 nucleótidos contiguos, al menos 30 nucleótidos contiguos, al menos 35 nucleótidos contiguos, al menos 40 nucleótidos contiguos, al menos 50 nucleótidos contiguos, al menos 60 nucleótidos contiguos, al menos 70 nucleótidos contiguos, al menos 80 nucleótidos contiguos, al menos 90 nucleótidos contiguos, al menos 100 nucleótidos contiguos, al menos 125 nucleótidos contiguos, al menos 150 nucleótidos contiguos, al menos 175 nucleótidos contiguos, al menos 200 nucleótidos contiguos, al menos 250 contiguos nucleótidos, al menos 300 nucleótidos contiguos, al menos 350 nucleótidos contiguos o al menos 380 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido, polipéptido o proteína. En una realización preferida, un fragmento de un ácido nucleico codifica un péptido o polipéptido que retiene la actividad de la proteína de longitud completa. En otra realización, el fragmento de la proteína de longitud completa no retiene la actividad de la proteína de longitud completa.

La expresión "secuencia heteróloga", como se usa en el presente documento en el contexto de un agente proteico, se refiere a una molécula que no se encuentra en la naturaleza para asociarse con la cadena principal del virus quimérico o, en particular, la glucoproteína del virus quimérico. La expresión "secuencia heteróloga" en el contexto de una secuencia de ácido nucleico o molécula de ácido nucleico se refiere a una molécula que no se encuentra en la naturaleza para estar asociada con el genoma de la cadena principal del virus quimérico.

La expresión "se une inmunoespecíficamente a un antígeno" y términos análogos, como se usan en el presente documento, se refieren a moléculas que se unen específicamente a un antígeno y no se unen específicamente a otra molécula (por ejemplo, anticuerpos específicos de antígeno que incluyen ambos anticuerpos modificados (es decir, anticuerpos que comprenden un dominio constante de IgG modificado (por ejemplo, IgG1), o fragmento de unión a FcRn del mismo (por ejemplo, el dominio Fc o dominio bisagra-Fc)) y anticuerpos no modificados (es decir, anticuerpos que no comprenden un dominio constante de IgG modificado (por ejemplo, IgG1); o fragmento de unión a FcRn del mismo (por ejemplo, el dominio Fc o el dominio bisagra-Fc)). Las moléculas que se unen específicamente a un antígeno pueden tener reactividad cruzada con antígenos relacionados. Preferiblemente, una molécula que se une específicamente a un antígeno no reacciona de forma cruzada con otros antígenos. Una molécula que se une específicamente a un antígeno puede identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Una molécula se une específicamente a un antígeno cuando se une a dicho antígeno con mayor afinidad que a cualquier antígeno de reacción cruzada según se determina usando técnicas experimentales, tales como radioinmunoensayos (MA) y enzimoimmunoanálisis (ELISA). Véase, por ejemplo, Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, Nueva York en las páginas 332 - 336, para una discusión con respecto a la especificidad del anticuerpo.

Como se usa en este documento, la expresión "en combinación" en el contexto de la administración de una o varias terapias a un sujeto, se refiere al uso de más de una terapia (por ejemplo, más de un agente profiláctico y/o agente terapéutico). El uso de la expresión "en combinación" no restringe el orden en que las terapias (p. ej., agentes profilácticos y/o terapéuticos) se administran a un sujeto (p. ej., un sujeto con una infección por el virus de la gripe, infección por NDV o una afección o un síntoma asociado con el mismo, o un sujeto con otra infección (p. ej., otra infección viral)). Se puede administrar una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) antes (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), concomitantemente con, o posterior a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) de la administración de una segunda terapia (p. ej., un segundo agente profiláctico o terapéutico) a un sujeto (p. ej., un sujeto con una infección por el virus de la gripe, una infección por NDV o una condición o síntoma asociado con el mismo, u otra infección (por ejemplo, otra infección viral)).

Como se usa en el presente documento, la frase "actividad antagonista de interferón" de un agente proteico se refiere a una proteína o polipéptido, o fragmento, derivado o análogo del mismo que reduce o inhibe la respuesta inmune del interferón celular. En particular, una proteína o polipéptido, o fragmento, derivado o análogo del mismo (por ejemplo, virus de la gripe NS1) que tiene actividad antagonista de interferón reduce o inhibe la expresión y/o actividad del interferón. En una realización específica, la frase "actividad antagonista del interferón" se refiere a la proteína o polipéptido del virus, o fragmento, derivado o análogo del mismo (por ejemplo, una proteína del virus de la gripe) que reduce o inhibe la respuesta inmune del interferón celular. Una proteína o polipéptido vírico con actividad antagonista de interferón puede afectar preferentemente a la expresión y/o actividad de uno o dos tipos de interferón (IFN). En una realización, la expresión y/o actividad de IFN- α se ve afectada. En otra realización, la expresión y/o actividad de IFN- β se ve afectada. En otra realización específica, la expresión y/o actividad de IFN- γ se ve afectada. En ciertas realizaciones, la expresión y/o actividad de IFN- α , IFN- β y/o IFN- γ en un huevo o célula embrionados se reduce aproximadamente de 1 a aproximadamente 100 veces, aproximadamente de 5 a aproximadamente 80 veces, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 veces, o 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 veces por un agente proteico con actividad antagonista de interferón relativa a la expresión y/o actividad de IFN- α , IFN- β , y/o IFN- γ en un huevo embrionado de control o una célula que no expresa o no se pone en contacto con dicho agente proteico como se mide mediante las técnicas descritas en este documento o conocidas por un experto en la técnica.

Como se usa en este documento, las frases "sistemas deficientes en IFN" o "sustratos deficientes en IFN" se refieren a sistemas, por ejemplo, células, líneas celulares y animales, tales como ratones, pollos, pavos, conejos, ratas, caballos, etc., que no producen uno, dos o más tipos de IFN, o no producen ningún tipo de IFN, o producen bajos niveles de uno, dos o más tipos de IFN, o producen bajos niveles de cualquier IFN (es decir, una reducción en cualquier expresión de IFN de 5-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% o más en comparación con sistemas competentes de IFN bajo las mismas condiciones), no responden o responden de manera menos eficiente a uno, dos o más tipos de IFN, o no responden a ningún tipo de IFN, y/o son deficientes en la actividad de los genes antivirales inducidos por uno, dos o más tipos de IFN o inducidos por cualquier tipo de IFN.

Como se usa en este documento, los términos "infección", "infección por gripe", "infección por gripe aviar" e "infección por NDV" se refieren a todas las etapas de un ciclo de vida del virus de la gripe, virus de la gripe aviar, NDV u otro agente infeccioso (por ej., otra infección viral o bacteriana) en un sujeto (que incluye, pero no se limita a, la invasión y replicación del virus de la gripe, virus de la gripe aviar, NDV u otro agente infeccioso en una célula o tejido corporal), así como el estado patológico resultante de la invasión y la replicación del virus de la gripe, virus de la gripe aviar o virus de la enfermedad de Newcastle. La invasión y multiplicación de un virus de la gripe, virus de la gripe aviar, NDV u otro agente infeccioso incluye, pero no se limita a, los siguientes pasos: el acoplamiento de los virus (p. ej., el virus de la gripe, virus de la gripe aviar o partículas NDV) a una célula, la fusión de un virus con una

membrana celular, la introducción de información genética viral en una célula, la expresión de proteínas virales (p. ej., proteínas del virus de la gripe, virus de la gripe aviar o NDV), la producción de nuevas partículas virales (es decir, partículas del virus de la gripe, virus de la gripe aviar o NDV) y la liberación del virus (por ejemplo, partículas del virus de la gripe, virus de la gripe aviar o NDV) de una célula. Una infección respiratoria (por ejemplo, un virus de la gripe o infección por NDV) puede ser una infección del tracto respiratorio superior (URI), una infección del tracto respiratorio inferior (LRI), o una combinación de las mismas. En realizaciones específicas, la infección es una infección secundaria (por ejemplo, neumonía secundaria) que se manifiesta después del inicio de la infección primaria (por ejemplo, neumonía viral). Las infecciones secundarias surgen debido a la infección primaria o a un síntoma o afección asociada que predisponen al sujeto infectado a una infección secundaria de este tipo. En realizaciones específicas, el estado patológico resultante de la invasión y replicación de un virus de la gripe, virus de la gripe aviar o NDV es un virus de la gripe agudo, virus de la gripe aviar o enfermedad de NDV. Las etapas agudas de las infecciones respiratorias pueden manifestarse como neumonía y/o bronquiolitis, donde tales síntomas pueden incluir hipoxia, apnea, dificultad respiratoria, respiración rápida, sibilancias, cianosis, etc. La etapa aguda de las infecciones respiratorias (por ejemplo, infecciones por virus de la gripe y NDV) requiere que un individuo afectado obtenga intervención médica, tal como hospitalización, administración de oxígeno, intubación y/o ventilación.

Como se usa en el presente documento, el término "aislado", en el contexto de los virus, se refiere a un virus que se deriva de un único virus parental. Se puede aislar un virus usando métodos de rutina conocidos por los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, los basados en la purificación de placas y la dilución limitante.

Como se usa en este documento, el término "aislado", en el contexto de moléculas de ácido nucleico, se refiere a una molécula de ácido nucleico que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. En una realización preferida, se aísla una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína viral.

Como se usa en este documento, los términos "controlar", "controlando" y "gestión" se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto deriva de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), que no da como resultado una cura de la enfermedad (por ejemplo, infección). En ciertas realizaciones, a un sujeto se le administran una o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos, tales como un anticuerpo descrito en este documento) para "controlar" una infección por virus de la gripe, virus de la gripe aviar o infección por NDV o una infección con otro agente infeccioso, uno o más síntomas de los mismos, o una afección asociada, potenciada, o con potenciación de una infección por el virus de la gripe o infección por NDV o infección con otro agente infeccioso, para prevenir la progresión o el empeoramiento de la infección.

Como se usa en este documento, la frase "multiplicidad de infección" o "MOI" es el número promedio de virus por célula infectada. La MOI se determina dividiendo la cantidad de virus añadidos (ml agregado × Pfu) por el número de células agregadas (ml agregado × células/ml).

Como se usa en el presente documento, la frase "gen NS1" se refiere al gen que codifica la proteína no estructural (NS1) en la gripe. NS1 es una de las ocho moléculas codificadas por el genoma segmentado de la gripe A y otro virus. Un "producto génico NS1" se refiere a un producto génico (por ejemplo, un ARN o proteína) codificado por un gen NS1. En el caso de una proteína, el producto del gen NS1 es de longitud completa y tiene actividad NS1 de tipo salvaje (p. ej., de la cepa A/WSN/33).

Como se usa en este documento, las expresiones "ácidos nucleicos", "secuencias de nucleótidos" y "moléculas de ácido nucleico" incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN y análogos de moléculas de ADN o ARN. Dichos análogos pueden generarse usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero no se limitan a, bases de inosina o tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden esqueletos modificados que otorgan atributos beneficiosos a las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a las nucleasas o una capacidad incrementada para atravesar las membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser monocatenarios, bicatenarios, pueden contener porciones monocatenarias y bicatenarias, y pueden contener porciones de triple cadena, pero preferiblemente son ADN de doble cadena.

Como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" se refieren a la prevención de la recurrencia o aparición, o una reducción en uno o más síntomas de una enfermedad (por ejemplo, infección viral u otra enfermedad infecciosa) en un sujeto como resultado de la administración de una terapia (p. ej., un agente profiláctico o terapéutico). Por ejemplo, en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto para una infección, "prevenir", "previniendo" y "prevención" se refieren a la inhibición o reducción en el desarrollo o aparición de una infección (p. ej., una infección por el virus de la gripe, una infección por NDV o una afección asociada a ella o una infección distinta de una infección por el virus de la gripe o NDV o una afección asociada a ella), o la prevención de la recurrencia, aparición o desarrollo de uno o más síntomas de una infección (p. ej., una infección por el virus de la gripe, una infección por NDV o una afección asociada a ella o una infección distinta de

una infección por el virus de la gripe, una infección por NDV o una afección asociada a ella) en un sujeto como resultado de la administración de una terapia (p. ej., agente profiláctico o terapéutico), o la administración de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos).

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno protector" en el contexto de un agente infeccioso incluye cualquier molécula que es capaz de provocar una respuesta inmune protectora cuando se administra a un sujeto, cuya respuesta inmune está dirigida contra el agente infeccioso.

10 Como se usa en este documento, las expresiones "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente(s) que puede usarse en la prevención de una enfermedad (por ejemplo, una infección) o un síntoma de la misma (por ejemplo, una infección por el virus de la gripe, una infección por NDV o una afección o síntoma asociado a la misma, o una infección que no sea de un virus de la gripe de una infección por NDV o una afección o síntoma asociado a la misma). Preferiblemente, un agente profiláctico es un agente que se sabe que es útil, se ha usado o se está usando actualmente para prevenir o impedir el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o un síntoma de la misma (por ejemplo, una infección o una condición o un síntoma asociado con la misma).

15 Como se usa en el presente documento, el término "purificado", en el contexto de los virus, se refiere a un virus que está sustancialmente libre de material celular y medios de cultivo de la fuente celular o tisular de la que deriva el virus. El lenguaje "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de virus en las que el virus se separa de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de forma recombinante. Por lo tanto, el virus que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de
20 proteínas que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de proteína celular (también referida en este documento como una "proteína contaminante"). El virus también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación del virus. Un virus puede purificarse usando métodos de rutina conocidos por los expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía y centrifugación.

25 Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" o "paciente" se usan indistintamente. Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal (por ejemplo, aves, reptiles y mamíferos). En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero incluyendo un no primate (por ejemplo, un camello, burro, cebra, vaca, caballo, gato, perro, rata y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, chimpancé, y un ser humano). En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano. En otras realizaciones, el sujeto es un
30 ser humano. En ciertas realizaciones, el mamífero (por ejemplo, el ser humano) tiene de 0 a 6 meses de edad, de 6 a 12 meses, de 1 a 5 años, de 5 a 10 años, de 10 a 15 años, de 15 a 20 años, de 20 a 25 años, de 25 a 30 años, de 30 a 35 años, de 35 a 40 años, de 40 a 45 años, de 45 a 50 años, de 50 a 55 años, de 55 a 60 años, de 60 a 65 años edad, de 65 a 70 años, de 70 a 75 años, de 75 a 80 años, de 80 a 85 años, de 85 a 90 años, de 90 a 95 años o de 95 a 100 años. En una realización específica, el sujeto o paciente es aviano. En ciertas realizaciones, el ave tiene
35 entre 0 y 3 meses, de 3 a 6 meses, de 6 a 9 meses, de 9 a 12 meses, de 12 a 15 meses, de 15 a 18 meses o de 18 a 24 meses.

40 Como se usa en el presente documento, el término "sinérgico" en el contexto de la administración o el resultado o terapias, se refiere a una combinación de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) que es más eficaz que los efectos aditivos de dos o más terapias individuales (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos). Un efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes
45 profilácticos o terapéuticos) permite el uso de dosis más bajas de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) y/o la administración menos frecuente de dichas terapias a un sujeto con una enfermedad (por ejemplo, una infección por el virus de la gripe, una infección por NDV o una condición o síntoma asociado con ella, o una infección diferente a una infección por el virus de la gripe, infección por NDV o una
50 condición o síntoma asociado a la misma). La capacidad de utilizar dosis más bajas de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) y/o administrar dichas terapias con menor frecuencia reduce la toxicidad asociada con la administración de dichas terapias a un sujeto sin reducir la eficacia de dichas terapias en la prevención o tratamiento de una enfermedad (p. ej., una infección por el virus de la gripe o una afección o síntoma asociado con ella, o una infección distinta de una infección por el virus de la gripe, infección por NDV o una afección
55 o síntoma asociado a la misma). Además, un efecto sinérgico puede dar como resultado una eficacia mejorada de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) en la prevención, control o tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, una infección por el virus de la gripe, una infección por NDV o una condición o síntomas asociados a ella, o una infección que no sea una infección por el virus de la gripe, una infección por NDV o una afección o síntoma asociado a ella). Finalmente, el efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) puede evitar o reducir los efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquier terapia individual.

60 Como se usa en el presente documento, los términos "terapias" y "terapia" pueden referirse a cualquier protocolo(s), método(s) y/o agente(s) que se pueden usar en la prevención, tratamiento, control o mejora de una enfermedad (por ejemplo, cáncer, una infección por el virus de la gripe, una infección por NDV o una afección o síntoma asociado con ella, o una infección distinta de una infección por el virus de la gripe, o infección por NDV o una afección o síntoma asociado a ella). En ciertas realizaciones, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a la terapia biológica, terapia

de apoyo y/u otras terapias útiles en el tratamiento, control, prevención o mejora de una enfermedad, una infección o una afección o síntoma asociado a la misma, conocidos por los expertos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "agente terapéutico" y "agentes terapéuticos" se refieren a cualquier agente(s) que pueden usarse en la prevención, tratamiento, control o mejora de una enfermedad (por ejemplo, una infección o un síntoma de la misma (por ejemplo, una infección por gripe, una infección por NDV o una afección o síntomas asociados con ella, una infección que no sea una infección por el virus de la gripe, infección por NDV o una afección o síntoma asociado a ella)). Preferiblemente, un agente terapéutico es un agente que se sabe que es útil, o se ha usado o se usa actualmente para la prevención, el tratamiento, el control o la mejora de una enfermedad o síntoma asociado (p. ej., una infección por gripe, infección por NDV o una afección o síntoma asociado con la misma, una infección distinta de una infección por el virus de la gripe, infección por NDV o una afección o síntoma asociado a la misma).

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando", en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto para una enfermedad, se refieren a la erradicación, reducción o mejora de los síntomas de dicha enfermedad. Con respecto a las infecciones (por ejemplo, virus de la gripe o virus NDV), el tratamiento se refiere a la erradicación o control de la replicación de un agente infeccioso (por ejemplo, un virus), la reducción en el número de un agente infeccioso (por ejemplo, la reducción en el título del virus), la reducción o mejora de la progresión, severidad y/o duración de una infección (por ejemplo, una infección por gripe, infección por NDV o una condición o síntomas asociados a ella, una infección distinta de una infección por el virus de la gripe, Infección por NDV o una afección o síntoma asociado a la misma), o la mejora de uno o más síntomas que resultan de la administración de una o más terapias (que incluyen, pero no se limitan a, la administración de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos). Con respecto al cáncer, el tratamiento se refiere a la erradicación, eliminación, modificación o control del tejido del cáncer primario, regional o metastásico que resulta de la administración de uno o más agentes terapéuticos descritos en este documento. En ciertos aspectos, dichos términos se refieren a minimizar o retrasar la diseminación del cáncer que resulta de la administración de uno o más agentes terapéuticos descritos en este documento a un sujeto con dicha enfermedad. En otros aspectos, tales términos se refieren a la eliminación de las células que causan las enfermedades.

4. Descripción de las figuras

FIG. 1. Representación esquemática de una construcción híbrida NAF-HN

La construcción codifica nucleótidos de la región 3' no codificante del ARNv de WSN NA, la región codificante de NA correspondiente a la cola citoplásmica y los dominios transmembrana de la proteína NA más el primer aminoácido del ectodominio NA, la región codificante de la proteína NDV B1 HN (solo ectodominio), dos codones de parada secuenciales, los nucleótidos no traducidos del marco de lectura WSN NA y la región 5' no codificante del ARNv de WSN.

FIG. 2. Representación esquemática de la alteración en la secuencia de aminoácidos polibásicos de HA

La secuencia de nucleótidos identificada como H5N1 HA representa los nucleótidos 1013-1045 (SEQ ID NO: 13, secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14) del marco de lectura abierto de la glicoproteína de superficie HA de Gripe A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Los nucleótidos 1026-1038 se reemplazaron por la citosina de nucleótido único usando PCR de excisión y mutagénesis dirigida que daba como resultado la secuencia de nucleótidos de HA avirulenta (SEQ ID NO: 15, secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16). El cambio de secuencia corresponde al reemplazo de la secuencia polibásica de 5 aminoácidos con el único aminoácido treonina.

FIG. 3. Representación esquemática de la alteración en la secuencia de ácido nucleico de HA

La secuencia identificada como HA avirulenta representa los nucleótidos 1013-1033 del marco de lectura abierto de una glucoproteína de superficie HA basada en secuencias consenso de las proteínas HA de la Gripe A/Vietnam/1203/04 (H5N1) (SEQ ID NO: 15; secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 16). Los residuos de adenosina subrayados se reemplazaron de forma tal que las mutaciones fueron sinónimos dando como resultado la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 17 y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16.

FIG. 4A-D. Esquema de mutantes de truncamiento pPol1VN1203 NS

A. La región de codificación del segmento del gen NS de H5N1 es de 833 nucleótidos. B. La construcción pPol1VN1203 NS1-126 tiene una delección en el gen NS de los nucleótidos 379-456 de la región codificante, la inserción de 3 codones de terminación y un sitio de restricción BgIII. C. La construcción pPol1VN1203 NS1-99 tiene una delección en el gen NS de los nucleótidos 298-456 de la región codificante, la inserción de 4 codones de terminación, un sitio de restricción BgIII y un sitio de restricción Pacl. D. La construcción pPol1VN1203 NS1-73 tiene una delección en el gen NS de los nucleótidos 219-456 de la región codificante, la inserción de 4 codones de terminación, un sitio de restricción BgIII y un sitio de restricción Pacl.

FIG. 5. Esquema de pNDV/B1

La secuencia representada está flanqueada en el extremo 3' por un promotor T7 y en el extremo 5' por una ribozima HDV y un terminador T7. El sitio de inserción entre los genes P y M comprende un sitio de restricción XbaI único.

FIG. 6. Análisis de transferencia Western de la expresión de KGFR en virus de rNDV quiméricos

5 Los virus quiméricos rNDV (carril 1), rNDV-KGFR (carril 2) y rNDV-KGFR/F-CT (carril 3) se cultivaron en huevos de pollo embrionados de 10 días. Los virus purificados se sometieron a análisis de transferencia Western usando un anti-KGFR murino y un HRPO anti-ratón como los anticuerpos primario y secundario, respectivamente.

FIG. 7. Análisis de transferencia Western de la expresión de H7 HA en virus quiméricos rNDV

10 Los virus quiméricos rNDV (carril 1), rNDV-KGFR (carril 2) y rNDV-KGFR/F-CT (carril 3) se cultivaron en huevos de pollo embrionados de 10 días. Los virus purificados se sometieron a análisis de transferencia Western usando un anti-KGFR murino y un HRPO anti-ratón como los anticuerpos primario y secundario, respectivamente.

FIG. 8. Modificación del sitio de escisión de la proteína F de rNDV

15 A: Representación esquemática del genoma de rNDV/B1 con dos o tres cambios de aminoácidos en el sitio de escisión de sus proteínas F. El enlace peptídico que se escinde en la proteína F se indica con una barra oblicua. B: Formación de sincitios en células CEF infectadas por rNDV con proteínas F modificadas. Las células CEF infectaron una multiplicidad de infección de 0,001, con los virus rNDV/B1, rNDV/F2aa y rNDV/F3aa. La diseminación viral se controló cada 24 horas mediante un ensayo de inmunofluorescencia.

FIG. 9. Construcción y caracterización del vector fusogénico rNDV que expresa la proteína HPAI H7 HA.

20 A: Representación esquemática de la construcción de ADNc de H7 quimérica rNDV/F3aa, con las secuencias de GE/GS, Kozak y H7 HA parcial presentadas (SEQ ID NO: 36). B: Comparación de la cinética de crecimiento viral, Log TCID vs Tiempo después de la inoculación (horas). Cuadrado, rNDV/B1; triángulo, rNDV/F3aa; asterisco en negrita, rNDV/B1-H7; asterisco, rNDV/F3aa-quiméricoH7. C: Expresión de la proteína WT H7 HA o la proteína H7 HA quimérica en células infectadas con rNDV. Carril 1, simulacro infectado; carril 2, rNDV/F3aa; carril 3, rNDV/B1-H7; carril 4, rNDV/F3aa-quimérico H7. Fila 1 α -aviar H7; fila 2, α -NDV. D: La incorporación de la proteína H7 HA quimérica en viriones de rNDV aumentó en comparación con la de la proteína WT H7 HA. Carril 1, rNDV/B1-H7; 25 rNDV/F3aa-quiméricoH7. Fila 1 α -aviar H7; fila 2, α -NDV.

5. Descripción detallada de la invención

30 La presente invención proporciona virus quiméricos de la enfermedad de Newcastle (NDV), que comprenden un genoma empaquetado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F-fusión que tiene los dominios transmembrana y citoplásmicos de una proteína F y al menos un epítipo de un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso o un antígeno asociado con una enfermedad que está anclado por el extremo C-terminal, de manera que la proteína F-fusión se expresa y se incorpora en el NDV quimérico, en donde el antígeno no se deriva de un paramixovirus, y en el que la función de la proteína F es suministrada por la proteína F-fusión o por la proteína F nativa.

35 En una realización, el NDV quimérico de la presente invención tiene un genoma que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F, de modo que la proteína F se expresa e incorpora en el NDV quimérico. En una realización adicional, la proteína F se modifica genéticamente en el sitio de corte para aumentar la actividad fusogénica, preferiblemente en la que el sitio de corte de la proteína F se reemplaza con un sitio de corte multibásico.

40 En otra realización del NDV quimérico de la presente invención, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión F reemplaza la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F de NDV y la proteína de F-fusión suministra la función de la proteína F.

En otras o adicionales realizaciones del NDV quimérico de la presente invención: (a) la secuencia que codifica la proteína de fusión F se inserta entre los genes P y M del genoma del NDV; y/o (b) los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína de fusión F son de la cepa LaSota de NDV.

45 En otras o adicionales realizaciones del NDV quimérico de la presente invención: (a) la proteína F-fusión contiene o bien residuos no aminoácidos del ectodominio de la proteína F, o contiene un fragmento del ectodominio de la proteína F que hace no retener la actividad del ectodominio de la proteína F; o (b) la proteína de fusión F comprende entre 1 y 15 residuos del ectodominio de una proteína F del NDV que están inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de la proteína F.

50 En otras o adicionales realizaciones, el NDV quimérico de la presente invención se atenúa. En otra o adicional realización del NDV quimérico de la presente invención, el agente infeccioso es un patógeno infeccioso.

En algunas realizaciones, el antígeno del NDV quimérico de la presente invención es un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno protector asociado con un parásito o un antígeno fúngico; preferiblemente en el que el

antígeno viral es un antígeno de adenoviridae, herpesviridae, leviviridae, poxviridae, picornaviridae, papovaviridae, reoviridae, retroviridae, flaviridae, togaviridae, hepadnaviridae, rhabdoviridae, arenaviridae, o coronavirusidae; preferiblemente en el que el antígeno bacteriano es un antígeno de bacterias de la familia Aquaspirillum, familia Azospirillum, familia Azotobacteraceae, familia Bacteroidaceae, especies de Bartonella, familia Bdellovibrio, especies 5 Campylibacter, especies de Chlamydia, Clostridium, la familia Enterobacteriaceae, familia Gardinella, Haemophilus influenzae, familia Halobacteriaceae, Familia Helicobacter, familia Legionallaceae, especie Listeria, familia Methylococcacea, familia Neisseriaceae, familia Oceanospirillum, familia Pasteurellaceae, especie Pneumococcus, especie Pseudomonas, familia Rhizobiaceae, familia Spirillum, familia Spirosomaceae, familia Staphylococcus, Streptococcus, Yersinia o familia Vampirovibrio; preferiblemente en donde el antígeno protector asociado con un 10 parásito es un antígeno de una ameba, un parásito de la malaria, Plasmodium o Trypanosoma cruzi; y preferiblemente en el que el antígeno fúngico es un antígeno de hongos de especies de Absidia, especies de Aspergillus, Ascomyces, Basidiomycetes, Basidibolus ranarum, Blastomyces dermatitidis, especies de Candida, Coccidioides immitis, especies de Conidiobolus, Cryptococcus neoformans, especies de Cunninghamella, dermatofitos, Deuteromicetes, Histoplasma capsulatum, Microsporium gypseum, Mucor pusillus, Oomycetes, 15 Paracoccidioides brasiliensis, Pseudallescheria boydii, Rhinosporidium seeberi, Pneumocystis carinii, especies de Rhizopus, especies de Saccharomyces, Sporothrix schenckii, o Zygomycetes.

En otra realización o adicional del NDV quimérico de la presente invención, el antígeno es el ectodominio de un antígeno de hemaglutinina de un virus de la gripe. En una realización, dicho virus de la gripe es un virus de la gripe 20 aviar. En una realización del NDV quimérico de la presente invención, la cadena principal del NDV quimérico es la cepa LaSota de NDV.

La presente invención también proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden el NDV quimérico de la presente invención.

Además, se proporcionan los NDV quiméricos de la presente invención o las composiciones inmunogénicas de la presente invención para usar en un método para inducir una respuesta inmune a NDV y un agente infeccioso o 25 enfermedad asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave, o para usar en la inducción de una respuesta inmune a un agente infeccioso o enfermedad asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave o un ser humano.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona usos de los NDV quiméricos de la presente invención en la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmune a NDV y una agente infeccioso o enfermedad 30 asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave, o para inducir una respuesta inmune a un agente infeccioso o una enfermedad asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave o un ser humano.

Además, se proporcionan NDV quiméricos de la presente invención o composiciones inmunogénicas de la presente invención para su uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad en un ser humano o en un ave, en donde la enfermedad está asociada con el antígeno de la proteína de fusión F.

En consecuencia, la presente invención también proporciona los usos de los NDV quiméricos de la presente invención en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad en un ser humano o en un 35 ave, en donde la enfermedad está asociada con el antígeno de la proteína de fusión F.

La presente invención también proporciona métodos para producir una formulación inmunogénica, comprendiendo el método los pasos de: (a) propagar el NDV quimérico de la presente invención en un huevo embrionado o en una 40 línea celular que es susceptible a una infección por NDV; y (b) recoger el virus progenie; en el que el virus se desarrolla en cantidades suficientes y en condiciones suficientes para que el virus esté libre de contaminación, de manera que la progenie del virus sea adecuada para su uso en una formulación inmunogénica.

La presente invención proporciona moléculas de ADN recombinante que codifican el NDV quimérico de la presente invención.

45 Se describen en este documento virus de ARN de cadena negativa quiméricos diseñados para expresar proteínas de fusión que incorporan al virión, métodos para producir tales virus quiméricos y el uso de tales virus, por ejemplo como inmunógenos en formulaciones inmunogénicas o en ensayos in vitro. Los virus quiméricos descritos en este documento se caracterizan por mostrar, en la superficie del virión, no solo antígenos asociados con el virus sino también la proteína de fusión.

50 Los virus que se pueden diseñar de acuerdo con los métodos descritos en este documento pueden ser cualquier virus envuelto. En un aspecto específico, los virus que pueden modificarse por ingeniería según los métodos descritos en este documento tienen genomas segmentados o no segmentados, genomas monocatenarios o bicatenarios, y expresan al menos una glucoproteína esencial (por ejemplo, NA, HA, HN o F) que se incorpora en la envoltura virial. Los virus para su uso de acuerdo con los métodos descritos en este documento pueden 55 seleccionarse de cepas de origen natural, variantes o mutantes; virus mutagenizados (por ejemplo, por exposición a irradiación UV, mutágenos y/o pases); reagrupados (para virus con genomas segmentados); y/o virus genéticamente modificados. Por ejemplo, los virus mutantes pueden generarse por variación natural, exposición a irradiación UV, exposición a mutágenos químicos, pases en huéspedes no permisivos, por reasignación (es decir, por coinfección

de un virus segmentado atenuado con otra cepa que tiene los antígenos deseados), y/o mediante ingeniería genética (por ejemplo, usando "genética inversa"). Los ejemplos no limitantes de virus con genomas segmentados para su uso de acuerdo con los métodos de la invención incluyen virus de la familia ortomixoviridae (por ejemplo, virus de la gripe), bunyaviridae (por ejemplo, Bunyamwera), reoviridae y arenaviridae (por ejemplo, fiebre de Lassa).

5 Los ejemplos no limitantes de virus con genomas no segmentados para su uso de acuerdo con los métodos descritos en este documento incluyen coronaviridae (por ejemplo, virus corona humano (SARS)), hepadnaviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis A, B o C), herpesviridae (por ejemplo, virus del herpes simple), poxviridae (por ejemplo, viruela), rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus Sendai y rabia), paramyxoviridae (p. ej., sarampión y virus respiratorio sincitial) y filoviridae (virus Marburg y Ébola). En ciertos aspectos, el virus segmentado es el virus de la gripe. En otras realizaciones, el virus no segmentado es NDV.

En ciertas realizaciones, los virus seleccionados para su uso en la invención están atenuados y/o tienen una actividad antagonista de IFN defectuosa; es decir, son infecciosos y pueden replicarse in vivo, pero solo generan títulos bajos que dan como resultado niveles subclínicos de infección que no son patógenos. Los virus pueden atenuarse mediante cualquier método conocido en la técnica y/o ejemplificado en la presente, por ejemplo, modificando el virus para que comprenda una mutación en el gen NS1 o comprender una modificación en la secuencia de aminoácidos polibásicos antes del sitio de escisión en la proteína HA. Dichos virus atenuados diseñados de acuerdo con la presente descripción son, por lo tanto, candidatos ideales para las formulaciones inmunogénicas, por ejemplo, vacunas de virus vivos. Cuando se administran a un sujeto, los virus quiméricos atenuados de la descripción son capaces de generar una respuesta inmune y provocar inmunidad tanto para el virus como para la proteína de fusión o no nativa. En algunas realizaciones, la proteína no nativa se deriva de un patógeno. Por extensión, la administración de dicho virus quimérico a un sujeto genera una respuesta inmune y/o inmunidad a dicho patógeno además del virus.

La invención también se refiere de forma general al uso del virus NDV quimérico de la invención en composiciones (por ejemplo, formulaciones inmunogénicas) para humanos o animales (por ejemplo, aves). En particular, los virus quiméricos que se atenúan pueden usarse como vacunas contra una amplia gama de virus y/o enfermedades. Debido a que el virus quimérico está diseñado para expresar secuencias de genes heterólogos como epítopos extraños en el virión, las composiciones que comprenden un virus NDV quimérico de la invención (p. ej., formulaciones de vacunas) pueden diseñarse para la inmunización contra variantes de cepas múltiples, diferentes virus o contra agentes infecciosos completamente diferentes o antígenos de enfermedades (por ejemplo, bacterias, parásitos, hongos o antígenos específicos de tumores) a partir de los cuales se derivan las secuencias de genes heterólogos. Se pueden usar muchos métodos para introducir las formulaciones de virus vivos atenuados a un sujeto humano o animal para inducir una respuesta inmune o de citocina apropiada. Estos incluyen, pero no se limitan a, rutas intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea.

5.1 Virus quimérico de la gripe

5.1.1 Virus quimérico de la gripe aviar que comprende una proteína de fusión incorporada en su virión

La presente descripción abarca el diseño de un virus de la gripe aviar de tal manera que una proteína de fusión está codificada por el genoma y, cuando se expresa, se incorpora en el virión. Cualquier tipo, subtipo o cepa del virus de la gripe aviar que pueda manipularse genéticamente para expresar e incorporar la proteína de fusión en el virión de la gripe aviar puede seleccionarse y utilizarse de acuerdo con la descripción, incluidas, entre otras, cepas naturales, variantes o mutantes, virus mutagenizados, recombinados y/o virus genéticamente modificados. En un aspecto, los virus de la gripe aviar pueden no ser virus naturales. En otro aspecto, los virus de la gripe aviar pueden ser virus genéticamente modificados. Los ejemplos no limitantes de virus de la gripe aviar incluyen los subtipos de Gripe A H5N1, H6N2, H7N3, H9N2 y H10N7.

La manipulación genética del virus de la gripe requiere el diseño de al menos uno de los ocho segmentos de ARN viral que comprenden el genoma viral. La mutagénesis del genoma puede lograrse mediante técnicas de "ingeniería inversa" (ver sección 5.4). Sin embargo, la plasticidad del genoma de la gripe está limitada tanto en la cantidad de segmentos como en la longitud de los segmentos que pueden integrarse de manera estable en el virus. La estabilidad general de los insertos largos es desconocida y los segmentos que comprenden dichos insertos, o partes de los mismos, pueden perderse debido a la variedad viral después de algunas generaciones. Por lo tanto el virus de la gripe aviar puede modificarse por ingeniería genética de manera que una de sus dos proteínas superficiales principales se reemplace por una proteína de fusión.

Por consiguiente, se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico que comprende al menos una proteína de fusión que comprende un ectodominio (ED) de una proteína de un agente infeccioso distinto de un virus de la gripe y los dominios citoplásmico (CT) y transmembrana (TM) o el dominio transmembrana (TM) de al menos una glucoproteína esencial del virus de la gripe, en donde la al menos una proteína de fusión reemplaza funcionalmente al menos una glucoproteína esencial del virus de la gripe aviar. En otras palabras, el virus de la gripe aviar sirve como la "estructura" que está diseñada para expresar e incorporar en su virión la proteína de fusión en lugar de una glucoproteína esencial del virus de la gripe aviar. La inclusión de los dominios TM y CT o dominio TM de una glucoproteína del virus de la gripe correspondiente a la glicoproteína del virus de la gripe aviar esencial reemplazada funcionalmente por la proteína de fusión permite que la proteína de fusión se incorpore al virión del

virus de la gripe aviar. Los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión pueden corresponder o derivarse de cualquier virus de la gripe que permita que la proteína de fusión se incorpore en el virión de la cadena principal del virus de la gripe aviar.

5 En ciertos aspectos, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o al dominio TM de un tipo, subtipo o cepa diferente del virus de la gripe aviar que el virus de la gripe aviar estructural. En otros aspectos, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o al dominio TM de un virus de la gripe distinto de un virus de la gripe aviar. En otros aspectos, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o al dominio TM de la estructura del virus de la gripe aviar.

10 El virión de la gripe aviar comprende dos glicoproteínas principales de superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (N), que comprenden un dominio citoplásmico, un dominio transmembrana y un ectodominio. Por consiguiente, en ciertos aspectos de la descripción, los dominios TM y CT de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT de una proteína HA o una proteína NA de un virus de la gripe. Dado que el dominio CT de HA o NA puede no ser necesario para la incorporación de la proteína de fusión en el virión del virus de la gripe aviar, la proteína de fusión, en algunos aspectos, está diseñada para contener solo el dominio TM de HA o NA. Por ejemplo, se ha demostrado que el dominio de CT de NA es innecesario para el empaquetado adecuado de esta proteína en envueltas virales de gripe A (García-Sastre et al., 1995, Virus Res. 37: 37-47). Por lo tanto, cuando se usan dominios estructurales correspondientes a los de una proteína de NA en la creación de la proteína de fusión, la descripción describe diseñar la proteína de fusión para que contenga solo un dominio TM correspondiente a una proteína NA del virus de la gripe. Por consiguiente, en un aspecto de la descripción, la proteína de fusión se modifica por ingeniería genética para que contenga solo un dominio TM, cuyo dominio TM corresponde al dominio TM de una proteína NA del virus de la gripe.

Los dominios TM y CT de las proteínas HA y NA del virus de la gripe son estructuralmente distintos ya que los dominios están ubicados en el extremo C de la proteína HA y el extremo N de la proteína NA. Además de la orientación diferente de los dos dominios en cada clase de glicoproteína de superficie, los dominios estructurales de HA y CT pueden comprender diferencias aún desconocidas en funcionalidad dependiendo de su colocación relativa dentro de una cadena polipeptídica. Por lo tanto, cuando se diseña la proteína de fusión para el virus de la gripe aviar, la orientación del ectodominio del agente infeccioso que se fusionará con los dominios TM y CT o el dominio TM de una glicoproteína del virus de la gripe guiará la selección de los dominios TM y CT o el dominio TM. Por ejemplo, cuando el ectodominio de un agente infeccioso está anclado por el extremo N, se pueden usar los dominios TM y CT de una proteína NA del virus de la gripe.

HA y NA exhiben actividades competitivas con respecto a la fusión y liberación celular, respectivamente, que son necesarias para la infectividad y propagación del virus. El HA se une al ácido N-AcetilNeuramínico (NeuNAc, ácido siálico) en una superficie celular que conduce a la captación del virus por una célula huésped, mientras que NA escinde restos de ácido siálico de la superficie celular que conducen a la liberación del virus de progenie de una célula infectada. La interrupción de cualquiera de estas actividades da como resultado un virus no funcional. En consecuencia, para mantener la competencia viral, cuando se reemplaza una glicoproteína de superficie, su función en el virus quimérico debe ser suministrada por la proteína de fusión. En un aspecto de la descripción, el virus de la gripe aviar quimérico comprende una proteína de fusión que exhibe actividad de neuraminidasa. En otro aspecto de la descripción, el virus de la gripe aviar quimérico comprende una proteína de fusión que exhibe actividad de unión al receptor. En otro aspecto más de la descripción, el virus de la gripe aviar quimérico comprende dos proteínas de fusión, una de las cuales muestra actividad de neuraminidasa, y la otra muestra actividad de unión al receptor. En todavía otros aspectos más, el virus de la gripe aviar quimérico comprende una proteína de fusión que comprende un epítipo de un agente infeccioso heterólogo, cuya proteína de fusión exhibe actividad de neuraminidasa o actividad de unión al receptor. En otro aspecto de la descripción, el virus de la gripe aviar quimérico comprende una proteína de fusión que exhibe actividad de unión al receptor. En otro aspecto de la descripción, el virus de la gripe aviar quimérico comprende una proteína de superficie que contiene el ectodominio de la proteína HN del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y los dominios TM y CT de la proteína NA de la Gripe AWSN/33, cuyo ectodominio HN muestra actividad de neuraminidasa. En otros aspectos, el virus de la gripe aviar quimérico comprende una proteína de superficie que contiene el ectodominio de la proteína HA de un virus de la gripe heterólogo (por ejemplo, la proteína H7 HA o la proteína H9 HA). HA y NA están codificadas por segmentos separados del genoma viral y la sustitución de la región de codificación completa de la proteína nativa elimina la mayoría de las restricciones de longitud en la secuencia que codifica la proteína introducida.

55 En ciertos aspectos de la descripción, la proteína de fusión comprende el dominio transmembrana más de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) inmediatamente adyacente(s) del ectodominio de una glicoproteína del virus de la gripe esencial. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender el dominio transmembrana de una proteína NA del virus de la gripe, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) inmediatamente adyacente(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de la gripe, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe de manera que la proteína de fusión pueda reemplazar funcionalmente la función de la proteína NA. En otro aspecto de la descripción, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y transmembrana de una proteína NA del virus de la gripe, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de la gripe que están inmediatamente adyacentes al dominio

transmembrana de la proteína NA del virus de la gripe, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe de manera que la proteína de fusión puede reemplazar funcionalmente a la proteína NA. En otro aspecto de la descripción, la proteína de fusión comprende el dominio transmembrana o dominios citoplasmáticos y transmembrana de una proteína NA, el dominio del tallo completo, o un fragmento del mismo, de una proteína NA que precede a su cabeza globular, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe de manera que la proteína de fusión puede reemplazar funcionalmente la función de la proteína NA. En otro aspecto de la descripción, la proteína de fusión comprende el dominio transmembrana de una proteína HA del virus de la gripe, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) inmediatamente adyacente(s) del ectodominio de la proteína HA del virus de la gripe, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe de modo que la proteína de fusión puede reemplazar funcionalmente la función de la proteína HA. En otro aspecto de la descripción, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y transmembrana de una proteína HA del virus de la gripe, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína HA del virus de la gripe que están inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de la proteína HA del virus de la gripe, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe de manera que la proteína de fusión puede reemplazar funcionalmente la proteína HA.

En ciertos aspectos, la al menos una proteína de fusión del virus de la gripe aviar quimérico no comprende el ectodominio completo de una proteína heteróloga (por ejemplo, comprende un fragmento antigénico del ectodominio de una proteína de un agente infeccioso heterólogo), y puede comprender o no adicionalmente uno o más fragmentos del ectodominio de una glicoproteína esencial nativa. Por consiguiente, en ciertos aspectos, el ectodominio de la proteína de fusión puede comprender un fragmento del ectodominio de una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En otros aspectos, el ectodominio de la proteína de fusión puede comprender fragmentos tanto de una glicoproteína esencial nativa como de una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En los ejemplos en los que la proteína de fusión reemplaza a una glicoproteína de superficie esencial, la proteína de fusión debe suministrar la función de la glicoproteína de superficie, es decir, la proteína de fusión debe exhibir la funcionalidad de la glicoproteína de superficie que está reemplazando.

Se describen en este documento secuencias de nucleótidos (es decir, segmentos recombinantes) que codifican las proteínas de fusión descritas en esta Sección 5.1.1. En aspectos preferidos, los segmentos recombinantes que comprenden ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en la Sección 5.1.1 comprenden señales de incorporación 3' y 5' que son necesarias para la replicación, transcripción y empaquetamiento adecuados de los ARNv (Fujii et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 2002-2007; Zheng, et al., 1996, Virology 217: 242 - 251). En un aspecto, los segmentos recombinantes usan, por lo tanto, las secuencias 3' y 5' no codificantes y/o no traducidas de segmentos de virus dentro del mismo tipo viral o cepa que el virus de la gripe aviar estructural. En otros aspectos de la descripción, los segmentos recombinantes comprenden ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en esta Sección, 5.1.1, que comprenden la región 3' no codificante de un ARNv del virus de la gripe NA, correspondiendo la región codificadora NA a los dominios CT y TM de la proteína NA, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de la gripe que están inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de la proteína NA del virus de la gripe, las regiones no traducidas del marco de lectura de la proteína NA y la región no codificante 5' del ARNv de NA.

Como alternativa al reemplazo de las proteínas NA o HA del virus de la gripe aviar, se pueden usar técnicas "genéticas inversas" y bicistrónicas para producir un virus de la gripe quimérico que comprenda un ectodominio, o un fragmento del mismo, de una proteína de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe y los dominios TM y/o CT de un virus de la gripe. Ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N° 6.887.699, la patente de EE.UU. N° 6.001.634, la patente de EE.UU. N° 5.854.037 y la patente de EE.UU. No. 5.820.871. Los enfoques bicistrónicos implican insertar la región codificante de la proteína de fusión en el marco de lectura abierto de una proteína necesaria del virus y su codón de parada. La inserción está flanqueada por un IRES y cualquier secuencia señal no traducida de la proteína necesaria en la que se inserta y no debe interrumpir el marco de lectura abierto, la señal de empaquetamiento, la poliadenilación o los promotores transcripcionales de la proteína viral necesaria. Cualquier IRES bien conocido en la técnica o descrito en este documento puede usarse de acuerdo con la descripción (por ejemplo, el IRES del gen BiP, los nucleótidos de 372 a 592 de la entrada de la base de datos GenBank HUMGRP78 o el IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), nucleótidos 1430-2115 de la entrada de la base de datos de GenBank CQ867238.). Dado que la función de HA o NA no se reemplaza cuando se usa el enfoque bicistrónico, la porción de ectodominio de la proteína de fusión no se limita a una proteína que proporcione la función de la proteína HA o NA reemplazada. El ectodominio de dicha proteína de fusión puede corresponder a cualquier molécula heteróloga, o comprender un fragmento de cualquier molécula heteróloga, incluidos, entre otros, antígenos, antígenos de enfermedad y antígenos derivados de cualquier proteína de un agente infeccioso (por ejemplo, cualquier antígeno protector asociado con agentes infecciosos virales, bacterianos o parasitarios). Ejemplos no limitativos de antígenos derivados o asociados con agentes infecciosos para su uso de acuerdo con los métodos descritos es este documento se describen en la Sección 5.3, más adelante.

La sustitución de una proteína de superficie necesaria del virus de cadena principal o la introducción de un segmento recombinante en el genoma viral puede atenuar el virus quimérico resultante, es decir, el virus quimérico exhibirá una replicación deteriorada con respecto al tipo silvestre. En ciertas realizaciones de la invención, se desea la atenuación del virus quimérico de modo que el virus quimérico permanezca, al menos parcialmente, infeccioso y

pueda replicarse in vivo, pero solo generará títulos bajos que darán como resultado niveles subclínicos de infección que no son patógenos. Dichos virus quiméricos atenuados son especialmente adecuados para las realizaciones de la invención en las que el virus se administra a un sujeto para actuar como un inmunógeno, por ejemplo, una vacuna viva. Los virus pueden atenuarse mediante cualquier método conocido en la técnica y/o ejemplificado en la presente, por ejemplo, modificando el virus para que comprenda una mutación en el gen NS1 o comprender una modificación en la secuencia de aminoácidos polibásicos antes del sitio de escisión en la proteína HA (véanse la Patente de Estados Unidos N° 6.468.544, la Patente de Estados Unidos N° 6.669.943, Li et al., 1999, J. Infect. Dis. 179: 1132-1138).

En un aspecto, un virus de la gripe aviar quimérico atenuado comprende un genoma que comprende una mutación en el gen NS1 del virus de la cadena principal de la gripe aviar, que se conoce en otros virus de la gripe por disminuir la capacidad del producto del gen NS1 para antagonizar una respuesta al interferón celular. En otro aspecto, un virus de la gripe aviar quimérico atenuado comprende un genoma que comprende una mutación en el gen HA del virus de la cadena principal de la gripe aviar, que se conoce en otros virus de la gripe por disminuir o eliminar la capacidad de las proteasas celulares para escindir la proteína en su forma activa y de ese modo reducir o eliminar la fusión e infectividad inducida por AH. En todavía otro aspecto más, un virus de la gripe aviar quimérico atenuado comprende un genoma que comprende una mutación tanto en el gen HA como en el gen NS1 del virus de la cadena principal de la gripe aviar, que se conocen por separado en otros virus gripales o cuando se combinan para reducir o disminuir la actividad viral. Los títulos de virus de la gripe aviar atenuados-quiméricos y salvaje pueden determinarse utilizando cualquier técnica bien conocida en la técnica o descrita en este documento (por ejemplo, ensayos de hemaglutinación, ensayos de placa, dosis infecciosas de huevo (EID50), dosis infecciosas de cultivo tisular (TCID50), etc.) y los virus pueden propagarse en las condiciones descritas en este documento o bien conocidas en la técnica (por ejemplo, en células CEF, células MDCK (por ejemplo, en MEM, suero de ternera fetal al 10% v/v (FCS), 1% de penicilina/estreptomina a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂) o huevos de gallina embrionados (por ejemplo, en una incubadora estacionaria a 37°C con 55% de humedad relativa). Alternativamente, los virus pueden propagarse en células (por ejemplo, células CEF, células MDCK, etc.) que crecen en medio sin suero o reducido en suero (por ejemplo, tripsina TPCK).

5.1.2 Virus de la gripe atenuado quimérico que comprende una proteína de fusión incorporada en su virión

Se describe en este documento el diseño de un virus de la gripe atenuado de modo que una proteína de fusión esté codificada por el genoma y que, cuando se exprese, se incorpore al virión. En otras palabras, se describe el uso de un virus de la gripe atenuado (el virus parental) como la "cadena principal" que está diseñada para expresar e incorporar a su virión la proteína de fusión. Cualquier cepa o tipo de virus de la gripe atenuados que incluya, pero no se limite a, cepas naturales, variantes o mutantes, virus mutagenizados, recombinantes y/o virus genéticamente modificados se puede utilizar como la estructura de la que está diseñada para expresar e incorporar a su virión la proteína de fusión. En un aspecto específico de la descripción, los virus de la gripe parentales no son virus naturales. En otro aspecto específico, los virus de la gripe parentales son virus genéticamente modificados.

Los virus de la gripe para su uso como el virus de cadena principal de acuerdo con la descripción pueden tener de forma natural un fenotipo atenuado o pueden modificarse genéticamente para que comprendan una mutación asociada con un fenotipo atenuado, donde dicha mutación es conocida en la técnica o se describe en este documento (por ejemplo, una mutación en la proteína viral NS1 o proteína HA viral). En algunos aspectos de la descripción, el virus atenuado es la gripe A. En otros aspectos de la descripción, el virus atenuado es la gripe B. En otros aspectos de la descripción más, el virus atenuado es la gripe C. Los ejemplos no limitantes de los virus de la gripe que pueden diseñarse de acuerdo con la descripción incluyen la gripe A subtipo H10N4, subtipo H10N5, subtipo H10N7, subtipo H10N8, subtipo H10N9, subtipo H11N1, subtipo H11N13, subtipo H11N2, subtipo H11N4, subtipo H11N6, subtipo H11N8, subtipo H11N9, subtipo H12N1, subtipo H12N4, subtipo H12N5, subtipo H12N8, subtipo H13N2, subtipo H13N3, subtipo H13N6, subtipo H13N7, subtipo H14N5, subtipo H14N6, subtipo H15N8, subtipo H15N9, subtipo H16N3, subtipo H1N1, subtipo H1N2, subtipo H1N3, subtipo H1N6, subtipo H1N9, subtipo H2N1, subtipo H2N2, subtipo H2N3, subtipo H2N5, subtipo H2N7, subtipo H2N8, subtipo H2N9, subtipo H3N1, subtipo H3N2, subtipo H3N3, subtipo H3N4, subtipo H3N5, subtipo H3N6, subtipo H3N8, subtipo H3N9, subtipo H4N1, subtipo H4N2, subtipo H4N3, subtipo H4N4, subtipo H4N5, subtipo H4N6, subtipo H4N8, subtipo H4N9, subtipo H5N1, subtipo H5N2, subtipo H5N3, subtipo H5N4, subtipo H5N6, subtipo H5N7, subtipo H5N8, subtipo H5N9, subtipo H6N1, subtipo H6N2, subtipo H6N3, subtipo H6N4, subtipo H6N5, subtipo H6N6, subtipo H6N7, subtipo H6N8, subtipo H6N9, subtipo H7N1, subtipo H7N2, subtipo H7N3, subtipo H7N4, subtipo H7N5, subtipo H7N7, subtipo H7N8, subtipo H7N9, subtipo H8N4, subtipo H8N5, subtipo H9N1, subtipo H9N2, subtipo H9N3, subtipo H9N5, subtipo H9N6, subtipo H9N7, subtipo H9N8 o subtipo H9N9; cepa de la gripe Aichi/5/88, cepa Akita/27/2001, cepa Akita/5/2001, cepa Alaska/16/2000, cepa Alaska/1777/2005, cepa Argentina/69/2001, cepa Arizona/146/2005, cepa Arizona/148/2005, cepa Bangkok/163/90, cepa Bangkok/34/99, cepa Bangkok/460/03, cepa Bangkok/54/99, cepa Barcelona/215/03, cepa Beijing/15/84, cepa Beijing/184/93, cepa Beijing/243/97, cepa Beijing/43/75, cepa Beijing/5/76, cepa Beijing/76/98, cepa Bélgica/WV106/2002, cepa Bélgica/WV107/2002, cepa Bélgica/WV109/2002, cepa Bélgica/WV114/2002, cepa Bélgica/WV122/2002, cepa Bonn/43, cepa Brasil/952/2001, cepa Bucarest/795/03, cepa Buenos Aires/161/00, cepa Buenos Aires/9/95, cepa Buenos Aires/SW16/97, cepa Buenos Aires/VL518/99, cepa Canadá/464/2001, cepa Canadá/464/2002, cepa Chaco/366/00, cepa Chaco/R113/00, cepa Cheju/303/03, cepa Chiba/447/98, cepa Chongqing/3/2000, cepa aislada clínica SA1 Tailandia/2002, cepa aislada clínica SA10 Tailandia/2002, cepa aislada clínica SA100 Filipinas/2002, cepa aislada clínica SA101

Filipinas/2002, cepa aislada clínica SA110 Filipinas/2002), cepa aislada clínica SA112 Filipinas/2002, cepa aislada clínica SA113 Filipinas/2002, cepa aislada clínica SA114 Filipinas/2002, cepa aislada clínica SA2 Tailandia/2002, cepa aislada clínica SA20 Tailandia/2002, cepa aislada clínica SA38 Filipinas/2002, cepa aislada clínica SA39 Tailandia/2002, cepa aislada clínica SA99 Filipinas/2002, cepa CNIC/27/2001, cepa Colorado/2597/2004, cepa
 5 Cordoba/VA418/99, cepa Checoslovaquia/16/89, cepa Checoslovaquia/69/90, cepa Daeku/10/97, cepa Daeku/45/97, cepa Daeku/47/97, cepa Daeku/9/97, cepa B/Du/4/78, cepa B/Durban/39/98, cepa Durban/43/98, cepa Durban/44/98, cepa B/Durban/52/98, cepa Durban/55/98, cepa Durban/56/98, cepa Inglaterra/1716/2005, cepa Inglaterra/2054/2005), cepa Inglaterra/23/04, cepa Finlandia/154/2002, cepa Finlandia/159/2002, cepa Finlandia/160/2002, cepa Finlandia/161/2002, cepa Finlandia/162/03, cepa Finlandia/162/2002, cepa
 10 Finlandia/162/91, cepa Finlandia/164/2003, cepa Finlandia/172/91, cepa Finlandia/173/2003, cepa Finlandia/176/2003, cepa Finlandia/184/91, cepa Finlandia/188/2003, cepa Finlandia/190/2003, cepa Finlandia/220/2003, cepa Finlandia/WV5/2002, cepa Fujian/36/82, cepa Geneva/5079/03, cepa Genoa/11/02, cepa Genoa/2/02, cepa Genoa/21/02, cepa Genova/54/02, cepa Genova/55/02, cepa Guangdong/05/94, cepa Guangdong/08/93, cepa Guangdong/5/94, cepa Guangdong/55/89, cepa Guangdong/8/93, cepa Guangzhou/7/97, cepa
 15 Guangzhou/86/92, cepa Guangzhou/87/92, cepa Gyeonggi/592/2005, cepa Hannover/2/90, cepa Harbin/07/94, cepa Hawaii/10/2001, cepa Hawaii/1990/2004, cepa Hawaii/38/2001, cepa Hawaii/9/2001, cepa Hebei/19/94, cepa Hebei/3/94), cepa Henan/22/97, cepa Hiroshima/23/2001, cepa Hong Kong/110/99, cepa Hong Kong/1115/2002, cepa Hong Kong/112/2001, cepa Hong Kong/123/2001, cepa Hong Kong/1351/2002, cepa Hong Kong/1434/2002, cepa Hong Kong/147/99, cepa Hong Kong/156/99, cepa Hong Kong/157/99, cepa Hong Kong/22/2001, cepa Hong
 20 Kong/22/89, cepa Hong Kong/336/2001, cepa Hong Kong/666/2001, cepa Hong Kong/9/89, cepa Houston/1/91, cepa Houston/1/96, cepa Houston/2/96, cepa Hunan/4/72, cepa Ibaraki/2/85, cepa ncheon/297/2005, cepa India/3/89, cepa India/77276/2001, cepa Israel/95/03, cepa Israel/WV187/2002, cepa Japón/1224/2005, cepa Jiangsu/10/03, cepa Johannesburgo/1/99, cepa Johannesburgo/96/01, cepa Kadoma/1076/99, cepa Kadoma/122/99, cepa Kagoshima/15/94, cepa Kansas/22992/99, cepa Khazkov/224/91, cepa Kobe/1/2002, cepa, cepa Kouchi/193/99, cepa
 25 Lazio/1/02, cepa Lee/40, cepa Leningrad/129/91, cepa Lissabon/2/90), cepa Los Angeles/1/02, cepa Lusaka/270/99, cepa Lyon/1271/96, cepa Malasia/83077/2001, cepa Maputo/1/99, cepa Mar del Plata/595/99, cepa Maryland/1/01, cepa Memphis/1/01, cepa Memphis/12/97-MA , cepa Michigan/22572/99, cepa Mie/1/93, cepa Milano/1/01, cepa Minsk/318/90, cepa Moscú/3/03, cepa Nagoya/20/99, cepa Nanchang/1/00, cepa Nashville/107/93, cepa Nashville/45/91, cepa Nebraska/2/01, cepa Netherland/801/90, cepa Netherlands/429/98, cepa
 30 Nueva York/1/2002, cepa NIB/48/90, cepa Ningxia/45/83, cepa Norway/1/84, cepa Omán/16299/2001, cepa Osaka/1059/97, cepa Osaka/983/97-V2, cepa Oslo/1329/2002, cepa Oslo/1846/2002, cepa Panamá/45/90, cepa Paris/329/90 , cepa Parma/23/02, cepa Perth/211/2001, cepa Perú/1364/2004, cepa Filipinas/5072/2001, cepa Pusan/270/99, cepa Quebec/173/98, cepa Quebec/465/98, cepa Quebec/7/01, cepa Roma/1/03, cepa Saga/S172/99, cepa Seoul/13/95, cepa Seoul/37/91, cepa Shangdong/7/97, cepa Shanghai/361/2002), cepa
 35 Shiga/T30/98, cepa Sichuan/379/99, cepa Singapur/222/79, cepa Spain/WV27/2002, cepa Stockholm/10/90, cepa Suiza/5441/90, cepa Taiwán/0409/00, cepa Taiwán/0722/02, cepa Taiwán/97271/2001, cepa Teherán/80/02, cepa Tokio/6/98, cepa Trieste/28/02, cepa Ulan Ude/4/02, cepa United Kingdom/34304/99, cepa USSR/100/83, cepa Victoria/103/89, cepa Vienna/1/99, cepa Wuhan/356/2000, cepa WV194/2002, cepa Xuanwu/23/82, cepa Yamagata/1311/2003, cepa Yamagata/K500/2001, cepa Alaska/12/96, cepa GA/86, cepa NAGASAKI/1/87, cepa
 40 Tokyo/942/96, o cepa Rochester/02/2001; Cepa Gripe C Aichi/1/81, cepa Ann Arbor/1/50, cepa Aomori/74, cepa California/78, cepa Inglaterra/83, cepa Grecia/79, cepa Hiroshima/246/2000, cepa Hiroshima/252/2000, cepa Hyogo/1/83, cepa Johannesburg/66, cepa Kanagawa/1/76, cepa Kyoto/1/79, cepa Mississippi/80, cepa Miyagi/1/97, cepa Miyagi/5/2000, cepa Miyagi/9/96, cepa Nara/2/85, cepa NewJersey/76, cepa cerdo/Beijing/115/81, cepa Saitama/3/2000), cepa Shizuoka/79, cepa Yamagata/2/98, cepa Yamagata/6/2000, cepa Yamagata/9/96, cepa
 45 BERLIN/1/85, cepa ENGLAND/892/8, cepa GREAT LAKES/1167/54, cepa JJ/50, cepa PIG/BEIJING/10/81, cepa PIG/BEIJING/439/82), cepa TAYLOR/1233/47, o cepa STRAIN C/YAMAGATA/10/81.

En un aspecto, el virus de la gripe atenuado (el virus parental) utilizado de acuerdo con la descripción tiene una capacidad alterada para antagonizar el interferón celular (IFN). En otro aspecto, el virus de la gripe atenuado (el virus parental) utilizado de acuerdo con la descripción es un tipo de virus o cepa de la gripe que comprende una
 50 mutación en el gen NS1 que da como resultado una capacidad deteriorada del virus para antagonizar la respuesta de interferón celular. Los ejemplos de los tipos de mutaciones que se pueden introducir en el gen NS1 del virus de la gripe incluyen deleciones, sustituciones, inserciones y combinaciones de los mismos. Se pueden introducir una o más mutaciones en cualquier lugar a lo largo del gen NS1 (por ejemplo, el extremo N, el extremo C o en algún punto intermedio) y/o el elemento regulador del gen NS1. En otro aspecto, un virus de la gripe atenuado (el virus parental) utilizado de acuerdo con la descripción comprende un genoma que tiene un gen NS1 del virus de la gripe con una mutación en el extremo N-terminal. En otro aspecto, un virus de la gripe atenuado (el virus parental) comprende un genoma que tiene un gen NS1 del virus de la gripe con una mutación en el extremo C-terminal. En otro aspecto, un virus de la gripe atenuado (el virus parental) utilizado de acuerdo con la descripción comprende un genoma que tiene una mutación en un gen NS1 del virus de la gripe que da como resultado una deleción que consiste en 5,
 55 preferiblemente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 126, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170 ó 175 residuos de aminoácidos del extremo C de NS1, o una deleción de entre 5-170, 25-170, 50-170, 100-170, 100-160 ó 105-160 residuos de aminoácidos del C-terminal. En otro aspecto, un virus de la gripe atenuado (el virus parental) utilizado de acuerdo con la descripción comprende un genoma que tiene una mutación en un gen NS1 del virus de la gripe que da como resultado una deleción de todos
 60 los residuos aminoacídicos excepto los residuos de aminoácidos 1-126, residuos de aminoácidos 1-120, residuos de
 65

aminoácidos 1-115, residuos de aminoácidos 1-110, residuos de aminoácidos 1-100, residuos de aminoácidos 1-99, residuos de aminoácidos 1-95, residuos de aminoácidos 1-85, residuos de aminoácidos 1-80, restos de aminoácidos 1-75, restos de aminoácidos 1-73, restos de aminoácidos 1-70, restos de aminoácidos 1-65 o restos de aminoácidos 1-60, en donde el aminoácido N-terminal es el número 1.

5 En un aspecto de la descripción, el virus de la gripe atenuado descrito en este documento comprende un genoma que comprende una mutación en el gen NS1 de la cadena principal del virus de la gripe, que disminuye la capacidad del producto del gen NS1 para antagonizar una respuesta de interferón celular, y permite que el virus atenuado, en una multiplicidad de infección (MOI) de entre 0,0005 y 0,001, 0,001 y 0,01, 0,01 y 0,1, o 0,1 y 1, o una MOI de
10 0,0005, 0,0007, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 ó 6,0 crezca a títulos entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 veces, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 veces, o de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 veces, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40,
15 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 veces más bajo que el virus de la gripe de tipo salvaje en las células (p. ej., células de origen humano, de ratones, ratas, porcinos, perros, caballos o aviar (p. ej., HEP-2, A549, 293T, células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) o fibroblastos de embrión de pollo (CEF)), determinado aproximadamente de 2 a 10 días, de 3 a 7 días, de 3 a 5 días o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días después de la infección cuando se propaga bajo las mismas condiciones. Los títulos de virus de la gripe atenuados y de tipo salvaje se pueden determinar utilizando cualquier técnica bien conocida en la técnica o descrita en este documento (por ejemplo, ensayos de hemaglutinación, ensayos de placa, dosis infecciosas de huevo (EID50), dosis infecciosas de cultivo de tejido (TCID50), etc.) y los virus pueden propagarse en las condiciones descritas en este documento o conocidas en la técnica (por ejemplo, en células CEF, células MDCK (por ejemplo, en MEM, suero bovino fetal al 10% v/v (FCS), penicilina al 1%/estreptomicina a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%) o huevos de gallina embrionados (por ejemplo, en una incubadora estacionaria a 37°C con 55% de humedad relativa). Alternativamente, los virus pueden propagarse en células (por ejemplo, células CEF, células MDCK, etc.) que crecen en medio sin suero o reducido en suero (por ejemplo, tripsina TPCK).

En otro aspecto, el virus de la gripe atenuado (el virus parental) utilizado de acuerdo con la descripción comprende un genoma que comprende una mutación en el gen HA del virus de la cadena principal de la gripe que disminuye o
30 elimina la capacidad de las proteasas celulares para escindir la proteína en su forma activa. Los ejemplos de los tipos de mutaciones que pueden introducirse en el gen HA de la gripe incluyen deleciones, sustituciones, inserciones o combinaciones de los mismos. La una o más mutaciones se introducen preferiblemente en el sitio de escisión de HA (p. ej., los nucleótidos 1013-1039 de la entrada del GenBank AY818135). En general, las mutaciones que disminuyen la capacidad de escisión de la proteína HA, según se determina mediante métodos estándar en CEF, se correlacionan con una disminución de la virulencia en ensayos in vivo (Horimoto y Kawaoka, 1994, 68: 3120-3128). En otro aspecto, un virus de la gripe atenuado (el virus parental) utilizado de acuerdo con la descripción comprende un genoma que tiene una mutación en el gen HA del virus de la gripe que da como resultado la sustitución de los nucleótidos 1026-1038 por el nucleótido simple timina. En otro aspecto de la descripción, un virus de la gripe atenuado como se describe en este documento comprende un genoma que comprende una mutación en el gen HA del virus de la cadena principal de la gripe que disminuye o elimina la capacidad de las proteasas celulares para escindir la proteína en su forma activa y permite que el virus atenuado, en una multiplicidad de infección (MOI) de entre 0,0005 y 0,001, 0,001 y 0,01, 0,01 y 0,1, o 0,1 y 1, o una MOI de 0,0005, 0,0007, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 ó 6,0 crezca a títulos entre aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 veces, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 veces, o de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 veces, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 veces más bajo que el virus de la gripe de tipo salvaje en las células (p. ej., células de humanos, ratones, ratas, porcinos, perro, caballo o aviar (p. ej., HEP-2, A549, 293T, células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) o fibroblastos de embrión de pollo (CEF)), determinado aproximadamente de 2 a 10 días, de 3 a 7 días, de 3 a 5 días, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días después de la infección cuando se propaga bajo las mismas condiciones. La proteína HA que comprende dicha mutación no es antigénicamente distinta de la proteína HA parental de tipo salvaje, es decir, todos los anticuerpos producidos contra la proteína HA natural reaccionarán de forma cruzada con la proteína AH mutada y todos los anticuerpos producidos contra la proteína HA mutada reaccionarán de forma cruzada con la proteína HA de tipo salvaje. Los títulos de virus de la gripe atenuados y de tipo salvaje se pueden determinar utilizando cualquier técnica bien conocida en la técnica o descrita en este documento (por ejemplo, ensayos de hemaglutinación, ensayos de placa, dosis infecciosas de huevo (EID50), dosis infecciosas de cultivo de tejido (TCID50), etc.) y los virus pueden propagarse en las condiciones descritas en este documento o bien conocidas en la técnica (por ejemplo, en células CEF, células MDCK (por ejemplo, en MEM, suero bovino fetal al 10% v/v (FCS), penicilina al 1%/estreptomicina a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%) o huevos de gallina embrionados (por ejemplo, en una incubadora estacionaria a 37°C con 55% de humedad relativa). Alternativamente, los virus pueden propagarse en células (por ejemplo, células CEF, células MDCK, etc.) que crecen en medio sin suero o reducido en suero (por ejemplo, tripsina TPCK).

En otro aspecto, el virus de la gripe atenuado (el virus parental) utilizado según la descripción comprende un genoma que comprende: (i) una mutación en el gen HA del virus de la cadena principal de la gripe que disminuye o elimina la capacidad de las proteasas celulares para escindir la proteína en su forma activa, y (ii) una mutación en el gen NS1 que da como resultado una capacidad alterada del virus para antagonizar la respuesta del interferón celular. En otro aspecto, el virus de la gripe atenuado de la descripción comprende un genoma que comprende una mutación tanto en el gen HA como en el gen NS1 del virus de la cadena principal de la gripe que permite que el virus atenuado, con una multiplicidad de infección (MOI) de entre 0,0005 y 0,001, 0,001 y 0,01, 0,01 y 0,1, o 0,1 y 1, o una MOI de 0,0005, 0,0007, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, o 6,0, crezca a títulos entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 veces, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 veces, o de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 veces, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 veces menos que el virus de la gripe tipo salvaje en las células (p. ej., células de origen humano, ratón, rata, porcino, perro, caballo o aviar (p. ej., HEP-2, A549, 293T, células renales caninas Madin-Darby (MDCK) o fibroblastos embrionarios de pollo (CEF)), determinado aproximadamente de 2 a 10 días, de 3 a 7 días, de 3 a 5 días o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días después de la infección cuando se propaga en las mismas condiciones.

Se describe en este documento un virus de la gripe atenuado quimérico que comprende al menos una proteína de fusión que tiene un ectodominio (ED), o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto de un virus de la gripe y los dominios citoplásmico (CT) y transmembrana (TM) o dominio transmembrana de una glucoproteína esencial del virus de la gripe, en el que la al menos una proteína de fusión reemplaza funcionalmente al menos una glucoproteína del virus de la gripe esencial. En otras palabras, el virus de la gripe atenuado sirve como la "estructura" que está diseñada para expresar e incorporar a su virión la al menos una proteína de fusión en lugar de una glucoproteína esencial del virus de la gripe. La inclusión de los dominios TM y CT o el dominio TM de una glucoproteína del virus de la gripe correspondiente a la glucoproteína esencial del virus de la gripe reemplazada funcionalmente por la proteína de fusión permite que la proteína de fusión se incorpore al virión del virus atenuado de la gripe. Los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión pueden corresponder o derivarse de cualquier virus de la gripe que permita que la proteína de fusión se incorpore en el virión de la cadena principal del virus de la gripe atenuado.

En ciertos aspectos de la descripción, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o al dominio TM de un tipo diferente, subtipo o una cepa del virus de la gripe que el virus de la gripe atenuado de la cadena principal. En otros aspectos de la descripción, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o al dominio TM de un virus de la gripe de una especie diferente del virus de la gripe atenuado de la cadena principal. En aspectos preferidos de la descripción, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o al dominio TM de la cadena principal del virus de la gripe atenuado.

En ciertos aspectos de la descripción, los dominios TM y CT de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT de una proteína HA o una proteína NA de un virus de la gripe. Como el dominio CT de HA o NA puede no ser necesario para la incorporación de la proteína de fusión en el virión del virus de la gripe, la proteína de fusión se puede modificar por ingeniería genética para que contenga solo el dominio TM de HA o NA.

Los dominios TM y CT de las proteínas HA y NA del virus de la gripe son estructuralmente distintos en que los dominios están ubicados en el extremo C de la proteína HA y el extremo N de la proteína NA. Además de la orientación diferente de los dos dominios en cada clase de la glicoproteína de superficie, los dominios estructurales de HA y CT pueden comprender diferencias aún desconocidas en la funcionalidad dependiendo de su colocación relativa dentro de una cadena polipeptídica. Por lo tanto, cuando se diseña la proteína de fusión que se manipulará en el virus de la gripe atenuado, la orientación del ectodominio, o el fragmento del mismo, del agente infeccioso que se fusionará con los dominios TM y CT o el dominio TM de una glucoproteína del virus de la gripe guiará la selección de los dominios TM y CT o el dominio TM.

Para mantener la competencia viral, cuando se reemplaza una glicoproteína de superficie, su función en el virus quimérico debe ser suministrada por la proteína de fusión. En un aspecto de la descripción, el virus de la gripe atenuado quimérico comprende una proteína de fusión que exhibe actividad de neuraminidasa. En otro aspecto de la descripción, el virus de la gripe atenuado quimérico comprende una proteína de fusión que exhibe actividad de unión al receptor. En otro aspecto de la descripción, el virus atenuado quimérico comprende dos proteínas de fusión, una de las cuales exhibe actividad de neuraminidasa y la otra muestra actividad de unión al receptor. En otro aspecto de la descripción, el virus de la gripe atenuado quimérico comprende una proteína de fusión que comprende un fragmento de una proteína de un agente infeccioso heterólogo, cuya proteína de fusión exhibe actividad de neuraminidasa o actividad de unión al receptor. En un aspecto de la descripción específico, el virus de la gripe atenuado quimérico comprende una proteína de superficie que contiene el ectodominio de la proteína HN del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y los dominios TM y CT de la proteína NA del Gripe A/WSN/33, cuyo ectodominio HN muestra actividad de neuraminidasa. En otro aspecto de la descripción, el virus de la gripe atenuado

quimérico comprende una proteína de fusión que contiene el ectodominio de la proteína HA de un subtipo o cepa de gripe heteróloga (por ejemplo, el ectodominio de H7 HA o ectodominio de H9 HA).

5 En ciertos aspectos, la al menos una proteína de fusión del virus de la gripe atenuado quimérico descrito en este documento no comprende el ectodominio completo de una proteína heteróloga (por ejemplo, comprende un
 10 fragmento antigénico o protector del ectodominio de una proteína de un agente infeccioso heterólogo), y puede comprender o no adicionalmente uno o más fragmentos del ectodominio de una glucoproteína esencial nativa. Por consiguiente, en ciertos aspectos, el ectodominio de la proteína de fusión puede comprender un fragmento del ectodominio de una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En otros aspectos, el ectodominio de la proteína de fusión puede comprender fragmentos tanto de una glucoproteína esencial nativa como de una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En aspectos en los que la proteína de fusión reemplaza una glucoproteína de superficie esencial, la proteína de fusión debe suministrar la función de la glicoproteína de superficie, es decir, la proteína de fusión debe exhibir la funcionalidad de la glucoproteína de superficie que está reemplazando.

15 El ectodominio de las proteínas de fusión descritas en esta Sección 5.1.2 puede corresponder o derivarse de cualquier glicoproteína, o fragmento de la misma, de un agente infeccioso (incluidos agentes infecciosos víricos, bacterianos y parasitarios). Ejemplos no limitantes de glicoproteínas de agentes infecciosos se proporcionan en la Sección 5.3, más adelante.

20 En ciertos aspectos de la descripción, la proteína de fusión comprende el dominio transmembrana más de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) inmediatamente adyacente(s) del ectodominio de una glicoproteína del virus de la gripe esencial. En un aspecto de la descripción, la proteína de fusión comprende el dominio transmembrana de una proteína NA del virus de la gripe, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) inmediatamente adyacente(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de la gripe, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe de modo que la proteína de fusión puede reemplazar funcionalmente la función de la proteína NA. En otro aspecto de la descripción, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y transmembrana de una proteína NA del virus de la gripe, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de la gripe que están inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de la proteína NA del virus de la gripe, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe de manera que la proteína de fusión puede reemplazar funcionalmente a la proteína NA. En otro aspecto, la proteína de fusión comprende el dominio transmembrana o dominios citoplasmáticos y transmembrana de una proteína NA, el dominio del tallo completo, o un fragmento del mismo, de una proteína NA que precede a su cabeza globular, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe de manera que la proteína de fusión puede reemplazar funcionalmente la función de la proteína NA. En otro aspecto, la proteína de fusión comprende el dominio transmembrana de una proteína HA del virus de la gripe, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) inmediatamente adyacente(s) del ectodominio de la proteína HA del virus de la gripe, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe de modo que la proteína de fusión puede reemplazar funcionalmente la función de la proteína HA. En otro aspecto, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y transmembrana de una proteína HA del virus de la gripe, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína HA del virus de la gripe que están inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de la proteína HA del virus de la gripe, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe de manera que la proteína de fusión puede reemplazar funcionalmente la proteína HA.

45 Se describen en este documento secuencias de nucleótidos (es decir, segmentos recombinantes) que codifican las proteínas de fusión descritas en esta Sección 5.1.2. En algunos aspectos, los segmentos recombinantes que comprenden ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en la Sección 5.1.2 comprenden señales de incorporación 3' y 5' que se requieren para la replicación, transcripción y empaquetamiento adecuados de los ARNv (Fujii et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 2002-2007; Zheng, et al., 1996, Virology 217: 242 - 251). En otros aspectos más, los segmentos recombinantes descritos en este documento usan, por lo tanto, las secuencias 3' y 5' no codificantes y/o no traducidas de segmentos de virus dentro del mismo tipo viral o cepa que el virus de la gripe atenuado de cadena principal. En aspectos de la descripción específicas, los segmentos recombinantes comprenden ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en la Sección 5.1.2 que comprenden la región no codificante 3' de un ARNv de NA del virus de la gripe, correspondiendo la región codificante NA a los dominios CT y TM de la proteína NA, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de la gripe que están inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de la proteína NA del virus de la gripe, las regiones no traducidas del marco de lectura de la proteína NA y la región no codificante 5' del ARNv de NA. En ciertos aspectos de la descripción, los segmentos recombinantes comprenden ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en la Sección 5.1.2 que comprenden el dominio del tallo completo, o fragmento del mismo, de una proteína NA que precede a su cabeza globular.

60 Como alternativa al reemplazo de las proteínas NA o HA de un virus de la gripe atenuado, se pueden usar técnicas de "genética inversa" y bicistrónicas para producir un virus de la gripe quimérico que comprende un ectodominio de un agente infeccioso distinto del virus de la gripe o un antígeno de enfermedad y los dominios TM y/o CT de un virus de la gripe. Ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N° 6.887.699, la patente de EE.UU. N° 6.001.634, la patente

de EE.UU. N° 5.854.037 y la patente de EE.UU. No. 5.820.871. Ejemplos no limitativos de moléculas heterólogas tales como antígenos de enfermedad y antígenos derivados de un agente infeccioso que puede usarse de acuerdo con los métodos descritos en este documento (por ejemplo, antígenos asociados con una enfermedad o proteínas víricas) se proporcionan en la sección 5.3, más adelante.

5 5.1.3 Virus quiméricos de la gripe aviar que comprenden el ectodominio de la proteína HN del virus de la enfermedad de Newcastle

Se describe en este documento el diseño genético de un virus de la gripe aviar de tal manera que una proteína de fusión que comprende el ectodominio de la proteína HN del virus de la enfermedad de Newcastle está codificada por el genoma y, cuando se expresa, se incorpora al virión. Cualquier tipo de virus o cepa de la gripe aviar que pueda modificarse por ingeniería genética para expresar e incorporar la proteína de fusión en el virión de la gripe aviar puede seleccionarse y usarse de acuerdo con la descripción, incluidas, entre otras, cepas naturales, variantes o mutantes, virus mutagenizados, reordenantes y/o virus genéticamente modificados. Los ejemplos no limitantes de virus de la gripe aviar incluyen los subtipos de Gripe A H5N1, H6N2, H7N3, H9N2 o H10N7.

Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico que comprende una proteína de fusión que tiene un ectodominio (ED) de una proteína HN del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y los dominios citoplasmático (CT) y transmembrana (TM) o el dominio transmembrana de una proteína NA del virus de la gripe, en donde la proteína de fusión reemplaza funcionalmente a la proteína NA del virus de la gripe aviar. En otras palabras, el virus de la gripe aviar sirve como la "estructura" que está diseñada para expresar e incorporar en su virión la proteína de fusión en lugar de la proteína NA del virus de la gripe aviar. La inclusión de los dominios TM y CT o el dominio TM de una proteína NA del virus de la gripe en la proteína de fusión permite que la proteína de fusión se incorpore en el virión del virus de la gripe aviar. Los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión pueden corresponder o derivarse de cualquier virus de la gripe que permita que la proteína de fusión se incorpore en el virión de la cadena principal del virus de la gripe aviar.

Las secuencias codificantes de los dominios TM y CT para usar de acuerdo con la descripción pueden obtenerse o derivarse de la secuencia publicada de cualquier proteína NA de cualquier cepa o subtipo de la gripe (p. ej., entrada AY651447 del GenBank, de la cepa A/Vietnam/1203/2004 (H5N1); entrada de GenBank AY96877, de la cepa A/turkey/Canada/63 (H6N2); entrada de GenBank AY706954, de la cepa A/duck/Hainan/4/2004 (H6N2); entrada de GenBank AY646080, de la cepa A/chicken/British Columbia/GSC_human_B/04 (H7N3); o entrada GenBank DQ064434, de la cepa A/chicken/Beijing/8/98 (H9N2)). En ciertos casos, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o al dominio TM de un tipo o cepa diferente del virus de la gripe aviar que el virus de la gripe aviar estructural. En otros casos, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o al dominio TM de un virus de la gripe distinto de un virus de la gripe aviar. En algunos casos, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o al dominio TM del esqueleto del virus de la gripe aviar. En otros casos, los dominios TM y CT de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT de la proteína NA de Gripe A/WSN/33.

En ciertos aspectos de la descripción, la proteína de fusión comprende el dominio transmembrana de una proteína NA del virus de la gripe, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) inmediatamente adyacente(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de la gripe, y el ectodominio de una proteína NDV HN. En otro aspecto de la descripción, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y transmembrana de una proteína NA del virus de la gripe, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de la gripe que están inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de la proteína NA del virus de la gripe, y el ectodominio de una proteína NDV HN. En otro aspecto de la descripción, la proteína de fusión comprende el dominio del tallo completo, o un fragmento del mismo, de una proteína NA que precede a su cabeza globular y el ectodominio de una proteína NDV HN. En otros aspectos de la descripción, la proteína de fusión comprende el dominio transmembrana o dominios citoplasmático y transmembrana de una proteína NA, y comprende además el dominio del tallo completo, o un fragmento del mismo, de una proteína NA que precede a su cabeza globular y el ectodominio de una proteína NDV HN.

Como alternativa al reemplazo de la proteína NA del virus de la gripe aviar, se pueden utilizar técnicas "genéticas inversas" y bicistrónicas para producir un virus de la gripe aviar quimérico que comprende un ectodominio de una proteína NDV HN y los dominios TM y/o CT de un virus de la gripe. Ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N° 6.887.699, la patente de EE.UU. N° 6.001.634, la patente de EE.UU. N° 5.854.037 y la patente de EE.UU. N° 5.820.871.

Se describen en este documento secuencias de nucleótidos (es decir, segmentos recombinantes) que codifican las proteínas de fusión descritas en esta Sección 5.1.3. En algunos aspectos de la descripción, los segmentos recombinantes que comprenden ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en la Sección 5.1.3 comprenden señales de incorporación 3' y 5' que son necesarias para la replicación, transcripción y empaquetamiento adecuados de los ARNv (Fujii et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 2002-2007; Zheng, et al., 1996, Virology 217: 242 - 251). En otro aspecto de la descripción, los segmentos recombinantes usan, por lo tanto, las secuencias 3' y 5' no codificantes y/o no traducidas de segmentos de virus dentro del mismo tipo o cepa viral que el virus de la gripe aviar estructural. En algunos aspectos de la descripción, el segmento recombinante

comprende ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en la Sección 5.1.3 comprenden la región no codificante 3' de un ARNv de NA del virus de la gripe, correspondiendo la región codificante NA a los dominios CT y TM de la proteína NA, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de la gripe que están inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de la proteína NA del virus de la gripe, las regiones no traducidas del marco de lectura de la proteína NA y la región 5' no codificante del ARNv de NA. En otros aspectos de la descripción, un segmento recombinante comprende, orden de 3' a 5', la región no codificante 3' del ARNv de WSN NA (19 nucleótidos), nucleótidos que codifican los residuos de aminoácido 1-36 (108 nucleótidos) de la región codificante de NA, nucleótidos que codifican los residuos de aminoácidos 51-568 de la proteína NDV B1 HN, dos codones de terminación secuenciales, 157 nucleótidos del marco de lectura no traducido de WSN NA y la región no codificante 5' del ARNv de WSN (28 nucleótidos). Ver FIG. 1.

La sustitución de la proteína NA del virus de la gripe estructural o la introducción de un segmento recombinante en el genoma viral puede atenuar el virus quimérico resultante, es decir, el virus quimérico exhibirá una replicación deteriorada con respecto al tipo silvestre. En ciertos aspectos de la descripción, se desea una atenuación del virus quimérico de modo que el virus quimérico permanezca, al menos parcialmente, infeccioso y pueda replicarse in vivo, pero solo genere títulos bajos que den como resultado niveles subclínicos de infección que no son patógenos. Dichos virus quiméricos atenuados son especialmente adecuados para aspectos de la descripción en los que el virus se administra a un sujeto para actuar como un inmunógeno, por ejemplo, una vacuna viva. Los virus pueden atenuarse mediante cualquier método conocido en la técnica y/o ejemplificado en la presente, por ejemplo, modificando el virus para que comprenda una mutación en el gen NS1 o comprender una modificación en la secuencia de aminoácidos polibásicos antes del sitio de escisión en la proteína HA (véanse los documentos US 6.468.544, US 6.669.943, Li et al., J. Infect. Dis. 179: 1132-1138).

En un aspecto de la descripción, un virus de la gripe aviar quimérico atenuado de la invención comprende un genoma que comprende una mutación en el gen NS1 del virus de la cadena principal de la gripe aviar, que se conoce en otros virus de la gripe que disminuye la capacidad del producto del gen NS1 para antagonizar una respuesta al interferón celular. En otro aspecto de la descripción, un virus de la gripe aviar quimérico atenuado comprende un genoma que comprende una mutación en el gen HA del virus de la cadena principal de la gripe aviar, que se conoce en otros virus de la gripe que disminuye o elimina la capacidad de las proteasas celulares para escindir la proteína en su forma activa y de ese modo reducir o eliminar la fusión e infectividad inducida por AH. En todavía otro aspecto de la descripción más, un virus de la gripe aviar quimérico atenuado comprende un genoma que comprende una mutación tanto en el gen HA como en el gen NS1 del virus de la cadena principal de la gripe aviar, que se sabe que en otros virus gripales, tanto por separado como cuando se combinan, reducen o disminuyen la actividad viral. Los títulos de virus de la gripe aviar atenuados-quiméricos y salvajes pueden determinarse utilizando cualquier técnica bien conocida en la técnica o descrita en este documento (por ejemplo, ensayos de hemaglutinación, ensayos de placa, dosis infecciosas de huevo (EID50), dosis infecciosas de cultivo tisular (TCID50), etc.) y los virus pueden propagarse en las condiciones descritas en este documento o bien conocidas en la técnica (por ejemplo, en células CEF, células MDCK (por ejemplo, en MEM, suero de ternera fetal al 10% v/v (FCS), 1% de penicilina/estreptomina a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂) o huevos de gallina embrionados (por ejemplo, en una incubadora estacionaria a 37°C con 55% de humedad relativa). Alternativamente, los virus pueden propagarse en células (por ejemplo, células CEF, células MDCK, etc.) que crecen en medio sin suero o reducido en suero (por ejemplo, tripsina TPCK).

5.2 Virus quimérico de la enfermedad de Newcastle

La presente invención abarca el diseño de un virus de la enfermedad de Newcastle ("NSV") de modo que al menos una proteína de fusión está codificada por el genoma y, cuando se expresa, se incorpora al virión. Cualquier tipo o cepa de NDV que pueda manipularse para expresar e incorporar al menos una proteína de fusión en el virión del NDV puede seleccionarse y usarse de acuerdo con la invención, que incluye, pero no se limita a, cepas naturales, variantes o mutantes, virus mutagenizados, reordenantes y/o virus genéticamente modificados. En una realización específica, el NDV es un virus natural. En otra realización específica, el NDV es un virus genéticamente modificado. Por ejemplo, como se describe en este documento, cepas mutantes del NDV recombinante, rNDV/F2aa y rNDV/F3aa, en las que el sitio de escisión de la proteína F se reemplazó con uno que contiene uno o dos residuos de arginina adicionales, permitiendo que el sitio de escisión mutante sea activado por proteasas expresadas de forma ubicua de la familia furin, pueden usarse de acuerdo con los métodos de la invención.

Los ejemplos no limitantes de NDV que pueden usarse de acuerdo con los métodos de la invención incluyen B1, LaSota, YG97, MET95 y F48E9. En una realización específica, el NDV o rNDV quimérico de la invención comprende una proteína de fusión que contiene el ectodominio de una proteína HA de gripe; en un ejemplo específico de acuerdo con esta realización, la proteína HA de la gripe es la proteína HA de la gripe H7.

De forma general, la presente invención proporciona un NDV quimérico, que comprende al menos una proteína de fusión que tiene un ectodominio (ED), o fragmento del mismo, de una proteína de un agente infeccioso distinto de una proteína NDV y los dominios de citoplasma (CT) y/o transmembrana (TM) de una glucoproteína NDV esencial. También se describe en este documento un NDV quimérico, que comprende al menos una proteína de fusión que tiene un ED, o fragmento del mismo, y un dominio TM de una proteína de un agente infeccioso distinto de una

5 glicoproteína NDV y la CT de una glucoproteína NDV esencial. Se describe en este documento además un NDV quimérico, que comprende una proteína de fusión que tiene un ED, o un fragmento del mismo, y un dominio CT de una proteína de un agente infeccioso distinto de una glicoproteína NDV y un dominio TM de una glucoproteína NDV esencial. En otras palabras, el virus NDV sirve como la "estructura" que está diseñada para expresar e incorporar a su virión la proteína de fusión. La inclusión de los dominios TM y/o CT de una glicoproteína NDV esencial en la proteína de fusión permite que la proteína de fusión se incorpore en el virión del NDV. Los dominios TM y/o CT de la proteína de fusión pueden corresponder o derivarse de cualquier NDV que permita que la proteína de fusión se incorpore en el virión de la cadena principal de NDV.

10 En ciertas realizaciones, los dominios TM y/o CT de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y/o CT de un tipo o cepa diferente de NDV que el NDV de la cadena principal. En realizaciones preferidas, los dominios TM y/o CT de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y/o CT de la cadena principal de NDV.

15 El virión de NDV comprende dos glucoproteínas de superficie principales: la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina-neuraminidasa (HN), que comprenden ambas un dominio citoplásmico, un dominio transmembrana y un ectodominio. De acuerdo con la presente invención, los dominios TM y CT de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT de una proteína F de un NDV.

Los dominios TM y CT de las proteínas NDV F y HN son estructuralmente distintos ya que los dominios están ubicados en el extremo C de la proteína F y en el extremo N de la proteína HN. Por lo tanto, cuando se diseña la proteína de fusión que se manipulará en el NDV, la orientación del ectodominio del agente infeccioso a fusionar con los dominios TM y/o CT de la glucoproteína NDV guiará la selección de los dominios TM y/o CT.

20 En ciertas realizaciones, la al menos una proteína de fusión del NDV quimérico comprende el dominio TM y de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuos inmediatamente adyacentes del ectodominio de una glucoproteína NDV esencial. Por ejemplo, en una realización específica, la proteína de fusión comprende el dominio transmembrana de una proteína F de NDV, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) inmediatamente adyacente(s) del ectodominio de la proteína F de NDV, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto del NDV de manera que la proteína de fusión pueda reemplazar funcionalmente la función de la proteína F. En otra realización específica, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y transmembrana de una proteína F de NDV, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína F de NDV que están inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de la proteína F de NDV, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto de NDV de modo que la proteína de fusión pueda reemplazar funcionalmente a la proteína F. En otro aspecto de la descripción, la proteína de fusión comprende el dominio transmembrana de una proteína NDV HN, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) inmediatamente adyacente(s) del ectodominio de la proteína NDV HN, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto de NDV de manera que la proteína de fusión pueda reemplazar funcionalmente la función de la proteína HN. En otro aspecto de la descripción, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y transmembrana de una proteína NDV HN, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2 ó 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína NDV HN que están inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de la proteína NDV HN, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso distinto de NDV de manera que la proteína de fusión pueda reemplazar funcionalmente a la proteína HN.

40 En ciertas realizaciones, una glucoproteína de superficie de NDV (es decir, la proteína F) se reemplaza por una proteína de fusión que suministra la función o funciones requeridas de la glicoproteína NDV. De acuerdo con estas realizaciones, el ectodominio de la proteína de fusión se debe seleccionar de manera que suministre la función o funciones requeridas de la glicoproteína NDV reemplazada. En otras realizaciones, la proteína de fusión se expresa e incorpora en el virión del NDV además de las glucoproteínas de superficie de NDV nativas.

45 En ciertas realizaciones, la al menos una proteína de fusión del NDV quimérico de la invención no comprende el ectodominio completo de una proteína heteróloga (por ejemplo, comprende un fragmento antigénico del ectodominio de una proteína de un agente infeccioso heterólogo), y puede o no puede comprender adicionalmente uno o más fragmentos del ectodominio de una glucoproteína esencial nativa. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el ectodominio de la proteína de fusión puede comprender un fragmento del ectodominio de una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En otras realizaciones, el ectodominio de la proteína de fusión puede comprender fragmentos tanto de una glucoproteína esencial nativa como de una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En realizaciones en las que la proteína de fusión reemplaza una glucoproteína de superficie esencial, la proteína de fusión debe suministrar la función de la glicoproteína de superficie, es decir, la proteína de fusión debe exhibir la funcionalidad de la glucoproteína de superficie que está reemplazando.

55 Siempre que la proteína de fusión descrita en esta Sección 5.2 no sea necesaria para reemplazar la función de una glucoproteína viral necesaria, el ectodominio de la proteína de fusión puede corresponder o derivarse de cualquier molécula heteróloga, incluido, entre otros, cualquier agente infeccioso antígeno (incluidos los antígenos de agentes infecciosos víricos, bacterianos y parasitarios) y cualquier antígeno de enfermedad. Ejemplos no limitativos de antígenos de agentes infecciosos y/o antígenos de enfermedad se proporcionan en la Sección 5.3, más adelante.

La presente invención abarca secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de fusión descritas en esta Sección 5.2. En realizaciones específicas, una secuencia de nucleótidos comprende ácidos nucleicos que codifican una secuencia de Kozak, seguido del extremo del gen, nucleótido intercistrónico (T) y secuencia de inicio del gen de la proteína F de NDV, seguido de la región 5' no traducida y ORF de la proteína HA de H7N2.

- 5 En realizaciones preferidas, las cepas de NDV usadas de acuerdo con la invención son las cepas lentogénicas del virus, es decir, aquellas cepas que típicamente exhiben una baja virulencia o infección asintomática en aves, por ejemplo, cepa B1, cepa LaSota o cepa Met95. La invención también abarca el uso de cepas altamente virulentas de NDV, por ejemplo, las cepas YG97 o F48E9 o NDV que se han modificado por recombinación genética usando métodos conocidos en la técnica o ejemplificados en este documento. En una realización específica, la invención abarca el uso de un NDV en el que la proteína F de NDV se ha modificado genéticamente en el sitio de escisión para aumentar la actividad fusogénica. En un ejemplo específico de acuerdo con esta invención, la proteína F modificada comprende de dos a tres mutaciones de aminoácidos en el sitio de corte F. La sustitución de una proteína de superficie necesaria del virus principal o la introducción de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión en el genoma viral puede atenuar, o atenuar aún más, el virus quimérico resultante, es decir, el virus quimérico exhibirá una replicación deteriorada en relación con el tipo salvaje. En ciertas realizaciones de la invención, se desea una atenuación, o una atenuación adicional, del virus quimérico de modo que el virus quimérico permanezca, al menos parcialmente, infeccioso y pueda replicarse in vivo, pero solo genere títulos bajos que den lugar a niveles subclínicos de infección que no sean patógenos. Dichos virus quiméricos atenuados son especialmente adecuados para las realizaciones de la invención en las que el virus se administra a un sujeto para actuar como un inmunógeno, por ejemplo, una vacuna viva. Los virus pueden atenuarse mediante cualquier método conocido en la técnica.

5.3 Antígenos que pueden diseñarse para los virus quiméricos de la invención

- De acuerdo con la descripción, cualquier molécula heteróloga puede manipularse en la cadena principal del virus para provocar una respuesta inmune a dicha molécula. En una realización específica, cualquier antígeno de cualquier patógeno infeccioso o asociado con cualquier enfermedad que sea capaz de desencadenar una respuesta inmune puede manipularse en una cadena principal del NDV quimérico. En una realización específica, el antígeno es una glicoproteína. En ciertas realizaciones preferidas, el antígeno es capaz de reemplazar funcionalmente una glicoproteína esencial de un NDV. En realizaciones específicas, el antígeno exhibe actividades de neuraminidasa o hemaglutinina (por ejemplo, unión a receptor/fusogénica). Al seleccionar la cadena principal viral para expresar el antígeno, se considera la orientación del nucleótido que codifica el antígeno. Por ejemplo, cuando el antígeno está anclado naturalmente a través de su extremo amino, los dominios TM y CT o el dominio TM para usar en la ingeniería de la proteína de fusión corresponderán a los dominios TM y CT o al dominio TM de una proteína viral necesaria del virus estructural, o virus relacionado, que también está anclado naturalmente a través de su extremo amino, por ejemplo, la proteína N de la gripe o la proteína HN del virus de la enfermedad de Newcastle.
- 35 En una realización específica, se modifica por ingeniería genética un antígeno vírico en una cadena principal de NDV, en el que el antígeno no se deriva de un paramixovirus. Los ejemplos no limitantes de antígenos virales incluyen antígenos de adenoviridae (por ejemplo, mastadenovirus y aviadenovirus), herpesviridae (por ejemplo, virus herpes simple 1, virus herpes simple 2, virus herpes simple 5, virus herpes simple 6, virus Epstein-Barr, HHV6-HHV8 y citomegalovirus), leviviridae (p. ej., levivirus, enterobacteria fase MS2, alolevirus), poxviridae (p. ej., chordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus y entomopoxvirinae), papovaviridae (p. ej., poliomavirus y papilomavirus), paramixoviridae (p. ej. virus parainfluenza 1, mobillivirus (p. ej., virus del sarampión), rubulavirus (p. ej., virus de la parotiditis), pneumonovirinae (p. ej., neumovirus, virus sincitial respiratorio humano), virus sincitial respiratorio humano y metapneumovirus (p. ej., neumovirus aviar y metapneumovirus humano)), picornaviridae (p. ej., enterovirus, rinovirus, hepatovirus (p. ej., virus de la hepatitis A humana), cardiovirus y aphovirus), reoviridae (p. ej., orthoreovirus, orbivirus, rotavirus, cypovirus, fijivirus, phytoreovirus y oryzavirus), retroviridae (por ejemplo, retrovirus tipo B de mamífero, retrovirus tipo C de mamífero, retrovirus tipo C aviar, grupo retrovirus tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus (p. ej. virus de la inmunodeficiencia humana 1 y virus de la inmunodeficiencia humana 2 (por ejemplo, VIH gp160), spumavirus), flaviviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis C, virus del dengue, virus del Nilo occidental), hepadnaviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis B), togaviridae (por ejemplo, alfavirus (p. ej., virus sindbis) y rubivirus (p. ej., virus de la rubéola), rhabdoviridae (p. ej., vesiculovirus, lyssavirus, ephemerovirus, cytorhabdovirus y necleorhabdovirus), arenaviridae (p. ej., arenavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus lppy y virus de lassa) y coronaviridae (por ejemplo, coronavirus y torovirus). En una realización específica, el antígeno viral es HIV gp120, HIV nef, RSV F glicoproteína, RSV G glicoproteína, virus de la gripe neuraminidasa, virus de la gripe hemaglutinina, HTLV tax, virus del herpes simple glicoproteína (p. ej., gB, gC, gD y gE) o antígeno de superficie de hepatitis B, proteína E del virus de la hepatitis C o proteína de pico de coronavirus. En ciertas realizaciones, el antígeno viral no es gp41. En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno viral se deriva de un paramixovirus. En realizaciones específicas, el antígeno viral no se deriva de un paramixovirus. En ciertas realizaciones, el antígeno vírico se deriva del virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza humano tipos 3, un RSV o virus Sendai. En otras realizaciones alternativas, el antígeno viral no se deriva del virus parainfluenza humano tipo 1, virus parainfluenza tipo 3, un RSV o del virus Sendai. En realizaciones específicas, la cadena principal del virus es un virus de la gripe y el antígeno modificado genéticamente en la cadena principal del virus de la gripe no es un antígeno de la gripe. En otras realizaciones

específicas, la cadena principal del virus es un NDV y el antígeno modificado genéticamente en la cadena principal de NDV no es un antígeno de NDV.

5 En otra realización, un antígeno bacteriano (por ejemplo, proteína de cubierta bacteriana o antígeno protector asociado con dicha bacteria) se modifica por ingeniería genética en una cadena principal de NDV. Los ejemplos no limitantes de antígenos bacterianos incluyen antígenos de bacterias de la familia Aquaspirillum, familia Azospirillum, familia Azotobacteraceae, familia Bacteroidaceae, especie Bartonella, familia Bdellovibrio, especie Campylobacter, especie Chlamydia (p. ej., Chlamydia pneumoniae), familia Clostridium, Enterobacteriaceae (p. ej., especie Citrobacter, Edwardsiella, Enterobacter aerogenes, especies Erwinia, Escherichia coli, especies Hafnia, especies Klebsiella, especies Morganella, Proteus vulgaris, Providencia, especies Salmonella, Serratia marcescens y Shigella flexneri), familia Gardinella, Haemophilus influenzae, familia Halobacteriaceae, familia Helicobacter, familia Legionellaceae, especies de Listeria, familia Methylococcaceae, micobacterias (p. ej., Mycobacterium tuberculosis), familia Neisseriaceae, familia Oceanospirillum, familia Pasteurellaceae, especie Pneumococcus, especie Pseudomonas, familia Rhizobiaceae, familia Spirillum, familia Spirosomaceae, Staphylococcus (p. ej., Staphylococcus aureus resistente a la meticilina y Staphylococcus pyrogenes), Streptococcus (por ejemplo, Streptococcus enteritidis, Streptococcus fasciae, y Streptococcus pneumoniae), familia Yersinia, Bacillus antracis y familia Vampirovibrio.

10 En otras realizaciones, un antígeno protector asociado con un parásito (por ejemplo, un protozoo) se modifica por ingeniería genética en una cadena principal de NDV. Cualquier antígeno asociado con un parásito o antígeno protector de un parásito (por ejemplo, un protozoo) se puede usar de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos no limitantes de antígenos de parásitos incluyen antígenos de un parásito tal como una ameba, un parásito de la malaria, Plasmodium, Trypanosoma cruzi.

15 En otra realización, se diseña un antígeno fúngico en una cadena principal de NDV. Los ejemplos no limitantes de antígenos fúngicos incluyen antígenos de especies de hongos de Absidia (por ejemplo, Absidia corymbifera y Absidia ramosa), especies de Aspergillus (por ejemplo, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger y Aspergillus terreus), Basidiobolus ranarum, Blastomyces dermatitidis, especies de Candida (p. ej., Candida albicans, Candida glabrata, Candida kerr, Candida krusei, Candida parapsilosis, Candida pseudotropicalis, Candida quillermondii, Candida rugosa, Candida stellatoidea y Candida tropicalis), Coccidioides immitis, especies de Conidiobolus, Cryptococcus neoforms, especies de Cunninghamella, dermatofitos, Histoplasma capsulatum, Microsporium gypseum, Mucor pusillum, Paracoccidioides brasiliensis, Pseudallescheria boydii, Rhinosporidium seeberti, Pneumocystis carinii, especies de Rhizopus (p. ej., Rhizopus arrhizus, Rhizopus oryzae y Rhizopus microsporus), especies de Saccharomyces, Sporothrix schenckii, zigomicetos, y clases tales como Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes.

20 En otra realización, un antígeno asociado a un tumor se modifica por ingeniería genética en una cadena principal de NDV. Cualquier antígeno asociado a tumor conocido en la técnica se puede usar de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos no limitantes de antígenos asociados a tumores incluyen MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, p-15, MART-1/MelanA, TRP-1 (gp75), Tirosinasa, quinasa 4 dependiente de ciclina, β -catenina, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, virus del papiloma humano-E6, virus del papiloma humano E7, MUC-1, caspasa-8, CD5, CD20, CEA, mucina-1, Lewis^x, CA-125, receptor del factor de crecimiento epidérmico, p185^{HER2}, IL-2R, Fap- α , tenascina, antígenos asociados con una metaloproteinasas y CAMPATH-1.

40 5.4 Construcción y propagación de virus quiméricos de la invención

Los NDV quiméricos de la invención se pueden generar usando la técnica de la genética inversa. La técnica de la genética inversa implica la preparación de ARN virales recombinantes sintéticos que contienen las regiones no codificantes del ARN vírico de cadena negativa que son esenciales para el reconocimiento por polimerasas virales y para las señales de empaquetamiento necesarias para generar un virión maduro. Los ARN recombinantes se sintetizan a partir de un molde de ADN recombinante y se reconstituyen in vitro con complejo de polimerasa viral purificado para formar ribonucleoproteínas recombinantes (RNP) que se pueden usar para transfectar células. Se logra una transfección más eficiente si las proteínas de la polimerasa viral están presentes durante la transcripción de los ARN sintéticos, ya sea in vitro o in vivo. Los RNP recombinantes sintéticos pueden ser rescatados en partículas de virus infecciosos. Las técnicas anteriores se describen en la patente de EE.UU. Número 5.166.057 expedida el 24 de noviembre de 1992; en la patente de los EE. UU. No. 5.854.037 expedida el 29 de diciembre de 1998; en la Patente Europea EP 0702085A1, publicada el 20 de febrero de 1996; en la solicitud de patente de EE. UU. No. 09/152.845; en las Publicaciones de Patentes Internacionales PCT WO97/12032 publicada el 3 de abril de 1997; WO96/34625 publicada el 7 de noviembre de 1996; en la Patente Europea EP A780475; WO 99/02657 publicada el 21 de enero de 1999; WO 98/53078 publicada el 26 de noviembre de 1998; WO 98/02530 publicado el 22 de enero de 1998; WO 99/15672 publicada el 1 de abril de 1999; WO 98/13501 publicada el 2 de abril de 1998; el documento WO 97/06270 publicado el 20 de febrero de 1997; y EPO 780 475A1 publicado el 25 de junio de 1997.

La tecnología de plásmidos sin auxiliares también se puede utilizar para diseñar un virus quimérico de la presente descripción. Brevemente, con respecto al virus de la gripe, los ADNc de longitud completa de segmentos virales se amplifican usando PCR con cebadores que incluyen sitios de restricción únicos, que permiten la inserción del

producto de PCR en el vector plasmídico (Flandorfer et al., 2003, J. Virol. 77:9116-9123; Nakaya et al., 2001, J. Virol. 75: 11868-11873). El vector plasmídico está diseñado para posicionar el producto de la PCR entre un promotor de ARN polimerasa I humana truncado y una secuencia de ribozima del virus de la hepatitis delta de manera que se produce un transcrito negativo exacto (sentido de ARNv) a partir del promotor de la polimerasa I. Los vectores plasmídicos separados que comprenden cada segmento viral así como los vectores de expresión que comprenden proteínas virales necesarias se transfectan en células que conducen a la producción de partículas virales recombinantes. Para una descripción detallada de la tecnología de plásmidos sin auxiliares véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 01/04333; Pat. U.S. No. 6.649.372; Fodor et al., 1999, J. Virol. 73:9679-9682; Hoffmann et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6108 - 6113; y Neumann et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9345-9350. De forma similar, con respecto al genoma de segmento único de NDV, se construyó un ADNc completo de la cepa Hitchner B1, se insertó en un vector plasmídico y se manipuló para que contuviera un sitio de restricción único entre los genes P y M. La proteína de fusión diseñada de acuerdo con la invención puede luego insertarse en el genoma viral en el único sitio de restricción. El segmento individual se colocó entre un promotor T7 y la ribozima del virus de la hepatitis delta para producir una transcripción negativa exacta de la polimerasa T7. El vector plasmídico y los vectores de expresión que comprenden las proteínas víricas necesarias se transfectan en células que conducen a la producción de partículas virales recombinantes (véase Swayne et al., 2003, Avian Dis. 47: 1047-1050 y Swayne et al., 2001, J. Virol. 11868-11873).

Los virus de la gripe quiméricos de la descripción se pueden diseñar para que contengan segmentos de ARN que sean bicistrónicos. Las técnicas bicistrónicas permiten la modificación genética de secuencias de codificación de múltiples proteínas en un solo ARNm mediante el uso de secuencias IRES. Las secuencias IRES dirigen el reclutamiento interno de ribosomas a la molécula de ARN y permiten la traducción aguas abajo de una manera independiente de la tapa. Brevemente, se inserta una región codificante de una proteína en el ORF de una segunda proteína. La inserción está flanqueada por un IRES y cualquier secuencia de señal no traducida necesaria para la expresión y/o función adecuadas. La inserción no debe interrumpir el marco de lectura abierto, la poliadenilación o los promotores transcripcionales de la segunda proteína (véanse, por ejemplo, Garcia-Sastre et al., 1994, J. Virol. 68: 6254-6261 y Garcia-Sastre et al., 1994 Dev. Biol. Stand. 82: 237-246).

5.4.1 Propagación de virus quiméricos

Los virus quiméricos de la presente invención se pueden propagar en cualquier sustrato que permita que el virus crezca a títulos que permitan los usos de los virus quiméricos descritos en este documento. En una realización, el sustrato permite que los virus quiméricos crezcan a títulos comparables a los determinados para los virus de tipo silvestre correspondientes. En una realización específica, los virus de la gripe quiméricos atenuados de la invención se propagan en sustratos deficientes en IFN.

Los virus quiméricos de la invención pueden crecer en células (por ejemplo, células de aves, células de pollo, etc.) que son susceptibles a la infección por virus, huevos embrionados o animales (por ejemplo, aves). Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica. En un aspecto, las células usadas para propagar los virus de la gripe atenuados con una actividad antagonista de interferón reducida son deficientes en IFN. En otro aspecto, los virus aviares quiméricos de la invención se propagan en células de pollo o huevos embrionados. Las células de pollo representativas incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos de embrión de pollo o células de riñón de embrión de pollo.

Los virus quiméricos de la invención se pueden propagar en huevos embrionados, por ejemplo, de 6 a 14 días de edad. Los huevos embrionados jóvenes o inmaduros pueden usarse para propagar los virus de la gripe quiméricos atenuados de la invención. Los huevos embrionados inmaduros abarcan huevos que tienen menos de diez días de edad, por ejemplo, huevos de 6 a 9 días que son deficientes en INF. Los huevos embrionados inmaduros también abarcan huevos que imitan artificialmente a los huevos inmaduros con menos de diez días de edad, como resultado de alteraciones en las condiciones de crecimiento, por ejemplo, cambios en las temperaturas de incubación; tratar con fármacos; o cualquier otra alteración que resulte en un huevo con un desarrollo retardado, de modo que el sistema IFN no esté completamente desarrollado en comparación con los huevos de diez a doce días de edad. Los virus quiméricos de la invención se pueden propagar en diferentes ubicaciones del huevo embrionado, por ejemplo, la cavidad alantoica. Para una discusión detallada sobre los virus de crecimiento y propagación, en particular, los virus de la gripe atenuados con una actividad antagonista de interferón reducida, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 6.852.522 y la patente de EE.UU. N° 6.852.522.

Para el aislamiento del virus, el virus quimérico se elimina del cultivo celular y se separa de los componentes celulares, típicamente por procedimientos de clarificación bien conocidos, por ejemplo, tal como la centrifugación en gradiente y la cromatografía en columna, y puede purificarse adicionalmente según se desee usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, ensayos de placa.

5.5 Usos de virus quiméricos

El NVD quimérico de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, puede usarse en métodos para inducir una respuesta inmune a NDV y/o un agente infeccioso o enfermedad en un ave y/o ser humano asociado con el antígeno de la proteína de fusión F.

De forma general, los virus quiméricos de la invención se pueden usar en inmunización activa en un sujeto. En un aspecto, los virus quiméricos de la invención se pueden usar para prevenir, controlar y tratar una o más enfermedades. En un aspecto específico, los virus quiméricos de la invención pueden usarse para prevenir, controlar y/o tratar infecciones por dos agentes infecciosos. Ver la Sección 5.5.1 para una descripción de la formulación inmunogénica y usos de esas formulaciones para inducir una respuesta inmune en un sujeto. Los virus quiméricos de la invención también se pueden usar para producir anticuerpos que se pueden usar en inmunoensayos diagnósticos, inmunoterapia pasiva y generación de anticuerpos antiidiotípicos. Por ejemplo, un virus de la gripe quimérico que comprende una proteína de fusión que tiene un ectodominio de un agente infeccioso distinto de un virus de la gripe puede administrarse a un sujeto (por ejemplo, un ratón, rata, cerdo, caballo, burro, pájaro o ser humano) para generar anticuerpos tanto para el agente estructural de la gripe como para el agente infeccioso que luego puede aislarse y usarse en ensayos diagnósticos, inmunoterapia pasiva y generación de anticuerpos antiidiotípicos. Los anticuerpos generados pueden aislarse por técnicas estándar conocidas en la técnica (por ejemplo, cromatografía de inmunoafinidad, centrifugación, precipitación, etc.) y usarse en inmunoensayos diagnósticos, inmunoterapia pasiva y generación de anticuerpos antiidiotípicos. Los anticuerpos aislados antes de usarse en la inmunoterapia pasiva pueden modificarse, por ejemplo, los anticuerpos pueden ser quimerizados o humanizados. Ver, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. Nos. 4.444.887 y 4.716.111; y las Publicaciones Internacionales Nos. WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741, para revisiones en la generación de anticuerpos quiméricos y humanizados.

Para los anticuerpos producidos por los virus quiméricos para su uso en la inmunización pasiva, la dosificación administrada a un sujeto es típicamente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente está entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,25 mg/kg, 0,0001 y 0,15 mg/kg, 0,0001 y 0,10 mg/kg, 0,001 y 0,5 mg/kg, 0,01 y 0,25 mg/kg o 0,01 y 0,10 mg/kg del peso corporal del sujeto. Los anticuerpos descritos en este documento pueden administrarse con otras composiciones profilácticas o terapéuticas para la inmunización de nuevo o el tratamiento, control o prevención de una enfermedad o afección infecciosa, o síntoma de la misma. La administración de dosis de anticuerpos descritas en este documento puede ser mediante inyección en bolo o administrada más lentamente por IV (por ejemplo, durante aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, o aproximadamente 6 horas). Las dosis de los anticuerpos de la invención también pueden repetirse (p. ej., todos los días, cada 2 días, cada 3 días, cada semana, cada 2 semanas, cada 3 semanas, cada 6 semanas, cada 9 semanas, cada 12 semanas, cada 4 meses, cada 6 meses, cada 12 meses, cada 18 meses o cada 2 años) durante el transcurso del tratamiento (p. ej., 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 10 meses, 12 meses, 16 meses, 20 meses o 24 meses o más). En ciertos casos, los anticuerpos producidos por los virus quiméricos descritos en este documento se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, o, alternativamente, se pueden administrar por vía oral o intranasal. Los anticuerpos descritos en este documento también se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida.

Los anticuerpos aislados de sujetos a los que se les administró un virus quimérico de la invención también pueden usarse para controlar el tratamiento y/o la progresión de la enfermedad. Cualquier sistema de inmunoensayo conocido en la técnica se puede usar para este propósito, incluidos, entre otros, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas), inmunoensayos "sandwich", reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y ensayos de inmunolectroforesis, por nombrar algunos.

Los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención también pueden usarse en la producción de anticuerpos antiidiotípicos. El anticuerpo antiidiotípico puede usarse a su vez para la inmunización, para producir una subpoblación de anticuerpos que se unen a un antígeno inicial de la gripe quimérica (Jerne, 1974, Ann. Immunol. (París) 125c: 373; Jerne et al., 1982, EMBO J. 1: 234).

En procedimientos de inmunización, la cantidad de inmunógeno a usar y el programa de inmunización serán determinados por un médico experto en la técnica y se administrarán por referencia a la respuesta inmune y títulos de anticuerpos del sujeto.

5.5.1 Formulaciones inmunogénicas

La presente invención se refiere a formulaciones inmunogénicas que comprenden los NVD quiméricos de la presente invención como se define en las reivindicaciones, que pueden usarse en métodos para inducir una respuesta inmune frente a NDV y/o un agente infeccioso o enfermedad asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave y/o un ser humano.

La invención también abarca el uso de los NDV quiméricos de la invención en formulaciones inmunogénicas, por ejemplo, formulaciones de vacunas. En los casos en que las formulaciones inmunogénicas comprenden un virus de la gripe quimérico, las formulaciones pueden usarse en métodos para prevenir, controlar, neutralizar, tratar y/o

mejorar la infección por el virus de la gripe, y/o infecciones por otro agente infeccioso y/o una enfermedad. En los casos en que las formulaciones inmunogénicas comprenden un NDV quimérico, las formulaciones pueden usarse en métodos para prevenir, controlar, neutralizar, tratar y/o mejorar una infección por NDV, infecciones por otro agente infeccioso y/o una enfermedad.

- 5 Las formulaciones inmunogénicas pueden comprender un NDV quimérico vivo o inactivado de la invención. El virus quimérico puede inactivarse por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos comunes usan formalina y calor para la inactivación. Ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N ° 6.635.246. Otros métodos incluyen los descritos en la patente de EE.UU. Nos. 5.891.705; 5.106.619 y 4.693.981.

- 10 Puede preferirse una formulación inmunogénica viva porque la multiplicación en el sujeto conduce a un estímulo prolongado de tipo y magnitud similares a los que ocurren en las infecciones naturales y, por lo tanto, confiere inmunidad sustancial y de larga duración. La producción de tales formulaciones inmunogénicas recombinantes vivas puede realizarse usando métodos convencionales que implican la propagación del virus quimérico en cultivo celular o en huevos embrionados (por ejemplo, huevos embrionados de pollo) seguido de la purificación. Además, los virus quiméricos pueden inducir una respuesta de IFN robusta que tiene otras consecuencias biológicas in vivo,
15 proporcionando protección contra infecciones posteriores.

- En una realización preferida, las formulaciones inmunogénicas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de un NDV quimérico de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enlistado en la Farmacopea de EE.UU. u otras farmacopeas generalmente reconocidas para su uso en animales y,
20 más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica (por ejemplo, la formulación inmunogénica o de vacuna). Las soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de
25 glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. La formulación debe adecuarse al modo de administración. La formulación particular también puede depender de si el virus quimérico está vivo o inactivado.

- Las formulaciones inmunogénicas de la invención se pueden administrar a un sujeto no expuesto, es decir, un sujeto
30 que no tiene una enfermedad o no ha sido ni está actualmente infectado con uno o ambos agentes infecciosos. En una realización, las formulaciones inmunogénicas se administran a un sujeto no expuesto, es decir, un sujeto que no tiene una enfermedad o no ha sido ni está actualmente infectado con uno o ambos agentes infecciosos, pero está en riesgo de contraer dicha enfermedad (por ej., una infección viral). En una realización, las formulaciones inmunogénicas de la invención se administran a un sujeto que no tiene una enfermedad, o que no tiene y no está
35 infectado con uno de los agentes infecciosos a los que el virus quimérico induce una respuesta inmune. En otra realización, las formulaciones inmunogénicas de la invención se administran a un sujeto que no ha sido ni está infectado con los dos agentes infecciosos a los que el virus quimérico induce una respuesta inmune. Las formulaciones inmunogénicas de la invención también pueden administrarse a un sujeto que está y/o ha sido infectado con uno o ambos de los agentes infecciosos u otro tipo, subtipo o cepa de los agentes a los que el virus
40 quimérico induce una respuesta inmune.

- Se pueden usar muchos métodos para introducir las formulaciones inmunogénicas, por ejemplo, las formulaciones de vacuna descritas anteriormente, estas incluyen, pero no se limitan a, rutas intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, conjuntiva y subcutánea. En aves, los métodos pueden incluir además la inoculación coanal. Como alternativa a la administración parenteral, la invención también abarca
45 rutas de administración masiva para fines agrícolas tales como a través de agua potable o en forma de aerosol. Puede ser preferible introducir la formulación inmunogénica del virus de la gripe quimérico a través de la ruta natural de infección del virus de tipo salvaje. Alternativamente, puede ser preferible introducir el virus quimérico de la invención a través de la ruta natural de infección del agente del que se deriva la proteína de fusión. La capacidad del virus quimérico para inducir una respuesta inmune secretora y celular vigorosa puede usarse ventajosamente. Por
50 ejemplo, la infección del tracto respiratorio por los virus quiméricos puede inducir una fuerte respuesta inmune secretora, por ejemplo, en el sistema urogenital, con protección concomitante contra un agente causante de la enfermedad particular. Además, en una realización preferida, puede ser deseable introducir las formulaciones farmacéuticas de la invención en los pulmones mediante cualquier ruta adecuada. La administración pulmonar también puede emplearse, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un
55 agente de aerosol para usar como una pulverización.

- En ciertas realizaciones, una formulación inmunogénica de la invención no da como resultado una protección completa contra una infección (por ejemplo, una infección viral o infección por un agente infeccioso no viral), pero da como resultado un título menor o un número reducido del patógeno (por ejemplo, un virus) en comparación con un sujeto no tratado. En ciertas realizaciones, la administración de las formulaciones inmunogénicas de la invención dan como resultado 0,5 veces, 1 vez, 2 veces, 4 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces,
60 50 veces, 75 veces, 100 veces, 125 veces, 150 veces, 175 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 750

veces, o 1.000 veces o más de reducción en el título del patógeno en relación con un sujeto no tratado. Los beneficios de una reducción en el título, el número o la carga total del patógeno incluyen, entre otros, una menor gravedad de los síntomas de la infección y una reducción en la duración de la enfermedad o afección asociada con la infección.

- 5 En ciertas realizaciones, se usa una formulación inmunogénica de la invención para proteger contra una enfermedad (por ejemplo, una infección) en sujetos no expuestos. En un aspecto de la descripción, una formulación inmunogénica de la descripción se usa para proteger contra una infección por el virus de la gripe y/o al menos otro agente infeccioso que no es un virus de la gripe y/o proteger contra una enfermedad o síntoma asociado con la infección en un sujeto no expuesto. En otras realizaciones, se usa una formulación inmunogénica de la invención para proteger contra la infección por NDV y/o al menos otro agente infeccioso y/o proteger contra una enfermedad o síntoma asociado con los mismos en sujetos no expuestos. Los ejemplos no limitantes de dichos otros agentes infecciosos son el virus del papiloma, virus del herpes, retrovirus (p. ej. VIH), virus de hepatitis, rinovirus, virus sincicial respiratorio, NDV, citomegalovirus, adenovirus, Clostridia sp., Salmonella sp., Staphylococcus sp., Enterococcus sp., Vibrio sp., E. coli, Streptococcus equi, Mycoplasma pneumoniae, Klebsiella pneumoniae y Pseudomonas aeruginosa, y Dermatophilus congolensis, o un protozoo tal como la ameba, parásito de la malaria o Trypanosoma cruzi.

El efecto profiláctico y/o terapéutico de las formulaciones inmunogénicas de la invención se basan, en parte, en lograr o inducir una respuesta inmune (por ejemplo, una respuesta inmune humoral). En un aspecto, las formulaciones inmunogénicas inducen un título en suero detectable de un anticuerpo contra antígenos del virus quimérico en el sujeto o en un modelo animal del mismo (por ejemplo, modelo de ratón, rata o canino). El título en suero de un anticuerpo se puede determinar usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, inmunoensayos tales como ELISA. En una realización, los anticuerpos se unen específicamente a un antígeno de la cadena principal del NDV quimérico. En otras realizaciones, los anticuerpos se unen específicamente a un antígeno de la al menos una proteína de fusión, es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con un agente o enfermedad infecciosa. En una realización específica, los anticuerpos generados mediante la administración de una formulación inmunogénica de la invención son anticuerpos neutralizantes.

En una realización, la administración de un virus quimérico de la invención a un sujeto o modelo animal del mismo da como resultado un título sérico de aproximadamente 1 µg/ml, aproximadamente 2 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 6 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 15 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 25 µg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 125 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 225 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 275 mg/ml, o aproximadamente 300 mg/ml o más de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de la estructura del virus quimérico. En otras realizaciones, la administración de un virus quimérico de la invención a un sujeto o modelo animal del mismo da como resultado un título sérico de aproximadamente 1 µg/ml, aproximadamente 2 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 6 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 15 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 25 µg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 125 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 225 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 275 mg/ml, o aproximadamente 300 mg/ml o más de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de proteína de fusión, es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con un agente infeccioso o enfermedad. Preferiblemente un título sérico de aproximadamente 1 µg/ml, aproximadamente 2 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 6 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 15 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 25 µg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml o aproximadamente 300 mg/ml o más de tales anticuerpos se logra aproximadamente 20 días (preferiblemente 25, 30, 35 ó 40 días) después de la administración de una primera dosis de una formulación inmunogénica de la invención y sin administración de ninguna otra dosis de la formulación. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, cuya respuesta se correlaciona o se extrapola luego a una respuesta prevista en el sujeto, por ejemplo, un ser humano.

50 En un aspecto se describen en este documento métodos para prevenir al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección de gripe y/o infecciones por otro agente infeccioso que no es la gripe) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una primera dosis de un cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus de la gripe quimérico de la descripción, cuyo virus quimérico comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno o epítipo de la cadena principal del virus quimérico 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En otro aspecto se describen en este documento métodos para prevenir al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por gripe y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea la gripe) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una primera dosis de un cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus de la gripe quimérico de la descripción, cuyo virus quimérico comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un

título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) a los 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y anterior a cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, cuya respuesta se correlaciona o se extrapola luego a una respuesta prevista en el sujeto, por ejemplo, un ser humano. En un aspecto se describen en este documento métodos para prevenir una infección y/o infecciones por gripe aviar por otro agente infeccioso que no sea la gripe aviar en un ave, comprendiendo el método administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un virus de la gripe aviar quimérico de la descripción, cuyo virus de la gripe aviar quimérico comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia de proteína heteróloga a dicho sujeto de una cantidad eficaz del virus aviar quimérico de la descripción, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título sérico de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno del virus quimérico y/o anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración subsecuente. En algunos aspectos de la descripción, la dosis del virus de la gripe quimérico administrado al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En un aspecto, se describen en este documento métodos para tratar al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por gripe y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea la gripe) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus de la gripe quimérico de la descripción, cuyo virus quimérico comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno o epítipo de la cadena principal del virus quimérico 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En otro aspecto, se describen en este documento métodos para tratar al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por gripe y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea la gripe) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus de la gripe quimérico de la descripción, cuyo virus quimérico comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) a los 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y anterior a cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, cuya respuesta se correlaciona o se extrapola luego a una respuesta prevista en el sujeto, por ejemplo, un ser humano. En un aspecto se describen en este documento métodos para tratar una infección y/o infecciones por gripe aviar por otro agente infeccioso que no sea la gripe aviar en un ave, comprendiendo el método administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un virus de la gripe aviar quimérico de la descripción, cuyo virus de la gripe aviar quimérico comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia de proteína heteróloga a dicho sujeto de una cantidad eficaz del virus aviar quimérico de la descripción, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título sérico de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno del virus quimérico y/o anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y anterior a cualquier administración posterior. En algunos aspectos, la dosis del virus de la gripe quimérico administrado al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En un aspecto se describen en este documento métodos para controlar y/o mejorar al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por gripe y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea la gripe) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus de la gripe quimérico de la descripción, cuyo virus quimérico comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno o epítipo de la cadena principal del virus quimérico 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En otro aspecto se describen en este documento métodos para controlar y/o mejorar al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por gripe y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea la gripe) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus de la gripe quimérico de la descripción, cuyo virus quimérico

comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) a los 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, cuya respuesta se correlaciona o extrapola luego a una respuesta prevista en el sujeto, por ejemplo, un ser humano. En un aspecto se describen en este documento métodos para controlar y/o mejorar una infección y/o infecciones por gripe aviar por otro agente infeccioso que no sea la gripe aviar en un ave, comprendiendo el método administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un virus de la gripe aviar quimérico de la descripción, cuyo virus de la gripe aviar quimérico comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia proteica heteróloga a dicho sujeto de una cantidad eficaz del virus aviar quimérico de la descripción, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno del virus quimérico y/o anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y anterior a cualquier administración posterior. En algunos aspectos, la dosis del virus de la gripe quimérico administrado al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En una realización, la presente invención proporciona NDV quiméricos para usar en métodos para prevenir al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, cuyo virus quimérico comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno o epítipo de la cadena principal del virus quimérico 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En otra realización, la presente invención proporciona NDV quiméricos para usar en métodos para prevenir al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, cuyo virus quimérico comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) a los 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, cuya respuesta se correlaciona o extrapola luego a una respuesta prevista en el sujeto, por ejemplo, un ser humano. En una realización, la presente invención proporciona NDV quiméricos para usar en métodos para prevenir una infección por NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV en un ave, comprendiendo el método administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, cuyo NDV quimérico comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia de proteína heteróloga a dicho sujeto de una cantidad eficaz del virus NDV quimérico de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título sérico de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno del virus quimérico y/o anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En algunas realizaciones, la dosis del virus de la gripe quimérico administrado al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En una realización, la presente invención proporciona NDV quiméricos para usar en métodos para tratar al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, cuyo virus quimérico comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno o epítipo de la cadena principal del virus quimérico 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En otra realización, la presente invención proporciona NDV quiméricos para usar en métodos para tratar al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea

NDV) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, cuyo virus quimérico comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inespecífica a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) a los 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, cuya respuesta se correlaciona o extrapola luego a una respuesta prevista en el sujeto, por ejemplo, un ser humano. En una realización, la presente invención proporciona NDV quiméricos para usar en métodos para tratar una infección por NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV en un ave, comprendiendo el método administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, cuyo NDV quimérico comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia de proteína heteróloga a dicho sujeto de una cantidad eficaz del virus quimérico de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título sérico de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inespecífica a un antígeno del virus quimérico y/o anticuerpos que se unen inespecíficamente a un antígeno de la proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En algunas realizaciones, la dosis del virus de la gripe quimérico administrado al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En una realización, la presente invención proporciona NDV quiméricos para usar en métodos para controlar y/o mejorar al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad eficaz de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, cuyo virus quimérico comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen inespecíficamente a un antígeno o epítipo de la cadena principal del virus quimérico 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En otra realización, la presente invención proporciona NDV quiméricos para usar en métodos para controlar y/o aliviar al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad eficaz de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, cuyo virus quimérico comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ejemplo, un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título en suero de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen inespecíficamente a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) a los 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, cuya respuesta se correlaciona o se extrapola luego a una respuesta prevista en el sujeto, por ejemplo, un ser humano. En una realización, la presente invención proporciona NDV quiméricos para usar en métodos para controlar y/o mejorar una infección por NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV en un ave, comprendiendo el método administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, cuyo NDV quimérico comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia de proteína heteróloga a dicho sujeto de una cantidad eficaz del virus NDV quimérico de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado un título sérico de aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o más de anticuerpos que se unen de forma inespecífica a un antígeno del virus quimérico y/o anticuerpos que se unen inespecíficamente a un antígeno de la proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En algunas realizaciones, la dosis del NDV quimérico administrado al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

Se describen en este documento métodos para prevenir, tratar y/o controlar al menos una enfermedad, comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus de la gripe quimérico de la descripción, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que da como resultado una reducción en la mortalidad, reducción en la hospitalización, reducción en la gravedad de la enfermedad y/o reducción en los síntomas clínicos de la enfermedad en relación con un sujeto al que no se administró la formulación inmunogénica. En ciertos aspectos de la descripción, el sujeto es un ser humano. En algunos aspectos de la descripción, la dosis del virus de la gripe quimérico administrado al sujeto es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En otro aspecto, se describen en este documento métodos para prevenir, tratar y/o controlar al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por gripe aviar y/o infección por otro agente infeccioso que no sea la gripe aviar) en un sujeto (preferiblemente aviar), comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus de la gripe aviar quimérico de la descripción, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en una reducción en el título o número de agentes infecciosos, reducción en la mortalidad, reducción en hospitalización, reducción en la gravedad de la infección y/o reducción en los síntomas clínicos de la infección en relación con un sujeto no administrado con la formulación inmunogénica de la descripción. En algunos aspectos de la descripción, la dosis del virus de la gripe aviar quimérico administrada al sujeto es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu. En ciertos aspectos de la descripción, la administración de la formulación inmunogénica de la descripción da como resultado una reducción del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% o más en la replicación del agente infeccioso relativo a un sujeto al que no se le ha administrado la formulación inmunogénica de la descripción como se determina a los 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de dicha administración mediante cualquier método conocido en la técnica o ejemplificado en la presente (por ejemplo, determinación del título viral). En otros aspectos, la administración de una formulación inmunogénica de la descripción da como resultado una reducción de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 ó 100 veces en la replicación del agente infeccioso o carga del agente infeccioso en relación con un sujeto al que no se le ha administrado una formulación inmunogénica de la descripción como se determina a los 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de dicha administración mediante cualquier método conocido en la técnica o ejemplificado en la presente memoria (por ejemplo, determinación del título vírico o carga bacteriana y/o concentración).

En otra realización, la presente invención proporciona NDV quiméricos para usar en métodos para prevenir, tratar y/o aliviar al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por NDV y/o infección por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto (por ejemplo, un ave), comprendiendo los métodos administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus NDV quimérico de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en una reducción en el título o número de agentes infecciosos, reducción en la mortalidad, reducción en hospitalización, reducción en la gravedad de la infección y/o reducción en los síntomas clínicos de la infección en relación con un sujeto al que no se administró la formulación inmunogénica de la invención. En algunas realizaciones, la dosis del virus NDV quimérico administrado al sujeto es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu. En ciertas realizaciones, la administración de la formulación inmunogénica de la invención da como resultado una reducción del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% o más en la replicación del agente infeccioso relativo a un sujeto al que no se le ha administrado la formulación inmunogénica de la invención como se determina a los 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de dicha administración mediante cualquier método conocido en la técnica o ejemplificado en la presente (por ejemplo, determinación del título viral). En otras realizaciones, la administración de la formulación inmunogénica de la invención da como resultado una reducción de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 ó 100 veces en la replicación del agente infeccioso o la carga de agente infeccioso en relación con un sujeto al que no se administró la formulación inmunogénica de la invención determinada 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferentemente, 30 días después de dicha administración mediante cualquier método conocido en la técnica o ejemplificado en la presente memoria (p. ej., determinación del título viral).

La cantidad de la formulación inmunogénica de la invención que será eficaz en el tratamiento, prevención y/o mejora de una enfermedad particular (por ejemplo, infección viral) dependerá de la naturaleza de la enfermedad, y puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, los ensayos in vitro se pueden emplear opcionalmente para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la infección o el trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada sujeto. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para la administración son generalmente de aproximadamente 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu, y lo más preferiblemente aproximadamente de 10^4 hasta aproximadamente 10^{12} , y se pueden administrar a un sujeto una vez, dos, tres o más veces con intervalos tan a menudo como sea necesario. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta de la dosis, derivadas de sistemas de prueba de modelos in vitro o animales.

En diversas realizaciones, las formulaciones inmunogénicas de la invención o los anticuerpos generados por los NDV quiméricos de la invención se administran a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ejemplo, terapias antivirales o inmunomoduladoras) para la prevención de al menos una enfermedad (p. ej., una infección por gripe y/o infección por otro agente infeccioso que no sea el virus de la gripe). En otras realizaciones, las formulaciones inmunogénicas de la invención o anticuerpos generados por los NDV quiméricos de la invención se administran a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ejemplo, terapias antivirales o inmunomoduladoras) para el tratamiento de al menos una enfermedad (p. ej. una infección por gripe y/o infección por otro agente infeccioso que no sea el virus de la gripe). En otras realizaciones más, las formulaciones inmunogénicas de la invención o anticuerpos generados por los NDV quiméricos de la invención se administran a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ejemplo, terapias antivirales o inmunomoduladoras) para el

tratamiento y/o mejora al menos una enfermedad (por ejemplo, una infección por gripe y/o infección por otro agente infeccioso que no sea el virus de la gripe). En una realización específica, las formulaciones inmunogénicas de la invención o anticuerpos generados por los NDV quiméricos de la invención se administran a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ejemplo, terapias antivirales o inmunomoduladoras) para la prevención de una infección por gripe aviar y/o infección por otro agente infeccioso que no sea el virus de la gripe aviar. En otra realización específica, las formulaciones inmunogénicas de la invención o anticuerpos generados por los NDV quiméricos de la invención se administran a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ejemplo, terapias antivirales o inmunomoduladoras) para el tratamiento de una infección por gripe aviar y/o infección por otro agente infeccioso que no sea el virus de la gripe aviar. En otras realizaciones más, las formulaciones inmunogénicas de la invención o anticuerpos generados por los NDV quiméricos de la invención se administran a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ejemplo, terapias antivirales o inmunomoduladoras) para la prevención de una infección por NDV y/o infección por otro agente infeccioso que no sea NDV. En otras realizaciones más, las formulaciones inmunogénicas de la invención o anticuerpos generados por los NDV quiméricos de la invención se administran a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ejemplo, terapias antivirales o inmunomoduladoras) para el tratamiento de una infección por NDV y/o infección por otro agente infeccioso que no sea NDV. En ciertas realizaciones, las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran con una separación de menos de 5 minutos, con menos de 30 minutos de diferencia, separación de 1 hora, con aproximadamente 1 hora de diferencia, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas de diferencia, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, de aproximadamente 12 horas a 18 horas de diferencia, de 18 horas a 24 horas de diferencia, de 24 horas a 36 horas de diferencia, de 36 horas a 48 horas de diferencia, de 48 horas a 52 horas de diferencia, de 52 horas a 60 horas de diferencia, de 60 horas a 72 horas de diferencia, de 72 horas a 84 horas de diferencia, de 84 horas a 96 horas de diferencia, o de 96 horas a 120 horas de diferencia. En realizaciones preferidas, dos o más terapias se administran dentro de la misma visita del paciente.

Se puede usar cualquier agente antiviral bien conocido por los expertos en la técnica en las formulaciones (por ejemplo, formulaciones de vacunas) y los métodos de la invención. Los ejemplos no limitantes de agentes antivirales incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y moléculas pequeñas que inhiben y/o reducen la unión de un virus a su receptor, la internalización de un virus en una célula, la replicación de un virus o la liberación de virus de una célula. En particular, los agentes antivirales incluyen, pero no se limitan a, análogos de nucleósidos (p. ej., zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina), foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, alfa-interferones y otros interferones, y AZT.

En realizaciones específicas, el agente antiviral es un agente inmunomodulador que es inmunoespecífico para un antígeno viral. Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno viral" incluye, pero no se limita a, cualquier péptido, polipéptido y proteína viral (por ejemplo, gp120 de VIH, nef VIH, glicoproteína F de RSV, glicoproteína G de RSV, neuraminidasa del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, tax HTLV, glicoproteína del virus del herpes simple (por ejemplo, gB, gC, gD y gE) y antígeno de superficie de la hepatitis B) que sea capaz de provocar una respuesta inmune. Los anticuerpos útiles en esta invención para el tratamiento de una enfermedad infecciosa viral incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra antígenos de virus patógenos, incluyendo como ejemplos y sin limitación: adenoviridae (por ejemplo, mastadenovirus y aviadenovirus), herpesviridae (por ejemplo, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, virus del herpes simple 5 y virus del herpes simple 6), leviviridae (p. ej., levivirus, enterobacteria fase MS2, alolevirus), poxviridae (p. ej., chordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporiipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus y entomopoxvirinae), papovaviridae (p. ej., polioma virus y papiloma virus), paramixoviridae (p. ej., paramixovirus, virus parainfluenza 1, morbillivirus (por ejemplo, virus del sarampión), rubulavirus (p. ej., virus de la parotiditis), pneumonovirinae (p. ej., neumovirus, virus sincitial respiratorio humano), y metapneumovirus (p. ej., neumovirus aviar y metapneumovirus humano), picornaviridae (p. ej., enterovirus, rinovirus, hepatovirus (p. ej., virus de la hepatitis A humana), cardiovirus y aphthovirus), reoviridae (por ejemplo, orthoreovirus, orbivirus, rotavirus, cypovirus, fiyivirus, phytoreovirus y oryzavirus), retroviridae (por ejemplo, retrovirus de mamífero tipo B, retrovirus de mamífero tipo C, retrovirus tipo C aviar, grupo de retrovirus tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus (p. ej. virus de la inmunodeficiencia humana 1 y virus de inmunodeficiencia humana 2), spumavirus), flaviviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis C, virus dengue, virus del nilo occidental), hepadnaviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis B), togaviridae (por ejemplo, alphavirus (por ejemplo, virus sindbis) y rubivirus (p. ej., virus de la rubéola)), rhabdoviridae (por ejemplo, vesiculovirus, lyssavirus, ephemerovirus, cytorhabdovirus y necleorhabdovirus), arenaviridae (por ejemplo, arenavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus lppy y virus lassa) y coronaviridae (p. ej., coronavirus y torovirus).

Se pueden usar agentes y terapias antibacterianos bien conocidos por los expertos en la técnica para la prevención, el tratamiento, el control o la mejora de las infecciones bacterianas en las composiciones (por ejemplo, formulaciones inmunogénicas) y los métodos de la invención. Los ejemplos no limitantes de agentes antibacterianos incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y moléculas pequeñas que inhiben o reducen una infección bacteriana, inhiben o reducen la replicación de bacterias, o inhiben o reducen la propagación de bacterias a otros sujetos. En particular, los ejemplos de agentes antibacterianos incluyen, pero no se limitan a, penicilina, cefalosporina, imipenem, axtreonam, vancomicina, cicloserina, bacitracina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, estreptomycin, tobramicina, gentamicina, amikacina, kanamicina, neomicina, espectinomycin, trimetoprim, norfloxacin, rifampicin, polimixina, anfotericina B, nistatina, ketoconazol, isoniazida, metronidazol y pentamidina. Las terapias antibacterianas y sus dosificaciones, vías de administración y uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en publicaciones tales como Physician's Desk Reference (56^a ed., 2002). Se encuentra disponible información adicional sobre infecciones respiratorias y terapias antibacterianas en Cecil Textbook of Medicine (18^a edición, 1988).

Pueden usarse en las composiciones agentes y terapias antihongos bien conocidos por los expertos en la técnica para la prevención, el control, el tratamiento y/o la mejora de una infección fúngica o uno o más síntomas de los mismos (por ejemplo, una infección respiratoria fúngica) (por ejemplo, formulaciones inmunogénicas) y métodos de la invención. Los ejemplos no limitantes de agentes antifúngicos incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y moléculas pequeñas que inhiben y/o reducen la infección fúngica, inhiben y/o reducen la replicación de hongos, o inhiben y/o reducen la propagación de hongos a otros sujetos. Los ejemplos específicos de agentes antifúngicos incluyen, pero no se limitan a, fármacos azólicos (p. ej., miconazol, ketoconazol (NIZORAL®), acetato de caspofungina (CANCIDAS®), imidazol, triazoles (p. ej., fluconazol (DIFLUCAN®) e itraconazol (SPORANOX®)), polieno (por ejemplo, nistatina, anfotericina B (FUNGIZONE®), complejo lipídico de anfotericina B ("ABLC") (ABELCET®), dispersión coloidal de anfotericina B ("ABCD") (AMPHOTEC®), anfotericina B liposomal (AMBISONE®)), yoduro de potasio (KI), pirimidina (p. ej., flucitosina (ANCOBON®)) y voriconazol (VFEND®). Las terapias antifúngicas y sus dosificaciones, vías de administración y uso recomendado son conocidas en la técnica y se han descrito en publicaciones tales como Dodds et al., 2000 Pharmacotherapy 20 (11) 1335-1355, Physician's Desk Reference (57^a ed., 2003) y el Merk Manual of Diagnosis and Therapy (17^a ed., 1999).

En ciertas realizaciones, una formulación inmunogénica de la invención se administra a un sujeto como una dosis única seguida de una segunda dosis de 3 a 6 semanas después. De acuerdo con estas realizaciones, las inoculaciones de refuerzo se pueden administrar al sujeto a intervalos de 6 a 12 meses después de la segunda inoculación. En una realización, el sujeto es un mamífero. En otra realización, el sujeto es un pájaro. En otra realización más, el sujeto es un ser humano. En una realización más preferida, el sujeto es un pollo en riesgo de contraer NDV o infección por virus de la gripe aviar.

En ciertas realizaciones, la administración de las mismas formulaciones inmunogénicas de la invención puede repetirse y las administraciones pueden separarse al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses o al menos 6 meses.

5.6 Ensayos biológicos

5.6.1 Ensayos in vitro

El crecimiento de los virus quiméricos de la presente invención puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente memoria (por ejemplo, en cultivos celulares (por ejemplo, cultivos de células de riñón embrionarias de pollo o cultivos de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF)). El crecimiento de los virus quiméricos atenuados de la invención puede evaluarse en células competentes en IFN y deficientes en IFN. En una realización específica, las células CEF se infectan a una MOI de 0,0005 y 0,001, 0,001 y 0,01, 0,01 y 0,1, 0,1 y 1, o 1 y 10, o una MOI de 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 ó 10 y se incuban con medio sin suero suplementado con 5% de fluido alantoideo. Los títulos virales se determinan en el sobrenadante por HA en placas de células CEF como se describe a continuación. Otras células en las que se pueden evaluar los títulos víricos incluyen, pero no se limitan a, células EFK-2, células Vero, células endoteliales de vena umbilical humana primaria (HUVEC), línea de células epiteliales humanas H292 y células HeLa.

La incorporación de la proteína de fusión en el virión de los virus quiméricos de la presente invención puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en este documento (por ejemplo, en cultivo celular, modelo animal o cultivo viral en huevos embrionados). Por ejemplo, las partículas víricas del cultivo celular del fluido alantoideo de huevos embrionados pueden purificarse por centrifugación a través de una almohadilla de sacarosa y posteriormente analizarse para determinar la expresión de la proteína de fusión mediante transferencia de Western usando métodos bien conocidos en la técnica.

Los ensayos virales incluyen aquellos que miden la replicación viral alterada (según se determina, por ejemplo, mediante formación de placas) o la producción de proteínas virales (según se determina, por ejemplo, mediante

análisis de transferencia western) o ARN virales (según se determina, por ejemplo, mediante RT-PCR o análisis de transferencia Northern) en células cultivadas in vitro usando métodos que son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la presente invención o fragmentos de los mismos se pueden caracterizar de una variedad de formas bien conocidas por los expertos en la técnica (p. ej. ELISA, visualización de resonancia de plasmón superficial (BIAcore), inmunotransferencia de tipo Western, inmunofluorescencia, inmunotinción y/o ensayos de microneutralización). En particular, los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden ensayarse según su capacidad de unirse inmuno-específicamente a un antígeno del virus de la cadena principal quimérico o un antígeno o epítipo de la proteína de fusión. Tal ensayo se puede realizar en solución (por ejemplo, Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13: 412-421), en perlas (Lam, 1991, *Nature* 354: 82-84), en chips (Fodor, 1993, *Nature* 364: 555-556), sobre bacterias (Patente de Estados Unidos N° 5.223.409), sobre esporas (patente de EE.UU. Nos. 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), en plásmidos (Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865 - 1869) o en fagos (Scott y Smith, 1990, *Science* 249: 386 - 390; Cwirla et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378 - 6382; y Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 301-310). Los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la presente invención o fragmentos de los mismos que se han identificado por unirse inmuno-específicamente a un antígeno del virus de la cadena principal quimérico o un antígeno o epítipo de la proteína de fusión pueden someterse a ensayo para determinarse su especificidad frente a dicho antígeno.

Los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden ensayarse según la unión inmuno-específica a un antígeno del virus quimérico de la invención (por ejemplo, un antígeno o epítipo de la cadena principal del virus quimérico o un antígeno o epítipo de la proteína de fusión (por ejemplo, un antígeno asociado con una enfermedad)) y la reactividad cruzada con otros antígenos por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inmuno-específica y la reactividad cruzada incluyen, entre otros, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis ligado a enzimas), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar algunos. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., Eds., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). Inmunoensayos ilustrativos se describen brevemente a continuación (pero no se pretende que sean limitativos).

Los protocolos de inmunoprecipitación generalmente comprenden lisar una población de células en un tampón de lisis tal como tampón RIPA (NP-40 al 1% o Triton X-100, desoxicolato sódico al 1%, SDS al 0,1%, NaCl 0,15 M, fosfato sódico 0,01 M a pH 7,2, 1% de Trasylol) complementado con proteína fosfatasa y/o inhibidores de la proteasa (por ejemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), añadiendo el anticuerpo de interés para el lisado celular, incubando durante un período de tiempo (por ejemplo, de 1 a 4 horas) a 40°C, añadiendo perlas de proteína A y/o proteína G Sepharose al lisado celular, incubando durante aproximadamente una hora o más a 40°C, lavando las perlas en tampón de lisis y resuspendiendo las perlas en SDS/tampón de muestra. La capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno particular puede evaluarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia Western. Cualquier experto en la técnica conocerá los parámetros que pueden modificarse para aumentar la unión del anticuerpo a un antígeno y disminuir la señal del fondo (por ejemplo, pre-limpieza del lisado celular con perlas de sefarosa). Para una discusión adicional con respecto a los protocolos de inmunoprecipitación véase, por ejemplo, Ausubel et al., Eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.16.1.

El análisis de transferencia Western generalmente comprende preparar muestras de proteínas, electroforesis de las muestras de proteínas en un gel de poliacrilamida (p. ej., SDS-PAGE al 8%-20% dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra de proteína del gel de poliacrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nylon, incubar la membrana en solución bloqueante (p. ej., PBS con BSA al 3% o leche sin grasa), lavar la membrana en tampón de lavado (p. ej., PBS-Tween 20), incubar la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, incubar la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo antihumano) conjugado con un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) o molécula radioactiva (por ejemplo, ³²P o ¹²⁵I) diluida en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado y detectar la presencia del antígeno. Cualquier experto en la materia conocerá los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada y reducir el ruido de fondo. Para una discusión adicional con respecto a los protocolos de la transferencia Western ver, por ejemplo, Ausubel y col., Eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.8.1.

Los ELISA comprenden preparar el antígeno, recubrir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado a un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un período de tiempo y detectar la presencia del antígeno. En el ELISA, el anticuerpo de interés no tiene que conjugarse con un compuesto detectable; en su lugar, se puede agregar al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo de interés) conjugado con un compuesto detectable. Además, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo

puede recubrirse al pocillo. En este caso, puede añadirse un segundo anticuerpo conjugado a un compuesto detectable después de la adición del antígeno de interés al pocillo recubierto. Cualquier experto en la técnica conocerá los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones del ELISA conocidas en la técnica. En una realización preferida, se puede realizar un ELISA recubriendo una placa de microtitulación de 96 pocillos de alta unión (Costar) con 2 µg/ml de rhu-IL-9 en PBS durante la noche. Después de tres lavados con PBS, la placa se incuba con diluciones triples en serie de Fab a 25°C durante 1 hora. Después de otros tres lavados de PBS, se agrega 1 µg/ml de conjugado de fosfatasa alcalina anti-humano kappa y la placa se incuba durante 1 hora a 25°C. Después de tres lavados con PBST, la actividad de la fosfatasa alcalina se determina en sustrato de 50 µl/AMP/PPMP. Las reacciones se detienen y la absorbancia a 560 nm se determina con un lector de microplacas VMAX. Para una discusión adicional con respecto a los ensayos ELISA, véanse, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1.

La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno y la velocidad de desactivación de una interacción anticuerpo-antígeno se puede determinar mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno marcado (por ejemplo, ³H o ¹²⁵I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes del antígeno no marcado, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo por un polipéptido de IL-9 y las tasas de liberación de la unión pueden determinarse a partir de los datos mediante el análisis gráfico de Scatchard. La competencia con un segundo anticuerpo también puede determinarse usando radioinmunoensayos. En este caso, se incuba un polipéptido de IL-9 con un anticuerpo de la presente invención conjugado con un compuesto marcado (por ejemplo, ³H o ¹²⁵I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado.

En una realización preferida, el análisis cinético BIAcore se usa para determinar las tasas de unión y disociación de los anticuerpos de la invención a un antígeno del virus quimérico de la invención (por ejemplo, un antígeno o epítipo de la cadena principal del virus quimérico o un antígeno o epítipo de la proteína de fusión (por ejemplo, un antígeno asociado con una enfermedad)). El análisis cinético de BIAcore comprende analizar la unión y disociación del polipéptido que comprende el antígeno de interés de los chips con anticuerpos inmovilizados generados por los virus quiméricos de la invención en su superficie. Un estudio cinético BIAcore típico implica la inyección de 250 µl de un reactivo de anticuerpo (mAb, Fab) a una concentración variable en tampón HBS que contiene 0,005% de Tween-20 sobre una superficie de chip sensor, sobre la que se ha inmovilizado el antígeno. El caudal se mantiene constante a 75 µL/min. Los datos de disociación se recopilan durante 15 min o más si es necesario. Después de cada ciclo de inyección/disociación, el mAb unido se elimina de la superficie del antígeno usando brevemente, pulsos de 1 min de ácido diluido, típicamente HCl 10-100 mM, aunque se emplean otros regenerados según lo justifiquen las circunstancias. Más específicamente, para la medición de las velocidades de asociación, k_{on} y de disociación, k_{off} , el polipéptido que comprende el antígeno se inmoviliza directamente sobre la superficie del chip sensor mediante el uso de químicas de acoplamiento de aminas estándar, concretamente el método EDC/NHS (EDC = N-dietilaminopropil)-carbodiimida). Brevemente, se prepara una solución 5-100 nM del polipéptido que comprende el antígeno en NaOAc 10 mM, pH 4 o pH 5, y se pasa sobre la superficie activada con EDC/NHS hasta que se inmovilizan aproximadamente 30-50 RU del antígeno. A continuación, los ésteres activos que no han reaccionado se "tapan" con una inyección de Et-NH2 1M. Una superficie en blanco, que no contiene antígeno, se prepara bajo idénticas condiciones de inmovilización con fines de referencia. Una vez que se ha preparado una superficie apropiada, se prepara una serie de diluciones adecuada de cada uno de los reactivos de anticuerpos en HBS/Tween-20, y se pasa por ambas superficies del antígeno y de la célula de referencia, que están conectadas en serie. El rango de concentraciones de anticuerpos que se preparan varía, dependiendo de lo que se estima que es la constante de equilibrio de enlace, KD. Como se describió anteriormente, el anticuerpo unido se elimina después de cada ciclo de inyección/disociación usando un regenerado apropiado.

Los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención o fragmentos de los mismos también se pueden analizar para determinar su capacidad para inhibir la unión de un antígeno del virus quimérico de la invención (por ejemplo, un antígeno o epítipo de la cadena principal del virus quimérico o un antígeno o epítipo de la proteína de fusión (por ejemplo, un antígeno asociado con una enfermedad)) a un receptor de la célula huésped usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células que expresan receptores que se sabe que se unen a dichos antígenos pueden ponerse en contacto con el antígeno en presencia o ausencia de un anticuerpo generado por los virus quiméricos de la invención o su fragmento y la capacidad del anticuerpo o fragmento del mismo para inhibir la unión del antígeno puede medirse, por ejemplo, por citometría de flujo o un ensayo de centelleo. El antígeno o el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede marcarse con un compuesto detectable, tal como un marcador radioactivo (por ejemplo, ³²P, ³⁵S y ¹²⁵I) o un marcador fluorescente (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre el antígeno y un receptor celular. Alternativamente, la capacidad de los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención o fragmentos de los mismos para inhibir un antígeno del virus quimérico de la invención (por ejemplo, un antígeno o epítipo de la cadena principal del virus quimérico o un antígeno o epítipo de la proteína de fusión (por ejemplo, un antígeno asociado con una enfermedad)) de la unión a un receptor se puede determinar en ensayos de células libres. Por ejemplo, un polipéptido que comprende el antígeno se puede poner en contacto con un anticuerpo o fragmento del mismo y se puede determinar la capacidad

del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para inhibir que el polipéptido se una a un receptor celular. Preferiblemente, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se inmoviliza en un soporte sólido y el polipéptido se marca con un compuesto detectable. Alternativamente, un polipéptido que comprende el antígeno se inmoviliza en un soporte sólido y el anticuerpo o fragmento del mismo se marca con un compuesto detectable.

5 5.6.2 Ensayos in vivo

La virulencia de los virus quiméricos de la presente invención se puede evaluar en un sujeto, en particular aves, o en un modelo animal del mismo. En un ejemplo, la capacidad de inducir lesiones pulmonares y causar infección en un modelo animal de infección por virus se compara con el virus de tipo salvaje y el virus simulado. Las lesiones pulmonares se pueden evaluar como un porcentaje de los lóbulos pulmonares que están sanos mediante inspección visual. Los animales se sacrifican 5 días p.i. por administración intravenosa de pentobarbital, y sus pulmones se retiran en su totalidad. El porcentaje de la superficie de cada lóbulo pulmonar que se ve afectado por lesiones macroscópicas se estima visualmente. Los porcentajes se promedian para obtener un valor medio para los 7 lóbulos pulmonares de cada animal. En otros ensayos, los hisopos nasales se pueden analizar para determinar la carga del virus o el título. Se pueden tomar hisopos nasales durante la necropsia para determinar la carga viral después de la infección.

Para la cuantificación de virus en muestras de tejido, las muestras de tejido se homogeneizan en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y las diluciones de los homogenados clarificados se adsorben durante 1 hora a 37°C en monocapas de células (por ejemplo, células CEF o MDCK). Las monocapas infectadas se recubren luego con una solución de medio esencial mínimo que contiene 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA), DEAE-dextrano al 0,01%, NaHCO₃ al 0,1% y agar al 1%. Las placas se incuban de 2 a 3 días hasta que se puedan visualizar las placas. Los ensayos de dosis infecciosas de cultivo tisular (TCID) para valorar el virus a partir de muestras infectadas con PR8 se llevan a cabo de la siguiente manera. Se incuban monocapas confluentes de células (por ejemplo, células CEF o MDCK) en placas de 96 pocillos con diluciones logarítmicas de homogeneizados tisulares clarificados en medios. De dos a tres días después de la inoculación, se evalúan las alícuotas de 0,05 ml de cada pocillo para el crecimiento viral mediante ensayo de hemaglutinación (ensayo de HA).

En otros ensayos más, se realizan evaluaciones histopatológicas después de la infección. Los cornetes nasales y la tráquea pueden examinarse para detectar cambios epiteliales e inflamación subepitelial. Los pulmones pueden examinarse para detectar cambios epiteliales bronquiolares e inflamación peribronquiolar en bronquiolos grandes, medianos y pequeños o terminales. Los alvéolos también se evalúan para detectar cambios inflamatorios. Los bronquiolos medianos se clasifican en una escala de 0 a 3+ de la siguiente manera: 0 (normal: revestido por células epiteliales columnares de medianas a altas con bordes apicales ciliados y núcleos pseudoestratificados basales, inflamación mínima); 1+ (capa epitelial columnar e incluso en líneas generales con proliferación solo ligeramente aumentada, cilios todavía visibles en muchas células); 2+ (cambios prominentes en la capa epitelial que van desde la atenuación a la proliferación marcada, las células desorganizadas y el contorno de la capa irregular en el borde luminal); 3+ (capa epitelial notablemente alterada y desorganizada con células necróticas visibles en la luz, algunos bronquiolos atenuados y otros en una proliferación reactiva marcada).

La tráquea se clasifica en una escala de 0 a 2,5+ de la siguiente manera: 0 (normal: Revestido por células epiteliales columnares de medianas a altas con borde apical ciliado, núcleos basales y pseudoestratificados. Citoplasma evidente entre el borde apical y el núcleo. Enfoque ocasional pequeño con células escamosas); 1+ (metaplasia escamosa focal de la capa epitelial); 2+ (metaplasia escamosa difusa de gran parte de la capa epitelial, los cilios pueden ser evidentes focalmente); 2,5+ (metaplasia escamosa difusa con muy pocos cilios evidentes).

La inmunohistoquímica de los virus se realiza usando un anticuerpo monoclonal específico de virus (p. ej., anticuerpos monoclonales específicos de NP, N o HN). La tinción se clasifica de 0 a 3+ de la siguiente manera: 0 (sin células infectadas); 0,5+ (pocas células infectadas); 1+ (pocas células infectadas, como células individuales ampliamente separadas); 1,5+ (pocas células infectadas, como solas separadas y en pequeños grupos); 2+ (cantidades moderadas de células infectadas, que generalmente afectan a grupos de células adyacentes en porciones de la capa epitelial que recubre los bronquiolos o en focos sublobulares pequeños en los alvéolos); 3+ (numerosas células infectadas, que afectan la mayor parte de la capa epitelial en los bronquiolos o diseminadas en focos sublobulares grandes en los alvéolos).

50 5.6.3 Determinación del título viral

El título viral se determina inoculando diluciones en serie del virus quimérico en cultivos celulares (por ejemplo, CEF o MDCK), embriones de pollo o animales vivos (por ejemplo, aves). Después de la incubación del virus durante un tiempo específico, el virus se aísla usando métodos estándar.

El ensayo HA puede llevarse a cabo en placas de 96 pocillos en V. Diluciones dobles seriadas de cada muestra en PBS se incuban durante 1 h en hielo con un volumen igual de una suspensión al 0,5% de eritrocitos de pollo en PBS. Los pocillos positivos contienen una capa adherente y homogénea de eritrocitos; los pocillos negativos contienen un sedimento no adherente.

La cuantificación física del título del virus se puede realizar usando la PCR aplicada a los sobrenadantes virales (Quinn y Trevor, 1997; Morgan et al., 1990), ensayos de hemaglutinación, dosis infecciosas de cultivo de tejido (TCID50) o dosis infecciosas de huevo (EID50).

5.6.4 Estudios de toxicidad

5 La toxicidad y/o eficacia de las composiciones (por ejemplo, formulaciones inmunogénicas) de la presente invención se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren las terapias que exhiben índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse terapias que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija dichos agentes al sitio del tejido afectado a fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

10 Los datos obtenidos de los ensayos del cultivo celular y los estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosificación de las terapias para su uso en sujetos. La dosificación de dichos agentes se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier terapia usada en la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración de plasma circulante que incluye la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) según se determina en un cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar con mayor precisión dosis útiles en sujetos (por ejemplo, caballos). Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

15 Además, cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica puede usarse para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de una composición (por ejemplo, formulación de vacuna), una terapia de combinación descrita en este documento para infección viral o una afección o síntomas asociados a la misma, una infección que no sea una infección viral o una afección o síntoma asociado con ella, o una afección en la que se usa un virus quimérico atenuado de la invención como vector para inducir una respuesta inmune a un antígeno asociado con la afección.

5.7 Descripciones específicas de la aplicación

30 Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico que comprende una proteína de fusión que tiene

(i) un ectodominio que comprende una secuencia peptídica heteróloga, cuya secuencia heteróloga comprende al menos un epítipo de un antígeno protector de un agente infeccioso, distinto de la gripe, o de un antígeno asociado con una enfermedad fusionado a

35 (ii) un dominio transmembrana y citoplásmico de una glicoproteína codificada por un gen esencial de un virus de la gripe,

en el que la proteína de fusión se incorpora a un virus de la gripe aviar, en el que la función del gen esencial es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa del virus de la gripe aviar. En ciertos aspectos, el gen esencial de un virus de la gripe es un gen de hemaglutinina (HA). En otros aspectos, el gen esencial de un virus de la gripe es un gen de neuraminidasa (NA). En ciertos aspectos, el virus de la gripe aviar quimérico está atenuado. De acuerdo con estos aspectos, el virus de la gripe aviar quimérico se puede atenuar mediante mutaciones en el gen NS1.

Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico que comprende una proteína de fusión que tiene

(i) un ectodominio de una proteína NDV HN fusionada a

(ii) un dominio transmembrana y citoplásmico de una proteína NA del virus de la gripe,

45 en donde la proteína de fusión se incorpora a un virus de la gripe aviar, en el cual la función de la proteína NA es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa del virus de la gripe aviar. En ciertos aspectos, el virus de la gripe aviar quimérico está atenuado. De acuerdo con estos aspectos, el virus de la gripe aviar quimérico se puede atenuar mediante mutaciones en el gen NS1.

Se describe en este documento un virus de la gripe quimérico atenuado, que comprende una proteína de fusión, que tiene

(i) un ectodominio que comprende una secuencia peptídica heteróloga, cuya secuencia heteróloga comprende al menos un epítipo de un antígeno protector de un agente infeccioso, distinto de la gripe, o de un antígeno asociado con una enfermedad de un antígeno protector de un agente infeccioso, distinto de la gripe fusionado a

(ii) un dominio transmembrana y citoplasmático de una glucoproteína codificada por un gen esencial de un virus de la gripe,

en el que la proteína de fusión se incorpora a un virus de la gripe atenuado, en el que la función del gen esencial es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa del virus de la gripe atenuado. En ciertos aspectos, el gen esencial de un virus de la gripe es un gen de hemaglutinina (HA). En otros aspectos, el gen esencial de un virus de la gripe es un gen de neuraminidasa (NA).

Se describe en este documento un NDV quimérico que comprende una proteína de fusión que tiene

(i) un ectodominio que comprende una secuencia peptídica heteróloga, cuya secuencia heteróloga comprende al menos un epítipo de un antígeno protector de un agente infeccioso, distinto de NDV, o de un antígeno asociado con una enfermedad fusionado a

(ii) un dominio transmembrana y citoplasmático de una glucoproteína codificada por un gen esencial de un NDV,

en el que la proteína de fusión se incorpora a un NDV, en el que la función de este gen esencial es aportada por la proteína de fusión o por la glucoproteína nativa del NDV.

Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico, que comprende un segmento NA del virus de la gripe empaquetado que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en el que el marco de lectura abierto NA se modifica de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA se reemplazan por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno de neuraminidasa de un agente infeccioso distinto de la gripe que está anclado por el extremo N, de modo que la proteína de fusión de la neuraminidasa se expresa e incorpora en el virus de la gripe aviar quimérico.

Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico, que comprende un segmento de HA del virus de la gripe empaquetado que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en el que el marco de lectura abierto HA se modifica de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio de HA se reemplazan por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno de hemaglutinina de un agente infeccioso distinto de la gripe que está anclado por el extremo C, de modo que la proteína de fusión de hemaglutinina se expresa e incorpora en el virus de la gripe aviar quimérico.

Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico que comprende un segmento de HA del virus de la gripe bicistrónico empaquetado, que comprende:

(a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína de hemaglutinina de la gripe aviar, y

(b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en la que los nucleótidos que codifican el ectodominio de hemaglutinina se reemplazan por nucleótidos que codifican una secuencia de péptidos heteróloga, cuya secuencia heteróloga comprende al menos un epítipo de un antígeno protector de un agente infeccioso distinto de la gripe o de un antígeno asociado con una enfermedad que está anclado por el C-terminal,

de modo que tanto la hemaglutinina de la gripe como la proteína de fusión se expresan e incorporan en el virus de la gripe aviar quimérico.

Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico que comprende un segmento NA del virus de la gripe bicistrónica empaquetado, que comprende:

(a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína de neuraminidasa de la gripe aviar, y

(b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en la que los nucleótidos que codifican el ectodominio de neuraminidasa están reemplazados por nucleótidos que codifican una secuencia de péptidos heteróloga, cuya secuencia heteróloga comprende al menos un epítipo de un antígeno protector de un agente infeccioso distinto de la gripe o de un antígeno asociado con una enfermedad que está anclado por el extremo N,

de modo que tanto la neuraminidasa de la gripe como la proteína de fusión se expresan e incorporan en el virus de la gripe aviar quimérico.

Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico que comprende un segmento NA del virus de la gripe empaquetado que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en el que el marco de lectura abierto NA se modifica de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA se reemplazan por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno HN de NDV, de modo que la proteína de fusión de neuraminidasa se expresa e incorpora en el virus de la gripe aviar quimérico.

En ciertos aspectos de la descripción, el virus de la gripe aviar quimérico de los párrafos 209-211 y 213-217 comprende un segmento del gen NS1 empaquetado que codifica una proteína NS1 modificada que reduce la actividad antagonista del interferón celular del virus. En otros aspectos de la descripción, el virus de la gripe aviar quimérico de los párrafos 209-211 y 213-217 comprende un segmento de HA que tiene un marco de lectura abierto modificado para eliminar el sitio de escisión polibásico de la hemaglutinina. En otros aspectos de la descripción, el virus de la gripe aviar quimérico del párrafo 215, el primer marco de lectura abierto se modifica para eliminar el sitio de escisión polibásico de la hemaglutinina.

Se describe en este documento una molécula de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, moléculas de ADN recombinantes) que codifica el segmento NA de los párrafos 213 y 216. La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico recombinantes (por ejemplo, moléculas de ADN recombinante) que codifican el segmento de HA de los párrafos 214-215.

Se describen en este documento métodos para propagar los virus de la gripe aviar quiméricos de los párrafos 209-211 y 213-218, que comprenden cultivar los virus de la gripe aviar quiméricos en un huevo embrionado o una línea celular que es susceptible a la infección por el virus de la gripe aviar. Se describen en este documento métodos para producir una formulación inmunogénica, comprendiendo el método:

(a) propagar el virus quimérico de la gripe aviar de los párrafos 209-211 y 213-218 en un huevo embrionado o en una línea celular que es susceptible a la infección por el virus de la gripe aviar; y

(b) recoger el virus de progenie,

en el que el virus se cultiva en cantidades suficientes y en condiciones suficientes para que el virus esté libre de contaminación, de modo que el virus de la progenie sea adecuado para su uso en una formulación inmunogénica, por ejemplo, una formulación de vacuna.

Se describe en este documento un virus de la gripe quimérico atenuado que comprende un segmento NA del virus de la gripe empaquetado que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en el que el marco de lectura abierto de NA se modifica de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA se reemplazan por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno de neuraminidasa de un agente infeccioso distinto de la gripe que está anclado por el extremo N, de modo que la proteína de fusión de neuraminidasa se expresa e incorpora en el virus de la gripe aviar quimérico atenuado.

Se describe en este documento un virus de la gripe quimérico atenuado que comprende un segmento de HA del virus de la gripe empaquetado que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en el que el marco de lectura abierto de HA se modifica de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio de HA se reemplazan por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno de hemaglutinina de un agente infeccioso distinto de la gripe que está anclado por el extremo C, de modo que la proteína de fusión de hemaglutinina se expresa e incorpora en el virus de la gripe quimérico atenuado.

Se describe en este documento un virus de la gripe aviar quimérico atenuado que comprende un segmento de HA del virus de la gripe bicistrónico empaquetado que comprende:

(a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína de hemaglutinina de la gripe aviar, y

(b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en la que los nucleótidos que codifican el ectodominio de hemaglutinina se reemplazan por nucleótidos que codifican una proteína heteróloga, conteniendo dicha proteína un epítipo de un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso distinto de la gripe o de un antígeno asociado con una enfermedad, dicha proteína de fusión anclada por el extremo C,

de modo que tanto la hemaglutinina como la proteína de fusión se expresan e incorporan en el virus de la gripe quimérico atenuado.

Se describe en este documento un virus de la gripe quimérico atenuado que comprende un segmento de NA del virus de la gripe bicistrónico empaquetado, que comprende:

(a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína de neuraminidasa de la gripe aviar, y

(b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en la que los nucleótidos que codifican el ectodominio de neuraminidasa están reemplazados por nucleótidos que codifican la proteína heteróloga, conteniendo dicha proteína un epítipo de un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso distinto de la gripe o de un antígeno asociado con una enfermedad, dicha proteína de fusión anclada por el término N,

de modo que tanto la neuraminidasa de la gripe como la proteína de fusión se expresan e incorporan en el virus de la gripe quimérico atenuado.

En ciertos aspectos de la descripción, el virus de la gripe quimérico atenuado de los párrafos 221-224 comprende un segmento del gen NS1 empaquetado que codifica una proteína NS1 modificada que reduce la actividad antagonista del interferón celular del virus. En ciertos otros aspectos, el virus de la gripe quimérico atenuado de los párrafos 221-224 comprende un segmento de HA que tiene un marco de lectura abierto modificado para eliminar el sitio de escisión polibásico de la hemaglutinina. En otros aspectos, en el virus de la gripe quimérico atenuado del párrafo 223 el primer marco de lectura abierto se modifica para eliminar el sitio de escisión polibásico de la hemaglutinina.

Se describen en este documento moléculas de ADN recombinante que codifican el segmento NA de los párrafos 221 y 224. Se describen en este documento moléculas de ADN recombinante que codifican el segmento HA de los párrafos 222-223.

Se describen en este documento métodos para propagar los virus de la gripe quiméricos atenuados de los párrafos 221-225 que comprenden cultivar los virus de la gripe quiméricos atenuados en un huevo embrionado o una línea celular que es susceptible a la infección por el virus de la gripe aviar. Se describen en este documento métodos para producir una formulación inmunogénica, comprendiendo el método:

(a) propagar el virus de la gripe quimérico atenuado de los párrafos 211 y 2221-225 en un huevo embrionado o una célula que es susceptible a la infección del virus de la gripe atenuado; y

(b) recoger el virus progenie,

en el que el virus se cultiva en cantidades suficientes y en condiciones suficientes para que el virus esté libre de contaminación, de modo que el virus de la progenie sea adecuado para su uso en una formulación inmunogénica, por ejemplo, una formulación de vacuna.

La presente invención proporciona un NDV quimérico que comprende un genoma empaquetado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F-proteína de fusión que tiene los dominios transmembrana y citoplásmico de una proteína F y el ectodominio de un antígeno de un agente infeccioso distinto de NDV anclado por el extremo C, de modo que la proteína F-proteína de fusión se expresa e incorpora en el NDV quimérico.

Se describe en este documento un NDV quimérico que comprende un genoma empaquetado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión HN que tiene los dominios transmembrana y citoplásmico de una proteína HN y el ectodominio de un antígeno de un agente infeccioso distinto de NDV que está anclado por el extremo N, de modo que la proteína de fusión HN se expresa e incorpora en el NDV quimérico.

En ciertas realizaciones, el genoma del NDV quimérico de los párrafos 212 y 228-229 comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F, de modo que la proteína F se expresa e incorpora en el NDV quimérico además de la proteína F-proteína de fusión. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F-proteína de fusión de NDV reemplaza la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F de NDV y la proteína F-proteína de fusión suministra la función de la proteína F para el NDV quimérico del párrafo 228.

En ciertos aspectos de la descripción, el genoma del NDV quimérico del párrafo 212 y 228-229 comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HN, de modo que la proteína HN se expresa e incorpora en el NDV quimérico. En otros aspectos, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión HN reemplaza la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína NDV HN y la proteína de fusión HN proporciona la función de la proteína HN para el NDV quimérico del párrafo 229.

La presente invención proporciona métodos para propagar los NDV quiméricos de los párrafos 212 y 228-229 que comprenden cultivar los NDV quiméricos en un huevo embrionado o en una línea celular que es susceptible a la infección por NDV. La presente invención también proporciona un método para producir una formulación inmunogénica, comprendiendo el método:

(a) propagar el NDV quimérico de los párrafos 212 y 228-229 en un huevo o célula embrionados; y

(b) recoger el virus de la progenie,

en el que el virus se cultiva en cantidades suficientes y en condiciones suficientes para que el virus esté libre de contaminación, de manera que el virus de la progenie sea adecuado para su uso en una formulación inmunogénica, por ejemplo, una formulación de vacuna.

Se describen en este documento huevos embrionados que comprenden los virus quiméricos de los párrafos 209-210, 212-218 y 228-229. Se describen en este documento líneas celulares que comprenden los virus quiméricos de los párrafos 209-210, 212-218 y 228-229. Se describen en este documento formulaciones inmunogénicas que comprenden los virus quiméricos de los párrafos 209-210, 212-218 y 228-229.

Se describen en este documento huevos embrionados que comprenden los virus quiméricos atenuados de los párrafos 211 y 221-225. Se describen en este documento líneas celulares que comprenden los virus quiméricos atenuados de los párrafos 211 y 221-225. Se describen en este documento formulaciones inmunogénicas que comprenden los virus quiméricos atenuados de los párrafos 211 y 221-225.

Se describen en este documento métodos para inducir una respuesta inmune de dos agentes infecciosos en un ave, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz de un virus de la gripe aviar quimérico de los párrafos 209-210 y 213-218. La presente invención también proporciona NDV quiméricos para usar en métodos para inducir una respuesta inmune de dos agentes infecciosos en un ave, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz de un NDV quimérico de los párrafos 212 y 228-229. Se describen en este documento métodos para inducir una respuesta inmune de dos agentes infecciosos en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un virus de la gripe quimérico atenuado de los párrafos 211 y 221-225. En ciertos aspectos, el sujeto es un sujeto humano. En otros aspectos, el sujeto es un mamífero no humano (por ejemplo, un cerdo, caballo, perro, gato o bovino). En otros aspectos más, el sujeto es un sujeto aviar.

5

10 6. Ejemplos

6.1 Ingeniería del virus de la gripe aviar quimérico que presenta un epítipo del virus de la enfermedad de Newcastle

El siguiente ejemplo describe la producción de un virus de la gripe aviar quimérico ejemplar. En particular, el ejemplo describe la ingeniería de un virus de la gripe aviar, Gripe A/Vietnam/1203/04 (H5N1), para expresar e incorporar en su virión una proteína de fusión que comprende los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína NA del virus de la gripe aviar y el ectodominio de la proteína HN de NDV. La proteína de fusión reemplaza funcionalmente a la proteína NA del virus de la gripe aviar.

15

6.1.1 Materiales y métodos

6.1.1.1 Construcción de Plásmidos

Todas las construcciones de plásmidos para su uso en el rescate de virus recombinantes solo en el plásmido se clonaron usando la misma estrategia. Los ADNc de longitud completa de segmentos virales se amplificaron usando PCR con cebadores que incluían sitios de restricción SapI, lo que permitió la inserción del producto de PCR en los sitios SapI del plásmido pPoll-SapI-Rb (Flandorfer et al., 2003, J. Virol. 77:9116-9123; Nakaya et al., 2001, J. Virol. 75: 11868-11873). Se confirmaron las secuencias de todos los insertos de PCR (instalación de secuenciación de ADN Mount Sinai, NY), y los cambios de nucleótidos que se habían introducido mediante PCR se corrigieron usando un kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange XL (Stragene, La Jolla, CA) cuando fue apropiado. Las secuencias del GenBank para Gripe A/Vietnam/1203/04 (H5N1), Gripe A/WSN/33 (WSN) y NDV se proporcionan en la Tabla 2:

20

25

Tabla 2. Números de acceso de GenBank de segmentos de virus

Virus	Segmento	Número de acceso del Genbank
H5N1	NS	AY651553 (SEQ ID NO: 1)
	M	AY651388 (SEQ ID NO: 2)
	NP	AY651499 (SEQ ID NO: 3)
	HA	AY818135 (SEQ ID NO: 4)
	NA	AY651447 (SEQ ID NO: 5)
	PA	AY818132 (SEQ ID NO: 6)
	PB1	AY818129 (SEQ ID NO: 7)
	PB2	AY651719 (SEQ ID NO: 8)
WSN	NA	L25817 (SEQ ID NO: 9)
NDV B1	HN	AF309418 (SEQ ID NO: 10)

30 6.1.1.2 Construcción del segmento viral quimérico

Un ADNc que codifica el ectodominio HN de NDV B1 y los dominios de la cola citoplásmica (CT) y transmembrana (TM) de la neuraminidasa (NA) de la gripe A/WSN/33 (A/Vietnam/1203/04-A/WSN/33 NA_(CT + TM)-NDV B1 HN_(ecto)) se construyó usando técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica. La construcción codifica 19 nucleótidos de la región 3' no codificante del ARNv de WSN NA, nucleótidos que codifican los aminoácidos 1-36 (108 nucleótidos) de la región codificante de NA, que corresponden a los dominios de la cola citoplásmica y transmembrana de la proteína NA más el primer amino ácido del ectodominio de NA, seguido de nucleótidos que codifican los aminoácidos 51-568 de la proteína HN de NDV B1 (ectodominio HN), dos codones de parada secuenciales, 157

35

nucleótidos no traducidos del marco de lectura NA de WSN y la región 5' no codificante del ARNv de WSN (FIGURA 1).

6.1.1.3 Construcción de construcciones de plásmidos que codifican H5N1-NDV quimérico

5 Se crearon construcciones de plásmido con el fin de producir, mediante rescate con plásmido único, un virus quimérico basado en H5N1 (el virus hospedador) diseñado para presentar una glicoproteína de superficie de NDV. El segmento de H5N1 que codifica la glucoproteína NA superficial se seleccionó para ser reemplazado por un segmento recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica los dominios CT y TM de la proteína NA más el primer aminoácido del ectodominio NA de A/WSN/33 y el ectodominio de la proteína HN de NDV-B1. La proteína de fusión, A/Vietnam/1203/04-AWSN/33 NA_(CT + TM)-NDV B1 HN_(ecto), suministra la actividad de neuraminidasa para el virus de la gripe aviar quimérico. Ver FIG. 1 para un esquema del segmento quimérico.

10 Los siete segmentos restantes de H5N1 enumerados en la Tabla 2 (NS, M, NP, HA, PA, PB1 y PB2) se clonaron en pPol1 para producir pPol1VN1203-NS, pPol1VN1203-M, pPol1 VN1203-NP, pPol1 VN1203-HA, pPol1 VN1203-PA, pPol1VN1203-PB1 y pPol1VN1203-PB2, respectivamente. Para asegurar la atenuación del virus H5N1 quimérico, se alteró el segmento que codifica HA de H5N1 para convertir la secuencia de aminoácidos polibásicos nativa inmediatamente antes del sitio de escisión de HA (nucleótidos 1013-1039 de la secuencia de codificación de HA de H5N1) en una secuencia consenso basada en cepas de gripe A H5 avirulentas aviares. La secuencia de aminoácidos en esta región se alteró a partir de QRERRRKKRG (SEQ ID N°: 11, aminoácidos 2-11 de SEQ ID N°: 14) a QRETRG (SEQ ID N°: 12, aminoácidos 2-7 de SEQ ID N°: 16), reemplazando los aminoácidos subrayados con treonina (figura 2). El uso de codones en esta región se modificó adicionalmente para reducir el número de residuos de adenosina con el fin de minimizar la posibilidad de reintroducción de residuos de adenosina en esta secuencia por deslizamiento de la polimerasa y la introducción resultante de residuos de aminoácidos básicos en el sitio de corte de HA. Solamente se introdujeron mutaciones sinónimas en la secuencia de HA avirulenta (Figura 3). El segmento resultante que codifica la glucoproteína de HA alterada, cepas de gripe A aviar de baja virulencia correspondientes, se clonó en un plásmido pPol1 como se describió previamente, pPol1VN1203-HALO. Con la excepción de PB1 y PB2, los productos génicos codificados por los segmentos de H5N1 no se alteraron a partir de las secuencias de genbank. Las secuencias de PB1 y PB2 se alteraron como resultado de la introducción de los sitios de restricción SapI. Una sustitución no sinónima con el nucleótido guanina en la posición 32 de la secuencia codificante de PB1 dio como resultado una mutación de lisina a arginina; la sustitución no sinónima con el nucleótido timina en la posición 1393 de la secuencia codificante de PB2 dio como resultado una mutación de prolina a serina.

15

20

25

30 Todos los productos génicos de H5N1 tienen un resto de adenosina en la posición 4 del ARNv.

Además de la construcción del plásmido que codifica la NS de H5N1 de tipo salvaje, pPol1VN1203-NS, también se generaron tres construcciones de pPol1 que codifican versiones truncadas de forma diferente del segmento del gen NS de H5N1. Las construcciones adicionales que codifican versiones alteradas del segmento NS pueden ser útiles para atenuar aún más el virus quimérico resultante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.669.943). Las tres construcciones variaron en el número de aminoácidos de la proteína NS1 (del extremo amino) que se expresan mediante la construcción del plásmido. pPol1VN1203 NS1-126, pPol1VN1203 NS1-99 y pPol1VN1203 NS1-73 codifican así solo los primeros 126, solo los primeros 99 y solo los primeros 73 aminoácidos contados a partir del extremo amino de la proteína NS1 de tipo salvaje, respectivamente. La mutagénesis para generar constructos truncados no afectó al marco de lectura abierto de NEP (Figura 4).

35

40 6.1.1.4 Rescate de virus infeccioso a partir de construcciones de plásmidos

Los virus quiméricos recombinantes de la descripción se rescatan por cualquier medio descrito en este documento o conocido en la técnica. Por ejemplo, las células 293T, HEp-2 o A549 pueden transfectarse con ocho de los plásmidos pPol1 descritos, seleccionados para alcanzar un nivel deseado de atenuación viral y para que se representen los ocho segmentos, es decir, las células se transfectan con pPol1VN WSN-NA_(CT + TM)-NDV B1 HN_(ecto); pPol1VN1203-HA o pPol1VN1203-HALO; pPol1VN1203-NS, pPol1VN1203 NS1-126, pPol1VN1203 NS1-99 o pPol1VN1203 NS1-73; pPol1VN1203-M; pPol1VN1203-NP; pPol1VN1203-PA; pPol1VN1203-PB1 y pPol1VN1203-PB2. Las células se transfectan adicionalmente con plásmidos de expresión eucarióticos que codifican NA, PA, PB1 y PB2, que son necesarios para la replicación y la transcripción de los ARNv. Después de la incubación durante la noche, las células transfectadas se pueden cultivar conjuntamente con fibroblastos de embrión de pollo para amplificar el virus producido. Después de una incubación adicional de 2 a 3 días, el sobrenadante del cocultivo se puede inyectar en las cavidades alantoides de huevos embrionados de pollo de 9 ó 10 días para la propagación. Para virus atenuados, se pueden usar huevos de 7 días de edad que no tienen un sistema de interferón competente. El crecimiento del virus puede confirmarse ensayando el fluido alantoideo cosechado para la hemaglutinación de acuerdo con protocolos estándar conocidos en la técnica.

45

50

55 6.2 Ingeniería del virus quimérico de la enfermedad de Newcastle que presenta un epítipo extraño

El siguiente ejemplo describe la producción de NDV quiméricos ejemplares. En particular, el ejemplo describe la ingeniería de un NDV quimérico para expresar e incorporar en su virión una proteína de fusión que comprende los dominios transmembrana y citoplásmico de una proteína necesaria de NDV y el ectodominio de un virus de la gripe

aviar. El ejemplo demuestra que dicho virus quimérico induce protección contra la infección posterior por el virus de la gripe y NDV.

El ejemplo también describe la ingeniería de un NDV ejemplar para expresar e incorporar en su virión una proteína de fusión que comprende el dominio citoplásmico de la proteína F de NDV y el ectodominio y dominio transmembrana del receptor del factor de crecimiento de queratinocitos humanos (KGFR).

6.2.1 Materiales y métodos

6.2.1.1 Líneas celulares

Se cultivaron células MDCK, HEp-2 y A549 en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero de ternera fetal al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. El ADNc de longitud completa de la cepa Hitchner B1 de NDV se ha publicado con el número de acceso de genbank AF375823 (Nakaya et al., 2001, J. Virol. 75: 11868-11873).

6.2.1.2 Construcción de Plásmidos

Se ha descrito la ingeniería de ADNc recombinante de NDV para codificar una proteína extraña (Nakaya et al., 2001, J. Virol. 75:11868-11873). Brevemente, el ADNc de longitud completa de NDV se introduce en un plásmido entre el promotor T7 y la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) y el terminador T7 para crear pNDV/B1. El ADNc de NDV tiene un sitio Xball diseñado entre los genes P y M que permite la introducción de secuencias extrañas como una unidad extratranscripcional en el genoma del NDV (Figura 5). Todos los genes insertados están diseñados para contener, secuencialmente, un gen final; 5'-TTAGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 18); nucleótido intercistrónico T; y la secuencia de inicio del gen; 5'-ACGGGTAGAA-3' (SEQ ID NO: 19) (la secuencia GE/GS).

Los virus rNDV/B1-KGFR, rNDV/B1-KGFR/F-CT y rNDV/B1-H7HA/F-TMCT se generaron mediante genética inversa a partir de las copias de ADNc de longitud completa derivadas de la cepa NDV Hitchner B1. Para construir estos virus, se clonó el ORF de KGFR o H7 HA (proteína HA del subtipo H7N2 de la gripe A) como una unidad extratranscripcional entre los genes P y M del ADNc de NDV/B1, como se describe para otros ORF (Nakaya et al. 2001, J. Virol. 75: 11868-11873 y Nakaya et al., 2004, J. Virol. 78: 9366-9375). KGFR y H7 HA son ambas proteínas transmembrana, cada una de las cuales comprende un dominio TM y CT. En la construcción KGFR/F-CT, el dominio CT de la proteína KGFR fue reemplazado por el de la proteína F de NDV. En la construcción H7 HA/F-TMCT, los dominios TM y CT de la proteína H7 HA fueron reemplazados por los de la proteína F de NDV. Los virus recombinantes de NDV se rescataron de ADNc y se propagaron usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, Swayne et al., 2003, Avian Dis. 47: 1047-1053 y Nakaya et al., 2001). La inserción de las nuevas unidades de transcripción en los virus recombinantes se confirmó mediante PCD de transcripción inversa seguido de análisis de secuenciación.

Por ejemplo, el ectodominio (ECTO) del gen H5 HA se produjo por PCR usando los siguientes cebadores (que incluyen la secuencia GE/GS): NheI-H5HA P, 5'-CG GCT AGC TTAGAAAAA T ACGGTAGAA GTGAA ACTAGT CC GCC ACC ATG GAA AGA ATA GTG ATT GCC TTT GCA-3' (SEQ ID NO: 20) y HpaI-H5HA P, 5'-CG GTT AAC CTG ATA AGC CCC CAT TGA TTC TAA T-3' (SEQ ID NO: 21). El fragmento PCR H5 HA_{ecto} se digirió con NheI y HpaI y se clonó en pSL1180 (Amersham Pharmacia Biotech) (pSLH5HA_{ecto}). La TM y la CT del gen F de NDV también se amplificaron por PCR usando los siguientes cebadores, HpaI-NDVF(TM + CYTO)P, 5'-CG GTT AAC CTC ATT ACC TAT ATC GTT TTG ACT-3' (SEQ ID NO: 22), SacI-NheI-NDVF(TM + CYTO)M, 5'-CG GAG CTC AA GCT AGC TTA TCA CAT TTT TGT AGT GGC TCT CAT CTG-3' (SEQ ID NO: 23). Para fusionar con H5 HA_{ecto}, la TM y CT del gen NDV F se digirieron con HpaI y SacI y luego se clonaron en pSLH5HA_{ecto} para obtener el gen de fusión híbrido. Finalmente, el plásmido que contiene el gen HA híbrido H5 se digirió con NheI y se clonó entre los genes P y M del ADNc de rNDV.

6.2.1.3 Transferencia Western y análisis biológico

Los virus de extractos celulares o alantoides se purificaron mediante ultracentrifugación a través de una almohadilla de sacarosa al 30%. Los niveles de proteína incorporada se controlaron mediante análisis de transferencia Western utilizando anticuerpos específicos y técnicas de rutina.

La capacidad del NDV quimérico para presentar la proteína KGFR no vírica in vivo se determinó inmunizando ratones BALB/c con 3×10^7 pfu del virus quimérico por vía intraperitoneal, seguido de una inmunización de refuerzo usando la misma dosis tres semanas después. Dos semanas después de la segunda inmunización, se analizaron los sueros de animales inoculados para determinar la presencia de anticuerpos contra KGFR por inmunotinción de células MDCK transfectadas con un plásmido que codificaba KGFR.

Se diseñó un sistema in vivo para evaluar si la inmunización con el rNDV que comprende el H7 HA/F-TMCT híbrido podía proporcionar protección contra la infección posterior por H7 o NDV. Los pollos de dos semanas se inmunizaron mediante el método de gotas oftálmicas con 100 μ l de tres vacunas, rNDV, rNDV-H7 HA/F-TMCT y Sham. A las 4 semanas de edad, se administraron 100 μ l que comprendían $10^{5.1}$ dosis embrionarias infecciosas medias de HP AIV (A/Steele/ACC-10/59 [H7N7]) a través de la hendidura coanal. Las aves fueron observadas en

busca de signos y lesiones por la infección HP AIV. Se registró la mortalidad y todos los sobrevivientes fueron sacrificados por pentobarbital sódico (100 mg/kg) a las 6 semanas de edad.

6.2.2 Resultados

6.2.2.1 Presentación de KGFR por NDV quimérico que expresa KGFR o KGFR/F-CT

- 5 Los virus quiméricos rNDV/B1-KGFR y rNDV/B1-KGFR/F-CT se cultivaron en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de pollo de 10 días de edad. Los virus purificados se analizaron para determinar la presencia de KGFR o KGFR/F-CT mediante análisis de transferencia Western usando un anticuerpo murino anti-KGFR. Se detectó una respuesta positiva en las muestras aisladas de huevos inoculados con rNDV/B1-KGFR/F-CT pero no con rNDV/B1-KGFR (figura 6).
- 10 Cada uno de estos virus quiméricos también se usó para inmunizar tres ratones BALB/c. Los sueros de los animales inmunizados se analizaron en cuanto a la presencia de anticuerpos KGFR. Los animales inmunizados con virus rNDV/B1-KGFR no desarrollaron niveles detectables de anticuerpos KGFR usando este ensayo. Por el contrario, los tres animales inmunizados con el virus rNDV/B1-KGFR/F-CT fueron positivos mediante este ensayo según la presencia de anticuerpos KGFR.

15 6.2.2.2 Protección contra infecciones por H7 por inmunización con rNDV-H7 HA/F-TMCT

- Los dominios TM y CT del H7 HA natural se reemplazaron por los dominios TM y CT de la proteína F NDV para generar una proteína HA híbrida, H7HA_{ecto}-NDV/F_(TM + CT). En un análisis de transferencia Western, tanto el control rNDV que expresa el ORF completo de H7 HA, rNDV-H7HA, como el rNDV quimérico que expresa el híbrido H7HA_{ecto}-NDV/F_(TM + CT), rNDV-H7HA_{ecto}-NDV/F_(TM + CT), generó una reacción positiva al anticuerpo H7; sin embargo,
- 20 la señal de rNDV-H7HA_{ecto}-NDV/F_(TM + CT) era visiblemente muchas veces más fuerte (Figura 7). Cuando los pollos inmunizados una vez con rNDV-H7HA_{ecto}-NDV/F_(TM + CT) fueron expuestos posteriormente con una dosis letal de gripe H7, 9 de cada 10 (90%) de los pollos inmunizados sobrevivieron. Cuando los pollos inmunizados una vez con rNDV-H7HA_{ecto}-NDV/F_(TM + CT) fueron expuestos posteriormente con una dosis letal de NDV, 10 de cada 10 (100%) de los pollos inmunizados sobrevivieron.

25 6.3 Ingeniería del virus quimérico de la enfermedad de Newcastle que presenta un epítipo extraño

El siguiente ejemplo describe la producción de NDV modificados quiméricos. En particular, se produjo un NDV recombinante para mejorar la virulencia de la estructura de NDV utilizado en el Ejemplo 6.2. El ejemplo demuestra que la virulencia mejorada del rNDV también mejoró la inmunogenicidad de formulaciones inmunogénicas que comprenden virus quiméricos basados en el rNDV.

30 6.3.1 Materiales y métodos

A menos que se indique lo contrario, todos los Materiales y Métodos descritos en la sección son idénticos a los descritos y ejemplificados en el Ejemplo 6.2, supra.

6.3.1.1 Generación de rNDV con un sitio de escisión modificado en sus proteínas F

- Los virus recombinantes de NDV rNDV/F2aa y virus rNDV/F3aa, que tienen dos o tres mutaciones de aminoácidos en el sitio de escisión F de la cepa Hitchner B1 de NDV, se generaron mediante genética inversa. Brevemente, para generar rNDV/F2aa, el fragmento de PCR se generó mediante el uso de cebadores, directo: F2aa-1(+) 5'-GGA TCC CGG TCG GCG CCC TCC AGG (SEQ ID N°: 24), e inverso F2aa-1(-) 5'-AAG GCG Cct CTG TCT CCg CCC TCC AGA TGT AGT CAC AG-3' (SEQ ID NO: 25) y el clon de NDV B1 de longitud completa, plásmido pT7NDV/B1, como plantilla. El siguiente fragmento de PCR se generó mediante el uso de cebadores, directo F2aa-2(+) 5'-GGc GGA GAC AGa GGC GCC TTA TAG GCG CCA TTA TTG G-3' (SEQ ID NO: 26), e inverso F2aa-2 (-) 5'-CCA TAT TCC CAC CAG CTA GAT TGT-3' (SEQ ID NO: 27) y pT7NDV/B1 como plantilla. Los nucleótidos mostrados en minúsculas se mutan para modificar la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de la proteína F a partir de la cepa NDV/B1 (GGRQGR↓L) a GRRQRR↓L. Estos dos fragmentos de PCR solapantes (el solapamiento se subraya en las secuencias del cebador) se combinaron mediante PCR usando cebadores, F2aa-1(+) y F2aa-2(-). El fragmento de PCR resultante, que contiene el gen F completo, se clonó en pSL1180 (Amersham Pharmacia Biotech) y se denominó pSLF2aa. El fragmento Stul-NotI (nt 4646 a 4952) de pSLF2aa se escindió para reemplazar el fragmento correspondiente en el plásmido pT7NDV/B1, dando como resultado la formación del plásmido pT7NDV/F2aa, que se usó para generar el virus rNDV/F2aa mediante genética inversa. Para la generación de rNDV/F3aa, la mutagénesis por PCR se realizó mediante la misma estrategia que la descrita anteriormente utilizando cebadores, directo, F3aa-1(+) 5'-GGA TCC CGG TCG GCG CCC TCC AGG-3' (SEQ ID NO: 28); inverso, F3aa-1(-) 5'-AAa GCG Cct CTG TCT CCg CCC TCC AGA TGT AGT CAC AG-3' (SEQ ID NO: 29); directo, F3aa-2(+) 5'-GGc GGA GAC AGa GGC Gct TTA TAG GCG CCA TTA TTG G-3' (SEQ ID NO: 30); inverso, F3aa-2(-) 5'-CCA TAT TCC CAC CAG CTA GAT TGT-3' (SEQ ID NO: 31) (los nucleótidos mutados se indican con minúsculas) y el pT7NDV/B1 como plantilla. Estos dos fragmentos de PCR superpuestos (la región de solapamiento está subrayada en las secuencias del cebador) se combinaron mediante PCR usando los cebadores F3aa-1(+) y F3aa-2(-), lo que produjo una modificación del sitio de escisión de GGRQGR↓L a GRRQRR↓F. El fragmento Stul-NotI (nt

4646 a 4952) de pSLF3aa se escindió para reemplazar el fragmento correspondiente en el plásmido pT7NDV/B1, dando como resultado la formación del plásmido pT7NDV/F3aa, que se usó para generar el virus rNDV/F3aa.

6.3.1.2 Generación de un vector rNDV fusogénico que expresa la proteína quimérica de H7 HA.

5 Para construir el gen H7 HA quimérico como una unidad extratranscripcional del genoma rNDV/F3aa, el fragmento que contiene la transmembrana (TM) y la cola citoplásmica (CYTO) del gen NDV F se produjo inicialmente mediante PCR usando cebadores, HpaNDV F(TM + CYTO)P, 5'-cgGT TAA CCT CAT TAC CTA TAT CGT TTT GAC T-3' (SEQ ID N°: 32) y SacNheNDVF(TM + CYTO)M, 5'-cg GAG CTC AAG CTA GCT TAT CAC ATT TTT GTA GTG GCT CTC ATC TG-3' (SEQ ID NO: 33) y el plásmido que contiene el gen F de NDV como molde. Este producto de PCR se digirió con Sac I y Hpa I y luego se clonó en el plásmido, pNhe-NDV-GE/GS que poseía el extremo del gen y la señal de inicio del gen del NDV, dando como resultado la formación del plásmido, pNhe-NDV-GE/GS-NDVF(TM + CYTO). Como paso siguiente, permitiendo la conexión del fragmento que contiene el ectodominio H7 HA con el fragmento de la región TM y CYTO del NDV F, el ectodominio H7HA se produjo mediante PCR usando los cebadores, SpeH7(ECTO)P, 5'-cgACT AGT CCG CCA CCA TGA ACA CTC AAA TTC TGG CAT TCA T-5' (SEQ ID NO: 34), HpaH7(ECTO)M, 5'-cgG TTA ACG TCT TTG TAT CCA CTA CTC AAT TTC AC-3' (SEQ ID NO: 35) y el plásmido que contiene el gen H7 HA de A/chicken/NY/13142-5/94 (H7N2) como plantilla. Este producto de PCR se digirió con Spe I y Hpa I y luego se insertó en el plásmido del casete, pNhe-NDV-GE/GS-NDVF(TM + CYTO). En una etapa final, el plásmido del casete, pNhe-NDV-GE/GS-NDV F(TM + CYTO) se digirió con NheI para cortar el gen H7 HA quimérico. Este fragmento de ADN se clonó entre los genes P y M de pT7NDV/F3aa, formando pT7NDV/F3aa-H7 quimérico. El virus rNDV/F3aa que expresa la proteína H7 HA quimérica se rescató a continuación de pT7NDV/F3aa-H7 quimérico utilizando los métodos descritos, supra.

6.3.1.3 Cinética de crecimiento viral

25 Los virus rNDV/B1, rNDV/F2aa, rNDV/F3aa, rNDV/B1-H7, o rNDV/F3aa-H7 quimérico (100 UFP/huevo) se inocularon en huevos de pollo embrionados de 10 días de edad. Se recogieron fluidos alantoides para determinar los títulos virales en diferentes momentos (24 horas, 48 horas y 72 horas). La dosis infectiva del cultivo de tejido al 50% (TCID₅₀) de cada virus presente en el fluido alantoideo se determinó mediante ensayo de inmunofluorescencia (IFA). Para este fin, se infectaron placas de noventa y seis pocillos que contenían células Vero con diluciones en serie de 10 veces de las muestras, y se determinó la presencia de proteínas NDV o proteína H7 HA quimérica mediante IFA.

6.3.2 Ensayos de inmunofluorescencia.

6.3.2.1 Ensayos de inmunofluorescencia

30 Las células MDCK infectadas con el virus de la gripe transfectante se fijaron y se permeabilizaron con metanol helado. Los antígenos virales se detectaron con anticuerpo monoclonal anti-NDV HN (7B1), anticuerpo monoclonal H1 HA anti-gripe (2G9) y suero policlonal H5 HA anti-gripe. Para el análisis del crecimiento de NDV y la expresión de la proteína viral, las células Vero confluentes se infectaron con los virus recombinantes, y se cosecharon en diferentes momentos (24, 48 y 72 horas). Las células infectadas se fijaron con formaldehído al 2,5% que contenía Triton X-100 al 0,1%. Las células fijas se trataron con anticuerpo policlonal NDV anti-conejo o suero policlonal anti-pollo AIV H7, se lavaron y se tiñeron con inmunoglobulinas anti-pollo conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (DAKO) para la proteína AIV H7 HA o inmunoglobulinas de conejo conjugadas con Texas Rojo (Molecular Probe) para las proteínas virales del virus de la enfermedad de Newcastle. La expresión de la proteína viral se examinó mediante microscopía de fluorescencia.

40 6.3.2.2 Tiempo de muerte promedio

Para verificar la patogenicidad de los virus recombinantes en huevos de gallina embrionados, se determinó el tiempo de muerte promedio (MDT). Brevemente, cinco huevos de pollo embrionados de 10 días de edad se infectaron con diluciones en serie de virus de 10 veces. Los huevos se incubaron a 37°C y se controlaron dos veces al día durante 7 días. El tiempo para matar los embriones fue registrado. La mayor dilución que mató a todos los embriones se determinó como la dosis letal mínima. El MDT se calculó como el tiempo medio para que la dosis letal mínima matara a los embriones.

6.3.2.3 Inmunización y exposición de los pollos

50 Fueron vacunados pollos White Leghorn una o dos veces con gotas oculares en el saco conjuntival con $10^{5,7-6,1}$ de dosis infecciosas medias de embriones de pollo (EID₅₀) de rNDV/F3aa-H7 quimérico, o dos veces con $10^{5,7-6,3}$ EID₅₀ de NDV parental/B1 (pNDV), o dos veces con medios de cultivo de tejidos estériles (simulacro) a las 2 y 4 semanas de edad. A las 6 semanas de edad, los pollos fueron expuestos intranasalmente con la cepa Fontana de NDV velogénico (vvNDV) ($10^{5,1}$ EID₅₀ por ave) o A/Humana/Steele/59 (H7N7) HPAI ($10^{5,1}$ EID₅₀ por ave). Los sobrevivientes fueron sangrados y sacrificados 14 días después de la exposición. Los títulos serológicos de la inhibición de la hemaglutinación (HI) se determinaron usando procedimientos estándar.

55 6.3.3 Resultados

6.3.3.1 Generación de mutantes de rNDV fusogénicos

Para mejorar las características fusogénicas de la cadena principal de rNDV, se desarrollaron dos mutantes rNDV, virus rNDV/F2aa y rNDV/F3aa, en los que se reemplazó el sitio de escisión de la proteína F con uno de los dos sitios de escisión multi-básicos variantes, que pueden ser activados por proteasas expresadas de manera ubicua (por ejemplo, furinas proteasas) (Figura 8A). La infección de células de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) con rNDV/F2aa y rNDV/F3aa, y no con rNDV/B1, dio como resultado la formación de sincitios en ausencia de proteasa añadida exógenamente (Figura 8B). Además, rNDV/F3aa indujo sincitios más rápidamente en células CEF que rNDV/F2aa. Por lo tanto, se postuló que una mejor diseminación del virus en animales inmunizados puede potenciar la inmunogenicidad contra la proteína foránea insertada. Por lo tanto, la rNDV/F3aa fusogénica se seleccionó como un vector estructural para desarrollar una vacuna bivalente diseñada para proteger a las aves de corral frente a AIV y NDV.

6.3.3.2 Análisis del tiempo de muerte promedio de vectores de plataforma rNDV en huevos de pollo embrionados.

El virus de la enfermedad de Newcastle puede clasificarse como altamente virulento (velogénico), intermedio (mesogénico) o no virulento (lentogénico) sobre la base de su patogenicidad para los pollos. Dado que se sabe que la presencia de una proteína F con un sitio de escisión multibásico es un factor de virulencia del NDV, se evaluó la patogenicidad de los rNDV con proteína F modificada en huevos embrionados de pollo de 10 días de edad. El tiempo de muerte promedio (EMT) de los embriones de pollo infectados con NDV se correlaciona con la virulencia in vivo. Las cepas lentogénicas (que causan infecciones asintomáticas en aves) se caracterizan por MDT de más de 90 horas, cepas mesogénicas (que causan enfermedades respiratorias en aves) tienen MDT entre 60 y 90 horas, y cepas velogénicas (que causan enfermedad grave en aves) tienen MDT menores de 60 horas. El MDT de rNDV/F2aa era indicativo de una cepa lentogénica, mientras que el de rNDV/F3aa era típico de una cepa mesogénica. Ninguna de estas cepas tenía MDT típicos de una cepa altamente patógena (velogénica) (Tabla 3).

Tabla 3. MDT de rNDVs en huevos de pollo embrionados

Virus	Requisito de tripsina (cultivo celular)	Inoculación EID ₅₀	MDT, h
rNDV/B1	Sí	10	113
		1	122
rNDV/F2aa	No	10	100
		1	104
rNDV/F3aa	No	10	80
		1	84
rNDV/B1-H7	Sí	10	Vivo
		1	Vivo
rNDV/3aa-H7 quimérico	No	10	128
		1	140

Sobre la base de estos datos, el vector rNDV/F3aa no representaría una amenaza para las aves y, por lo tanto, es adecuado como estructura para desarrollar una vacuna bivalente para la protección de las aves de corral contra AIV y NDV.

6.3.3.3 Generación de un vector rNDV fusogénico que expresa el ectodominio de la proteína AIV HA.

El gen que codifica la proteína H7 HA de A/chicken/NY/13142-5/94 (H7N2) se incorporó al vector rNDV/F3aa como se describe supra, dando como resultado la formación de rNDV/F3aa-H7 quimérico (figura 9A). La cinética de crecimiento de rNDV/F3aa-H7 quimérico en huevos de gallina embrionados se comparó con la rNDV/F3aa parental (Figura 9B). El virus que expresa la proteína H7 HA quimérica creció más lentamente que el virus sin la inserción y los títulos máximos fueron aproximadamente un logaritmo más bajo. Curiosamente, el MDT de este virus fue el de una cepa lentogénica (128 ~ 140 h) (Tabla 3). La expresión de la proteína H7 HA quimérica a partir de rNDV/F3aa-H7 quimérico se confirmó mediante transferencia Western de células Vero infectadas 36 horas después de la infección (Figura 9C).

6.3.3.4 Mejora en la incorporación de la proteína AIV H7 HA en viriones rNDV.

Para determinar si la expresión de la proteína H7 HA quimérica que contiene las regiones heteróloga transmembrana y de la cola citoplásmica de la proteína F del NDV se asociaría con la incorporación mejorada en viriones rNDV, los viriones rNDV/B1-H7 y rNDV/F3aa-H7 quiméricos fueron purificados tal como se describe en §6.3. Las cantidades de proteína HA H7 o proteína viral NDV de rNDV/B1-H7 o rNDV/F3aa-H7 quimérico se midieron mediante transferencia Western usando anticuerpo policlonal anti-pollo AIV H7 o suero policlonal anti-conejo NDV. Como se esperaba, la incorporación de la proteína HA H7 quimérica en viriones de rNDV aumentó significativamente en comparación con la de la proteína de wt HA H7 (Figura 9D). Estos datos sugieren que las regiones transmembrana y de la cola citoplásmica de la proteína F del NDV juegan un papel principal en la incorporación mejorada de la proteína extraña en la superficie viral.

6.3.3.5 Inmunización y exposición de pollos.

Después de una o dos vacunaciones con rNDV/F3aa-H7 quimérico, 50-80% de los pollos tenían títulos de inhibición de hemaglutinación (HI) para H7 AIV y 90-100% de los pollos tenían títulos HI para NDV (Tabla 4A y B). Mientras que todos los pollos inmunizados dos veces con el NDV/B1 parental (pNDV) tenían títulos HI para NDV pero ninguno tenía títulos para H7 AIV. Todas las aves infectadas con medios de cultivo de tejidos estériles (simulados) carecían de títulos HI para cualquiera de los virus. Cuando se desafió con vNDV, se protegió el 100% de los pollos inmunizados con rNDV/F3aa-H7 quimérico y pNDV. En comparación, el 90% de los pollos vacunados con rNDV/F3aa-H7 quimérico estaban protegidos del virus HPAI H7, pero ninguno de los pollos vacunados con pNDV estaba protegido del virus HPAI H7. Por el contrario, el 100% y el 70% de las aves infectadas simuladamente murieron cuando fueron atacadas por los virus vNDV y HPAI H7, respectivamente. Los sobrevivientes desarrollaron una respuesta amnésica evidente como un aumento de cuatro veces o más en el título de HI para el virus de prueba respectivo, excepto para los tres sobrevivientes en el grupo de exposición al virus simulado-HPAI H7 que no tenía evidencia serológica de infección.

Tabla 4A. Serología HI de pollos inmunizados con virus quiméricos antes de la exposición

Grupo vacunal*	antígeno AIV/H7	antígeno NDV
rNDV/F3aa-H7 quimérico, 1X	8/10 (11)	10/10 (49)
rNDV/F3aa-H7 quimérico, 1X	7/10 (10)	10/10 (49)
rNDV/F3aa-H7 quimérico, 2X	8/10 (13)	9/10 (56)
rNDV/F3aa-H7 quimérico, 2X	5/10 (9)	9/10 (60)
pNDV, 2X	0/10	10/10 (34)
pNDV, 2X	0/10	10/10 (56)
Simulado, 2X	0/10	0/10
Simulado, 2X	0/10	0/10

Tabla 4B. Serología HI de pollos inmunizados con virus quiméricos después de la exposición (14 días después de la exposición)

Grupo vacunal*	Virus	Sin supervivientes	antígeno AIV/H7	antígeno NDV
rNDV/F3aa-H7 quimérico, 1X	vNDV	10/10	9/10 (15)	10/10 (416)
rNDV/F3aa-H7 quimérico, 1X	HPAIV	9/10	9/9 (2.048)	9/9 (37)
rNDV/F3aa-H7 quimérico, 2X	vNDV	10/10	7/10 (17)	10/10 (315)
rNDV/F3aa-H7 quimérico, 2X	HPAIV	9/10	8/8 (955)	8/8 (30)
pNDV, 2X	vNDV	10/10	0/10	10/10 (294)
pNDV, 2X	HPAIV	0/10	NA	NA
Simulado, 2X	vNDV	0/10	NA	NA
Simulado, 2X	HPAIV	3/10	0/3	0/3

ES 2 668 018 T3

Simulado = fluido de cultivo tisular estéril

HPAIV = virus A/humano/Steele/59 (H7N7)

La serología HI se muestra como el número de pollos con suero positivo para HI/número de pollos vacunados; los valores entre paréntesis son el título medio geométrico (GMT)

5 *n = 10 aves por grupo, 1X = una vacuna, 2X = 2 vacunas

La publicación titulada "Engineered Viral Vaccine Constructs with Dual Specificity: Avian Influenza and Newcastle Disease" de Man-Seong Park et al., en PNAS 103: 8203-8208 (2006).

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Mt. Sinai School of Medicine of New York University
- 5 <120> VIRUS QUIMÉRICOS QUE PRESENTAN PROTEÍNAS DE SUPERFICIE NO NATURALES Y USOS DE LOS MISMOS
- <130> J101875PCEPT1
- 10 <150> 60/741,833
<151> 02-12-2005
- <150> 60/802,864
<151> 22-05-2006
- 15 <160> 36
- <170> FastSEQ for Windows versión 4.0
- 20 <210> 1
<211> 823
<212> ADN
<213> Virus de la Gripe A
- 25 <220>
<223> gen de la proteína no estructural 2 (NS) del virus A de la gripe (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))
- <400> 1
- | | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| atggattcca | acactgtgtc | aagctttcag | gtagactgct | ttctttggca | tgtccgcaaa | 60 |
| cgatttgca | accaagaact | gggtgatgcc | ccattccttg | accggcttcg | ccgagatcag | 120 |
| aagtccttaa | gaggaagagg | caacactctt | ggtctggaca | tcgaaacagc | tactcgcgca | 180 |
| ggaaagcaga | tagtggagcg | gattctggag | ggggagtctg | ataaggcact | taaaatgccg | 240 |
| gcttcacgct | acctaactga | catgactctc | gaagaaatgt | caagggactg | gttcatgctc | 300 |
| atgcccaagc | agaaagtggc | aggttccctt | tgcatacaaaa | tggaccaggc | aataatggat | 360 |
| aaaacatca | tattgaaagc | aaacttcagt | gtgatttttg | accggttggg | aaccctaata | 420 |
| ctacttagag | ctttcacaga | agaaggagca | atcgtggggag | aaatctcacc | attaccttct | 480 |
| cttccaggac | atactggtga | ggatgtcaaa | aatgcaattg | gcgtcctcat | cggaggactt | 540 |
| gaatggaatg | ataacacagt | tcgagtcact | gaaactatac | agagattcgc | ttggagaaac | 600 |
| agtgatgagg | atgggagact | tccactccct | ccaaatcaga | aacggtaa | ggcgagaaca | 660 |
| attgagtcag | aagtttgaag | aaataaggtg | gctgattgaa | gaagtaagac | atagattgaa | 720 |
| aattacagaa | aacagcttcg | aacagataac | gtttatgcaa | gccttacaac | tactgcttga | 780 |
| agtggagcaa | gagataagag | ccttctcgtt | tcagcttatt | taa | | 823 |
- 30 <210> 2
<211> 982
<212> ADN
<213> Virus de la Gripe A
- 35 <220>
<223> gen de la proteína 1 (M) del canal 2 iónico de la membrana y de la matriz del virus A de la gripe (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))
- 40 <400> 2

ES 2 668 018 T3

```

atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tcatcccgtc aggccccctc 60
aaagccgaga tcgcacagaa acctggaagat gtctttgag gaaagaacac cgatctcgag 120
gctctcatgg agtgggctaaa gacaagacca atctgtcac ctctgactaa agggattttg 180
ggatttgat tcacgctcac cgtgccaggt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240
cagaatgccc taaatggaaa tggagatcca aataatatgg atagggcagt taagctatat 300
aagaagctga aaagagaaat aacattccat ggggctaagg aggtcgcact cagctactca 360
accggtgcac ttgccagttg catgggtctc atatacaaca ggatgggaac ggtgactacg 420
gaagtggctt ttggcctagt gtgtgccact tgtgagcaga ttgcagattc acagcatcgg 480
tctcacagac agatggcaac tatcaccaac ccactaatca gacatgagaa cagaatggtg 540
ctggccagca ctacagctaa ggctatggag cagatggcgg gatcaagtga gcaggcagcg 600
gaaccatgg agatcgctaa tcaggctagg cagatggtgc aggcaatgag gacaattggg 660
actcatccta actctagtgc tggcttgaga gataatcttc ttgaaaattt gcaggcctac 720
cagaacgaa tgggagtgca gatgcagcga ttcaagtgat cctattgttg ttgccgcaa 780
tatcattggg atcttgcact tgatattgtg gattcttgat cgtcttttct tcaaatgcat 840
ttatcgctgc cttaaatacg gtttgaaaag agggcctgct acggcagggg tacctgagtc 900
tatgagggaa gagtaccggc aggaacagca gagtgtgtg gatgttgacg atggtcattt 960
tgtcaacata gaattggagt aa 982

```

<210> 3

<211> 1485

5 <212> ADN

<213> Virus de la Gripe A

<220>

10 <223> gen de la proteína (NP) de la nucleocápsida del virus A de la gripe (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))

<400> 3

```

atggcgtctc aaggcaccaa acgatcttat gaacagatgg aaactggtgg ggaacgccag 60
aatgctactg agatcagggc atctgttggg agaatggtta gtggcattgg gaggttctac 120
atacagatgt gcacagaact caaactcagt gactatgaag ggaggctgat ccagaacagc 180
ataacaatag agagaatggt actctctgca ttgatgaaa gaaggaacag atacctggaa 240
gaacacccca gtgctgggaaa ggacccgaag aagactggag gtccaattta tcggaggaga 300
gacgggaaat gggtgagaga gctaattctg tacgacaaag aggagatcag gaggatttgg 360
cgtcaagcga acaatggaga ggacgcaact gctggtctta cccacctgat gatatggcat 420
tccaatctaa atgatgccac atatcagaga acgagagctc tcgtgcgtac tggaaatggac 480
ccaaggatgt gctctctgat gcaagggtca actctcccga ggagatctgg agctgccggg 540
gcagcagtaa agggggtagg gacaatggtg atggagctga ttccggatgat aaaacgaggg 600
atcaacgacc ggaatttctg gagaggcga aatggaagaa gaacaaggat tgcatatgag 660
agaatgtgca acatcctcaa agggaaattc caaacagcag cacaagagc aatgatggat 720
caagtgcgag agagcagaaa tcctgggaat gctgaaattg aagatctcat tttctggca 780
cggctgcac tcatcctgag aggatcagtg gccataagt cctgcttgcc tgcttggtg 840
tacggacttg cagtggccag tggatatgac ttgagagag aagggtactc tctggttgg 900
atagatcctt tccgcctgct tcaaaacagc caggtcttta gtctcattag accaaatgag 960
aatccagcac ataagagtca attagtgtgg atggcatgcc actctgcagc atttgaggac 1020
cttagagtct caagtttcat cagagggaca agagtgggtcc caagaggaca gctatccacc 1080
agaggggttc aaattgcttc aaatgagaac atggaggcaa tggactcaa cactctttaa 1140
ctgagaagca gatattgggc tataagaacc agaagcggag gaaacaccaa ccagcagagg 1200
gcactgcag gacagatcag cgttcagccc actttctcgg tccagagaaa ccttccttc 1260
gaaaagagcga ccattatggc agcatttaca ggaataactg agggcagaac gtctgacatg 1320
aggactgaaa tcataagaat gatggaagt gccagaccag aagatgtgtc attccagggg 1380
cggggagtct tcgagctctc ggacgaaaag gcaacgaacc cgatcgtgcc ttcctttgac 1440
atgaataatg aaggatctta tttcttcgga gacaatgcag agggag 1485

```

<210> 4

15 <211> 1707

<212> ADN

<213> Virus de la Gripe A

<220>

20 <223> gen de la hemaglutinina HA del virus A de la gripe (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))

<400> 4

ES 2 668 018 T3

```

atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaacaa ctcgacagag caggittgaca caataatgga aaagaacggt 120
actgttacac atgcccaga catactggaa aagaacacaca acgggaagct ctgcatcta 180
gatggagtga agcctcta atttgagagat tttgagagat tttgagagat ctggatggct cctcggaaac 240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggctct acatagtggg gaaggccaat 300
ccagtcaatg acctctgtta cccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt gagatcatcc ccaaaagttc ttggtccagt 420
catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc agggaaaagtc ctcccttttc 480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacaatcc caacaataaa gaggagctac 540
aataatacca accaagaaga tcttttggtg ctgtggggga ttcaccatcc taatgatgcy 600
gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata ttccggttg gacatcaaca 660
ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtggg 720
aggatggagt tcttctggac aattttaaag ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt 840
atgaaaagtg aattggaaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaaactcc aatgggggcy 900
ataaactcta gcatgccatt ccacaatata caccctctca ccattgggga atgccccaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtcccttgc actgggctca gaaatagccc tcaagagag 1020
agaagaagaa aaaagagagg attatttggg gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
cagggaaatg tagatgggtg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac 1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcy 1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtttggg gccgttggaa gggaaattta caacttagaa 1260
aggagaatag acaaatttaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat 1320
aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
gtcaagaacc ttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt 1440
aacggttgtt tcgacttcta tcataaatgt gataatgaa gtatggaaa tgtaagaaat 1500
ggaacgtagt agcaattcga gattccagaa gaaagcagac taaaaagaga ggaataaagt 1560
ggagtaaaat tggaaatcaat aggaatttac caaactgtgt caattttatc tacagtggcy 1620
agtccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatgga 1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

```

<210> 5
5 <211> 1350
<212> ADN
<213> Virus de la Gripe A

<220>
10 <223> gen de la neuraminidasa (NA) del virus A de la gripe (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))

```

<400> 5
atgaatccaa atcagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaaatggt 60
agcttaatgt tacaaattgg gaacatgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca 120
gggaatcaac accaatctga accaatcagc aatactaatt ttcttactga gaaagctgtg 180
gcttcagtaa aattagcggg caattcatct ctttggccca ttaacggatg ggctgtatac 240
agtaaggaca acagtataag gatcgggtcc aagggggatg tgtttgttat aagagagccg 300
ttcatctcat gctcccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg 360
aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa gacagaagcc ctcacagaac attaatgagt 420
tgtctgtggg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagctgtg tgcttggctca 480
gcaagtgctt gccatgatgg caccagtgtg ttgacgattg gaatttctgg cccagacaat 540
ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gagtggagg 600
aacaacatac tgagaactca agagctgaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact 660
gtaatgactg acggaccaag taatggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaa 720
gggaaagtgg ttaaatcagt cgaattggat gctcctaatt atcactatga ggaatgctcc 780
tgttatccta atgccggaga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat 840
cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtggg 900
gttttcggag acaatccacg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct 960
aacggggcat atggggtaaa agggttttca tttaaatagc gcaatgggtg ctggatcggg 1020
agaaccaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg 1080
actgaaacgg acagtagctt ttcagtgaaa caagatatcg tagcaataac tgattgtgca 1140
ggatatagcy ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag gactagattg cataagacct 1200
tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg ccaaaagaga gcacaatttg gactagtggg 1260
agcagcatat ctttttggg tgtaaatagt gacactgtgg gttggctctg gccagacggt 1320
gctgagttgc cattcaccaat tgacaagtat 1350

```

<210> 6
15 <211> 2151
<212> ADN
<213> Virus de la Gripe A

<220>
20 <223> gen de la proteína polimerasa PA del virus A de la gripe (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))

<400> 6

ES 2 668 018 T3

```

atggaagact ttgtgcgaca atgcttcaat ccaatgattg tcgagcttgc ggaaaaggca 60
atgaaagaat atgggggaaga tccgaaaatc gaaacgaaca agtttgctgc aatatgcaca 120
cacttgaggg tctgtttcat gtattcggat tttcacttta ttgatgaacg gagtgaatca 180
ataattgtag aatctggaga tccgaaatgca ttattgaaac accgatttga aataattgaa 240
ggaagagacc gaacgatggc ctggactgtg gtgaatagta tctgcaacac cacaggagtt 300
gagaaaccta aatttctccc agatttgtat gactacaaag agaaccgatt catcgaatatt 360
ggagtgcacac ggaggggaagt tcatacatatc tatctggaga aagccaacaa gataaaatcc 420
gaggagacac atattcacatc attctcattc acaggggagg aaatggccac caaagcggac 480
tacacccctg atgaagagag cagggcaaga attaaaacca ggctgttcac cataaggcag 540
gaaatggcca gtaggggtct atgggattcc tttcgtcaat ccgagagagg cgaagagaca 600
attgaagaaa aatttgaatc cactggaacc atgctgagac ttgcagacca aagtctcca 660
ccgaacttct ccagccttga aaactttaga gcctatgtgg atggattcga accgaacggc 720
tgcattgagg gcaagctttc tcaaatgtca aaagaagtga atgctagaat tgagcattt 780
ttgaagacaa cgccacgccc tctcagacta cctgatgggc ctccttgctc tcagcggctg 840
aagttccttg tgatggatgc ccttaaatga agcatcgaag acccgagtca tgagggggag 900
gggataccac tatacgatgc aatcaaatgc atgaagacat ttttcggctg gaaagagccc 960
aacatcgtga aaccacatga aaaaggtata aaccccaatt acctcctggc ttggaagcaa 1020
gtgctggcag aactccaaga tattgaaaat gaggagaaaa tccccaaaac aaagaacatg 1080
aaaaaaacaa gccagttgaa gtgggcactc ggtgagaaca tggcaccaga gaaagtagac 1140
tttgaggact gcaaagatgt tagcgtacta agacagtatg acagtgatga accagagtct 1200
agatcactag caagctggat tcagagtgaat tcaacaagg catgtgaatt gacagattcg 1260
atgttgattg aactcgtatga aataggagaa gacgtagctc caattgagca cattgcaagt 1320
atgagaagga actattttac agcggaaagta tcccattgca gggccactga atacataatg 1380
aagggagtgt acataaacac agccctgttg aatgcatcct gtgcagccat ggtgactttt 1440
caactgattc caatgataag caaatgcaga accaaagaag gaagacggaa aactaatctg 1500
tatggattca ttataaaagg gagatcccac ttgaggaatg ataccgatgt ggtaaatttt 1560
gtgagtatgg aattctctct tactgatccg aggctggagc cacacaagtg ggaaaagtac 1620
tgtgtcctcg agataggaga catgctcctc cggactgcag taggccaagt ttcgagggcc 1680

atgttcctgt atgtaagaac caatggaacc tccaagatca aaatgaaatg gggcatggaa 1740
atgagggcat gccttcttca atcccttcaa caaatgaaa gcatgattga agccgagtct 1800
tctgtcaaag agaaggacat gaccaaagaa ttctttgaaa acaaatcaga aacatggccg 1860
attggagagt cccccaaggg agtggaggaa ggctccatcg gaaaggtgtg cagaaccttg 1920
ctggcgaagt ctgtgttcaa cagtttatat gcactctcac aactcgaggg gttttcagct 1980
gaatcaagaa aattgcttct cattgctcag gcacttaggg acaacctgga acctgggacc 2040
ttcgatcttg gagggctata tgaagcaatt gaggagtgcc tgattaacga tccctggggt 2100
ttgcttaatg cgtcttgggt caactccttc ctgcacatg cactgaaata g 2151

```

- 5 <210> 7
- <211> 2274
- <212> ADN
- <213> Virus de la Gripe A

- 10 <220>
- <223> gen de la proteína polimerasa PB1 del virus A de la gripe (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))

<400> 7

ES 2 668 018 T3

```

atggatgtca atccgacttt acttttcttg aaagtaccag tgcaaaatgc tataagtacc 60
accitccctt atactggaga ccctccatac agccatggaa cagggacagg atacaccatg 120
gacacagtca acagaacaca ccaatattca gaaaagggga agtggacaac aaacacagag 180
actggagcac cccaactcaa cccgattgat ggaccactac ctgaggataa tgagcccagt 240
gggtacgcac aaacagattg tgtattggaa gcaatggctt tccttgaaga atcccaccca 300
gggatctttg aaaactcgtg tcttgaacag atggaaattg ttcaacaaac aagagtggat 360
aaactgacct aaggtcgcca gacctatgac tggacattga atagaaacca accggctgca 420
actgctttgg ccaacactat agaaatcttc agatcgaacg gtctaacagc caatgaatcg 480
ggacggctaa tagatttctt caaggatgtg atggagtcaa tggataagga agaaatggag 540
ataacaacac atttccagag aaagagaagg gtgagggaca acatgaccaa gaaaaatggtc 600
acacaagaa caatagggaa gaaaaaacaa aggctgaaca aaaagagcta cctgataaga 660
gactgacac tgaacacaat gacaaaagat gcagaaagag gcaaattgaa gaggcgagcg 720
attgcaacac ccggaatgca aatcagagga ttcgtgtact ttgttgaac actagcgagg 780
agtatctgtg agaaacttga gcaatctgga ctcccagtcg gagggaatga gaagaaggct 840
aaattggcaa acgtcgtgag gaagatgatg actaactcac aagatactga actctccttt 900
acaattactg gagacaatac caaatggaat gagaatcaga atcctaggat gtttctggca 960
atgataacgt acatcacaag gaaccagcca gaatggtttc ggaatgtctt aagcatagct 1020
cctataatgt tctcaaacaa aatggcgaga ctaggaaaag gatacatgtt cgaaagttag 1080
agcatgaagt tacgaacaca aataccagca gaaatgcttg caaacattga tcttaatac 1140
ttcaatgaat taacgaaaaa gaaaattgag aaaaataaggc ctctattaat agatggatca 1200
gcctcattga gccctggaat gatgatgggc atgttcaaca tgctgagtac agtccatgga 1260
gtttcaatcc tgaatcttgg acagaaaagg tacaccaaaa ccacatattg gtgggacgga 1320
ctccaatcct ctgatgattt cgctctcacc gtaaattgcac cgaatcatga ggaatacaa 1380
gcaggagtgg ataggtttta taggacttgt aaactagttg gaatcaatat gagcaagaag 1440
aagctttaca taaatcggac agggacattt gaattcacga gctttttcta ccgctatgga 1500
ttttagacca atttcagtat ggagctgccc agttttggag tgtctggaat taatgaatcg 1560
gccgacatga gcattgggtg tacagtgata aaaaacaata tgataaaca cgccttggg 1620
ccagcaacag ctcagatggc tcttcagtta tcatcaagg actacagata cacataccga 1680
tgccacagag gggatacgc aatccaaca aggagatcat tcgagctgaa gaagctgtgg 1740
gagcaaaccc gttcaaaggc aggactgttg gtttcagatg gaggaccaa tctatacaat 1800
atccgaaacc tccatattcc tgaagtctgc ttaaattggg aattgatgga tgaagattac 1860
cagggcagac tgtgtaatcc tctgtaatca ttcgtcagcc ataaggaaat tgaatctgtc 1920
aacaatgctg tagtaatgcc agctatggc ccggccaaga gtatggaata tgatccggt 1980
gcaactacac attcattggat tcctaaaagg aaccgttcca ttctcaatac gagtcaaagg 2040
ggaattcttg aggatgaaca gatgtaccag aagtgtgca atctattcga gaaattcttc 2100
cccagcagtt catatcggag gccagttgga atttccagca tgggtggagg catggtgtct 2160
agggcccgaa ttgacgcacg aatcgatttc gactctggaa ggattaagaa agaagagttt 2220
gccgagatca tgaagatctg ttccaccatt gaagaactca gacggcaaaa atag 2274

```

<210> 8

<211> 2280

5 <212> ADN

<213> Virus de la Gripe A

<220>

10 <223> gen de subunidad básica 2 de la polimerasa (PB2) del virus A de la gripe (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))

<400> 8

```

atggagagaa taaaagaatt acgagatcta atgtcacagt cccgcaactc cgagatacta 60
acaaaaacca ctgtggacca tatggccata atcaagaaat acacatcagg aagacaagag 120
aagaaccctg ctctcagaat gaaatggatg atggcaatga aatatccaat cacagcggac 180
aagagaataa tagagatgat tcctgaaagg aatgaacaag ggcagacgct ctggagcaag 240
acaaatgatg ctggatcggc cagggtgatg gtgtctcccc tagctgtaac ttggtggaat 300
aggaatgggc cggcgacaag tgcagttcat tatccaaagg ttacaaaac atactttgag 360
aaggttgaaa gattaaaaca tggaaccttc ggtcccgttc atttccgaaa ccaggttaaa 420

```

ES 2 668 018 T3

```

atagccgcc gagttgatat aaatcctggc catgcagatc tcagtgctaa agaagcacia 480
gatgtcatca tggaggctcg tttcccaaat gaagtgggag ctagaatatt gacatcagag 540
tcgcaattga caataacgaa agagaagaaa gaagagctcc aagattgtaa gattgctccc 600
ttaatggttg caticatggt ggaaagggaa ctggtccgca aaaccagatt cctaccggtg 660
gcaggcggaa caagtagtgt gtacattgag gtattgcatt tgactcaagg gacctgctgg 720
gaacagatgt acactccagg cggagaagtg agaaatgacg atgttgacca gagtttgatc 780
attgctgcca gaacatttgt taggagagca acagtatcag cggatccact ggcatactg 840
ctggagatgt gtcacagcac acaaattggt gggataagga tgggtggacat ccttaggcaa 900
aatccaactg aggaacaagc tgtggatata tgcaaagcag caatgggtct taggatcagt 960
tcttccttta gctttggagg cttcactttc aaaagaacaa gtggatcatc cgtcaagaag 1020
gaagaggaag tgcttacagg caacctcaa acattgaaaa taagagtaca tgagggtgat 1080
gaggaaattca caatggttgg gcggagggca acagctatcc tgaggaaagc aactagaagg 1140
ctgatccagt tgatagtaag tggaaagagc caacaatcaa tcgctgaggc aatcattgta 1200
gcaatggtgt tctcacagga ggattgcatg ataaaggcag tccgaggcga tctgaatttc 1260
gtaaacagag caaaccaaag attaaacccc atgcatcaac tcttgagaca ttttcaaaag 1320
gacgcaaaaag tgctatttca gaattgggga attgaacca ttgataatgt catggggatg 1380
atcggaatat tacctgacat gactcccagc acagaaatgt cactgagagg agtaagagtt 1440
agtaaaatgg gagtggatga atattccagc actgagagag tagttgtaag tattgaccgt 1500
ttcttaaggg ttcgagatca gcgggggaaac gtactcttat ctcccgaaga ggtcagcgaa 1560
accaggggaa cagagaaatt gacaataaca tattcatcat caatgatgtg ggaaatcaac 1620
ggtcctgagt cagtgtctgt taacacctat cagtggatca tcagaaactg ggagactgtg 1680
aagattcaat ggtctcaagg ccccacgatg ctgtacaata agatggagtt tgaaccgitt 1740
caatccttgg taccacaaag tgccagaggt caatacagtg gatttgtgag aacattattc 1800
cagcaaatgc gtgacgtact ggggacattt gatactgtcc agataataaa gctgtacca 1860
tttgacagcag ccccaccgaa gcagagcaga atgcagtttt cttctctaac tgtgaatgtg 1920
agaggctcag gaatgagaat actcgtaaagg ggcaattccc ctggtttcaa ctacaataag 1980
gcaacccaaa ggcttaccgt ccttgaaag gacgcaggtg cattaacaga ggatccggat 2040
gaaggagcag ccggagtgga gtctgcagta ctgaggggat tcttaatttt aggcaaggag 2100
gacaaaaggt atggaccagc attgagcatc aatgaactga gcaatcttgc gaagggggag 2160
aaaagctaatt tgcctagagc gcaaggagac gttggttgg taatgaaacg aaaacgggac 2220
tctagcatac ttactgacag ccagacagcg accaaaagaa ttcggatggc catcaattag 2280

```

<210> 9
 <211> 1409
 5 <212> ADN
 <213> Virus de la Gripe A

<220>
 <223> gen de la neuraminidasa del virus A de la gripe (A/WSN/1933(H1N1))

10 <400> 9

```

agcgaagca ggaagtttaa tgaatccaaa ccagaaaata ataaccattg ggtcaatctg 60
tatgtagtgc ggaataatta gcctaataat gcaaatagga aatataatct caatatggat 120
tagccattca attcaaacgg gaaatcaaaa ccatactgga atatgcaacc aaggcagcat 180
tacctataaa gttggtgctg ggcaggactc aacttcagtg atattaaccg gcaattcatc 240
tctttgtccc atccgtgggt gggctataca cagcaaaagc aatggcataa gaattgggtc 300
caaaggagac gttttgtgca taagagagcc tttatttca tgttctcact tggaaatgca 360
gaccttttt ctgactcaag gcgccttact gaatgacaag cattcaaggg ggacctttaa 420
ggacagaagc cttataggg cttaatgag ctgcccgtgc ggtgaagctc cgtcccgta 480
caattcaagg tttgaatcgg ttgcttggtc agcaagtgca tgtcatgatg gaatgggctg 540
gctaacaatc ggaatctctg gtccagatga tggagcagtg gctgtattaa aatacaacgg 600
cataataact gaaccataa aaagttggag gaagaatata ttgagaacac aagagtctga 660
atgtacctgt gtaaatggtt catgttttac cataatgacc gatggcccaa gtgatgggct 720
ggcctcgtac aaaattttca agatcgagaa ggggaagggt actaaatcaa tagagttgaa 780
tgcacctaat tctcactacg aggaatgttc ctgttaccct gataccggca aagtgatgtg 840
tgtgtgcaga gacaattggc acggttcgaa ccgaccatgg gtgtccctcg accaaaacct 900
agattataaa ataggataca tctgcagtgg ggtttcgggt gacaacccgc gtcccaaaga 960
tggaaacaggc agctgtggcc cagtgtctgc tgatggagca aacggagtaa agggattttc 1020
atataagtat ggcaatgggt tttggatagv aaggactaaa agtgacagtt ccagacatgg 1080
gtttgagatg atttgggatc ctaatggatg gacagagact gatagtaggt tctctatgag 1140
acaagatggt gtggcaatga ctgatcggtc agggtaacagc ggaagtctcg ttcaacatcc 1200
tgagctaaca gggctagact gtatgagggc ttgcttctg gttgaattaa tcagggggct 1260
acctgaggag gacgcaatct ggactagtg gacatcatt tctttttgtg gtgtgaatgg 1320
tgatactgta gattggtcct ggccagacgg tgcgtgagttg ccgttcacca ttgacaagta 1380
gtttgttcaa aaaactcctt gtttctact

```

<210> 10
 15 <211> 15186
 <212> ADN
 <213> virus de la enfermedad de Newcastle

<220>
 20 <223> genoma de B1 del virus de la enfermedad de Newcastle

ES 2 668 018 T3

<400> 10

accaaacaga gaatcgggta gttacgataa aaggcgaagg agcaattgaa gtcgcacggg 60
 tagaaggtgt gaatctcgag tgcgagcccg aagcacaaac tcgaggaagc cttctgcca 120
 catgtcttcc gtattcgacg agtacgaaca gctcctcgcg gctcagactc gcccgaatgg 180
 agtcatgga gggggggaga aagggagtag cttaaaagta gactgcccgg tattcactct 240
 taacagtgat gacccagaag ataggtggag ctttgggta ttctgcctcc ggattgctgt 300
 tagcgaagat gccacaacac cactcaggca aggtgctctc atatctcttt tatgctccca 360
 ctacaggta atgaggaacc atgttgcctc tgcagggaaa cagaatgaag ccacattggc 420
 cgtgcttgag attgatggct ttgccaacgg caccgcccag tccaacaata ggagtggagt 480
 gtctgaagag agagcacaga gatttgcgat gatagcagga tctctccctc gggcatgcag 540
 caacggcacc cgttctgtca cagccggggc tgaagatgat gcaccagaag acatcaccga 600
 taccttggag aggatcctct ctatccaggc tcaagtatgg gtcacagtag caaaagccat 660
 gactgctgat gagactgcag atgagtcgga aacaagggca atcaataagt atatgcagca 720
 aggcagggtc cttactgcga acatcctcta ccccgatgc gggagcacia tccaactcac 780
 gatcagacag tctcttgcag tccgcatctt tttggttagc gagctcaaga gaggccgcaa 840
 cacggcaggt ggtacctcta cttattataa cctagtaggg gactgtagact catatatcag 900
 gaataccggg cttactgcga tcttcttgac actcaagtac ggaatcaaca ccaagacatc 960
 agcccttgca cttagtagcc tctcaggcga catccagaag atgaagcagc tcatgctgtt 1020
 gtatcggatg aaaggagata atgcacaact ttactccttt gccatgggta tggcatcagt 1080
 gagctttgag cctgcccaggt atgcacaatt tgccaaggac tttatgagca catcattctg 1140
 cctagataaa ggtactggga ctcaggctca ggaagtagc attaacgagg atatggctgc 1200
 gagacttgga gtagagtacg cagcaaggag gggcctggca gctgctgccc aacgagtctc 1260
 cgagctaaag agcagcatag acatgctctac tcaacaagtc gtagtctctca ctgggcttag 1320
 cgaggtgacc tcccaagccc tacaaggcgg atcgaataga tgcgaagggc aaccagaagc 1380
 cgagggggga gagaccatc tctgacaggg gcactcccca atcggggctc cccagcctgc 1440
 cggggatggg gatccccaat tcctggatct atcggggctc cctcgatttg cggctctata 1500
 ggcgccaaac ctgacacagg gacaccgact gtagtgcacc ttctctcctt tacaactccg 1560
 ccaagataac gacaccgact gctctcacc ccatccccctc ccccctgctg tacaactccg 1620
 acatcccaat gctctcacc cacaatgctg ctcactaaca atcaaaacag agccgagggg 1680
 ctcaaacaaa catccccctc cacaatgctg gaagagggat attcagagat cggggcaagt 1740
 gcaacagagg cacaatgctg gaagagggat atagaccagg acaaacatgg ccaactttac 1800
 agtacgggta atagaccagg aagtggaaact gtcattgaca acataattac agccagggtt 1860
 cctctacctg aagtggaaact aaggagtgc atccccaca gcaagaccaa ggtgctgagc 1920
 tatttgagac aaggagtgc atccccaca cccaggcca cgaccccga tgacagcccg 1980
 agactgttgg aaggagtgc atccccaca cccaggcca cgaccccga tgacagcccg 2040
 agaagcatgg aaggagtgc atccccaca cccaggcca cgaccccga tgacagcccg 2100
 ctgacaaaca accatccaca cccaggcca cgaccccga tgacagcccg 2160
 ccgctgacca gccccccacc caggccacag acgaagccgt cgacacacag 2220
 gagcaagcaa ctctctgctg ctctatgctg acaagctcag caataaatcg tccaatgcta 2280
 aaaaggggcc atggtcagtc ccccaagagg ggaatcacca acgtccgact caacagcagg 2340
 ggagtcaacc cagtcgcgga aacagtcagg aaagaccgca gaaccaagtc aaggccgccc 2400
 ctggaacca gggcacagac gtgaacacag catatcatgg acaatgggag gagtcacaac 2460
 tatcagctgg tgaaccccct catggtctcc gatcaaagca gagccaaaacc aataaccctg 2520
 tttctgcgga tcatctccac ccactgttag actttgtgca agcgatgatg tctattatgg 2580
 aggggatttc ccaaagagta agtaaggttg cctatcaggt agatcttgtt tttaaacaga 2640
 catctctcct cctatgtagt gggctccgaaa tccaacagct gaaaacattt gttgcagtca 2700
 tggaaagcaa cttgggaaat atgaagattt tggatcccgg ttgtgccaac atttcatctt 2760
 tgagtgtact acgggcagtt gcccgatctc acccggtttt agtttcaggc cctggagacc 2820
 catctcccta tgtgatacaa ggaggcgaaa tggcacttaa taaactttcg caaccagtgc 2880
 cacatccatc tgaattgatt aaaccgcgca ctgcatgctg gcctgatata ggagtggaga 2940
 gggcactgt cctgtcattg atcatgtcac gcccaatgca cccgagttct tcagccaagc 3000
 tcctaagcaa gttgatgta cccgggtcga tgcaggaaat caggaaaatc aagcgccttg 3060
 ctctaaatgg ctaattacta ctcaccacag tagcgggtcc ctgtccactc ggcacacac 3120
 ggaatctgca ccgagtcccc ccccgagac ccaaggtcca acttccaag ggcgaatcct 3180
 ctctcgcttc ctacagcccc ctgaatgatc gcgcaaccgc aattaatcta gctacattaa 3240
 ggattaagaa aaaatagcgg tagaattgga gtgcccctaa tgtgccaaga tggactcatc 3300
 taggacaatt gggctgtact ttgattctgc ccattcttct agcaacctgt tagcatttcc 3360
 gatcgtccta caagacacag gagatgggaa gaagcaaatc gccccgcaat ataggatcca 3420
 ggccttgac ttgtggactg atagtaagga agactcagta ttcacacca cctatggatt 3480
 catctttcaa gttgggaatg aagaagccac tgtcggcatt atcgatgata aaccgaagcg 3540
 cgagttactt tccgctgcca tccctctgct aggaagcgtc ccaaataccg gagaccttat 3600
 tgagctggca agggcctgtc tcaatgatg ggtcacatgc aagaagagtg caactaatac 3660
 tgagagaatg gttttctcag tagtgcaggc accccaagt ctgcaagct gtagggtgtg 3720
 ggcaaacaaa tactatcag tgaatgcagt caagcacgtg aaagcgcagc agaagatccc 3780
 cgggagtgga accctagaat acaaggtgaa ctttgtctcc ttagctgtgg taccgaagaa 3840
 ggatgtctac aagatcccag ctgcagtatt gaagatttct ggctcgagtc tgtacaatct 3900
 tgcctcaat gtcactatta atgtggaggt agacccgagg agtcccttgg ttaaatctct 3960
 gctaaagtct gacagcggat aciatgctaa cctctcttgg catattggac ttatgaccac 4020
 cgtagatagg aaggggaaga aagtgcatt tgacaagctg gaaaagaaaa taaggagcct 4080
 tgatctatct gtcgggtcca gtgatgtgct cgggccttcc gtgttggtaa aagcaagagg 4140
 tgcacggact aagcttttgg cactttctt ctctagcag gggacagcct gctatcccat 4200
 agcaaatgct tcctctcagg tggccaagtt actctggagt caaacgcgt gcctgcggag 4260
 cgtaaaatc attatccaag caggtacca acgcgctgtc gcagtgaccg ctgaccaga 4320
 ggttacctct actaagctgg agaaggggca cacccttgc aaatacaatc cttttaagaa 4380
 ataagctgct tctgtagatg tgcyctcgc ccactcacc agatcatcat gacacaaaa 4440
 actaatctgt cttgatattt tacagttagt ttacctgtcc atcaagttag aaaaaacacg 4500
 ggtagaagac tctggatccc ggttggcgc ctcagggtgc aggatgggct ccagacctt 4560

taccaagaac	ccagcaccta	tgatgctgac	tatccgggtc	gcgctggtat	tgagttgcat	4620
ctgtccggca	aactccattg	atggcaggcc	ttttgcaact	gcaggaattg	tggttacagg	4680
agacaaagca	gtcaacatat	acacctcatc	ccagacagga	tcaatcatag	ttaagctcct	4740
cccgaatctg	cccaaggata	aggaggcatg	tgcgaaaagcc	cccttgatg	catacaacag	4800
gacattgacc	actttgctca	cccccttgg	tgactctatc	cgtaggatag	aagagtctgt	4860
gactacatct	ggagggggga	gacaggggcg	ccttataggc	gccattattg	gagggtgtgg	4920
tcttgggggt	gcaactgccc	cacaaataac	agcggccgca	gctctgatac	aagccaaaca	4980
aatgctgccc	aacatcctcc	gacttaaaga	gagcattgcc	gcaaccaatg	aggctgtgca	5040
tgaggctact	gacggattat	cccaactagc	agtggcagtt	gggaagatgc	agcagtttgt	5100
taatgaccaa	tttaataaaa	cagctcagga	attagactgc	ataaaaatg	cacagcaagt	5160
tggtgtagag	ctcaacctgt	acctaaccga	attgactaca	gtattcggac	cacaaatcac	5220
ttcacctgcc	ttaaacaagc	tgactattca	ggcactttac	aatctagctg	gtgggaatat	5280
ggattactta	ttgactaagt	taggtatagg	gaacaatcaa	ctcagctcat	taatcggtag	5340
cggttaatc	accggttaacc	ctattctata	cgactcacag	actcaactct	tggtataca	5400
ggtaactcta	ccctcagtcg	ggaacctaaa	taatatgctg	gccacctact	tggaacctt	5460
atccggtaat	acaactgccc	gatttgcctc	ggcacttctc	ccaaaagtgg	tgacacaggt	5520
cggttctgtg	atagaagaac	ttgacacctc	atactgtata	gaaactgact	tagatttata	5580
ttgtacaaga	atagtaacct	tccttatgct	ccctggtatt	tactcctgct	tgagcggcaa	5640
tacatcgccc	tgatgtact	caaagaccga	aggcgcactt	actacaccat	atagactat	5700
caaaggctca	gtcatcgcta	actgcaagat	gacaacatgt	agatgtgtaa	acccccggg	5760
tatcatatcg	caaaaactatg	gagaagccgt	gtctctataa	gataaacaat	catgcaatgt	5820
tttatcctta	ggcgggataa	ctttaaggct	cagtggggaa	ttcgatgtaa	cttatcagaa	5880
gaatatctca	atacaagatt	ctcaagtaat	aataacaggc	aatcttgata	tctcaactga	5940
gcttgggaat	gtcaacaact	cgatcagtaa	tgctttgaa	aagtttagagg	aaagcaacag	6000
aaaactagac	aaagtcaatg	tcaaactgac	cagcacatct	gctctcatta	cctatatcgt	6060
tttgactatc	atatctcttg	tttttgggat	acttagcctg	attctagcat	gctacctaat	6120
gtacaagcaa	aaggcgcaac	aaaagacctt	attatggctt	gggaataata	ccctagatca	6180
gatgagagcc	actcaaaaaa	tgatgaacaca	gatgaggaac	gaaggtttcc	ctaatagtaa	6240
tttgtgtgaa	agttctggta	gtctgtcagt	tcggagagtt	aagaaaaaac	taccggttg	6300
agatgaccaa	aggacgatat	acgggtagaa	cggttagaga	ggcggcccct	caattgagag	6360
ccagacttca	caacctccgt	tctaccgctt	caccgacaac	agtcctcaat	catggaccgc	6420
gcccgttagc	aagttgcggt	agagaatgat	gaaagagagg	caaaaaatc	atggcgcttg	6480
atattccgga	ttgcaatctt	attcttaaca	gtagtgcact	tggtctatct	tgtagcctcc	6540
cttttatata	gcatgggggc	tagcacacct	agcgatcttg	taggcatacc	gactaggatt	6600
tccagggcag	aagaaaagat	tacatctaca	cttggttcca	atcaagatgt	agtagatag	6660
atataaagc	aagtggccct	tgagtctcca	ttggcattgt	taataactga	gaccacaatt	6720
atgaacgcaa	taacatctct	ctcttatcag	attaatggag	ctgcaaacaa	cagcgggttg	6780
ggggcaccta	ttcatgacc	agattatata	ggggggatag	gcaaaqaact	catgtagat	6840
gatgctagtg	atgtcacatc	attctatccc	tctgcatttc	aagaacatct	gaattttatc	6900
ccggcgccca	ctacaggatc	aggttgcact	cgaataccct	catttgacat	gagtgctacc	6960
cattactgct	acaccataaa	tgtaafattg	tctggatgca	gagatcactc	acactcatat	7020
cagtatttag	cacttgggtg	gctccggaca	tctgcaacag	ggaggggtat	cttttctact	7080
ctcggttcca	tcaacctgga	cgacacccaa	aatcggaggt	cttgagtggt	gagtgcaact	7140
cccctggggt	gtgatatgct	gtgctcgaaa	gccacggaga	cagaggaaga	agattataac	7200
tcagctgtcc	ctacgaggat	ggtagatggg	aggttagggt	tcgacggcca	atatcacgaa	7260
aaggacctag	atgtcacaac	attatctcgg	gactgggtgg	ccaactacc	aggagtaggg	7320
gggtgactct	ttatgacag	cccgctatgg	ttctcagtct	acggagggtt	aaaacccaat	7380
tcacccagtg	acactgtaca	ggaagggaaa	tatgtgatat	acaagcgata	caatgacaca	7440
ttcccagatg	agcaagacta	ccagatctga	atggccaagt	cttcgtataa	gctcggacgg	7500
tttgggtgga	agcgcataca	ccaggtctac	ttatctatca	aagtgtcaac	atccttaggc	7560
gaagaccctg	tactgactgt	accgccaac	acagtcacac	tcaggggggc	cgaaggcaga	7620
attctcacag	tagggacatc	ccatttcttg	tatcagcgag	ggatcatata	cttctctccc	7680
gcgttattat	atcctatgac	agtcagcaac	aaaacagcca	ctcttcatag	tccttataca	7740
ttcaatgctc	tcactcggcc	aggtagtatc	ccttgccagg	cttcagcaag	atgccccaac	7800
tcgtgtgtta	ctggagtcta	tacagatcca	tatcccctaa	tcttctatag	aaaccacacc	7860
ttgcgagggg	tattcgggac	aatgcttgat	ggatgaacaag	caagacttaa	ccctgcgtct	7920
gcagtattcg	atagcacatc	ccgcagtcgc	ataactcgag	tgagttcaag	cagcatcaaa	7980
gcagcataca	caacatcaac	ttgttttaaa	gtggctcaaga	ccaataagac	ctattgtctc	8040
agcattgctg	aaatatctaa	tactctcttc	ggagaattca	gaatcgtccc	gttactagtt	8100
gagatcctca	aagatgacgg	ggttagagaa	gccaggtctg	gctagttgag	tcaactatga	8160
aagagttgga	aagatggcat	tgatcacctt	atcttctcgg	acatcaagaa	tcaaacgcaa	8220
tgccggcgcg	tgctcgaatt	ccatgtcggc	agttgaccac	aatcagccag	tgctcatgcg	8280
atcagattaa	gccttgctaa	tagtctcttg	attaagaaaa	aatgtaagtg	gcaatgagat	8340
acaaggcaaa	acagctcatg	gtaaataata	cgggtaggac	atggcgagct	ccggtcctga	8400
aagggcagag	catcagatta	tcctaccaga	gtcacacctg	tcttccaccat	tggtcaagca	8460
caaactactc	tattattgga	aattaactgg	gctaccgctt	ctgatgaa	gtgacttcca	8520
ccactcattt	ctcagccgac	aatggaaaaa	aataacttga	tcggcctctc	ctgatactga	8580
gagaatgata	aaactcggaa	gggcagtaca	ccaaactctt	aaccacaatt	ccagaataac	8640
cggagtactc	caccctcagg	gtttagaaga	actggctaat	attgaggtcc	ctgattcaac	8700
caacaatttt	cggaagattg	agaagaagat	ccaaattcac	aacacgagat	atggagaact	8760
gttcacaagg	ctgtgtacgc	atatagagaa	gaaactgctg	gggtcatctt	ggtcctaaca	8820
tgcccccgcc	tcagaggagt	tcagcagcat	tcgtacggat	ccggcattct	ggtttctact	8880
aaaatggctc	acagccaagt	ttgcatggct	ccatataaaa	cagatccaga	ggcatctgat	8940
tggtggcagc	aggcaacggt	ctgcggccaa	caaattgggt	atgctaacc	ataaggtagg	9000
ccaagtcttt	gactctctct	aacttgttgt	tgtagcgcct	acgaatgaga	acaagttcac	9060
atgtcttacc	caggaacttg	tattgatgta	tgtagatag	atggagggca	gagataggt	9120

ES 2 668 018 T3

caacataata tcaaccacgg cgggtgatct cagaagctta tcagagaaaa ttgatgacat 9180
 tttgcggtta atagacgctc tggcaaaaga ctigggtaat caagtcacag atgttgatc 9240
 actaatggag ggatttgcat acgggagctgt ccagctactc gagccgctag gtacatttg 9300
 gggagatttc ttcgattca acctgcagga gcttaagac attctaattg gcctcctcc 9360
 caatgatata gcagaatccg tgactcatgc aatcgctact gtattctctg gtttagaaca 9420
 gaatcaagca gctgagatgt tgtgcctggt cggctctggt ggtcaccac tgcttgatc 9480
 ccgtattgca gcaaaaggcag tcaggagcca aatgtgcgca ccgaaaatgg tagactttga 9540
 tafgatcctt caggtactgt ctttctcaaa gggaacaatc atcaacggat acagaaagaa 9600
 gaatgcaggt gtgtggccgc gagtcaaagt ggatacaata tatgggaagg tcattgggca 9660
 actacatgca gattcagcag agatttcaca cgatatcatg ttgagagagt ataagagttt 9720
 atctgcactt gaatttgagc catgtataga atacgacct gtcactaac tgagcatgtt 9780
 cctaaaagac aaggcaatcg cacaccccaa cgataattgg cttgcctcgt ttaggcggaa 9840
 ccctctctc gaagaccaga aaaggaagcg acttcgacta accgcctctt 9900
 gatagagttt ttagagtcaa atgattttga tccatataaa gagatggaat atctgacgac 9960
 ccttgagtag cttagagatg acaatgtggc agtatcatic tcgctcaaaq agaaggaagt 10020
 gaaaagtta tgcacggatc tcgctaagct gacaaaagaag ttaaggaact gtcagggtat 10080
 ggcggaaggg atcctagccg atcagattgc acctttcttt cagggaaatg gagtcattca 10140
 ggatagcata tccttgacca agagtatgct agcgtatgag caactgtcct ttaacagcaa 10200
 taagaacagt atcactgag gtaaagaag agtatcttca aaccgcaat atgtaccgaa 10260
 aagcaagaac cgtcggagag ttgcaacctt catacaact gacctgcaa agtactgtct 10320
 taattggaga tatcagacga tcaaatgttt cgctcatgcc atcaatcagt tgatgggct 10380
 acctcattc ttcagtgaga ttcactaag actgatggac actacgatg tcgtaggaga 10440
 ccctttcaat cctcaagtg accctactga ctgtgacct tcaagagtc ctaatgatga 10500
 catatataat gtcagtgcga gagggggtat cgaaggatta tgccagaagc tatggacaat 10560
 gatctcaatt gctgcaacc aactgtctgc agctagatcg cattgtcgtg ttgctgtat 10620
 ggtacaggg gataatcaag taatagcag aacgagagag gtaagatcag atgactctcc 10680
 ggagatgggt ttgacacag tgcatacagc cagtgataat tcttcaagg aatlaatca 10740
 tgcataatc ttgattggcc ataattgaa ggatcgtgaa accatcaggt cacacacatt 10800
 cttcatatac agcaaacgaa tcttcaaaga tggagcaatc ctcagtcaag tctcaaaaa 10860
 ttcacttaaa ttagtgttag tgtcaggtga tctcagtgaa aacaccgtaa tgcctctgtc 10920
 caacattgcc tctactgtag cacggctatg cgagaacggg cttcccaag acttctgtta 10980
 ctatttaaac tatataatga gttgtgtgca gacatacttt gactctgagt tctccatcac 11040
 caacaattcg caccctgatc ttaatcagtc gtggattgag gacatctctt ttgtgcactc 11100
 atagtctct actcctgccc aattaggggg actgagtaac cttcaatact caaggctcta 11160
 cactagaat atcggtgacc cggggactac tgcctttgca gagatcaagc gactagaagc 11220
 agtgggacta ctgagtccta acattatgac taatatctta actaggccgc ctgggaatgg 11280
 agattgggccc agtctgtgca acgaccata ctctttcaat ttgagactg tlgcaagccc 11340
 aaatattggt cttaaagaac atacgcaaaq agtccatttt gaaactgtt caaatccctt 11400
 attgtctgga gtgcacacag aggataatga ggcagaagag aaggcattgg ctgaattctt 11460
 gcttaatcaa gaggtgattc atccccgctg tggcctatcc atcatggagg caagctctgt 11520
 aggtaggaga aagcaaatc aaggcctgtg tgacacaaca aacactgtaa ttaagattgc 11580
 gctactaggt aggcattag gcatcaagag gctgatgagg atagtcaatt attctagcat 11640
 gcatgcaat ctgtttagag acgatgtttt ttctctagt agatccaacc accccttagt 11700
 ctcttcaat atgtgtctc tgacactggc agactatgca cggaatagaa gctggtcacc 11760
 tttgacggga ggcaggaaaa tactgggtgt atctaactc gatacgatag aactcgtaga 11820
 gggtagatt cttagtgtaa gcggaaggtg tacaagatgt gacagcggag atgaacaatt 11880
 tacttggttc catcttcaa attgaccgat gacaccagca agacaccctcc 11940
 gatgagggta ccatatctcg ggtcaagac acaggagagg agagctgcct cacttgcgaa 12000
 aatagctcat atgtcgccc atgtgaaggg tgccctaagg gcatcatccg tgttgatctg 12060
 ggttatggg gataatgaa taaattggac tgctgtctc acgattgcaa aatctcgtg 12120
 taatgtaaac tttagatc ttcggttact gtcccctta cccacggctg ggaatctca 12180
 acatagacta gatgatggt taactcagat gacattcacc cctgcctc tctacaggtg 12240
 tcacctaca ttcacatc acaatgattc caaaggctgt tcaactgaaga aggagtcaaa 12300
 gaggggaatg tggttacca acagagctat gctcttgggt ttatctctaa tcgaatcgat 12360
 ctttccaatg acaacaacca gaacatatga ctcttgggt ctgcacctac atagtaaatt 12420
 tagttgctg atcagggaa gctctgttc ggttctttc gagctacttg gggiggcacc 12480
 ggaactgagg acagtgacct caaataagtt tatgtatgat cctagccctg tatcggaggg 12540
 agactttgc agacttgact tagctatctt caagagttat gagcttaatc tggagtcata 12600
 tcccacgata gagctaatga acattctttc aatatccagc gggaaagtta ttggccagtc 12660
 tgtggtttc tatgatgaag atacctccat aaagaatgat gccataatag tgtatgaca 12720
 taccgaaat tggatcaggt aagctcagaa ttcagatgtg gtcgccctat ttgaatatgc 12780
 agcaatatt gtcctctc agcttctt ccaactctat facctgagag taagaggcct 12840
 caacattt gcttatata tgggtgatt atacaagaat atgccaggaa tttactctt 12900
 caacattt gctacaat gctacatctc cattcattca aggttacatg cagtgggcct 12960
 ggtcaacct gacggatcac accaactg agatacggat tttatcgaaa tgtctgcaa 13020
 actgtagta tctgacccc ctcagtgat ctccggctta tattcaggaa ataagtatga 13080
 tctgctgtt ccatctgtct tagatgataa cctgaatgag aagatgctc agctgatac 13140
 ccggttatg tctgtgaca cggtaactct tgctacaaca agagaaatcc cgaaaataag 13200
 agcttaact gcagaagaga actcactgag atctactgt tatttactgt cggatgctgt 13260
 gaaaccatta cttagcccc atcaagtgag ctctatcatg tctcctaaca taattacatt 13320
 cccagctaat ctgtactaca tgtctcgaa gaccctcaat ttgatcaggg aaagggagga 13380
 cagggact atcctggcgt gttgttccc ccaagagcca ttattagagt tccctctgt 13440
 gcaagatatt ggtgctcgag tgaaagatcc attcaccca caacctgagg catttttgc 13500
 agagttagt ttgagtgtc cagcaaggtg tgacgattc acacttagtc agattcatcc 13560
 tgaactcaca tctcacaatc cggaggaaga ctacttagta cgatactgt tcagaggat 13620
 agggactgca tcttctctt ggtataaggg atccccctc cttctgtac ccgaggtgaa 13680

ES 2 668 018 T3

```

atgtgcaaga cacgggaact cttataactt ggctgaagga agcggagcca tcatgagtct 13740
tcitgaaactg catgtaccac atgaaactat ctattacaat acgctctttt caaatgagat 13800
gaaccccccg caacgacatt tcggggccgac cccaactcag tttttgaatt cggttgttta 13860
taggaatcta caggcggagg taacatgcaa ggatggattt gtccaagagt tccgtccatt 13920
atggagagaa aatacagagg aaagtgacct gacctcagat aaagcagtgg ggtatattac 13980
atctgcagta ccctacagat ctgtatcatt gctgcattgt gacattgaaa ttcctccagg 14040
gtccaatcaa agcttactag atcaactagc tatcaattta tctctgattg ccatgcattc 14100
tgtaagggag ggcggggtag taatcatcaa agtgttggat gcaatgggat actactttca 14160
tctactcatg aacttgtttg ctccgtgttc cacaaaagga tatattctct ctaatggtta 14220
tgcatgtcga ggggatatgg agtgttacct ggtatttgtc atgggttacc tgggcgggccc 14280
tacatttcta catgaggtgg tgaggatggc aaaaactctg gtgcagcggc acggtacgct 14340
cttgtctaaa tcagatgaga tcacactgac caggttattc acctcacagc ggcagcgtgt 14400
gacagacatc ctatccagtc ctttaccagc attaataaag tacttgagga agaattttga 14460
cactgcgctg attgaagccg ggggacagcc cgtccgtcca ttttgtgcgg aaagtttggg 14520
gagcacgcta cgaacataa ctcagataac ccagattatc gctagtcaaa ttgacacagt 14580
catccggtct gtgatataa tggaagctga gggatgatct gctgacacag tatttctatt 14640
taccctttac aatctctcta ctgacgggaa aaagaggaca tcacttaaac agtgcacgag 14700
acagatccta gaggttaca tactaggctc tagagtcgaa aatctcaata aaataggcga 14760
tataatcagc ctagtgctta aaggcatgat ctccatggag gaccttatcc cactaaggac 14820
atacttgaag catagtacct gccctaataa ttgaaaggct gtcctaggta ttaccaaact 14880
caaagaaatg tttacagaca cttctgtact gtacttgact cgtgctcaac aaaaattcta 14940
catgaaaact ataggcaatg cagtcaaagg atattacagt aactgtgact cctaacgaaa 15000
atcacatatt aataggctcc ttttttggcc aattgtattc ttgttgattt aattatatta 15060
tgttagaaaa aagttgaact ctgactcctt aggactcga ttcgaactca aataaatgtc 15120
tttaaaaag gttgcgaca attattcttg agtgtagtct cgtcattcac caaatctttg 15180
tttggg

```

<210> 11
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia consenso basada en cepas aviarias benignas de gripe A H5 en la región inmediatamente anterior al sitio de corte de HA

<400> 11
 Gln Arg Glu Arg Arg Lys Lys Arg Gly
 1 5 10

15 <210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> secuencia consenso alterada basada en cepas aviarias benignas de gripe A H5 en la región inmediatamente anterior al sitio de corte de HA

<400> 12
 Gln Arg Glu Thr Arg Gly
 1 5

25 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia consenso basada en cepas aviarias benignas de gripe A H5 en la región inmediatamente anterior al sitio de corte de HA

35 <400> 13
 cct caa aga gag aga aga aaa aag aga gga 33
 Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly
 1 5 10

40 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 668 018 T3

<220>
 <223> secuencia consenso basada en cepas aviarias benignas de gripe A H5 en la región inmediatamente anterior al sitio de corte de HA

5

<400> 14
 Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly
 1 5 10

<210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> secuencia consenso alterada basada en cepas aviarias benignas de gripe A H5 en la región inmediatamente anterior al sitio de corte de HA

<400> 15
 cct caa aga gag acg aga gga 21
 Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly
 1 5

20

<210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> secuencia consenso basada en cepas aviarias benignas de gripe A H5 en la región inmediatamente anterior al sitio de corte de HA

30

<400> 16
 Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly
 1 5

<210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> secuencia consenso de ADN alterada adicionalmente basada en cepas aviarias benignas de gripe A H5 en la región inmediatamente anterior al sitio de corte de HA

40

<400> 17
 cctcagcggg agacgcgggg a 21

45

<210> 18
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> secuencia "fin de gen" modificada en los genes que se insertaron en el NDV como unidades extratranscripcionales

<400> 18
 ttagaaaaa 10

55

<210> 19
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>

ES 2 668 018 T3

<223> secuencia "comienzo de gen" modificada en los genes que se insertaron en el NDV como unidades extratranscripcionales

5 <400> 19
acgggtagaa 10

<210> 20
<211> 74
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador PCR usado para producir el ectodominio (ECTO) del gen H5 HA

15 <400> 20
cggctagctt agaaaaaata cggtagaagt gaaactagtc cgccaccatg gaaagaatag 60
tgattgcctt tgca 74

<210> 21
<211> 33
20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador PCR usado para producir el ectodominio (ECTO) del gen H5 HA

25 <400> 21
cggtaacct gataagcccc cattgattct aat 33

<210> 22
30 <211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> cebador PCR usado para amplificar TM y CT del gen NDV F

<400> 22
cggtaacct cattacctat atcgtttga ct 32

40 <210> 23
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> cebador PCR usado para amplificar TM y CT del gen NDV F

<400> 23
50 cggagctcaa gctagcttat cacattttg tagtggctct catctg 46

<210> 24
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> cebador directo F2aa-1(+) usado para generar rNDV/F2aa

<400> 24
60 ggatcccggt tggcgcctc cagg 24

<210> 25
<211> 38
<212> ADN
65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador inverso F2aa-1(-) usado para generar rNDV/F2aa

5 <400> 25
 aaggcgctc tgtctccgcc ctccagatgt agtcacag 38

<210> 26
 <211> 37
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador directo F2aa-2(+) usado para generar rNDV/F2aa

15 <400> 26
 ggcggagaca gaggcgctt ataggcgcca ttattgg 37

<210> 27
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador inverso F2aa-2(-) usado para generar rNDV/F2aa

25 <400> 27
 ccatattccc accagctaga ttgt 24

<210> 28
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador directo F3aa-1(+) usado para generar rNDV/F3aa

35 <400> 28
 ggatcccggg tggcgccctc cagg 24

40 <210> 29
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> cebador inverso F3aa-1(-) usado para generar rNDV/F3aa

50 <400> 29
 aaagcgctc tgtctccgcc ctccagatgt agtcacag 38

<210> 30
 <211> 37
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador directo F3aa-2(+) usado para generar rNDV/F3aa

60 <400> 30
 ggcggagaca gaggcgctt ataggcgcca ttattgg 37

<210> 31
 <211> 24
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 668 018 T3

<220>
<223> cebador inverso F3aa-2(-) usado para generar rNDV/F3aa

5 <400> 31
ccatattccc accagctaga ttgt 24

<210> 32
<211> 32
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador HpaNDV F(TM+CYTO)P usado para generar el gen H7HA quimérico

15 <400> 32
cgggtaacct cattacctat atcgtttga ct 32

<210> 33
<211> 46
20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> cebador SacNheNDVF(TM+CYTO)M usado para generar el gen H7HA quimérico

<400> 33
cggagctcaa gctagcttat cacattttg tagtggctct catctg 46

30 <210> 34
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> cebador SpeH7(ECTO)P usado para generar el gen H7HA quimérico

<400> 34
40 cgactagtcc gccaccatga aactcaaat tctggcattc at 42

<210> 35
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> cebador HpaH7(ECTO)M usado para generar el gen H7HA quimérico

<400> 35
50 cgggtaacgt cttgtatcc actactcaat ttac 35

<210> 36
<211> 52
<212> ADN
55 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H7HA partical con GE/GS y secuencia Kozak

60 <400> 36
gctagcttag aaaaaatagc ggtagaacac tagtccgcca ccatggtcag ct 52

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus quimérico de la enfermedad de Newcastle (NDV), que comprende un genoma empaquetado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión F que tiene los dominios transmembrana y citoplásmico de una proteína F y al menos un epítipo de un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso o un antígeno asociado con una enfermedad que está anclado por el extremo C, de modo que la proteína de fusión F se expresa e incorpora en el NDV quimérico, en el que el antígeno no se deriva de un paramixovirus, y en el que la función de la proteína F es suministrada por la proteína de fusión F o por la proteína F nativa.
- 10 2. El NDV quimérico de la reivindicación 1, en el que el genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F, de modo que la proteína F se expresa e incorpora en el NDV quimérico.
3. El NDV quimérico de la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína F se modifica genéticamente en el sitio de escisión para aumentar la actividad fusogénica, preferiblemente en el que el sitio de escisión de la proteína F se reemplaza por un sitio de escisión multi-básico.
- 15 4. El NDV quimérico de la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión F reemplaza la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F de NDV y la proteína de fusión F proporciona la función de la proteína F.
5. El NDV quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que:
 - a. la secuencia que codifica la proteína de fusión F se inserta entre los genes P y M del genoma del NDV; y/o
 - b. los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína de fusión F son de la cepa NDV LaSota.
- 20 6. El NDV quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que:
 - a. la proteína de fusión F no contiene residuos de aminoácidos del ectodominio de la proteína F, o contiene un fragmento del ectodominio de la proteína F que no retiene la actividad del ectodominio de la proteína F; o
 - b. la proteína de fusión F comprende entre 1 y 15 residuos del ectodominio de una proteína F del NDV que están inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana de la proteína F.
- 25 7. El NDV quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el NDV quimérico está atenuado.
8. El NDV quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el agente infeccioso es un patógeno infeccioso.
9. El NDV quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el antígeno es un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno protector asociado con un parásito o un antígeno fúngico,
- 30 preferiblemente en donde el antígeno viral es un antígeno de adenoviridae, herpesviridae, leviviridae, poxviridae, picornaviridae, papovaviridae, reoviridae, retroviridae, flaviridae, togaviridae, hepadnaviridae, rhabdoviridae, arenaviridae o coronaviridae;
- preferiblemente en donde el antígeno bacteriano es un antígeno de bacterias de la familia Aquaspirillum, familia Azospirillum, familia Azotobacteraceae, familia Bacteroidaceae, especie Bartonella, familia Bdellovibrio, especie Campylobacter, especie Chlamydia, Clostridium, familia Enterobacteriaceae, familia Gardinella, Haemophilus influenzae, familia Halobacteriaceae, Familia Helicobacter, familia Legionellaceae, especie Listeria, familia Methylococcaceae, familia Neisseriaceae, familia Oceanospirillum, familia Pasteurellaceae, especie Pneumococcus, especie Pseudomonas, familia Rhizobiaceae, familia Spirillum, familia Spirosomaceae, familia Staphylococcus, Streptococcus, familia Yersinia, o familia Vampirovibrio;
- 35 preferiblemente en donde el antígeno protector asociado con un parásito es un antígeno de una ameba, un parásito de la malaria, Plasmodium o Trypanosoma cruzi; y
- preferiblemente en donde el antígeno fúngico es un antígeno de hongos de especies de Absidia, especies de Aspergillus, Ascomycetes, Basidiomycetes, Basidibolus ranarum, Blastomyces dermatitidis, especies de Candida, Coccidioides immitis, especies de Conidiobolus, Cryptococcus neoformans, especies de Cunninghamella, dermatófitos, Deuteromycetes, Histoplasma capsulatum, Microsporium gpseum, Mucor pusillus, Oomycetes, Paracoccidioides brasiliensis, Pseudallescheria boydii, Rhinosporidium seeberi, Pneumocystis carinii, especies de Rhizopus, especies de Saccharomyces, Sporothrix schenckii o Zygomycetes.
- 45 10. El NDV quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el antígeno es el ectodominio de un antígeno de hemaglutinina de un virus de la gripe.
- 50 11. El NDV quimérico de la reivindicación 10, en el que el virus de la gripe es un virus de la gripe aviar.

12. El NDV quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la estructura del NDV quimérico es la cepa NDV de LaSota.
13. Una composición inmunogénica que comprende el NDV quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 5 14. Un NDV quimérico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o una composición inmunogénica como se define en la reivindicación 13 para su uso en un método para inducir una respuesta inmune frente a NDV y un agente infeccioso o enfermedad asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave, o para su uso en la inducción de una respuesta inmune a un agente infeccioso o enfermedad asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave o un ser humano.
- 10 15. El uso del NDV quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmune frente a NDV y un agente infeccioso o enfermedad asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave, o para inducir una respuesta inmune frente a un agente infeccioso o enfermedad asociada con el antígeno de la proteína de fusión F en un ave o un ser humano.
- 15 16. Un NDV quimérico según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o una composición inmunogénica como se define en la reivindicación 13 para su uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad en un ser humano o ave, en el que la enfermedad está asociada con el antígeno de la proteína de fusión F.
- 20 17. El uso del NDV quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad en un ser humano o en un ave, en el que la enfermedad está asociada con el antígeno de la proteína de fusión F.
18. Un método para producir una formulación inmunogénica, comprendiendo el método:
- a. propagar el NDV quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en un huevo embrionado o en una línea celular que es susceptible a una infección por NDV; y
- b. recoger el virus de la progenie,
- 25 en el que el virus se cultiva en cantidades suficientes y en condiciones suficientes como para que el virus esté libre de contaminación, de modo que el virus de la progenie sea adecuado para su uso en una formulación inmunogénica.
19. Una molécula de ADN recombinante que codifica el NDV quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

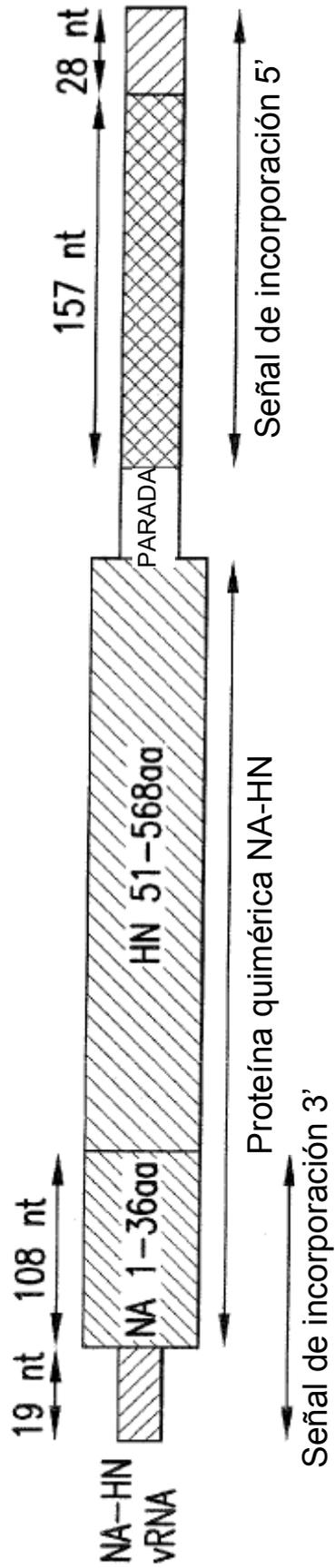


FIG.1



FIG.3

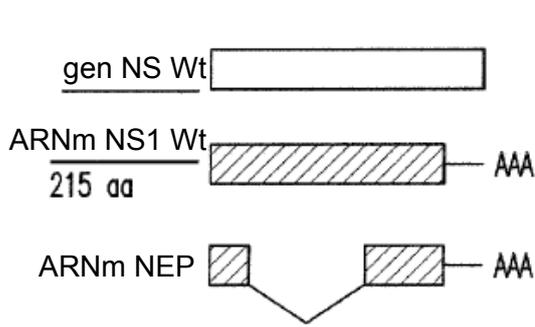


FIG.4A

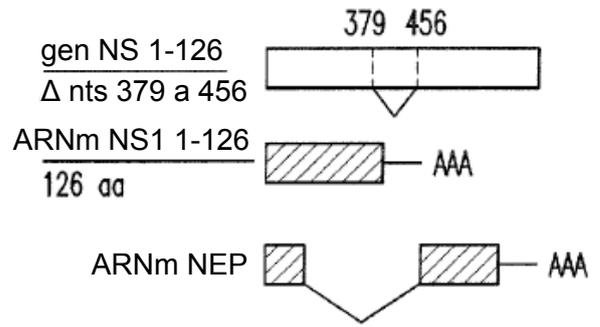


FIG.4B

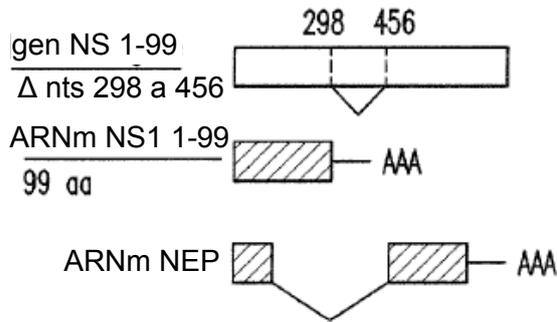


FIG.4C

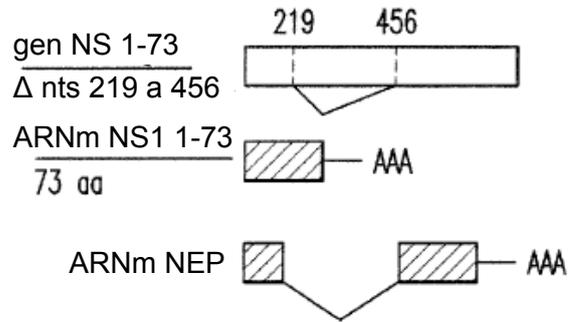


FIG.4D

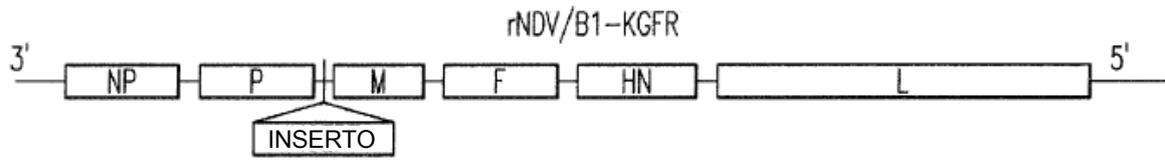


FIG.5

1 2 3



1: rNDV
2: rNDV-KGFR
3: rNDV-KGFR/F-CT

FIG.6

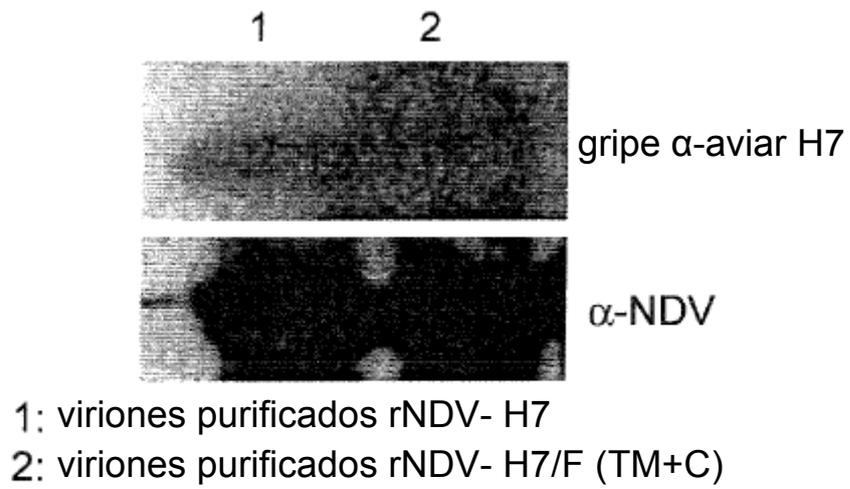


FIG.7

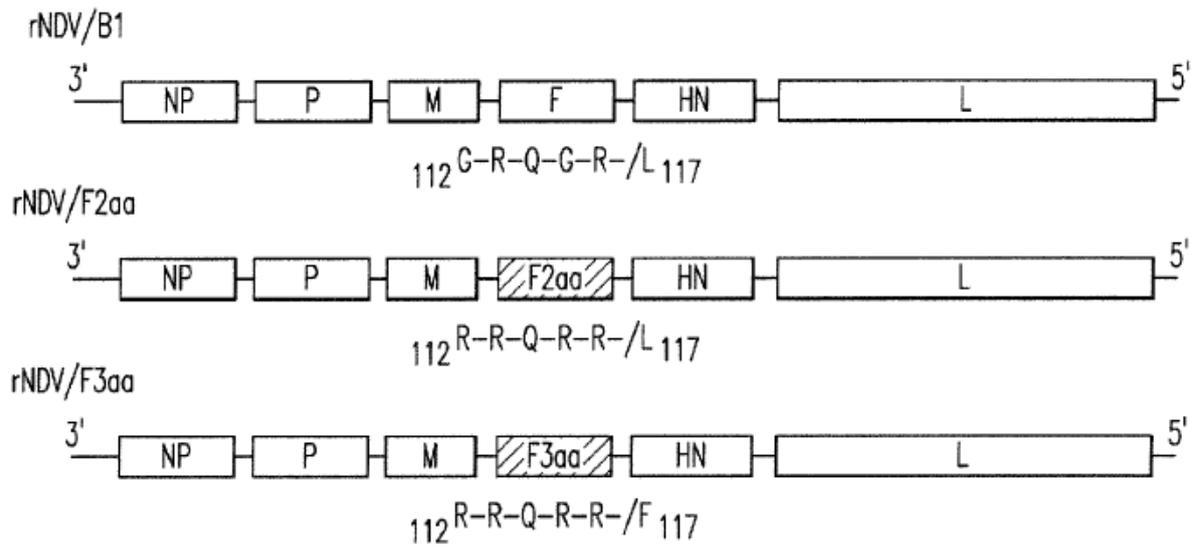


FIG.8A

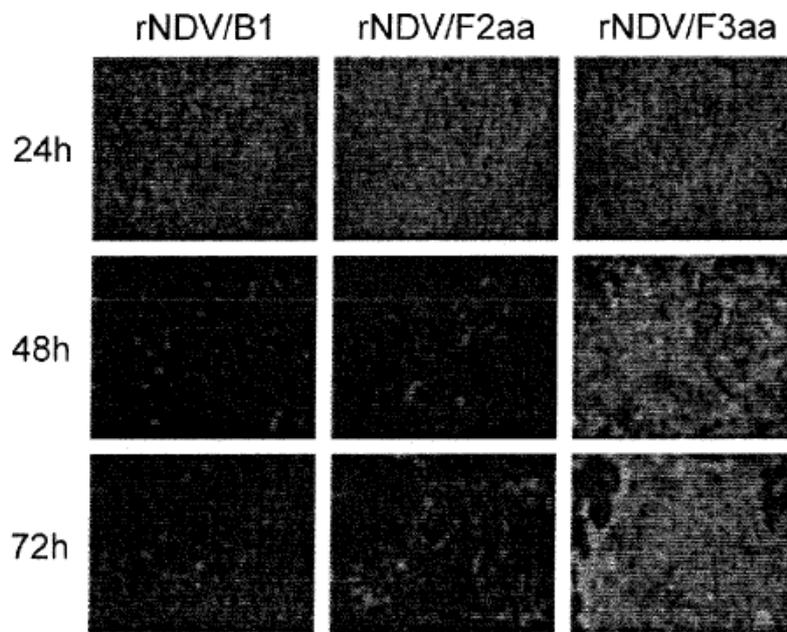


FIG.8B

rNDV/F3aa-H7 quimérico

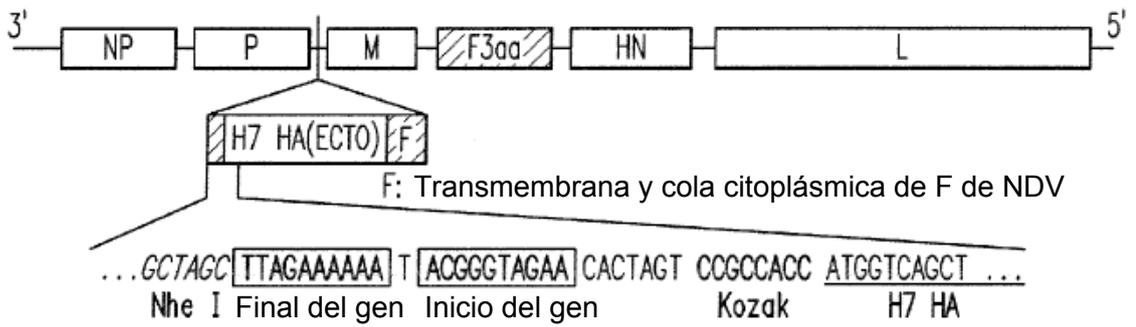


FIG.9A

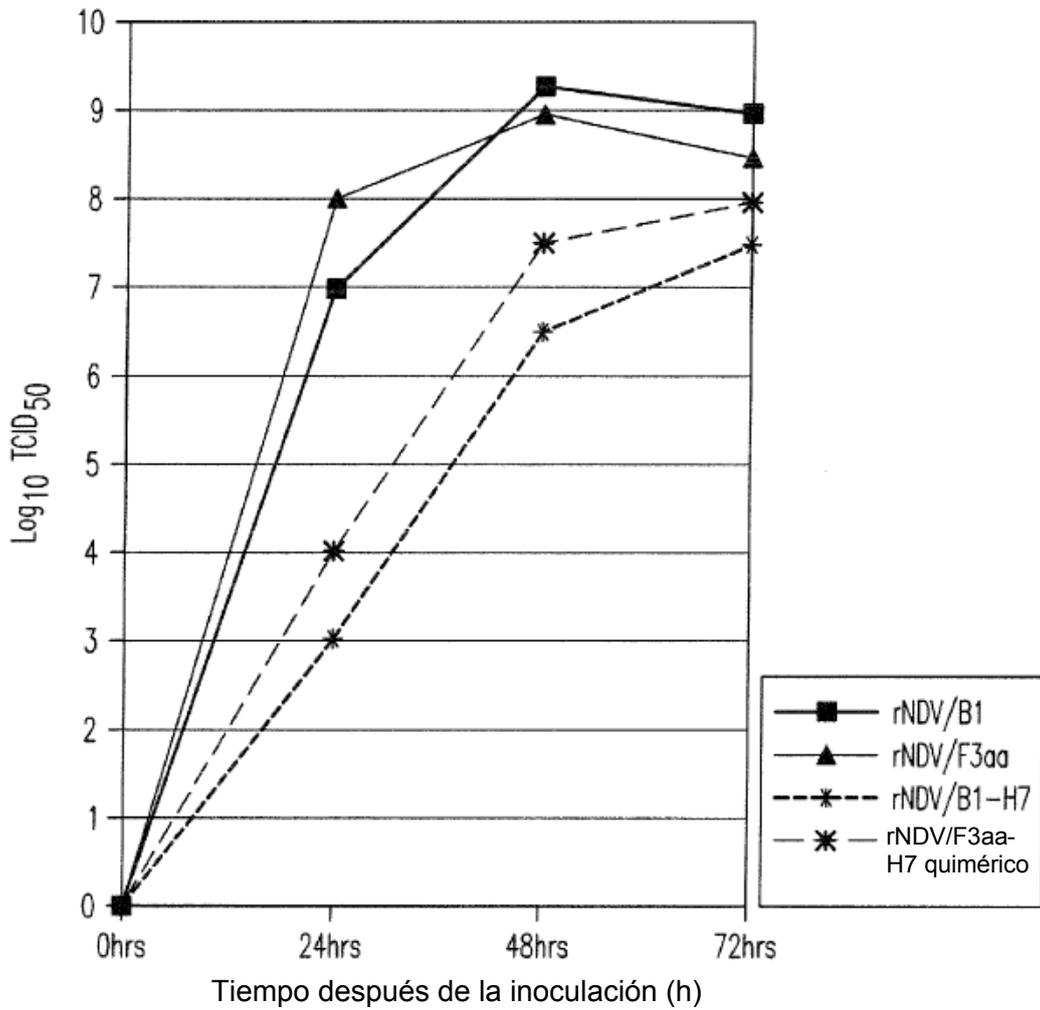


FIG.9B



FIG.9C

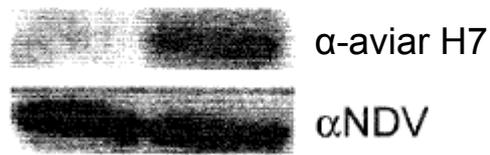


FIG.9D