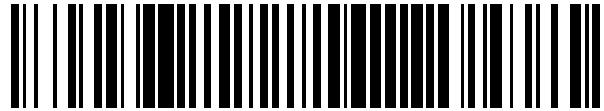


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 147**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2015 PCT/EP2015/078457**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16087560**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2015 E 15805147 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 3227433**

54 Título: **Fibroblastos de embrión de pollo inmortalizados**

30 Prioridad:

04.12.2014 EP 14196345

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

14.02.2019

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

KOOL, JAAP

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 700 147 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

Fibroblastos de embrión de pollo inmortalizados

5 La presente invención se refiere a fibroblastos de embrión de pollo inmortalizados, a cultivos celulares que comprenden dichas células inmortalizadas, a vacunas que comprenden dichas células, a métodos para la replicación de virus aviares en dichas células, y a métodos para la preparación de dichas células y dichas vacunas.

10 La propagación de virus para la producción de vacunas requiere la disponibilidad de células hospedadoras susceptibles. Por lo general, dependiendo de la especie de virus y del tipo de célula hospedadora que se utilice, estas células hospedadoras crecerán en cultivos celulares. Para la propagación de muchas especies de virus aviares existe la posibilidad adicional de la propagación en huevos embrionados. Sin embargo, en la práctica, muchas especies de virus aviares crecen en células de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) primarias. (Las células que se cultivan directamente de un animal se conocen como células primarias). Dichas células de FEP primarias son susceptibles a muchas especies de virus diferentes y, a menudo, dichos virus pueden crecer a títulos altos en estas células. Son
15 ejemplos de virus que crecen con frecuencia en células de FEP, el herpesvirus del pavo (HVT, *Herpes virus of turkey*), el virus de Marek, el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV, *Newcastle Disease virus*), el virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV, *Infectious Bronchitis virus*), el virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa (IBDV, *Infectious Bursal Disease virus*), el virus del Síndrome de la Caída de la Puesta (EDSV, *Egg Drop Syndrome virus*), Reovirus (RV) y el virus de Rinotraqueitis del Pavo (TRT, *Turkey Rhinotracheitis virus*).

20 Sin embargo, existen varios inconvenientes sobre el uso de células de FEP. Dichas células tienen un período de vida *in vitro* relativamente corto y se obtienen de huevos embrionados libres de patógenos específicos, por lo que su producción para una demanda continuada es muy laboriosa y muy costosa. Por lo tanto, sería deseable establecer líneas celulares de origen aviar para reemplazar el uso de células de FEP primarias.
25

30 Para los fines de la presente invención, una línea celular inmortalizada es una población de células (en este caso FEP) que se origina en un organismo multicelular, que normalmente no proliferaría indefinidamente, pero debido a la mutación, ha evitado la senescencia celular normal y, en cambio, puede mantenerse experimentando división celular. Dichas células han evadido la limitación normal de crecimiento solo durante un número finito de ciclos de división.

35 En principio, una forma inmortalizada de células de FEP (una línea celular de FEP) podría resolver los problemas identificados anteriormente, pero dichas células apenas están disponibles. Una forma para obtener dichas células es aislar y hacer crecer células de FEP primarias y esperar a que ocurra un acontecimiento de inmortalización espontánea. Sin embargo, en las células aviares, la inmortalización espontánea es muy rara. Como consecuencia, solo se han inmortalizado espontáneamente tres líneas celulares de pollo inmortalizadas; DF-1 (Patente de Estados Unidos US 5672485), SC-1 y SC-2 (Christman, S.A. *et al.*, Dissertation Abstracts Int. 65: 4414 (2004) (ISBN 0-496-06882-2). Aparte del hecho de que encontrar y aislar una célula de FEP inmortalizada espontáneamente puede llevar mucho tiempo, también resulta que dichas células de FEP inmortalizadas pueden mostrar características muy
40 diferentes, tales como tasas de crecimiento y niveles de p53 variables a lo largo del tiempo, dependiendo del número de pases que hayan tenido (Christman, S.A. *et al.*, FEBS letters 579: 6705-6715 (2005)). Sin embargo, especialmente para la producción de vacunas, se necesitan líneas celulares cuyas características permanezcan iguales a lo largo del tiempo, independientemente del número de pases. La FDA ha indicado que se desaconseja el desarrollo de vacunas víricas atenuadas vivas mínimamente purificadas en células neoplásicas que se hayan transformado por mecanismos desconocidos (FDA; Análisis del CBER sobre sustratos celulares, 12 de mayo de 2000). Por lo tanto, las células de FEP inmortalizadas espontáneamente son menos deseables como una fuente de células para la propagación de virus con fines vacunales.
45

50 También hay métodos conocidos en la técnica para la inmortalización intencional de las células. La ventaja de dichos métodos es que se elimina el factor de coincidencia, que se sabe que es un obstáculo grave cuando se apunta a células inmortalizadas espontáneamente. Para células no aviares, especialmente células de mamíferos, un método frecuentemente utilizado para obtener células inmortalizadas se basa en la infección de células primarias con retrovirus o vectores retrovíricos, o en la transfección de células primarias con moléculas de ADN que comprenden retrovirus o al menos secuencias retrovíricas con Repeticiones Terminales Largas (LTR, del inglés *long terminal repeat*) y secuencias que codifican oncoproteínas, tales como T y t del Virus de Simio SV40, de virus tumorales de ADN
55

60 Las oncoproteínas T y t del SV40 desempeñan un papel en la inactivación de las proteínas de retinoblastoma (Rb) y p53. Un artículo de revisión de Deepika Ahuja *et al.*, sobre el antígeno T grande y t pequeño que codifica el antígeno T del SV40 proporciona información sobre los mecanismos de acción de estas proteínas (Oncogene 24: 7729-7745 (2005)). Básicamente, los productos génicos T y t del antígeno T de SV40 inhiben la familia de supresores tumorales de p53 y Rb.

65 Las LTR son elementos retrovíricos que comprenden todas las señales necesarias para la expresión génica retrovírica: potenciador, promotor, iniciación de la transcripción, terminador de la transcripción y señal de poliadenilación.

Sin embargo, se sospecha que estas LTR tienen efectos tumorigénicos. Esto se debe al hecho de que se sabe que

activan en cis a otros genes celulares y al hecho de que pueden recombinarse con otras secuencias retrovíricas en el genoma celular (Mosier, D.E., *Applied Biosafety* 9: 68-75 (2004)). Por tanto, una grave desventaja del uso de ADN retrovírico que comprende LTR o al menos secuencias retrovíricas largas para transfectar células, es que en dichos casos las secuencias de LTR se introducirán en el ADN de las células inmortalizadas.

5 Para las células aviares, solo se conoce un ejemplo de una inmortalización satisfactoria con una molécula de ADN que comprende LTR y que expresa el antígeno T de SV40: dichas células de FEP inmortalizadas se describen en la Solicitud PCT WO 97/44443.

10 Aparentemente, dichos métodos no son muy satisfactorios. Soo-Hyun Kim describió la transfección de células de FEP con un retrovirus que codifica el antígeno T de SV40, en un intento por inmortalizar células de FEP mediante la inactivación de los supresores tumorales de retinoblastoma (Rb) y p53. (*J. Cell Science* 119: 2435-2443 (2006)). Sin embargo, esto solo condujo a una ligera prolongación de la longevidad de las células de FEP, no a la inmortalización. En ese momento, Kim sugirió que una posible explicación de la prolongación limitada de la longevidad podría ser el continuo desgaste de los telómeros. Sin embargo, la situación se complica por el hecho de que las células de pollo contienen macro y micro cromosomas con diferentes clases de tamaño de repeticiones teloméricas, algunas de las cuales son intersticiales. Por lo tanto, en esta coyuntura, la dinámica del desgaste y la reparación de los telómeros y su efecto en la inmortalización de las células de pollo sigue sin estar clara.

20 Esto plantea la cuestión básica y no resuelta de si un papel crítico en la inmortalización de FEP se relaciona con la pérdida de p53 y Rb o con la activación de la telomerasa (Campisi, J., *Exp. Gerontol.* 36: 607-618 (2001) y Sherr, J.C. y DePinho, R.A., *Cell* 102: 407-410 (2000)).

A partir de experimentos recientes, se puede llegar a la conclusión de que, contrariamente a la sugerencia de Kim, el papel de la telomerasa en la inmortalización de células de FEP no parece ser crítico. En primer lugar, llama la atención que en la línea celular SC-1 de células de FEP inmortalizadas espontáneamente (véase anteriormente), no puede detectarse expresión de telomerasa (Christman, S.A. *et al.* *FEBS letters* 579: 6705-6715 (2005)).

25 En segundo lugar, en varios experimentos sencillos en los que las células de pollo se transdujeron o transfectaron con cTR, cTERT o tanto con cTR como con cTERT, no se obtuvieron células de pollo inmortalizadas (Swanberg, S.E. *et al.* *Exp. Gerontol.* 45: 647-654 (2010)).

30 En contra de todas las expectativas, ahora se ha descubierto que pueden obtenerse líneas celulares de FEP transfectadas de manera estable a través de la transfección de células de FEP, sin utilizar secuencias LTR, con una molécula de ADN que comprende repeticiones invertidas de transposones para la integración de la molécula de ADN en el genoma celular y una combinación tanto del gen que codifica el antígeno T y t, o al menos el antígeno T, de SV40, bajo el control de un promotor adecuado como del gen que codifica la telomerasa de pollo (cTERT, *chicken telomerase*) bajo el control de un promotor heterólogo. Las repeticiones invertidas de transposones desempeñan un papel en la integración estable del gen que codifica el antígeno T y t, o al menos T, de SV40 y el gen que codifica (cTERT) en el genoma del FEP, que es un requisito previo para obtener un FEP inmortalizado transfectado de manera estable de acuerdo con la invención.

40 Por lo tanto, una primera realización de la presente invención se refiere a un fibroblasto de embrión de pollo (FEP) inmortalizado transfectado de manera estable, caracterizado por que el FEP inmortalizado transfectado de manera estable expresa un antígeno T de SV40, expresa la telomerasa de pollo (cTERT) bajo un promotor heterólogo y no comprende ADN exógeno retrovírico con Repeticiones Terminales Largas.

Se considera que el ADN retrovírico exógeno con LTR es ADN que se introduce en un fibroblasto de embrión de pollo durante el proceso de inmortalización como se ha descrito anteriormente.

45 Los detalles y las características de dicho FEP inmortalizado, así como los métodos para la preparación de dicho FEP, se describen detalladamente a continuación.

Una segunda realización de la presente invención se refiere a métodos para la preparación de dichas líneas celulares de FEP inmortalizados.

50 Los métodos para la preparación de una línea celular de FEP inmortalizado de acuerdo con la invención comprenden básicamente las siguientes etapas:

a) la etapa de obtener células de FEP primarias. Esta etapa es muy conocida en la técnica y la han descrito, entre otros, Hernández, R y Brown, D.T. en *Current protocols in Microbiology* 17: A.4i.1 - A.4i.8 (2010) y otros autores. Sigue siendo la forma preferida de obtener FEP.

55 b) la etapa de transfectar dichas células de FEP con 1) una molécula de ADN sin secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones y que comprende un gen que codifica el antígeno T de SV40 bajo el control de un promotor adecuado, 2) una molécula de ADN sin secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones y que comprende un gen que codifica la telomerasa de pollo; cTERT bajo el control de un promotor adecuado y 3) una molécula de ADN que comprende un gen que codifican la transposasa bajo el control de un promotor heterólogo.

60 La molécula de ADN que comprende un gen que codifica la transposasa bajo el control de un promotor adecuado, no necesita carecer necesariamente de secuencias LTR, ya que esta molécula de ADN en sí no comprende secuencias de transposones y, por lo tanto, probablemente no estará integrada en el genoma del hospedador. Sin embargo, para evitar una integración accidental no intencionada, preferentemente la molécula de ADN que comprende un gen que codifica la transposasa bajo el control de un promotor adecuado, carece de secuencias LTR.

Por razones de eficacia, en la práctica, la transfección se realizaría preferentemente con una sola molécula de ADN sin secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones, que comprende tanto un gen que codifica el antígeno T de SV40 bajo el control de un promotor adecuado, como un gen que codifica la telomerasa de pollo bajo el control de un promotor heterólogo y que comprende un gen que codifica la transposasa bajo el control de un promotor adecuado.

La actividad transposasa es necesaria solo durante las primeras etapas del proceso de immortalización para la integración del ADN en el genoma del FEP. Una vez que el (los) ADN(s) está(n) integrado(s), la transposasa ya no es necesaria. Después, incluso puede llegar a ser perjudicial para la estabilidad de las células.

Por lo tanto, incluso más preferentemente, la etapa de transfectar dichos FEP se realizaría con 1) una sola molécula de ADN sin secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones y que comprende tanto un gen que codifica el antígeno T de SV40 bajo el control de un promotor adecuado como un gen que codifica la telomerasa de pollo bajo el control de un promotor heterólogo y 2) una molécula de ADN, preferentemente sin secuencias LTR, que solo comprende el gen de la transposasa bajo el control de un promotor adecuado sin secuencias de transposones.

La transfección puede realizarse de muchas maneras conocidas en la técnica. En el comercio existen kits para la transfección disponibles, entre otros, en Bio-Rad (Life Science (Research, Education, Process Separations, Food Science), Life Science Research, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547, USA) e Invitrogen (Life Technology, 3175 Staley Road, Grand Island, NY 14072, USA). Los métodos de transfección basados en reactivos comúnmente utilizados comprenden el uso de lípidos, fosfato de calcio, polímeros catiónicos, DEAE-dextrano, dendrímeros activados y perlas magnéticas. Los métodos basados en instrumentos comprenden electroporación, nucleofección y microinyección.

Una molécula de ADN sin secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones, que comprende un gen que codifica el antígeno T de SV40 bajo el control de un promotor adecuado y repeticiones invertidas de transposones y/o el gen que codifica la telomerasa de pollo bajo el control de un promotor adecuado, podría ser, por ejemplo, un plásmido. Cuando el plásmido se utiliza para la etapa de transfección su forma puede ser circular o lineal.

El uso de transposones como tal es muy conocido en la técnica. En un artículo de Ivics, Z. e Izsvak Z., se revisa detalladamente los transposones y su uso, y proporciona información sobre los mecanismos de acción de los transposones (Mobile DNA 1: 25-39 (2010)). Los transposones pueden contemplarse como vehículos naturales de transferencia de ADN que, de manera similar a los virus integradores, son capaces de realizar una inserción genómica eficaz, mediada por transposasa.

En principio, los transposones permanecen presentes de forma estable en el genoma celular después de la integración en el genoma. Por lo tanto, preferentemente los FEP immortalizados de acuerdo con la invención comprenden secuencias de transposones tales como las repeticiones invertidas de transposones.

En la técnica se conoce una gran cantidad de promotores adecuados para la expresión del antígeno T de SV40 y de la cTERT, que son reconocidos por su nivel de expresión eficaz. Se sabe que los promotores que son transcripcionalmente activos en células de mamífero también funcionan bien en células aviares. Dichos promotores incluyen promotores clásicos, tales como el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (humano) (Sun-Young Lee *et al.*, Journal of Biomedical Science 6: 8-17 (1999), Seed, B. *et al.*, Nature 329, 840-842, 1987; Fynan, E.F. *et al.*, PNAS 90, 11478-11482, 1993; Ulmer, J.B. *et al.*, Science 259, 1745-1748, 1993), el promotor - potenciador de Citomegalovirus Humano (Donofrio G., *et al.*, Clinical and Vaccine Immunology 13: 1246-1254, (2006)), el promotor temprano inmediato de Citomegalovirus de Ratón (MCMVie1), el promotor temprano de Citomegalovirus de Ratón (MCMVe1), el promotor temprano inmediato de SV40 (Sprague J. *et al.*, J. Virology 45, 773, 1983), el promotor de SV-40 (Berman, P.W. *et al.*, Science, 222, 524-527, 1983), el promotor de metalotioneína (Brinster, R.L. *et al.*, Nature 296, 39-42, 1982), el promotor de choque térmico (Voellmy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4949-53, 1985), el promotor tardío principal de Ad2 y el promotor de la β -actina (Tang *et al.*, Nature 356, 152-154, 1992).

Un promotor preferido es el promotor CAG. (Miyazaki, J; Takaki, S; Araki, K; Tashiro, F; Tominaga, A; Takatsu, K; Yamamura, K., Gene 79 (2): 269-277 (1989), y Niwa, H; Yamamura, K; Miyazaki, J. Gene 108 (2): 193-199 (1991)).

c) la etapa de seleccionar células que sean capaces de mantener la proliferación. Las células de FEP que son capaces de mantener la proliferación son células que siguen proliferando durante al menos 45 duplicaciones poblacionales. El ciclo celular, o el ciclo de división celular, es la serie de acontecimientos que tienen lugar en una célula que conducen a su división y duplicación (la replicación celular). La selección de células que sean capaces de mantener la proliferación es un proceso muy sencillo por la siguiente razón: las células de FEP primarias no son, incluso en la situación más óptima, capaces de dividirse fuera de su entorno natural, el embrión aviar, durante más de 45 veces. Después de una fase de proliferación inicial, la tasa de proliferación de las células de FEP primarias vivas después del aislamiento disminuye con el tiempo y, finalmente, todas las células FEP primarias entran en una fase no proliferativa. Como consecuencia, morirán después de un máximo de aproximadamente 45 duplicaciones poblacionales.

Esto significa que, si hay un aumento en el número de células, especialmente después de 45 duplicaciones poblacionales, esto se debería al hecho de que una o más células se han transfectado satisfactoriamente y que el gen que codifica el antígeno T de SV40 y el gen que codifica la cTERT, se insertaría en el genoma celular. Por tanto, básicamente, el proceso es de autoselección: el mantenimiento de los FEP, algunos de los cuales se transfectaron

satisfactoriamente, en un medio de crecimiento celular adecuado, conducirá automáticamente a la replicación de estas células afectadas, mientras que las células no inmortalizadas dejarán de dividirse y morirán. En la técnica se conocen medios de crecimiento celular adecuados (véase, Kim, 2006 y Hernández, 2010, citados anteriormente) y se describen, entre otros, en la sección de Ejemplos.

5 En los Ejemplos puede encontrarse ayuda adicional sobre las condiciones de cultivo celular.

Normalmente, se seleccionan células que se han cultivado durante al menos 45 ciclos celulares. Se puede suponer razonablemente que dichas células son FEP inmortalizados satisfactoriamente, ya que generalmente las células de FEP primarias no se replicarán más de aproximadamente 45 veces *in vitro* después del aislamiento del embrión de pollo.

10 Por tanto, una realización de la presente invención se refiere a un método para la preparación de un FEP inmortalizado de acuerdo con la invención, en el que dicho método comprende las etapas de

a) obtener células de FEP primarias,

15 b) transfectar dichas células de FEP con 1) una molécula de ADN sin secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones y que comprende un gen que codifica al antígeno T de SV40 bajo el control de un promotor adecuado, 2) una molécula de ADN sin secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones y que comprende un gen que codifica la telomerasa de pollo; cTERT bajo el control de un promotor heterólogo y 3) una molécula de ADN sin secuencias LTR, que comprende un gen que codifica la transposasa bajo el control de un promotor adecuado,

20 c) seleccionar células de FEP que se hayan cultivado durante al menos 45 ciclos celulares.

Una forma preferida de esta realización se refiere a un método para la preparación de un FEP inmortalizado de acuerdo con la invención, caracterizado por que dicho método comprende las etapas de

25 a) obtener células de FEP primarias,

b) transfectar dichas células de FEP primarias con una sola una molécula de ADN sin secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones, que comprende tanto un gen que codifica al antígeno T de SV40 bajo el control de un promotor adecuado como un gen que codifica la telomerasa de pollo bajo el control de un promotor heterólogo y que comprende un gen que codifica transposasa bajo el control de un promotor adecuado,

30 c) seleccionar células de FEP que se hayan cultivado durante al menos 45 ciclos celulares.

Una forma más preferida de esta realización se refiere a un método para la preparación de un FEP inmortalizado de acuerdo con la invención, caracterizado por que dicho método comprende las etapas de

35 a) obtener células de FEP primarias,

b) transfectar dichas células de FEP primarias con 1) una sola una molécula de ADN sin secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones, que comprenden tanto un gen que codifica el antígeno T de SV40, bajo el control de un promotor adecuado, como un gen que codifica la telomerasa de pollo, bajo el control de un promotor heterólogo y con 2) una molécula de ADN sin secuencias LTR, que comprende un gen que codifica la transposasa bajo el control de un promotor adecuado,

40 c) seleccionar células de FEP que se hayan cultivado durante al menos 45 ciclos celulares.

45 En casos excepcionales, las células que pasaron por aproximadamente 45 ciclos celulares, aún pueden mostrar un comportamiento inestable, por ejemplo, debido al hecho de que el transposón se ha integrado en el genoma celular en un sitio muy crítico, o debido a la integración inestable del gen que codifica el antígeno T de SV40 o que codifica la cTERT. Por lo tanto, en la práctica se seleccionan preferentemente células que se hayan cultivado durante al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 o incluso 160 ciclos celulares, en ese orden de preferencia. Las posibilidades de que se manifieste cualquier inestabilidad disminuyen con la cantidad de ciclos celulares del FEP inmortalizado seleccionado.

50 Por tanto, preferentemente, se seleccionan células que se hayan cultivado durante al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 o incluso 160 ciclos celulares, en ese orden de preferencia.

Una tercera realización de la presente invención se refiere a métodos para la replicación de un virus aviar o un vector vírico aviar, comprendiendo dichos métodos las etapas de

55 a) cultivar un FEP inmortalizado de acuerdo con la invención,

b) poner en contacto el FEP inmortalizado con el virus aviar o vector vírico aviar

c) permitir que el virus aviar o vector vírico aviar se replique y

60 d) aislar el virus descendiente.

Los virus aviares de especial interés son los siguientes virus aviares: Herpesvirus del pavo (HVT), virus de Marek, virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa (IBDV), virus del Síndrome de la Caída de la Puesta de Huevo (EDSV), Reovirus (RV) y virus de la Rinotraqueitis del Pavo (TRT). En la técnica se conocen vacunas para todos estos virus, ya sea basándose en virus vivos atenuados, virus inactivados o virus recombinantes; vectores víricos, que expresan componentes inmunogénicos de cualquiera de estos virus.

Un vector vírico es un virus que transporta un gen adicional, que no está presente en la forma natural (*wild-type*) del virus. Los vectores víricos son muy conocidos en la técnica. Los vectores víricos pueden utilizarse para transportar, por ejemplo, un gen bacteriano extraño o un gen vírico extraño. Normalmente, el gen adicional se coloca bajo el control de un promotor adecuado. Son ejemplos de dichos vectores víricos, por ejemplo, un vector de HVT que comprende el gen de VP2 del IBDV, el gen de la proteína espiga del IBV, el gen de HA de la gripe aviar, el gen de la proteína gD/gI del virus de la ILT o el gen de F del NDV.

Por tanto, una forma preferida de esta realización se refiere a métodos para replicar un virus aviar o un vector vírico aviar, de acuerdo con la invención, en los que el virus aviar o el vector vírico aviar se selecciona del grupo de virus aviares que consiste en el virus de la Enfermedad de Marek (MDV), el Herpesvirus del pavo (HVT) relacionado con el MDV, el virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), el virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa (IBDV), el virus del Síndrome de la Caída de la Puesta de Huevo (EDSV), Reovirus (RV), el virus de la Rinotraqueitis del Pavo (TRT) y un vector de HVT que comprende el gen de VP2 del IBDV, el gen de la proteína espiga del IBV, el gen de HA del virus de la gripe aviar, el gen de la proteína gD/gI de la ILT o el gen de F del NDV.

El virus de la Enfermedad de Marek (MDV) es un herpesvirus que se sabe que existe en tres serotipos: el serotipo 1 altamente virulento, el serotipo 2 moderadamente virulento y el serotipo 3, un virus del pavo que no es virulento para los pollos; el Herpesvirus de pavo (HVT) relacionado con el virus de la Enfermedad de Marek.

Las células de FEP inmortalizadas de acuerdo con la invención son muy adecuadas para la propagación de estos tres serotipos del MDV.

Por tanto, una forma más preferida de esta realización se refiere a métodos para la replicación de un virus aviar de acuerdo con la invención, en los que el virus aviar se selecciona del grupo de virus aviares que consiste en el MDV y en virus de vectores de MDV.

Una cuarta realización de la presente invención se refiere a un cultivo celular que comprende un FEP inmortalizado de acuerdo con la invención.

Una forma preferida de esta realización se refiere a un cultivo celular de este tipo que está infectado con un virus aviar o con un vector vírico aviar.

Una forma más preferida de esta realización se refiere a un cultivo celular de este tipo que está infectado con un virus aviar o un vector vírico aviar seleccionado del grupo que consiste en el virus de la Enfermedad de Marek (MDV), el Herpesvirus del pavo (HVT) relacionado con el MDV, el virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), el virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa (IBDV), el virus del Síndrome de la Caída de la Puesta de Huevo (EDSV), el virus de la Rinotraqueitis del Pavo (TRT), Reovirus (RV) y un vector de HVT que comprende el gen de VP2 del IBDV, el gen de la proteína espiga del IBV, el gen de HA de la gripe aviar, el gen de la proteína gD/gI del virus de la ILT o el gen de F del NDV.

Una forma aún más preferida de esta realización se refiere a un cultivo celular de este tipo en el que el cultivo celular está infectado con MDV o con un vector vírico de MDV.

Una quinta realización de la presente invención se refiere a métodos para la preparación de una vacuna que comprende un virus aviar o un vector vírico aviar, comprendiendo el método la etapa de mezclar un cultivo celular de acuerdo con la invención, en el que el cultivo celular está infectado con un virus aviar o vector vírico aviar, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una forma preferida de esta realización, el virus aviar o un vector vírico aviar se selecciona del grupo que consiste en el virus de la Enfermedad de Marek (MDV), el Herpesvirus de pavo (HVT) relacionado con el MDV, el virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), el virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa (IBDV), el virus del Síndrome de la Caída de la Puesta de Huevo (EDSV), Reovirus (RV), el virus de la Rinotraqueitis del Pavo (TRT) y un vector de HVT que comprende el gen de VP2 del IBDV y/o el gen de F del NDV.

Algunos virus relacionados con el MDV, solo son capaces de sobrevivir si están unidos a la célula en la que crecen. El serotipo 1 es capaz de sobrevivir sin estar unido a una célula. El serotipo 2 es menos probable que sobreviva sin estar unido a una célula. El serotipo 3 (HVT) no sobrevive cuando se separa de la célula en la que crece. Los FEP inmortalizados de acuerdo con la invención son muy adecuados para desarrollar estos serotipos del MDV. Por lo tanto, para el MDV, especialmente para los serotipos 2 y 3 del MDV, los FEP inmortalizados de acuerdo con la invención que están infectados con estos serotipos del MDV, son muy adecuadas para su uso en una vacuna que comprende el MDV unido a células. Dichas vacunas pueden prepararse de acuerdo con técnicas estándar conocidas en la materia para la preparación de vacunas del MDV unido a células, mezclando dichos FEP inmortalizados infectados con MDV y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por lo tanto, en una forma más preferida de esta realización, el virus aviar o vector vírico aviar es el MDV.

En una forma aún más preferida de esta realización, el MDV o vector vírico de MDV está en una forma atenuada viva.

Una sexta realización de la presente invención se refiere a métodos para la preparación de una vacuna que comprende un virus aviar o un vector vírico aviar, comprendiendo el método las etapas de

- a) infectar un cultivo celular de FEP de acuerdo con la invención con un virus aviar o un vector vírico aviar
- b) replicar dicho virus aviar o un vector vírico aviar
- c) aislar el virus descendiente
- d) mezclar el virus descendiente con un vehículo farmacéuticamente aceptable

Una forma preferida de esta realización se refiere a una vacuna de este tipo en la que el virus aviar o un vector vírico aviar se selecciona del grupo que consiste en el virus de la Enfermedad de Marek (MDV), el Herpesvirus del pavo (HVT) relacionado con el MDV, el virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), el virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa (IBDV), el virus del Síndrome de la Caída de la Puesta de Huevo (EDSV), Reovirus (RV), el virus de la Rinotraqueitis del Pavo (TRT) y un vector de HVT que comprende el gen de VP2 del IBDV y/o el gen de F del NDV.

Una forma más preferida de esta realización se refiere a una vacuna de este tipo en la que el virus aviar o un vector vírico aviar es el MDV o un vector del MDV.

Como se ha indicado anteriormente, algunos virus relacionados con el MDV solo son capaces de sobrevivir si están unidos a la célula en la que crecen. Por lo tanto, para el MDV, especialmente para los serotipos 2 y 3 del MDV, los FEP inmortalizados de acuerdo con la invención que están infectados con estos serotipos del MDV, son muy adecuados para su uso en una vacuna que comprende MDV unido a células. Dichas vacunas pueden prepararse de acuerdo con técnicas estándar conocidas en la materia para la preparación de vacunas del MDV unido a células, mezclando dichos FEP inmortalizados infectados con MDV y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por tanto, una séptima realización de la presente invención se refiere a vacunas que comprenden un cultivo celular de FEP inmortalizados de acuerdo con la invención en el que ese cultivo celular está infectado con un MDV, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Leyenda de las figuras:

Figura 1: Mapas vectoriales de pPB-CAG-Ag T de SV40 (A) y de pPB-CAG-cTERT (B).

Figura 2: Secuencia de aminoácidos de cTERT: el *indica el codón de terminación.

Figura 3: Curva de crecimiento de la línea celular ST-1 de FEP. Células transfectadas con pPB-Ev (cruces), pPB-SV (rombos) o pPB-SV y pPB-cTERT (ST-1 de FEP) (cuadrados) se sometieron a pases. En cada pase, los números de células se determinaron para calcular la duplicación poblacional por pase.

Figura 4: La morfología de ST-1 de FEP permanece constante durante los pases. Las células ST-1 de FEP se fotografiaron en el pase 25 (100x) (A) y el pase 44 (100x) (B).

Figura 5: Curva de crecimiento de la línea celular ST-2 de FEP. Células transfectadas con pPB-SV (rombos) o pPB-SV y pPB-cTERT (ST-2 de FEP) (cuadrados) se sometieron a pases. En cada pase, los números de células se determinaron para calcular la duplicación poblacional por pase.

Figura 6: La morfología de ST-2 de FEP permanece constante durante los pases. Las células ST-2 de FEP se fotografiaron en el pase 19 (100x) (A) y en el pase 26 (40x) (B).

Figura 7: Replicación del HVT en células ST-2 de FEP. Células ST-2 de FEP se infectaron con HVT a T = 0 con una MOI (multiplicidad de infección) de 0,05. Las células se recogieron en los momentos indicados y los títulos del HVT se determinaron mediante titulación.

Figura 8: Células ST-2 de FEP se infectaron con HVT a T=0 con una MOI de 0,05. Las células se tripsinizaron (se trataron con tripsina), se recogieron después de 96 horas y se resembraron en una monocapa reciente de ST-2 de FEP. Este procedimiento se repitió 4 veces. En cada pase, las muestras se recogieron para determinar el título de HVT.

Figura 9: Células ST-2 de FEP se infectaron con HVT o con virus HVT recombinante a T=0 con una MOI de 0,05. Las células se tripsinizaron y se recogieron después de 96 horas. Los títulos del HVT se determinaron mediante titulación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Inmortalización de fibroblastos embrionarios de pollo

Plásmidos.

Para construir pPB-CAG-Ag T de SV40, se añadieron los sitios XhoI y BglII al antígeno T del SV40 mediante PCR utilizando los cebadores etiqueta de SV40 5'-BII (5'-GGCGAGATCTACCATGGATAAAGTTTTAAACAG-3') y etiqueta de SV40 3'-XI (5'-GGCGCTCGAGTTATGTTTCAGGTTTCAGGGG-3'). La ADN polimerasa de fusión se utilizó para la PCR de acuerdo con el protocolo del fabricante (New England Biolabs). El fragmento se clonó en pCR-Blunt (Life

Technologies) y se verificó mediante secuenciación. A continuación, el Ag T de SV40 se escindió de pCR-Blunt y se clonó en pPB-CAG-EBNXN (Yusa *et al.*, 2009) utilizando los sitios BgIII-XhoI para crear pPB-CAG-Ag T de SV40 (Fig. 1A). La construcción final se verificó mediante secuenciación.

5 La secuencia que codifica la cTERT seguida de una secuencia de señal poliA de herpesvirus felino (CAATAAACATAGCATACGTTATGACATGGTCTACCGCTCTTATATGGGGACGAC) (Willemse *et al.*, 1995) se generó sintéticamente, se secuenció y se clonó en pPB-CAG-EBNXN (Yusa *et al.*, 2009) utilizando los sitios XhoI-Clal para crear pPB-CAG-cTERT (Fig. 1B y Fig. 2). El ADN plasmídico para la transfección en los FEP se aisló utilizando kit maxi para plásmidos de Qiagen EndoFree (Qiagen).

10

Aislamiento y crecimiento de los FEP.

Durante diez días, se incubaron diez huevos SPF (*Specific Patogen Free*, libres de patógenos específicos) a una temperatura de 37 °C y se utilizaron para el aislamiento de fibroblastos embrionarios primarios. Los embriones se recogieron de los huevos en condiciones estériles. Después de extraer la cabeza, las patas y las alas, los embriones se lavaron tres veces en PBS estéril y se disociaron utilizando una solución de tripsina/EDTA. Después de la disociación, se añadió suero de ternero fetal para inactivar la tripsina. Las células aisladas se centrifugaron durante 15 minutos a 400xg. Las células sedimentadas se resuspendieron en DMEM que contenía suero de ternero fetal al 5 % (Moregate), suero de pollo al 1 % (Sigma), glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y antibióticos, se tiñeron para determinar la viabilidad y se realizó el recuento. Se sembraron 2x10⁵ células/cm² en matraces de cultivo y se incubaron a una temperatura de 40 °C y con CO₂ al 5 %.

Transfección

25 Después de 3 días en cultivo, se recogieron los FEP y antes de la transfección se realizó un recuento de las células viables. Por cada transfección, se transfectaron 1x10⁶ células viables en tampón P3 de células primarias 100 µl + complemento (Lonza Cologne AG) utilizando el programa CA-137 del dispositivo Nucleofector 4D (Lonza Cologne AG). Las células se transfectaron con pPB-CAG-Ag T de SV40 1,6 µg y pPB-CMV-hyPBase 0,4 µg (Yusa *et al.*, 2011) o, como control, con pPB-CAG-EBNXN 1,6 µg y pPB-CMV-hyPBase 0,4 µg. Después de la administración del pulso, las células se dejaron a TA durante 5 min. A continuación se añadieron 400 µl de RPMI 1640 (37 °C) lentamente a las células y se incubaron a 37 °C durante 5 minutos. Después, las células se resuspendieron cuidadosamente, se sembraron en matraces T25 en medio de crecimiento y se incubaron a 40 °C y con CO₂ al 5 %. La transfección de las células de FEP + pPB-CAG-Ag T del SV40 con pPB-CAG-cTERT se realizó utilizando el mismo protocolo. En este caso, los FEP transfectados de manera estable con pPB-CAG-Ag T del SV40 se transfectaron con pPB-CAG-cTERT 35 1,6 µg y con pPB-CMV-hyPBase 0,4 µg (Yusa *et al.*, 2011) o, como control, con pPB-CAG-EBNXN 1,6 µg y pPB-CMV-hyPBase 0,4 µg o con 2 µg de un vector de expresión de GFP estándar (pmaxGFP, Lonza).

Cultivo tisular

40 Después de la transfección, los cultivos crecieron en medio de crecimiento (DMEM que contenía suero de ternero fetal al 5 % (Moregate), suero de pollo al 1 % (Sigma), glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM) y se sometieron a pases rutinariamente a una confluencia de 80-90 %. Después de retirar el medio, las células se lavaron dos veces con PBS y se tripsinizaron utilizando una solución de tripsina/EDTA. Las células se resuspendieron en medio de crecimiento y se sedimentaron. Las células sedimentadas se resuspendieron en medio de crecimiento y se realizó el recuento utilizando una cámara de recuento Bürker-Türk. Las células se sembraron en medio reciente en matraces de cultivo tisular Cellbind (Corning) y se incubaron a 40 °C y con CO₂ al 5 %. Las células de FEP + pPB-CAG-SV40 se congelaron para su conservación en nitrógeno líquido a diferentes pases en medio estándar que contenía FCS al 42,5 % y DMSO al 10 %. Las células de FEP + pPB-CAG-antígeno T del SV40 transfectadas con pPB-CAG-cTERT o con plásmidos de control se sembraron en placas en superficies recubiertas con colágeno I (Biocoat, Corning) en un medio de crecimiento normal o en un medio sin componente animal + suero de ternero recién nacido al 1 % (Hyclone, ThermoFisher). El número de duplicaciones poblacionales se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$45 \text{ Duplicaciones poblacionales} = \frac{\log N_t - \log N}{\log 2}$$

en la que N_t era el número de células viables al final del periodo de crecimiento y N el número de células sembradas en placa (Venkatesan y Price, 1998). Las células se fotografiaron utilizando una cámara Olympus DP21 acoplada a un microscopio Olympus CKX41.

Infección

60 Las células se sembraron durante 24 horas antes de la infección a una densidad de 1x10⁵ células/cm² en medio sin componente animal con o sin suero de ternero recién nacido al 0,25 % y se incubaron a 40 °C y con CO₂ al 5 %. Las células se infectaron con una MOI de 0,05 unidades formadoras de placa (UFP). Los virus utilizados fueron HVT (FC126), un HVT recombinante que expresa tanto un antígeno F del NDV como un antígeno VP2 del IBDV (HVT-NDV-IBDV) y un HVT recombinante que expresa un antígeno gD/dl del virus de la ILT (HVT-ILT). Después de la infección,

las células se incubaron a 38,5 °C y con CO₂ al 5 %. El medio se repuso completamente después de 72 horas en el caso en el que las células se incubasen durante más de 72 horas. Dependiendo del experimento, para la titulación las muestras se recogieron 72, 96, 120 o 144 horas después de la infección y se congelaron para su conservación en nitrógeno líquido: Después de eliminar el medio, las células se lavaron dos veces con PBS y se tripsinizaron utilizando una solución de tripsina/EDTA. Las células se resuspendieron en medio de crecimiento y se sedimentaron. Después de retirar el sobrenadante, las células se resuspendieron en medio de crecimiento reciente y se realizó el recuento. A continuación, 1x10⁷ células/ml se congelaron en medio de crecimiento que contenía una concentración final de DMSO al 10 % y suero de ternero fetal al 20 % y se conservaron en nitrógeno líquido.

10 Titulación

Se descongelaron ampollas de las células congeladas, infectadas con HVT, y se determinó el número de UFP/ml mediante titulación de las células infectadas con HVT en los FEP. Las placas se visualizaron con un ensayo de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales en suero de pollo que reconocían el HVT. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos Alexa 488 de cabra contra pollo o anticuerpos Alexa 488 de cabra contra ratón, respectivamente. Todas las titulaciones se realizaron por duplicado.

Resultados

20 La expresión del antígeno T de SV40 prolonga la longevidad de los FEP primarios.

FEP primarios se transfectaron en el pase 1 con pPB-CAG-Ag T del SV40 (pPB-SV) y con un vector de expresión de transposasa piggyBac para obtener la integración genómica y la expresión estable del Ag T del SV40. Como control, los FEP también se transfectaron con el vector vacío pPB-CAG-EBNXN (pPB-EV). Después de la transfección, las células se sometieron a pases rutinariamente a una confluencia de 80-90 % y se realizó su recuento para determinar el número de células viables. El número de células viables en los pases se utilizó para calcular el número de duplicaciones de la población después de sembrar (duplicaciones poblacionales (PD, *population doublings*)). Aunque las células que expresan el Ag T del SV40 mostraron una longevidad prolongada en comparación con los controles (35 duplicaciones poblacionales frente a 26 duplicaciones poblacionales, respectivamente), el crecimiento de todos los cultivos se detuvo finalmente alrededor del pase 17 (Fig. 3). Después del pase 17, en los cultivos aún quedaban células en proliferación. Sin embargo, dado que muchas células en el cultivo murieron, no se encontró un aumento en el número total de células y finalmente todas las células murieron.

Se examinaron células de FEP+pPB-SV para determinar la expresión del Ag T del SV40 a diferentes pases con un ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal específico para el Ag T de SV40. En el pase 2, un pase después de la transfección, un pequeño número de células era positivo al Ag T de SV40. Casi todas las células expresaron el Ag T de SV40 después del pase 7 (datos no mostrados).

40 La expresión de cTERT en células que expresan el Ag T de SV40 inducen inmortalización

Línea celular ST-1 de FEP

Para obtener fibroblastos de embrión de pollo, FEP, inmortalizados, se transfectaron células de FEP + pPB-SV con el vector de expresión pPB-CAG-cTERT (pPB-cTERT). Se descongelaron ampollas del pase 13 de FEP + pPB-SV, las células se incorporaron a cultivo, se sometieron a pases y se transfectaron en el pase 18 con pPB-cTERT y el vector de expresión de transposasa. El número total de células de FEP + pPB-SV en el pase 18 fue bajo. Por lo tanto, se utilizaron las células de FEP + pPB-SV que se transfectaron con un vector de expresión (EV, *expression vector*) de GFP estándar para determinar la eficacia de la transfección también como controles de vector vacío durante los pases. Después de la transfección, las células se sembraron y se examinaron diariamente para determinar la proliferación y el resultado de colonias. No se observó proliferación en los cultivos de FEP + pPB-SV + EV y finalmente todas las células murieron (datos no mostrados). Sin embargo, en los cultivos de FEP + pPB-SV + pPB-cTERT, las colonias de rápida proliferación fueron claramente visibles después de 10 días. Estas colonias se tripsinizaron, se realizó el recuento de las células y se sembraron en matraces de cultivo tisular. Se descubrió que estas células proliferaban mejor en medio sin componente animal (ACF, *animal component free*) que en nuestro medio de crecimiento estándar (datos no mostrados), por lo tanto continuamos haciendo crecer estas células en medio ACF. Estos FEP + pPB-SV + pPB-cTERT continuaron creciendo energicamente y se sometieron a pases hasta que se realizaron más de 100 duplicaciones poblacionales (PD) (Fig. 3).

En este punto, las células todavía estaban sanas y proliferaban energicamente. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que se había establecido una línea celular de FEP inmortalizada y se denominó ST-1 (por FEP + Ag T SV40 + cTERT-nr.1) de FEP. Las células tienen una morfología fibroblástica que permanece constante durante los pases (Fig. 4).

Las células ST-1 de FEP, de diferentes pases, se habían congelaron en ampollas para su conservación en nitrógeno líquido. Estas células pueden volver a crecer fácilmente después de su conservación en nitrógeno líquido.

Línea celular ST-2 de FEP

La línea celular ST-1 de FEP se generó transfectando células de FEP + pPB-SV de pase 18 con el vector de expresión cTERT. En este punto, un número limitado de células todavía estaba proliferando y muchas células en el cultivo ya habían muerto. Dado que solo surgió una pequeña cantidad de colonias inmortalizadas después de la transfección con cTERT y se produjo la línea celular ST-1 de FEP, se llegó a la conclusión de que la línea ST-1 de FEB es una línea celular oligoclonal.

Para establecer una línea celular policlonal, es decir, una línea celular que se origina a partir de muchas células de FEP inmortalizadas diferentes, también se transfectaron células de FEP + pPB-SV de pase temprano con cTERT. Las células de FEP + pPB-SV que se conservaron en nitrógeno líquido en el pase 9 se llevaron a cultivo, se sometieron a pases en medio ACF y se transfectaron en el pase 11 células con pPB-cTERT o pPB-EV en combinación con el vector de expresión de transposasa. Después de la transfección, las células se sembraron y se sometieron a pases. Las células de FEP + pPB-SV + pPB-EV dejaron de proliferar y murieron después del pase 16 (datos no mostrados). Las células transfectadas tanto con pPB-SV como con pPB-cTERT continuaron proliferando enérgicamente y se efectuaron pases hasta que se realizaron más de 70 PD (duplicaciones poblacionales) (pase 33, Fig. 5).

En este punto, las células todavía están sanas y proliferaban bien. Por lo tanto, se llegó a la conclusión que se había establecido otra línea celular de FEP inmortalizada. Esta línea celular se denominó ST-2 de FEP (por FEP + Ag T SV40 + cTERT-nr.2). Las células ST-2 de FEP tienen una morfología fibroblástica que permanece constante durante los pases (Fig. 6). Las células ST-2 de FEP de diferentes pases se habían congelado en ampollas para su conservación en nitrógeno líquido. Estas células pueden volver a crecer fácilmente después de su conservación en nitrógeno líquido.

Replicación del HVT en ST-1 de FEP y ST-2 de FEP.

Las líneas celulares ST-1 y ST-2 de FEP se analizaron para determinar su capacidad para soportar la replicación del Herpesvirus del pavo (HVT). En primer lugar, utilizando un ensayo de inmunofluorescencia (IF), se demostró que la ST-1 de FEP puede infectarse con HVT y soportar la replicación del HVT. Se infectaron células ST-1 de FEP con HVT y se fijaron para ensayo IF después, 72, 96 y 120 horas. En todos los momentos indicados pudieron observarse focos positivos a HVT en células ST-1 de FEP infectadas con HVT, lo que indicaba que las células ST-1 de FEP podían infectarse con HVT y soportar la propagación del HVT célula a célula (datos no mostrados).

En un segundo experimento, se comparó la eficacia de la infección con HVT y la propagación célula a célula entre las células ST-1 y ST-2 de FEP. Tanto la ST-1 como la ST-2 de FEP se infectaron con HVT y se fijaron a diferentes momentos para estudiar los parámetros cinéticos de la replicación del HVT en estas líneas celulares. Había focos positivos a HVT en ambas líneas celulares después de 24, 48 y 72 horas y el número y tamaño de los focos aumentó con el tiempo (datos no mostrados). A partir de estos experimentos se constató que en ST-2 de FEP en comparación con ST-1 de FEP, se observaba un mayor número de focos de HVT y también que eran más grandes. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que las células ST-2 de FEP eran un mejor sustrato para la replicación del HVT que las ST-1 de FEP.

A continuación, se examinaron más detalladamente los parámetros cinéticos de la replicación de HVT en la línea ST-2 de FEP. Para determinar el número de unidades formadoras de placas (UFP) por ml (Fig. 7), células ST-2 de FEP se infectaron con HVT y se tomaron muestras 72, 96, 120 y 144 horas después de la infección. Estos resultados indican que el HVT se replica en las células ST-2 de FEP, y aunque las diferencias en el título entre diferentes tiempos de recogida eran pequeñas, los títulos de virus parecían aumentar aproximadamente 96 horas después de la infección (Fig. 7).

Pueden efectuarse pases del HVT en células ST-2 de FEP.

Después, se estableció que ST-2 de FEP es un sustrato para la infección y replicación del HVT, se examinó si las células ST-2 de FEP infectadas con HVT podían infectar monocapas recientes de células ST-2 de FEP. Células ST-2 de FEP se infectaron con HVT, se recogieron después de 96 horas y se sembraron en una monocapa de células ST-2 de FEP reciente. Este procedimiento se repitió 4 veces y cada pase de células se fijó para tinción mediante ensayo IF y se tomaron muestras para determinar el número de UFP/ml. La tinción por IF demostró que había focos positivos a HVT después de cada pase y que después del cuarto pase se observaba un gran número de focos claros de HVT (datos no mostrados). La titulación mostró que los títulos del HVT en el pase 2 era ligeramente inferiores en comparación con los títulos del pase 1 (Fig. 8). Sin embargo, pases posteriores en células ST-2 de FEP dieron como resultado un aumento en los títulos del HVT con cada pase y en el pase 5 los títulos del HVT fueron $10^{5.7}$ UFP/ml. Esto demuestra claramente que la línea celular ST-2 de FEP es un sustrato adecuado para replicación del HVT.

La ST-2 de FEP es un sustrato para la replicación de construcciones de HVT recombinantes.

El HVT también puede utilizarse como un vector vírico para la expresión de antígenos, por ejemplo de otros virus aviares tales como el virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa

(IBDV) o el virus de Laringotraqueitis Infecciosa (ILT) (Iqbal, 2012). Para analizar si las células ST-2 de FEP también permitían la replicación de construcciones de HVT recombinantes, células ST-2 de FEP se infectaron con HVT natural, un HVT recombinante que expresaba tanto un antígeno F del NDV como un antígeno VP2 del IBDV (HVT-NDV-IBDV) o con un HVT recombinante que expresaba un antígeno gD/gI del virus de la ILT (HVT-ILT). Las células se fijaron para tinción con IF o las células se recogieron para preparar muestras para la titulación 96 horas después de infección. La tinción con IF demostró claramente focos tanto del HVT natural como de construcciones de HVT recombinantes en células ST-2 de FEP (datos no mostrados). La titulación de las muestras también demostró que las células ST-2 de FEP soportaban la replicación de construcciones de HVT recombinantes (Fig. 9) aunque en las condiciones utilizadas, la replicación de los HVT recombinantes es menos eficaz que la replicación del HVT natural.

Listado de referencias

Iqbal, M. (2012). Progress toward the development of polyvalent vaccination strategies against multiple viral infections in chickens using herpesvirus of turkeys as vector. *Bioengineered*. 3, 222-226.

Venkatesan, R.N. y Price, C. (1998). Telomerase expression in chickens: constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 14763-14768.

Willemsse, M.J., Strijdveen, I.G., van Schooneveld, S.H., van den Berg, M.C., y Sondermeijer, P.J. (1995). Transcriptional analysis of the short segment of the feline herpesvirus type 1 genome and insertional mutagenesis of a unique reading frame. *Virology* 208, 704-711.

Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., y Bradley, A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat. Methods* 6, 363-369.

Yusa, K., Zhou, L. Li, M.A., Bradley, a. y Craig, N.L. (2011). A hyperactive piggyback transposase for mammalian applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1531-1536.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Intervet International B.V.

<120> Fibroblastos de embrión de pollo inmortalizados

<130> 23892

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 1

ggcgagatct accatggata aagttttaaa cag

33

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 2

ggcgctcgag ttatgtttca ggttcagggg

30

<210> 3

<211> 55

<212> ADN

ES 2 700 147 T3

Ser Ala Lys Val Asn Phe Gln Ala Gly Arg Gln Ile Ser Thr Val Thr
 275 280 285

Ala Arg Leu Glu Lys Gln Ser Cys Ser Ser Leu Cys Leu Pro Ala Arg
 290 295 300

Ala Pro Ser Leu Lys Arg Lys Arg Asp Gly Glu Gln Val Glu Ile Thr
 305 310 315 320

Ala Lys Arg Val Lys Ile Met Glu Lys Glu Ile Glu Glu Gln Ala Cys
 325 330 335

Ser Ile Val Pro Asp Val Asn Gln Ser Ser Ser Gln Arg His Gly Thr
 340 345 350

Ser Trp His Val Ala Pro Arg Ala Val Gly Leu Ile Lys Glu His Tyr
 355 360 365

Ile Ser Glu Arg Ser Asn Ser Glu Met Ser Gly Pro Ser Val Val His
 370 375 380

Arg Ser His Pro Gly Lys Arg Pro Val Ala Asp Lys Ser Ser Phe Pro
 385 390 395 400

Gln Gly Val Gln Gly Asn Lys Arg Ile Lys Thr Gly Ala Glu Lys Arg
 405 410 415

Ala Glu Ser Asn Arg Arg Gly Ile Glu Met Tyr Ile Asn Pro Ile His
 420 425 430

Lys Pro Asn Arg Arg Gly Ile Glu Arg Arg Ile Asn Pro Thr His Lys
 435 440 445

Pro Glu Leu Asn Ser Val Gln Thr Glu Pro Met Glu Gly Ala Ser Ser
 450 455 460

Gly Asp Arg Lys Gln Glu Asn Pro Pro Ala His Leu Ala Lys Gln Leu
 465 470 475 480

Pro Asn Thr Leu Ser Arg Ser Thr Val Tyr Phe Glu Lys Lys Phe Leu
 485 490 495

Leu Tyr Ser Arg Ser Tyr Gln Glu Tyr Phe Pro Lys Ser Phe Ile Leu
 500 505 510

Ser Arg Leu Gln Gly Cys Gln Ala Gly Gly Arg Arg Leu Ile Glu Thr
 515 520 525

ES 2 700 147 T3

Ile Phe Leu Ser Gln Asn Pro Leu Lys Glu Gln Gln Asn Gln Ser Leu
530 535 540

Pro Gln Gln Lys Trp Arg Lys Lys Arg Leu Pro Lys Arg Tyr Trp Gln
545 550 555 560

Met Arg Glu Ile Phe Gln Lys Leu Val Lys Asn His Glu Lys Cys Pro
565 570 575

Tyr Leu Val Phe Leu Arg Lys Asn Cys Pro Val Leu Leu Ser Glu Ala
580 585 590

Cys Leu Lys Lys Thr Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ala Leu Pro Gly Glu
595 600 605

Ala Lys Val His Lys His Thr Glu His Gly Lys Glu Ser Thr Glu Gly
610 615 620

Thr Ala Pro Asn Ser Phe Leu Ala Pro Pro Ser Val Leu Ala Cys Gly
625 630 635 640

Gln Pro Glu Arg Gly Glu Gln His Pro Ala Glu Gly Ser Asp Pro Leu
645 650 655

Leu Arg Glu Leu Leu Arg Gln His Ser Ser His Trp Gln Val Tyr Gly
660 665 670

Phe Val Arg Glu Cys Leu Glu Arg Val Ile Pro Ala Glu Leu Trp Gly
675 680 685

Ser Ser His Asn Lys Cys Arg Phe Phe Lys Asn Val Lys Ala Phe Ile
690 695 700

Ser Met Gly Lys Tyr Ala Lys Leu Ser Leu Gln Gln Leu Met Trp Lys
705 710 715 720

Met Arg Val Asn Asp Cys Val Trp Leu Arg Leu Ala Lys Gly Asn His
725 730 735

Ser Val Pro Ala Tyr Glu His Cys Tyr Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys
740 745 750

Phe Leu Tyr Trp Leu Met Asp Ser Tyr Val Ile Glu Leu Leu Lys Ser
755 760 765

Phe Phe Tyr Ile Thr Glu Thr Met Phe Gln Lys Asn Met Leu Phe Tyr
770 775 780

ES 2 700 147 T3

Tyr Arg Lys Phe Ile Trp Gly Lys Leu Gln Asn Ile Gly Ile Arg Asp
 785 790 795 800
 His Phe Ala Lys Val His Leu Arg Ala Leu Ser Ser Glu Glu Met Glu
 805 810 815
 Val Ile Arg Gln Lys Lys Tyr Phe Pro Ile Ala Ser Arg Leu Arg Phe
 820 825 830
 Ile Pro Lys Met Asn Gly Leu Arg Pro Val Val Arg Leu Ser Arg Val
 835 840 845
 Val Glu Gly Gln Lys Leu Ser Lys Glu Ser Arg Glu Lys Lys Ile Gln
 850 855 860
 Arg Tyr Asn Thr Gln Leu Lys Asn Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu
 865 870 875 880
 Arg Thr Val Asn Thr Ser Ile Ile Gly Ser Ser Val Phe Gly Arg Asp
 885 890 895
 Asp Ile Tyr Arg Lys Trp Lys Glu Phe Val Thr Lys Val Phe Glu Ser
 900 905 910
 Gly Gly Glu Met Pro His Phe Tyr Phe Val Lys Gly Asp Val Ser Arg
 915 920 925
 Ala Phe Asp Thr Ile Pro His Lys Lys Leu Val Glu Val Ile Ser Gln
 930 935 940
 Val Leu Lys Pro Glu Ser Gln Thr Val Tyr Gly Ile Arg Trp Tyr Ala
 945 950 955 960
 Val Ile Met Ile Thr Pro Thr Gly Lys Ala Arg Lys Leu Tyr Lys Arg
 965 970 975
 His Val Ser Thr Phe Glu Asp Phe Ile Pro Asp Met Lys Gln Phe Val
 980 985 990
 Ser Lys Leu Gln Glu Arg Thr Ser Leu Arg Asn Ala Ile Val Val Glu
 995 1000 1005
 Gln Cys Leu Thr Phe Asn Glu Asn Ser Ser Thr Leu Phe Thr Phe
 1010 1015 1020
 Phe Leu Gln Met Leu His Asn Asn Ile Leu Glu Ile Gly His Arg

ES 2 700 147 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|--|
| 1025 | | | | | | 1030 | | | | | | 1035 | | | |
| Tyr | Tyr | Ile | Gln | Cys | Ser | Gly | Ile | Pro | Gln | Gly | Ser | Ile | Leu | Ser | |
| 1040 | | | | | | 1045 | | | | | 1050 | | | | |
| Thr | Leu | Leu | Cys | Ser | Leu | Cys | Tyr | Gly | Asp | Met | Glu | Asn | Lys | Leu | |
| 1055 | | | | | | 1060 | | | | | 1065 | | | | |
| Leu | Cys | Gly | Ile | Gln | Lys | Asp | Gly | Val | Leu | Ile | Arg | Leu | Ile | Asp | |
| 1070 | | | | | | 1075 | | | | | 1080 | | | | |
| Asp | Phe | Leu | Leu | Val | Thr | Pro | His | Leu | Met | Gln | Ala | Arg | Thr | Phe | |
| 1085 | | | | | | 1090 | | | | | 1095 | | | | |
| Leu | Arg | Thr | Ile | Ala | Ala | Gly | Ile | Pro | Glu | Tyr | Gly | Phe | Leu | Ile | |
| 1100 | | | | | | 1105 | | | | | 1110 | | | | |
| Asn | Ala | Lys | Lys | Thr | Val | Val | Asn | Phe | Pro | Val | Asp | Asp | Ile | Pro | |
| 1115 | | | | | | 1120 | | | | | 1125 | | | | |
| Gly | Cys | Ser | Lys | Phe | Lys | His | Leu | Pro | Asp | Cys | Arg | Leu | Ile | Ser | |
| 1130 | | | | | | 1135 | | | | | 1140 | | | | |
| Trp | Cys | Gly | Leu | Leu | Leu | Asp | Val | Gln | Thr | Leu | Glu | Val | Tyr | Cys | |
| 1145 | | | | | | 1150 | | | | | 1155 | | | | |
| Asp | Tyr | Ser | Ser | Tyr | Ala | Phe | Thr | Ser | Ile | Arg | Ser | Ser | Leu | Ser | |
| 1160 | | | | | | 1165 | | | | | 1170 | | | | |
| Phe | Asn | Ser | Ser | Arg | Ile | Ala | Gly | Lys | Asn | Met | Lys | Cys | Lys | Leu | |
| 1175 | | | | | | 1180 | | | | | 1185 | | | | |
| Thr | Ala | Val | Leu | Lys | Leu | Lys | Cys | His | Pro | Leu | Leu | Leu | Asp | Leu | |
| 1190 | | | | | | 1195 | | | | | 1200 | | | | |
| Lys | Ile | Asn | Ser | Leu | Gln | Thr | Val | Leu | Ile | Asn | Ile | Tyr | Lys | Ile | |
| 1205 | | | | | | 1210 | | | | | 1215 | | | | |
| Phe | Leu | Leu | Gln | Ala | Tyr | Arg | Phe | His | Ala | Cys | Val | Leu | Gln | Leu | |
| 1220 | | | | | | 1225 | | | | | 1230 | | | | |
| Pro | Phe | Asn | Gln | Lys | Val | Arg | Asn | Asn | Pro | Asp | Phe | Phe | Leu | Arg | |
| 1235 | | | | | | 1240 | | | | | 1245 | | | | |
| Ile | Ile | Ser | Asp | Thr | Ala | Ser | Cys | Cys | Tyr | Phe | Ile | Leu | Lys | Ala | |
| 1250 | | | | | | 1255 | | | | | 1260 | | | | |

ES 2 700 147 T3

Lys Asn Pro Gly Val Ser Leu Gly Ser Lys Asp Ala Ser Gly Met
1265 1270 1275

Phe Pro Phe Glu Ala Ala Glu Trp Leu Cys Tyr His Ala Phe Ile
1280 1285 1290

Val Lys Leu Ser Asn His Lys Val Ile Tyr Lys Cys Leu Leu Lys
1295 1300 1305

Pro Leu Lys Val Tyr Lys Met His Leu Phe Gly Lys Ile Pro Arg
1310 1315 1320

Asp Thr Met Glu Leu Leu Lys Thr Val Thr Glu Pro Ser Leu Cys
1325 1330 1335

Gln Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
1340 1345

REIVINDICACIONES

- 5 1. Fibroblasto de embrión de pollo (FEP) inmortalizado y transfectado de manera estable, **caracterizado por que** dicho FEP inmortalizado expresa un antígeno T del SV40, expresa telomerasa de pollo (cTERT) bajo el control de un promotor heterólogo y no comprende ADN exógeno retrovítico con Repeticiones Terminales Largas.
2. Cultivo celular que comprende FEP inmortalizado de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 2 **caracterizado por que** el cultivo celular está infectado con un virus aviar o un vector vírico aviar.
- 15 4. Cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 3 **caracterizado por que** el virus aviar o el vector vírico aviar se seleccionan del grupo que consiste en el virus de la Enfermedad de Marek (MDV), el Herpesvirus del pavo (HVT) relacionado con el MDV, el virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), el virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa (IBDV), el virus del Síndrome de la Caída de la Puesta (EDSV), virus de la Rinotraqueitis del Pavo (TRT), Reovirus (RV) y un vector de HVT que comprende un gen de VP2 del IBDV, un gen de la proteína espiga del IBV, un gen de HA de la gripe aviar, un gen de la proteína gD/gI del virus de la ILT o un gen de F del NDV.
- 20 5. Método para la preparación de un FEP inmortalizado de acuerdo con reivindicación 1 **caracterizado por que** dicho método comprende las etapas de
- 25 a) obtener células de FEP primarias,
b) transfectar dichas FEP primarias con
- 30 1) una molécula de ADN que carece de secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones y que comprende un gen que codifica al antígeno T de SV40 bajo el control de un promotor adecuado,
2) una molécula de ADN que carece de secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones y que comprende un gen que codifica la telomerasa de pollo; cTERT bajo el control de un promotor heterólogo y
3) una molécula de ADN que comprende un gen que codifica la transposasa bajo el control de un promotor adecuado.
- 35 c) seleccionar células de FEP que se hayan cultivado durante al menos 45 ciclos celulares.
6. Método para la preparación de un FEP inmortalizado de acuerdo con reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho método comprende las etapas de
- 40 a) obtener células de FEP primarias,
b) transfectar dichas células de FEP primarias con una sola molécula de ADN que carece de secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones y que comprende tanto un gen que codifica al antígeno T de SV40 bajo el control de un promotor adecuado como un gen que codifica la telomerasa de pollo bajo el control de un promotor heterólogo y que comprende un gen que codifica la transposasa bajo el control de un promotor adecuado,
45 c) seleccionar células de FEP que se hayan cultivado durante al menos 45 ciclos celulares.
7. Método para la preparación de un FEP inmortalizado de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado por que** dicho método comprende las etapas de
- 50 a) obtener células de FEP primarias,
b) transfectar dichas células FEP primarias con
- 55 1) una molécula de ADN que carece de secuencias LTR, que comprende repeticiones invertidas de transposones, que comprende tanto un gen que codifica al antígeno T de SV40 bajo el control de un promotor adecuado como un gen que codifica la telomerasa de pollo bajo el control de un promotor heterólogo y con
2) una molécula de ADN que comprende un gen que codifica la transposasa bajo el control de un promotor adecuado.
- 60 c) seleccionar células de FEP que se hayan cultivado durante al menos 45 ciclos celulares.
8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, **caracterizado por que** en la etapa c) se seleccionan células que se han cultivado durante al menos 100 ciclos celulares.
- 65 9. Método para la replicación de un virus o un vector vírico aviar, comprendiendo dicho método las etapas de

- a) cultivar un FEP inmortalizado de acuerdo con la reivindicación 1,
- b) poner en contacto el FEP inmortalizado con el virus aviar o el vector vírico aviar
- c) permitir que el virus aviar o el vector vírico aviar se repliquen y
- d) aislar el virus descendiente.

- 5
10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** el virus aviar o el vector vírico aviar se seleccionan del grupo de virus aviares que consiste en el virus de la Enfermedad de Marek (MDV), el Herpesvirus de pavo (HVT) relacionado con el MDV, el virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), el virus de la Enfermedad de la Bursitis Infecciosa (IBDV), el virus del Síndrome de la Caída de la Puesta (EDSV), el virus de la Rinotraqueitis del Pavo (TRT), Reovirus (RV) y un vector de HVT que comprende un gen de VP2 del IBDV, un gen de la proteína espiga del IBV, un gen de HA de la gripe aviar, un gen de la proteína gD/gI del virus de la ILT o un gen de F del NDV.
- 10
11. Método de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** dichos virus aviar o vector vírico aviar se seleccionan del grupo de virus aviares que consisten en MDV y virus de vectores de MDV.
- 15
12. Método para la preparación de una vacuna que comprende un virus aviar o un vector vírico aviar, **caracterizado por que** el método comprende la etapa de mezclar un cultivo celular de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4 con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20
13. Método de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado por que** el virus aviar o un vector vírico aviar son un MDV.
- 25
14. Método de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado por que** en la vacuna el MDV o el vector vírico de MDV están en una forma atenuada viva.
- 30
15. Vacuna que comprende un cultivo celular de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35
16. Método para la preparación de una vacuna que comprende un virus aviar o un vector vírico aviar, **caracterizado por que** el método comprende las etapas de:
- a) infectar un cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 2, con un virus aviar o un vector vírico aviar
 - b) replicar dicho virus aviar o un vector vírico aviar
 - c) aislar el virus descendiente
 - d) mezclar el virus descendiente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1A

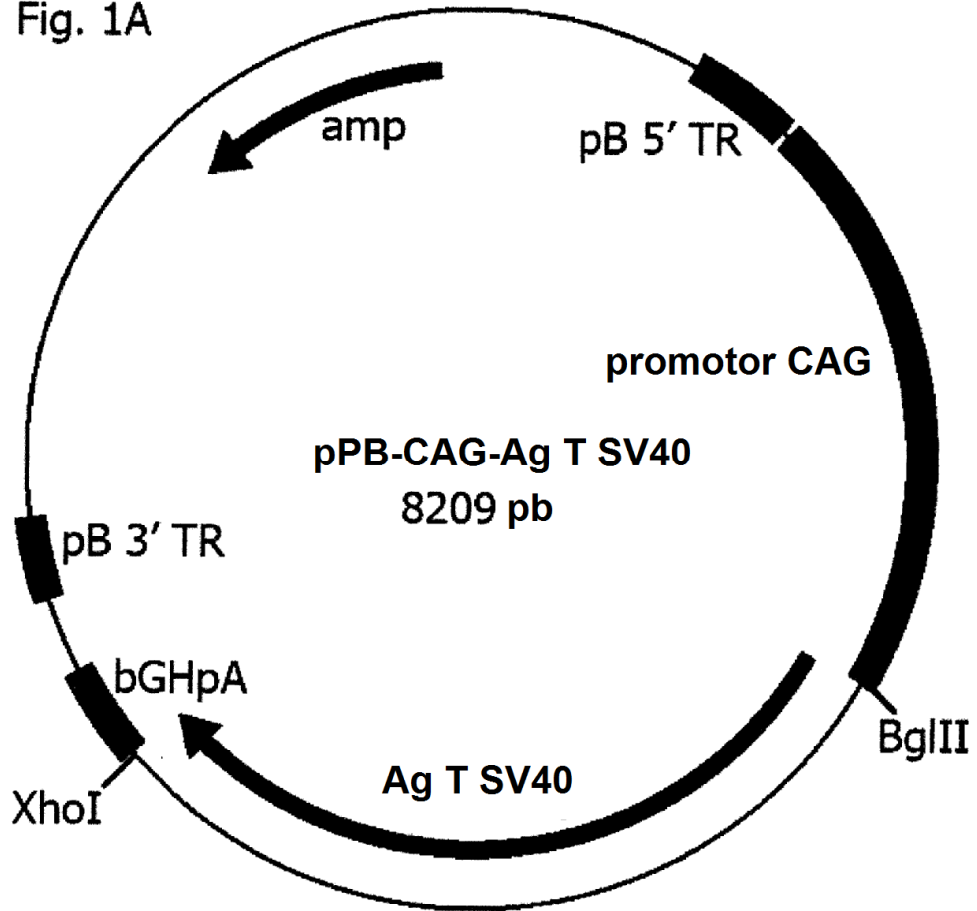
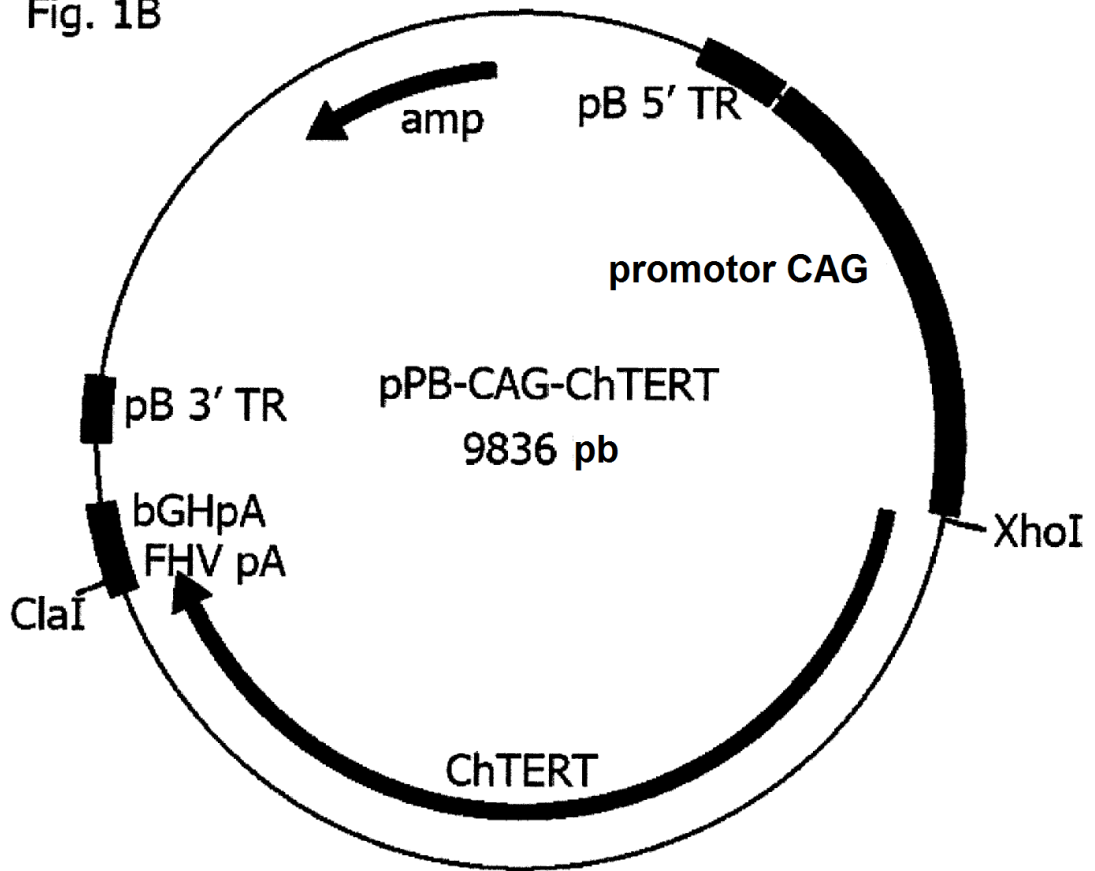


Fig. 1B



MERGAQPGVGVRRRLRNVAREEPFAAVL GALRGCYAEATPLEAFVRRRLQEGGTGEVEVLRG
DDAQCYRTFVSQCVCVPRGARAI PRPICFQQLSSQSEVITRIVQRLCEKKKKNILAYGY
SLLDENSCHFRVLPSSCIYSYLSNTVTETIRISGLWEILLSRIGDDVMMYLLEHCALFML
VPPSNCYQVCGQPIYELISRN VGPSPGFVRRRYSRFKHN SLLDYVRKRLVFHRHYLSKSQ
WWWKCRPRRRGRVSSRRKRRSHRIQSLRSGYQPSAKVNFQAGRQISTVTARLEKQSCSSLC
LPARAPSLKRKR DGEQVEITAKRVKIMEKEIEEQACSIVPDVNQSSSQRHGTSWHVAPRA
VGLIKEHYISERSNSEMSGSPSVHRSHPGKRPVADKSSFQGVQGNKRIKTGAEKRAESN
RRGIEMYINPIHKPNRRGIERRINPTHKPELNSVQTEPMEGASSGDRKQENPPAHLAKQL
PNTLSRSTVYFEKKFLLYSRSYQEYFPKSFILSRLQGCQAGGRRIETIFLSQNPLKEQQ
NQSLPQQKWRKRLPKRYWQMREIFQKLVKNHEKCPYLVFLRKNCPVLLSEACLKKTTEL
LQAALPGEAKVHKHTEHGKESTEGTAPNSFLAPPSVLACGQPERGEQHPAEGSDPLLREL
LRQHSSHWQVYGVFRECLERVIPAE LWGSSHNKCRFFKNVKAFISMGKYAKLSLQQLMWK
MRVNDVCVWLRLAKGNHSPAYEH CYREEILAKFLYWLMDSYVIELLKSFFYITETMFQKN
MLFYRKFIVGKLNIGIRDHFAKVHLRALSSEEMEVIROKKYFPIASRLRFIPKMNGLR
PVVRLSRVVEGQKLSKESREKKIQRYNTQLKNLFSVLNYERTVNTSIIIGSSVFRDDIYR
KWKEFVTKVFESGGEMPHFYFVKGDVSRAFDTIPHKKLVEVISQVLKPESTVYVYRIRWYA
VIMITPTGKARKLYKRHVSTFEDFIPDMKQFVSKLQERTSLRNAIVVEQCLTFNENSSTL
FTFFLQMLHNNILEIGHRYIIQCSGIPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLLCGIQKDGVLIR
LIDDFLLVTPHLMQARTFLRTIAAGIPEYGF LINAKKTVVNFVDDIPGCSKFKHLPDCR
LISWGCLLLDVQTLEVYCDYSSYAFTSIRSSLSFNSSRIAGKNMKCKLTAVLKLKCHPLL
LDLKINSLQTVLINIYKIFLLQAYRFHACVLQLPFNQKVRNNDFFLRIISDTASCCYFI
LKAKNPGVSLGSKDASGMFPFEAAEWLCYHAFIVKLSNHKVIYKCLLKPLKVYKMHLFGK
IPRDTMELLKTVTEPSLCQDFKTILD*

Figura 2.

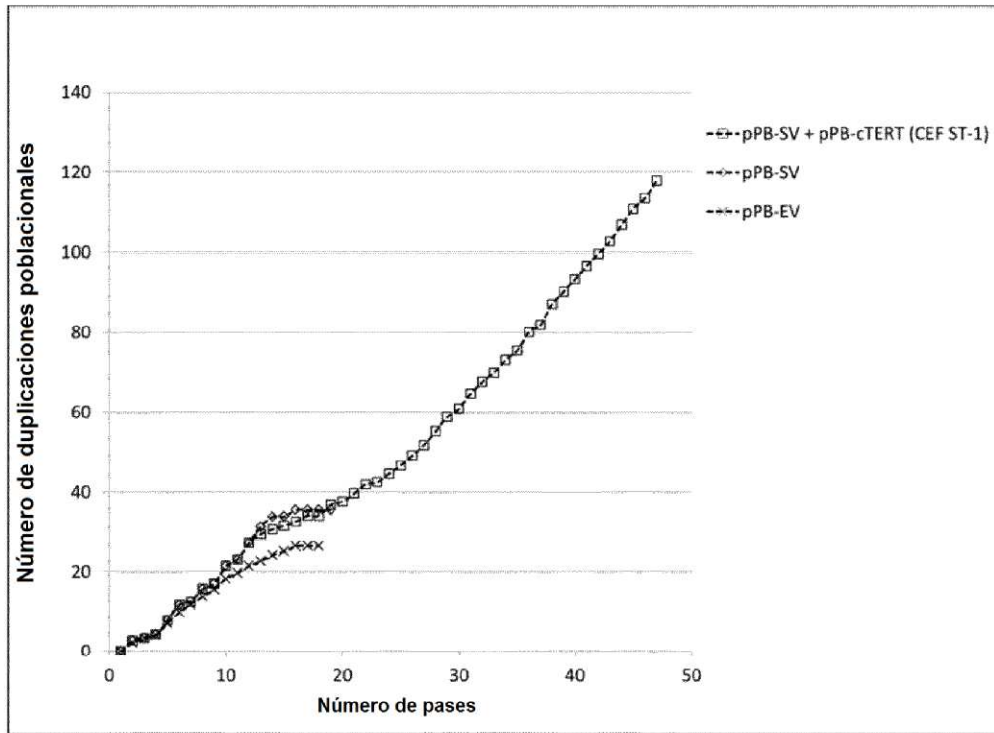


Figura 3.



Figura 4.

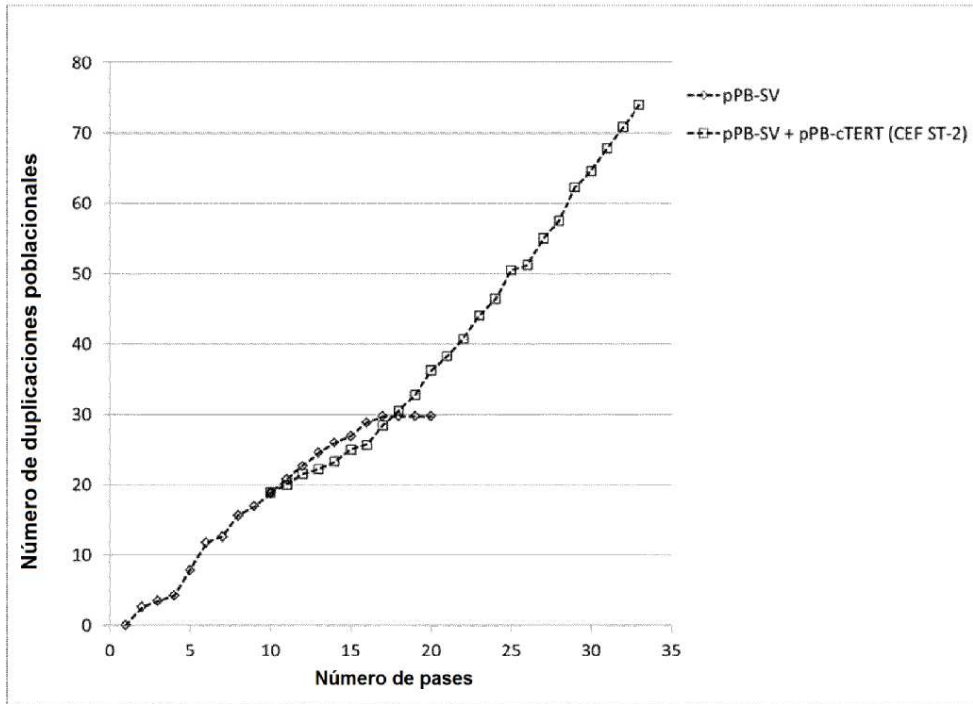


Figura 5.

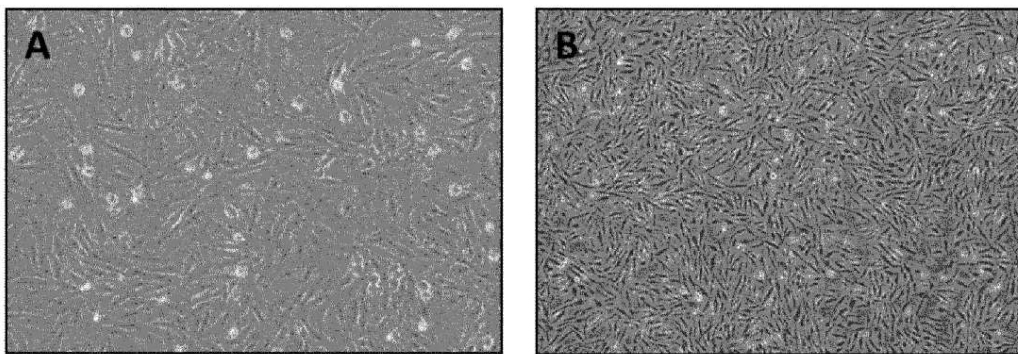


Figura 6.

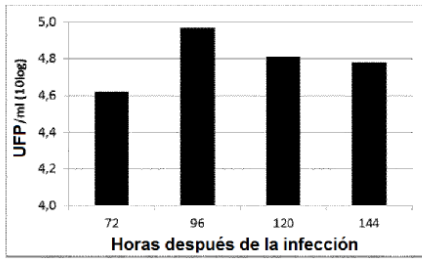


Figura 7.

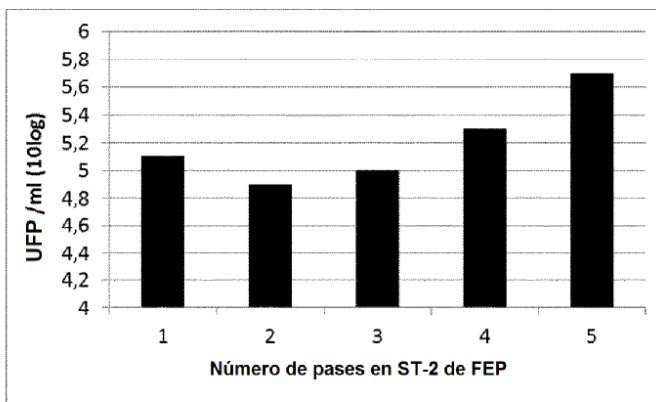


Figura 8.

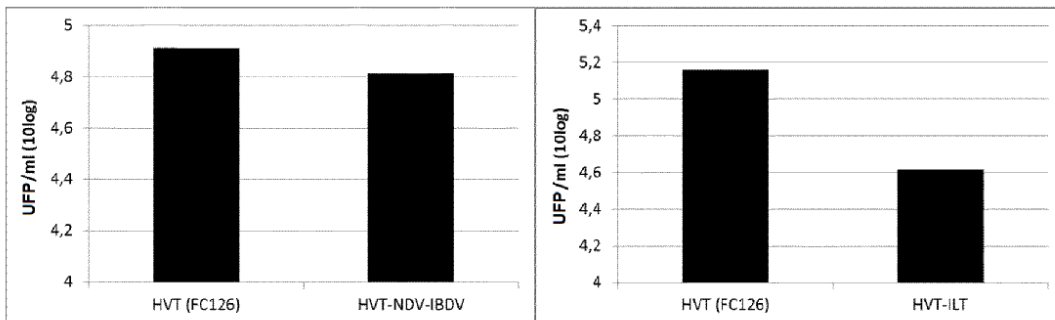


Figura 9.