

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 952**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2014 PCT/GB2014/051693**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195692**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2014 E 14734210 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 3004333**

54 Título: **Células aviares para producción de virus mejorada**

30 Prioridad:

05.06.2013 GB 201310031

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

17.07.2019

73 Titular/es:

**THE PIRBRIGHT INSTITUTE (100.0%)
Ash Road, Pirbright, Woking
Surrey GU24 0NF, GB**

72 Inventor/es:

**FIFE, MARK y
GIBSON, MARK**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 719 952 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

Células aviares para producción de virus mejorada

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una célula aviar en la que la expresión y/o actividad de al menos una proteína transmembranal inducida por interferón (IFITM) se reduce.

10 Antecedentes de la invención

La prevención y control de infección y enfermedad virales representan un desafío continuo para tanto la medicina clínica como veterinaria. Como tales, los métodos para reducir la incidencia y severidad de enfermedades virales permanecen al frente de la investigación médica y biotecnológica.

15 La estrategia más común que se utiliza actualmente para el control de infección y enfermedad virales es un método de vacunación. Las vacunas pueden comprender virus inactivados o productos purificados que se han tratado con químicos tales como aziridina, por ejemplo, etilenimina binaria (BEI). Vacunas alternativas pueden comprender, virus vivos, atenuados que se han cultivado en condiciones que conducen a una pérdida de virulencia mientras que retienen inmunogenicidad. Por ejemplo, el virus que causa enfermedad puede ser pasado a través de una serie de cultivos celulares o embriones animales hasta un punto en el que resulta lo suficientemente deficiente para replicarse en sus células diana de manera que puede usarse como una vacuna. En este punto el virus ha perdido virulencia pero continúa siendo inmunogénico y capaz de estimular una respuesta inmune.

25 Los huevos de pollo embrionados y fibroblastos embrionarios de pollo primarios (CEF) se usan comúnmente para la fabricación de vacunas virales humanas y veterinarias, incluyendo vacunas tradicionales de gran volumen tales como vacunas contra la influenza o Enfermedad de Newcastle así como también vectores virales recombinantes más modernos para vacunas (por ejemplo, poxvirus), huevos de pollo embrionados y CEFs se usan para pasar virus con el fin de generar virus atenuados no virulentos. Ejemplos de vacunas que utilizan virus atenuados incluyen la vacuna contra el sarampión, vacuna contra las paperas, vacuna contra la rubeola, vacuna oral contra la poliomielitis (Sabin) y vacuna contra la fiebre amarilla.

35 La carga mundial de enfermedades virales tanto en la salud humana como animal da como resultado una necesidad de producción en masa de virus inactivados y atenuados para uso en vacunas. De manera adicional, el brote de pandemias estacionales, por ejemplo, de influenza, requiere de la producción de una gran cantidad de virus en un período de tiempo breve. De hecho, la disponibilidad mundial de una vacuna contra el virus de la influenza que sea efectiva de manera terapéutica durante una pandemia continúa siendo un desafío principal para la industria biofarmacéutica.

40 Una cuestión actual que impacta el uso de huevos de pollo embrionados y CEFs en la producción de virus para vacunas consiste en el tiempo que se necesita para generar la gran cantidad de virus que se requiere. Además, una desventaja en cuanto al uso de virus atenuados, vivos en vacunas consiste en la duración del tiempo que se necesita para alcanzar un número suficiente de pases en una célula huésped con el fin de generar un virus atenuado. El virus vaccinia Ankara modificado altamente atenuado (MVA), por ejemplo, que sirve como una vacuna candidata para inmunizar contra enfermedades infecciosas y cáncer, requiere más de 500 pases en CEFs para generar un MVA atenuado que ha perdido una parte sustancial de las secuencias de codificación de genoma y demuestra una restricción severa de replicación en células mamíferas. De manera adicional, las restricciones de la frecuencia de pases de virus en células huésped pueden servir como una etapa limitante que influye en la producción de virus y rendimiento.

50 Existe, de este modo, una necesidad de métodos que aumenten el rendimiento y eficiencia de producción de ya sea virus inactivados como atenuados en sistemas tales como huevos de pollo embrionados y CEFs para la producción de vacunas.

55 Descripción de las figuras

60 Figura 1: La arquitectura de locus de chIFITM y alineamientos de secuencias múltiples. El grupo de genes de IFITM en Gga5 se encuentra bordeado por ATHL1 y B4GALNT4. Esta región es sinténica con el grupo de genes de IFITM en Hs11 (A). Un alineamiento de ortólogos de pollo, chimpancé y humano se llevó a cabo usando ClustalW y refinamiento de alineamiento manual y se anotaron usando BioEdit. Las columnas de color muestran residuos que se comparten entre todas las 9 secuencias de IFITM. Residuos significativos se han resaltado con un símbolo por debajo de la secuencia: Δ - Tirosina; O - cisteína doble; * - Fenilalanina importante para multimerización; ↑ - lisina ubiquitinada conservada. IM1 (Intramembrana 1), CIL (bucle intracelular conservado), IM2 (intramembrana 2).

Figura 2: Infección de células A549 con un rango de virus pseudotipeados con ya sea envolturas de glicoproteína de tyssavirus (CVS; virus estándar de desafío (virus Rabies), MHK; virus Mokola y RV1; virus del murciélago de Lagos) o envolturas de hemaglutinina de influenza (H1 (humana), H4 (ave) y H5 (humana), H7 (ave), H10 (ave).

5 Figura 3: Localización celular de proteínas IFITM sobreexpresadas en células A549.

Figura 4: (A) El log de cambio de proporción en la expresión de chIFITM3 en células de pollo DF-1 después de estimulación con IFN- γ , (B) porcentaje de reducción de expresión de chIFITM3 con ARNip específico con respecto a chIFITM3 (CH) o un ARNip desorganizado (NS), (C) infección de células DF-1 con virus de influenza A (A/WSN/1933 (WSN/33)), que se mide mediante citometría de flujo usando un anticuerpo contra nucleoproteína (NP). La preincubación con un ARNip específico con respecto a chIFITM3 (CH) o un ARNip desorganizado (NS) se usó en todos los casos. Las barras de error representan la desviación estándar a través de cada condición que se llevó a cabo por triplicado.

10 15 Figura 5: Expresión diferencial de transcripciones de IFITM de pollo en un panel de tejido.

Figura 6: Células A549 que expresan diferentes niveles de proteína chIFITM3 mediante western blot de la etiqueta HA (B) restringen la replicación de un lentivirus pseudotipeado con la envoltura de glicoproteína de virus del murciélago de Lagos (LBV) de acuerdo con el nivel de proteína expresada (A).

Figura 7: La IFITM3 de pollo tiene una actividad antiviral en células de pollo DF-1. El nivel de expresión y log de cambio de proporción de chIFITM3 se midieron usando RT-PCR cuantitativa después de estimulación con IFN- α y IFN- γ después de preincubación con un ARNip no dirigido o uno específico para chIFITM3 (A). El efecto de reducir la expresión de chIFITM3 endógeno en células DF-1 infectadas con virus de influenza A (A/WSN/1933 [WSN/33]) se midió mediante citometría de flujo usando un anticuerpo contra nucleoproteína (NP) (B), $P=0,01$, Prueba t de Student. Las células DF-1 transfectadas con chIFITM3-HA se infectaron mediante WSH. La expresión de HA y NP se detectó mediante citometría de flujo (C y D), y titulaciones virales se midieron mediante PFU (E). Las barras de error representan desviaciones estándares a través de cada condición que se llevó a cabo por triplicado.

20 25 30 Sumario de aspectos de la invención

La familia de proteínas transmembranales inducidas por interferón (IFITM) constituye una familia de genes estimulados por interferón que restringen la replicación de varios virus humanos altamente patogénicos, incluyendo coronavirus SARS, filovirus (virus de Marburgo y virus del Ebola), virus de la influenza A y flavivirus (virus del Dengue). A pesar de que el locus de IFITM, que incluye *IFITM1*, *2*, *3* y *5*, se presenta en especies mamíferas, este locus no se ha identificado y caracterizado en especies aviares. Los presentes inventores han mostrado que el locus de IFITM existe en pollos e identifican secuencias de IFITM aviar nuevas que se asocian con una capacidad de inhibir la infección viral de una célula cuando se expresa en esa célula.

Estas secuencias de IFITM identificadas pueden facilitar métodos mejorados para el pase y propagación de virus en células huésped aviares. Pueden usarse además en métodos para la evaluación de animales aviares en cuanto a la resistencia con respecto a infecciones virales y para la selección de animales dentro de una población con resistencia aumentada con respecto a la infección viral.

De este modo, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una célula aviar que tiene expresión y/o actividad reducida de IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta en comparación con una célula de tipo salvaje equivalente no tratada o no modificada, en la que dicha célula aviar que tiene expresión y/o actividad reducida de uno o más de dicho polipéptido resulta más susceptible a infección viral en comparación con dicha célula de tipo salvaje equivalente no tratada o no modificada.

La célula puede haber reducido, además, la expresión de IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a de esta.

La célula aviar puede encontrarse dentro de un embrión aviar. La célula aviar puede derivar a partir de un embrión aviar. Por ejemplo, la célula aviar pueden ser una célula de fibroblasto embrionario de pollo (CEF).

La célula puede ser parte de un órgano, huevo, ave o cualquier otro animal.

La célula aviar puede comprender una versión mutante de IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante de secuencia con al menos el 90% de identidad con respecto a esta, en la que la versión mutante se asocia con una resistencia reducida a infección viral.

El genoma de la célula aviar puede carecer de secuencias de nucleótidos que codifican para IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta.

De manera alternativa, la expresión de IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta puede reducirse en la célula aviar mediante ARN de interferencia (ARNi).

5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para propagar un virus que comprende las siguientes etapas:

(i) transducción de una célula aviar de acuerdo con el primer aspecto de la invención con un virus; y,

10 (ii) pase de la célula con el fin de propagar el virus.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una vacuna que comprende las siguientes etapas:

15 (i) propagación de un virus de acuerdo con el método del segundo aspecto de la invención; y,

(ii) incorporación del virus propagado en una vacuna.

20 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para generar un virus atenuado que comprende las siguientes etapas:

(i) transducción de una célula aviar de acuerdo con el primer aspecto de la invención con un virus; y,

25 (ii) pase de la célula aviar de manera tal que el virus completa múltiples rondas de infección y se vuelve atenuado.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una vacuna que comprende las siguientes etapas:

30 (i) atenuación de un virus de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención;

(ii) propagación del virus atenuado; y,

(iii) incorporación del virus generado en (ii) en una vacuna.

35 En el método del quinto aspecto de la invención, la etapa (ii) puede realizarse de acuerdo con el método del segundo aspecto de la invención.

En el método de acuerdo con cualquiera de los aspectos segundo a quinto, el virus puede ingresar a través de endosomas ácidos.

40 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un animal aviar transgénico en la que la expresión o actividad de IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta se reduce, se atenúa o se bloquea.

45 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un animal aviar transgénico cuyas células germinales y células somáticas comprenden una versión heterogénea de una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta cuyo gen se introdujo en dicho animal, o un antepasado de dicho animal, en una etapa embrionaria.

50 En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un animal aviar transgénico en el que el número de copias de un gen que codifica IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta aumenta.

55 El animal transgénico de acuerdo con los aspectos sexto, séptimo u octavo de la invención puede ser un ave de corral doméstica. Por ejemplo, el animal transgénico puede ser un pollo.

En un noveno aspecto, la presente invención proporciona una célula aviar de acuerdo con el primer aspecto de la invención que deriva a partir de un animal aviar transgénico de acuerdo con el aspecto sexto, séptimo u octavo de la invención.

60 En un décimo aspecto, la presente invención se refiere a un método para investigar la resistencia innata de un animal aviar con respecto a infección viral que comprende la etapa de investigar la secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y/o investigar el número de copias de la secuencia de nucleótidos en el genoma.

En un undécimo aspecto, la presente invención proporciona un método para seleccionar un animal aviar que tiene resistencia a infección viral a partir de una pluralidad de animales aviares de la misma especie, que comprende las siguientes etapas:

5 (i) investigación de la secuencia de nucleótidos que codifica para una IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y/o el número de copias de la secuencia de nucleótidos en el genoma;

10 (ii) selección de un animal aviar que tiene una secuencia de nucleótidos de IFITM2 y/o un número de copias que se asocia con resistencia a infección viral.

La pluralidad de animales aviares puede exhibir variación genética y/o de número de copias en el locus de IFITM.

15 La infección viral puede medirse mediante un virus que ingresa a través de endosomas ácidos. Por ejemplo, la infección viral puede medirse mediante el virus de influenza aviar (AIV), Virus de Bronquitis Infecciosa (IBV), Virus de Enfermedad Infecciosa de la Bolsa (IBDV) o Virus de Enfermedad de Newcastle (NDV).

20 Se describe en la presente un método para prevenir o tratar una infección viral en un animal aviar que comprende la etapa de aumentar la expresión de uno o más de los siguientes polipéptidos, o un homólogo de estos: IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1); IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) y IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) en el animal.

Se describe en la presente, además, un polipéptido de IFTTM aviar que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 2 (IFITM2 de pollo) o variante u homólogo de este.

25 El polipéptido de IFTTM aviar puede comprender uno o más, o todos de los siguientes residuos de aminoácidos; Trp35, Ser36, Leu37, Arg64, Asp65, Asp71, Gly74, Ala75, Tyr78, Ala82, Lys83, Asn86 y Ile87 con referencia a la numeración de posición de aminoácidos dada en la SEQ ID No. 2.

30 Una variante o homólogo de polipéptido de IFTTM aviar puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de homología con respecto a la SEQ ID No. 2.

El polipéptido de IFTTM aviar puede inhibir, cuando se expresa en una célula, la infección viral de la célula.

35 Se describe en la presente, además, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación.

40 La identificación del locus de IFITM aviar facilita la capacidad de reducir la resistencia de células aviares que se usan para el pase de virus con respecto a infección viral. Esta resistencia reducida de las células huésped aviares con respecto a infección viral aumenta la tasa de infección del virus mejorando así la eficiencia del virus que pasa en células huésped aviares. La presente invención proporciona, de este modo, métodos para pasar virus en células aviares, por ejemplo, con el fin de producir virus para uso en vacunas y para generar virus atenuados.

45 De manera adicional, el control de patógenos es un componente clave para asegurar la seguridad alimentaria, constituyendo amenazas significativas ambos virus endémico y exótico, en particular para la industria avícola y pequeños productores avícolas. La identificación y caracterización del locus de IFITM aviar realizada por los presentes inventores proporcionará métodos mejorados para combatir enfermedades virales importantes de aves de corral, mejorando por lo tanto la seguridad alimentaria.

50 La identificación del locus de IFITM aviar facilitará la selección y cría de aves con resistencia aumentada a infección viral y permitirá la generación de animales transgénicos que expresan secuencias de IFTTM exógena con una resistencia aumentada a infecciones virales. Como tal, la presente invención proporciona estrategias y metodologías para aumentar la resistencia viral innata de bandadas de aves de corral y controlar, por lo tanto, la introducción y propagación de virus dentro de poblaciones de aves de corral y reducir la presente dependencia a los programas de vacunación.

55 Descripción detallada

IFITMs

60 La presente invención se refiere a polipéptidos de IFITM aviar.

65 Las proteínas transmembranales inducidas por interferón (IFITM) restringen los procesos de entrada y replicación de varios virus humanos altamente patogénicos, incluyendo coronavirus SARS, filovirus (virus de Marburgo y virus del Ebola), virus de la influenza A (IAV), flavivirus (virus del Dengue) y HIV-1. Su expresión se induce mediante interferones Tipo I y Tipo II y como tales se encuentran dentro de la categoría de genes estimulados por interferón (ISGs).

Las proteínas IFITM son pequeñas (~130aa) y comparten una topología común que se define mediante un dominio CD225 conservado. El dominio CD225 comprende dos regiones (IM) intramembrana (IM1 e IM2) y un bucle intracelular conservado (CIL) y se bordea mediante un dominio N-terminal y uno C-terminal.

5 En humanos, *IFITM1*, 2 y 3 se expresan en un amplio rango de tejidos, mientras que la expresión de *IFITM5* se limita a osteoblastos. Los ratones tienen ortólogos para *IFITM1*, 2, 3 y 5 y genes adicionales *Ifitm6* e *Ifitm7*.

10 Las proteínas IFITM inhiben la infección viral mediante el bloqueo de entrada citoplasmática y replicación de diversos virus envueltos. La restricción mediada por proteína IFITM ocurre en sitios de entrada de virus restringidos por IFITM en los componentes endosomales y lisosomales tardíos donde se prevé que las proteínas adoptan una estructura intramembrana. La restricción mediada por IFITM precede, por lo tanto, la replicación viral, aparentemente sin oportunidad para la síntesis de respuestas virales codificadas.

15 Las proteínas IFITM impiden la formación de un poro de fusión entre las membranas de virus y endosomales continuando con la activación ácida de proteínas de fusión de envoltura de virus. La capacidad de las proteínas IFITM para alterar las propiedades de membrana celular se han demostrado, lo que ha conducido a la detención de la formación de poro de fusión en la etapa de fusión de hemimembrana. La reducción de *fitm3* en células de ratón da como resultado una pérdida del 40%-70% del efecto de protección mediado por IFN contra el virus que ingresa por vía endosomal y una atenuación similar se detecta también en los ratones *IfitmDel*, añadiendo *Ifitm1*, 2, 3, 5 y 6. La evidencia clínica directa para participación de IFITM3 en restricción de virus se ha demostrado recientemente mediante una asociación entre las variantes de IFITM3 y el número de personas hospitalizadas con virus H1N1/09 de influenza pandémica o estacional.

25 El genoma de pollo contiene dos genes IFITM putativos en el cromosoma 5, los así denominados *IFITM5* (ENSGALG0000004239; cromosoma 5:1620304-1621805:1) e *IFITM10* (ENSGALG00000020497; cromosoma 5:15244061-15249351:1). El análisis previo del genoma de pollos, sobre la base de homología de secuencia de nucleótidos ha previsto la existencia de dos ortólogos de IFITMs adicionales con respecto al *IFITM1* humano (variante 1: XM_001233949.2; variante 2: XM_003641281.1) e *IFITM3* (XM_420925.3). Tal análisis de genoma se confunde frecuentemente mediante identificación inapropiada de pseudogenes y desalineamiento de ortólogos debido a un conocimiento incompleto de duplicación génica y divergencia evolutiva durante especiación. Esto resulta especialmente relevante para las secuencias de IFITM aviares previstas ya que sus secuencias de nucleótidos difieren significativamente con respecto a los ortólogos de chimpancé y humano. No han existido informes previos de polipéptidos aviares que proporcionan una función similar a la de IFITM.

35 Los presentes inventores han realizado análisis genómicos cuidadosos de regiones sinténicas y caracterización funcional de los productos génicos con el fin de definir secuencias funcionales de polipéptidos y nucleótidos de IFITM aviar.

40 Se describen en la presente los polipéptidos de IFITM aviar que comprenden las secuencias de aminoácidos que se seleccionan a partir del grupo que comprende; SEQ ID No 1 (IFITM1 de pollo), SEQ ID No 2 (IFITM2 de pollo), SEQ ID No 3 (IFITM3 de pollo), y homólogos y variantes de estos.

SEQ ID No 1:

45 MQSYPQHTSINMPYSGQDVTTTIPISPQPPPDKDFVLSLNFVLCNAFCLGLCALSYSI
KSRDRIIAKDFVGAASSYGRGRTAKIFNIFAFCVGLLVTLISIVLVFLYLPLYTVRP

SEQ ID No 2:

50 MKPQQAQAEVSIPLHPPGRGPPLASLPDEQPRDFILWSLNFVLAGFALAYLGCFCFPSLIFS
IKARDCKVLGDLEGARRYGSRAKVLNIIFSVLIAGVGLSTITIAIMFITAIRS

SEQ ID No 3:

MERVASGPGVPPYEPLMDGMDMEGKTRSTVVTVETPLVPPPRDHLAWSLCTTLYA
55 NVCCLGFLALVFSVKSRDRKVLGDYSGALSYGSTAKYLNITAHLINVFLIILIALVASG
TIMVANIFNHQQQHPEFIGPT

El polipéptido de IFITM aviar puede comprender uno o más, o todos de los siguientes aminoácidos; Trp35, Ser36, Leu37, Arg64, Asp65, Asp71, Gly74, Ala75, Tyr78, Ala82, Lys83, Asn86 y Ile87 con referencia a la numeración de posición de aminoácido dada en la SEQ ID No. 2.

5 Una variante o polipéptido de IFITM aviar homólogo puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90, 95 o 98% de homología con respecto a la SEQ ID No. 1, 2 o 3.

10 Comparaciones idénticas pueden realizarse a ojo o, de manera más usual, con la asistencia de programas de comparación de secuencias que se disponen fácilmente. Estos programas de ordenadores que se disponen comercialmente pueden calcular el % de identidad entre dos o más secuencias. Un programa de ordenador adecuado para llevar a cabo un alineamiento como tal es el paquete de GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, EE.UU; Devereux et al., 1984, Nucleotide sequences Research 12:387). Ejemplos de otros softwares que pueden realizar comparaciones de secuencia incluyen, pero sin limitación, al paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999 ibid – Capítulo 18), FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y la suite de GENEWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST y FASTA se disponen para búsqueda fuera de línea y en línea.

15 Una vez que el software ha producido un alineamiento óptimo, resulta posible calcular el % de identidad. El software realiza esto normalmente como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

20 Debido a la redundancia del código genético, resulta posible que variaciones en las secuencias de SEQ ID No 4-7 codifiquen el mismo polipéptido. Estas secuencias se incluyen en la presente invención.

25 Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs), inserciones y eliminaciones en la secuencia de nucleótidos codificante y otra variación en los polipéptidos de IFITM aviares pueden impactar en la función antiviral del polipéptido. Las variantes de IFITM pueden ser, por lo tanto, variantes activas o inactivas, en los que la variante activa es un polipéptido de IFITM con una actividad antiviral que resulta equivalente a o mayor que la secuencia de tipo salvaje y una variante inactiva es un polipéptido de IFITM con una actividad antiviral menor que la secuencia de tipo salvaje. Las secuencias de IFITM variantes pueden denominarse como secuencias mutantes.

30 Una proteína de tipo mutante se refiere a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es la versión no mutada de una secuencia de aminoácidos que resulta común en la población general.

35 Las variantes de secuencia de IFITM pueden existir dentro de una bandada, una raza y/o una especie de animales aviares. Estas variantes de secuencia de IFITM pueden ser variantes activas o inactivas, que se asocian con diferentes niveles de resistencia a infección viral, y como tal, los animales por separado dentro de la bandada, raza y/o especie pueden asociarse con diferentes niveles de resistencia a infección viral.

40 Propagación y atenuación de virus

La presente invención proporciona métodos para propagación de virus mediante transducción de una célula aviar con un virus y pase de la célula con el fin de propagar el virus.

45 La célula aviar puede formar parte de un embrión aviar, puede derivar a partir de un embrión aviar o puede constituir una línea celular aviar.

La célula puede ser cualquier célula aviar o línea celular aviar.

50 Los virus para uso en vacunas se producen comúnmente mediante propagación en huevos de pollos embrionados y/o células que derivan a partir de huevos de pollo embrionados, por ejemplo, fibroblastos embrionicos de pollo (CEFs).

Las técnicas generales para la propagación de virus en células aviares se conocen bien en la técnica.

55 El término “transducir” se usa en su sentido convencional para referirse a la transducción de material genético en una célula de potencia mediante un vector viral. En el presente caso, este se refiere a la transducción del material genético viral en la célula huésped de manera tal que el virus puede replicarse con el fin de que la progenie de virus que se genera se libere a partir de la célula huésped para infectar otras células.

60 El término “propagar” se refiere a aumentar el número o cantidad de partículas de virus.

La fase “pasar la célula” se refiere a facilitar o permitir la división y/o mantenimiento de la célula huésped aviar de manera tal que el virus infecta múltiples células dentro de la población, permitiendo que ocurran replicación viral y propagación.

65

Si la célula aviar forma parte de un embrión aviar, por ejemplo, si resulta ser un huevo de pollo embrionado, pasar la célula puede referirse a la provisión del ambiente apropiado de manera tal que el virus puede infectar una pluralidad de células dentro del embrión a continuación del evento de transducción inicial. Si la célula aviar deriva a partir de un huevo de pollo embrionado, por ejemplo, si la célula es un CEF, pasar la célula puede incluir mantener las células y facilitar la división de la célula usando técnicas de cultivo celular estándares, tal como la separación regular de las células en recipientes de cultivo de nuevo tejido para mantener la densidad de cultivo que se requiere.

Las vacunas pueden comprender virus muertos/inactivos o productos purificados de estos. De manera alternativa, las vacunas pueden comprender virus vivos, atenuados que se han cultivado en condiciones que conducen a una pérdida de virulencia mientras que retienen inmunogenicidad. Por ejemplo, el virus que causa enfermedad puede pasar a través de una serie de cultivos celulares o embriones animales hasta un punto en el que resulta lo suficientemente deficiente para replicación en sus células diana de manera que puede usarse como una vacuna. En este punto el virus ha perdido virulencia pero continúa siendo inmunogénico y capaz de estimular una respuesta inmune. Virus atenuados para uso en vacunas se producen comúnmente mediante el pase del virus en huevos de pollo embrionados y/o células que derivan a partir de huevos de pollo embrionados, tales como CEFs, hasta un punto donde el virus deja de ser virulento para su célula huésped original y deja de ser virulento, por lo tanto, para su especie huésped original.

La capacidad de polipéptidos de IFITM para restringir infección mediante virus que no se dirigen comúnmente a la célula huésped en la que se expresan resulta importante en el contexto de la generación de virus atenuados para uso en vacunas. La reducción de la expresión de IFITM y/o actividad en una célula huésped aviar puede aumentar la susceptibilidad de la célula huésped en cuanto a infección mediante virus no aviares, por ejemplo, virus mamíferos, tales como humanos.

La presente invención proporciona, por lo tanto, un método para generar un virus atenuado que comprende las siguientes etapas:

(i) transducción de una célula aviar de acuerdo con el primer aspecto con un virus; y;

(ii) pase de la célula aviar de manera tal que el virus completa múltiples rondas de infección y se vuelve atenuado.

Los métodos de propagación y/o atenuación de virus provistos mediante la presente invención incluyen la reducción del nivel de proteína de IFITM2 o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta en embriones aviares o células aviares que se usan para pasar virus. Las proteínas de IFITM funcionan para inhibir infección viral y, por lo tanto, células en las que el nivel de expresión o actividad de IFITM disminuye son más susceptibles a infección viral. La susceptibilidad aumentada de las células con respecto a la infección viral da como resultado una mayor eficiencia de la infección viral, infectándose más células y produciéndose más virus en comparación con las células en las que el nivel de expresión de IFITM no se manipula. Tales características resultan beneficiosas para mejorar el rendimiento de producción de virus en aplicaciones que incluyen el pase de virus en células huésped.

El primer aspecto de la presente invención se refiere a una célula aviar que tiene expresión y/o actividad reducida de IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta.

El término "reducida" indica que la expresión o actividad de la IFITM es menor que la expresión o actividad de la IFITM en una célula de tipo salvaje equivalente sin modificar o sin tratar.

La expresión o actividad de la IFITM puede reducirse hasta, por ejemplo, el 25, 50 o 75%.

Los embriones aviares o líneas celulares aviares con expresión o actividad de IFITM reducida pueden generarse mediante un número de técnicas que se conocen por la persona experta en la técnica.

La expresión génica de IFITM puede reducirse mediante la vía del ARN de interferencia (ARNi) usando mediadores de ARNi tal como ARN antisentido, ARN pequeño de interferencia (ARNip), microARN, y ARN de horquilla pequeña (ARNsh). Las moléculas de mediador ARNi pueden entregarse de manera transitoria como ARN desnudo, en vectores plasmídicos, o en cápsulas lipídicas y/o proteínicas mediante técnicas tales como electroporación, lipofección o entrega de nanopartículas. De manera alternativa, las moléculas de mediador ARNi pueden introducirse de manera estable en el genoma de células diana a través del uso de vectores de retrovirus, por ejemplo, lentivirus, en las que, las células diana se transducen con lentivirus de manera tal que el genoma lentiviral se integra en el genoma de la célula diana. Si se usan vectores de lentivirus que comprenden un marcador manejable tal como GFP, pueden seleccionarse las células en las que la molécula de mediador de ARNi se expresa. Debido a que el genoma de lentivirus se integra de manera estable en el genoma de célula huésped se permite la expresión heredada de la molécula de mediador de ARNi y, por lo tanto, se generan niveles de IFITM reducidos de expresión estable en progenie.

La confirmación de expresión reducida de IFITM puede evaluarse usando un número de técnicas que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el nivel de ARNm de IFITM puede evaluarse usando técnicas de PCR convencionales o en tiempo real y los niveles de proteína de IFITM pueden evaluarse mediante técnicas de western blot.

5 Un animal transgénico no humano en el que la expresión de uno o más de los siguientes polipéptidos, o un homólogo de estos: IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1); IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) y IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) se reduce o se bloquea en las células germinales o células somáticas de dicho animal puede producirse mediante entrega lentiviral de una molécula de mediador ARNi que se dirige contra una o más secuencia de nucleótidos que
10 codifica para dicho polipéptido con respecto a ovocitos maduros, espermatozoides, cigotos recién fertilizados, embriones tempranos o Células Germinales Primordiales (PGC) de dicho animal en la etapa de desarrollo apropiada. Esto dará como resultado la expresión de la molécula de mediador ARNi en la progenie de la célula y la expresión disminuida del polipéptido codificado mediante el gen dirigido.

15 La actividad de uno de los polipéptidos anteriores puede reducirse mediante la entrega de una secuencia transgénica que codifica una versión mutante dominante negativa del polipéptido con respecto a los ovocitos maduros, espermatozoides, cigotos recién fertilizados, embriones tempranos o Células Germinales Primordiales (PGC) de dicho animal en la etapa de desarrollo apropiada.

20 Bloqueos alternativos de genes diana pueden generarse mediante eventos homólogos o de recombinación dirigida.
Los genes que codifican IFITM pueden reemplazarse con secuencias de nucleótidos que no codifican para una proteína de IFITM funcional usando las técnicas que se describen anteriormente. En el contexto de la presente invención, el término "funcional" se refiere a la capacidad del polipéptido de IFITM para inhibir infección viral de una
25 célula huésped cuando se expresa en esa célula.

Vacuna

30 Los virus que se propagan y/o atenúan mediante métodos de la presente invención pueden incorporarse en vacunas.

El término "vacuna" como se usa en la presente se refiere a una preparación en la que, cuando se administra a un sujeto, induce o estimula una respuesta inmune protectora. Una vacuna puede volver a un organismo inmune con respecto a una enfermedad en particular.

35 La vacuna puede usarse de manera terapéutica, para tratar una infección existente; o de manera profiláctica, para bloquear o reducir la probabilidad de infección y/o impedir o reducir la probabilidad de contraer la enfermedad.

40 Una vacuna comprende una o más entidad(es) de vacunación y, de manera opcional, uno o más adyuvantes, excipientes, transportadores y diluyentes.

La entidad de vacunación puede ser un virus que se propaga y/o se atenúa mediante un método de la presente invención.

45 La entidad de vacunación puede ser además un producto purificado del virus que se propaga y/o se atenúa mediante un método de la presente invención.

50 La vacuna puede comprender además, o ser capaz de expresar, otro agente activo, por ejemplo, uno que podría estimular protección temprana antes de la respuesta inmune adaptativa inducida por la entidad de vacunación. El agente podría ser un agente antiviral, tal como interferón de tipo I. De manera alternativa, o de manera adicional, el agente puede ser un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

Investigación de la resistencia innata de una animal aviar a infección viral

55 La presente invención proporciona un método para investigar la resistencia innata de un animal aviar a infección viral que comprende la etapa de investigar la secuencia de nucleótidos que codifica para una IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y/o el número de copias de esta.

60 La investigación de la secuencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de IFITM, por ejemplo, un gen de IFITM, puede realizarse mediante barrido de genes de IFITM para variación de secuencia. El barrido de variantes de IFITM puede realizarse usando un número de técnicas convencionales que se conocen bien en la técnica y que incluyen, pero sin limitación, PCR, secuenciación de ADN convencional y secuenciación de ADN de segunda generación.

65

El número de copias de un gen es el número de copias del gen que ocurre en el genoma. Las variaciones en el número de copias (CNVs) son alteraciones del ADN de un genoma que se dan como resultado en la célula que tiene un número anormal de copias de uno o más genes. Las CNVs surgen usualmente cuando regiones relativamente grandes del genoma se han eliminado (dando menos que el número normal de copias de un gen) o se han duplicado (dando más que el número normal de copias de un gen) en ciertos cromosomas.

La variación en el número de copias puede investigarse mediante técnicas citogenéticas tal como hibridación fluorescente *in situ*, hibridación genómica comparativa, ensayo de hibridación genómica comparativa, cariotipado virtual con ensayos SNP y secuenciación de nueva generación.

De manera adicional al método de barrido de genes de IFITM que se describe anteriormente, la presente invención proporciona además un método para seleccionar un animal aviar que tiene resistencia a infección viral a partir de una pluralidad de animales aviares de la misma especie. Un método como tal comprende las etapas de investigar la secuencia y/o número de copias del gen de IFITM2 aviar según se describe anteriormente y seleccionar un animal aviar que tiene una secuencia de IFITM2 o número de copias que se asocia con resistencia a infección viral.

La pluralidad de animales que se evalúan y se seleccionan potencialmente a partir de los métodos anteriores puede comprender una bandada, una raza o una especie. Debido a la posible variación en la secuencia genética de genes de IFITM, diferentes animales dentro de una población pueden asociarse con diferentes secuencias de IFITM. Tales diferencias en la secuencia genética de un gen de IFITM entre miembros individuales de una población pueden denominarse como la variación genética dentro de la pluralidad.

Inhibición de infección viral

El término "para inhibir infección viral" se refiere a la capacidad de un polipéptido para disminuir, inhibir o reducir el nivel de virus que ingresa, se replica en o se libera a partir de una célula. Un animal aviar que expresa un polipéptido que resulta capaz de inhibir infección viral se asocia, por lo tanto, con resistencia a infección viral.

Un número de técnicas para evaluar niveles de infectividad viral se conocen en la técnica. Estas técnicas incluyen normalmente la determinación de la presencia de marcadores de replicación viral, por ejemplo, la evaluación de niveles de ARN viral, péptidos virales y/o partículas de virus o evaluación de nivel de mortalidad en una población que se ha infectado con un virus. Tales técnicas se usan comúnmente para determinar la función antiviral potencial de una entidad tal como un polipéptido, o secuencia de nucleótidos, mediante el aumento o reducción del nivel de una entidad antiviral candidata en una muestra y comparación del nivel de infectividad viral con respecto a una muestra equivalente en la que el nivel de la entidad antiviral no se ha modulado. Las técnicas de evaluación de niveles de infectividad viral incluyen, pero sin limitación, ensayos de placas, citometría de flujo, qPCR, ELISA y tasas de mortalidad.

Infecciones virales

El polipéptido según se describe en la presente es capaz de inhibir infección viral.

La infección viral puede originarse a partir de cualquier virus que ingresa a la célula diana a través de endosomas ácidos. Tal entrada incluye la toma del virus en la célula diana mediante endocitosis antes del procesamiento a través de la vía endosomal. A medida que el endosoma se procesa y madura en la célula su pH se vuelve más ácido y la acidez aumentada da como resultado cambios en la conformación del endosoma que permite que el virus se libere en la célula.

La infección viral puede originarse mediante un virus aviar y/o uno mamífero. El virus puede ser un virus envuelto. Las IFITMs bloquean la entrada citosólica de virus envueltos mediante el bloqueo de la fusión de envoltura de virus con membranas endosomales celulares.

La infección viral aviar puede ser influenza aviar, bronquitis infecciosa aviar, enfermedad infecciosa de la bolsa, enfermedad de Marek o Enfermedad de Newcastle.

La influenza aviar se origina mediante el Virus de Influenza Aviar (AIV), que es un virus de influenza A de la familia Orthomyxoviridae. Todos los subtipos (pero no todas las cepas de todos los subtipos) del virus de influenza A se adaptan a las aves y cepas de todos los subtipos del virus de influenza A se han aislado a partir de aves salvajes, en las que se lleva a cabo frecuentemente sin la presentación de síntomas de enfermedad. Algunos aislamientos del virus de influenza A pueden causar, sin embargo, enfermedad severa tanto en aves de corral domésticas como ocasionalmente en humanos. Los virus de influenza A son virus de ARN segmentado, de sentido negativo y monocatenario. Se definen de acuerdo con un número H, para el tipo de hemaglutinina, y un número N, para el tipo de neuraminidasa que se presenta en la cápsula del virus. Existen 17 antígenos H diferentes (H1 a H17) y nueve antígenos N diferentes (N1 a N9). Subtipos de AIV incluyen, pero sin limitación, a H1N1, H5N1, H5N2, H5N8, H7N1, H7N3 y H7N7.

La entrada celular de AIV e implicación es un proceso de múltiples etapas que incluye la entrada del virus en células huésped mediante interacciones entre hemaglutinina viral y ácido siálico huésped, liberación del genoma de ARN del virus (ARNv) y proteínas de núcleo viral dentro del contexto de compartimentos endosomales ácidos, conversión de ARNv a ARNm para facilitar la expresión de proteínas virales, implicación de ARNv y liberación de partículas virales a partir de células infectadas mediante formación de ampollas.

Los síntomas en aves son variables y pueden no ser específicos pero podrían incluir plumas erizadas, reducción en producción de huevos y pérdida de peso que se combinan con enfermedad respiratoria. En su forma patogénica más alta, el AIV en pollos y pavos produce una aparición repentina de síntomas severos y casi el 100% de mortalidad dentro de los dos días. Estos brotes pueden originar grandes pérdidas económicas a los productores avícolas.

La bronquitis infecciosa aviar se origina mediante el Virus de Bronquitis Infecciosa aviar (IBV) El IBV es un coronavirus altamente infeccioso que infecta especies aviares, incluyendo pollos, y afecta las vías respiratorias, el intestino, riñón, y sistemas reproductivos.

El IBV tiene un genoma de ARN no segmentado, de sentido positivo y monocatenario y se replica mediante la entrada en células huésped en endosomas ácidos continuando con la liberación de ARN genómico viral en el citoplasma. El genoma del Coronavirus tiene una tapa 5' metilada y una cola 3' poliadenilatada que permite que el ARN se fije a ribosomas para traducción directa. El Coronavirus codifica también una replicasa, que permite que el genoma viral de ARN se transcriba en nuevas copias de ARN usando el mecanismo de células huésped.

La enfermedad infecciosa de la bolsa (que se conoce también como IBD, Enfermedad de Gumboro, Bursitis Infecciosa o Nefritis Infecciosa Aviar) es una enfermedad altamente contagiosa de pollos jóvenes que se origina mediante el Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa (IBDV), el IBDV es un virus de ARN bicatenario que tiene un genoma bisegmentado y corresponde al género *Avibirnavirus* de la familia *Birnaviridae*, el IBDV ingresa a células diana huésped mediante endosomas ácidos. Existen dos serotipos distintos del virus, pero solo los virus de serotipo 1 originan enfermedad en aves de corral. Al menos seis subtipos antigénicos de IBDV de serotipo 1 se han identificado y las variantes dentro de este subtipo son capaces de romper altos niveles de anticuerpos maternos en bandadas comerciales, originando tasas de mortalidad de hasta el 60 al 100 por ciento en pollos.

El IBD se caracteriza mediante inmunosupresión y mortalidad, generalmente en la semana 3 a 6 de vida. Los síntomas de la enfermedad puede aparecer de repente y la morbilidad alcanza normalmente el 100%. Las aves infectadas pueden producir una diarrea acuosa y pueden tener descargas manchadas-heces inflamadas. La mayoría de la bandada infectada puede yacer y tener plumas erizadas. La infección afecta en primer lugar la bolsa de Fabricio y da como resultado aves infectadas que se encuentran inmunocomprometidas.

La enfermedad de Marek es una enfermedad neoplásica viral altamente contagiosa de pollos que se origina mediante un alfa herpesvirus que se conoce como Virus de Enfermedad de Marek de serotipo 1 (MDV-1) o Gallid herpesvirus 2 (GaHV-2). La enfermedad se caracteriza mediante la presencia de linfoma de células T y la infiltración de nervios y órganos mediante linfocitos. Los seis síndromes que ocurren según se conoce después de la infección de MDV-1 son; neurolinfomatosis, enfermedad de Marek aguda, linfomatosis ocular, enfermedad de Marek cutánea, aterosclerosis e inmunosupresión.

El MDV-1 comprende un genoma de ADN y es de replicación nuclear, transcribiéndose el ADN viral a ARNm dentro del núcleo de células infectadas. La infección se inicia cuando las glicoproteínas de envoltura viral interactúan con receptores de membrana celular diana originando que el virión se internalice dentro de endosomas ácidos y se desmantele, permitiendo que el ADN viral migre al núcleo celular. Una vez dentro del núcleo, ocurre la replicación de ADN viral y transcripción de genes virales.

Durante la infección sintomática, las células infectadas transcriben genes virales líticos que conducen a la muerte de células huésped infectadas. De manera adicional a los genes virales líticos, las células huésped pueden expresar también transcripciones que se asocian a la latencia (LAT), a su vez. En esta fusión, el virus puede persistir en la célula (y, de este modo, en el huésped) de manera indefinida.

La enfermedad de Newcastle se origina mediante el Virus de la Enfermedad de Newcastle, paramixovirus aviar (NDV). Los genomas de paramixovirus son ARN no segmentado de sentido negativo, de 15-19 kilobases de largo. Los signos de infección con NDV varían mucho dependiendo de factores tales como la cepa del virus y la salud, edad y especie del huésped pero incluyen: síntomas respiratorios (jadeo, carraspeo), síntomas nerviosos (depresión, inapetencia, temblores musculares, alas caídas, torsión de cabeza y cuello, dar vueltas en círculos, parálisis total), inflamación de los tejidos alrededor de los ojos y cuello, diarrea acuosa verdosa, huevos deformados de cáscara rugosa o fina y producción reducida de huevos. En casos agudos, la muerte puede ocurrir de repente y, en el comienzo del brote, las aves restantes pueden ser asintomáticas. En bandadas con buena inmunidad, sin embargo, los síntomas (respiratorios y digestivos) son leves y progresivos, y continúan con síntomas nerviosos después de siete días, en especial cabezas torcidas. Las cepas de NDV pueden categorizarse como velogénicas (altamente virulentas), mesogénicas (virulencia intermedia) o lentogénicas (no virulentas) Las cepas velogénicas produce

síntomas nerviosos y respiratorios severos, se propagan rápidamente y causan hasta el 90% de mortalidad, las cepas mesogénicas origina carraspeo, afectan la calidad y producción de huevos y dan como resultado hasta el 10% de mortalidad, las cepas lentogénicas producen síntomas moderados con mortalidad insignificante.

5 El polipéptido que se describe en la presente puede usarse en la prevención o tratamiento de una enfermedad viral.

El uso del polipéptido para la prevención de una enfermedad viral se refiere a su uso como una entidad profiláctica. En la presente, el polipéptido, o un ácido nucleico que codifica el polipéptido puede administrarse a un animal aviar que no ha contraído todavía la enfermedad y/o que no muestra ningún síntoma de la enfermedad para prevenir o deteriorar la causa de la enfermedad o para reducir o impedir el desarrollo de al menos un síntoma que se asocia con la enfermedad.

10

El uso del polipéptido para el tratamiento de una enfermedad viral se refiere a su uso como una entidad terapéutica. En la presente el polipéptido, o un ácido nucleico que codifica el polipéptido, puede administrarse a un animal aviar que tiene una enfermedad o condición existente con el fin de aliviar, reducir o mejorar al menos un síntoma que se asocia con la enfermedad y/o para ralentizar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad.

15

Aumento de expresión

20 Se describe en la presente un método para prevenir o tratar una infección viral en un animal aviar que comprende la etapa de aumentar la expresión de uno o más de los siguientes polipéptidos, o un homólogo de estos: IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1); IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) y IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) en el animal.

25 La expresión puede aumentarse mediante, por ejemplo, transfección o transducción al animal aviar con el gen(es) relevante. El gen(es) puede introducirse mediante un método basado en vector. El vector puede ser un vector viral o no viral.

30 El vector puede usarse en un enfoque de tipo "terapia de genes" para originar un aumento permanente del número de copias del gen(es) en el genoma del animal aviar.

La expresión puede aumentarse además mediante modulación del promotor y/o potenciador(es) que controlan la expresión del gen(es).

Animales aviares transgénicos

35 Según se indica anteriormente, las variantes de secuencia de polipéptidos de IFITM pueden variar en cuanto a su capacidad de inhibir infecciones virales. De manera adicional, los niveles aumentados de expresión de IFITM pueden correlacionarse con protección aumentada contra infección viral. Como tal, la presente divulgación se refiere, además, a un método para producir un animal aviar que tiene resistencia aumentada a infección viral, comprendiendo el método el aumento de la expresión de una, dos o tres de las IFITM1, 2 y 3 aviares en el animal aviar o inducción de la expresión o sobreexpresión de una variante(s) activa de estas o aumento del número de copias de estas en el genoma.

40

El animal aviar transgénico puede ser un pollo transgénico.

45 Según se usan en la presente, los términos exógeno, transgénico y heterogéneo, son todos sinónimos para secuencias de ácidos nucleicos que se introducen de manera intencional en el genoma de un sujeto mediante intervención humana en lugar de mediante mutación espontánea. Todos los métodos para producir animales transgénicos, incluyendo pollos transgénicos, se basan en técnicas que se diseñan para introducir material genético nuevo en células que darán lugar a células germinales. Como tales, ovocitos maduros, espermatozoides, cigotos recién fertilizados, embriones tempranos o Células Germinales Primordiales (PGC) pueden usarse como la diana para introducir el transgen.

50

Los métodos que se podrían usar para generar animales transgénicos se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación a transferencia de genes mediada por virus, microinyección de ADN, transferencia de genes mediada por célula primordial/célula madre embrionaria, transferencia nuclear, transferencia de cromosoma artificial, transferencia de genes mediada por testículo y transferencia de genes mediada por esperma.

55

La presente invención proporciona además un animal aviar transgénico cuyas células germinales y células somáticas comprenden una secuencia de nucleótidos heterogénea, que codifica para un polipéptido de IFITM2 (SEQ ID No. 2) aviar o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta, que se introduce en dicho animal, o un antepasado de dicho animal, en una etapa embrionaria.

60

La invención se describirá ahora adicionalmente mediante Ejemplos, que sirven para asistir a una persona de conocimiento ordinario en la técnica para llevar a cabo la invención y no se dirigen a limitar de ninguna manera el alcance de la invención.

65

Ejemplos

Ejemplos 1 – Extracción de secuencias de IFITM de pollo

Los análisis de TBLASTN de la versión más reciente del genoma de pollo (navegador NCBI, v4.0) revelaron tres IFITMs de pollo. Dos de estas habían sido previamente identificadas y designadas *IFITM3-like* (NCBI I.D. XM_420925.3) y *IFITM1-like* (variante 1: XM_001233949.2; variante 2: XM_003641281.1). Todos los parálogos de chIFITM, como IFITMs mamíferas comprendieron dos exones y la ubicación del límite intrón-exón se conserva a través de todas estas especies.

Ejemplo 2 – Anotación de genes de IFITM de pollo

Los alineamientos de aminoácidos entre los 3 genes de chIFITM y ortólogos directos en especies de primates muestran que un número de motivos de familia de IFITM conservados se presenta en algunas de las secuencias de pollo (Figura 1B). Las secuencias de pollo difieren significativamente con respecto a los ortólogos de chimpancé y de humano; sin embargo, un número de residuos, la mayoría de lo que yacen en el dominio de bucle intracelular conservado (CIL), se conservan. Múltiples alineamientos de secuencia revelan también algunos residuos importantes en los genes de IFITM de pollo que contribuyen a categorizar cada secuencia como ya sea IFITM1 o IFITM2/3. Tyr20 se conserva en toda la secuencia de IFITM2 o 3 de primate y se presenta también en IFITM3 de pollo pero no lo hace en ninguno de los otros ortólogos de *IFITM*. El alineamiento revela también que otros residuos funcionalmente importantes se conservan en algunas de las secuencias de IFITM de pollo, incluyendo las dos cisteínas (Cys75-76) en intramembrana 1 (IM1) que han demostrado encontrarse palmitoilatadas en otras especies y que son importantes para el posicionamiento de membrana, Phe79, también en IM1, se conserva en IFITM3 de pollo. El análisis de la sintenia conservada entre el locus de IFITM humana y esta región del genoma de pollo (NCBI, v4.0) junto a un análisis exhaustivo de residuos clave, ha dado como resultado la definición de los genes de chIFITM como *IFITM3* (*chIFITM3*) (anteriormente "NGBI chicken *IFITM1-like*") y *IFITM1* de pollo (*chIFITM1*) (anteriormente "NCBI chicken *IFITM3-like*"). Un nuevo chIFITM, *chIFITM2*, también se ha identificado (Figura 1).

Ejemplo 3 – Infección de líneas celulares que expresan IFITM con virus pseudotipeados

Existió una correlación negativa entre el nivel de chIFITM3 que se sobreexpresó y el porcentaje de células infectadas mediante un vector de lentivirus pseudotipeado con el LBV de envolturas de Lyssavirus (Figura 6).

El nivel de restricción antiviral de las IFITMs de pollo se comparó con sus proteínas humanas ortólogas en células A549. La sobreexpresión de *chIFITM3* dio como resultado una reducción del 94-98,5% en infección de células A549 para un rango de vectores de lentivirus pseudotipeados con las envolturas de lyssavirus; RABV, LBV y MOKV. Esto resultó muy similar al nivel de restricción mediante hulFFFM3 con respecto al mismo virus (Figura 2) aunque los pollos se infectan raramente mediante lyssavirus. ChIFITM2 restringe también infección de LBV y RABV de lyssavirus en un 70%, sin embargo, solo restringe mínimamente lyssavirus de MOKV (20%). Un patrón similar de restricción se observa para lentivirus pseudotipeados con IAV H1, H4, H5, H7 y H10. HulIFITM3 y chIFITM3 restringen infección viral de todas las hemaglutininas de influenza de manera muy efectiva, reduciendo la infección en más del 90%, ChIFITM2 y hulIFITM2 restringen de manera más moderada, aunque chIFITM2, que tiene actividad limitada contra la envoltura de lyssavirus de MOKV, restringe influenza H4 a un nivel similar con respecto a chIFITM3. De manera similar, hulIFITM2 mostró mayor restricción de influenza H1 y H4 en comparación con H5. En general, aunque chIFITM3 y hulIFITM3 solo comparten el 42% de identidad de aminoácidos, el nivel de restricción viral de chIFITM3 resulta equivalente a hulIFITM3, en contraste con hulIFITM3 y hulIFITM2, que comparten el 90% de identidad de secuencia pero muestran patrones diferentes de restricción de virus.

Ejemplo 4 – Localización celular de proteínas IFITM

La localización celular de proteínas IFITM en las A549s transducidas se estableció mediante microscopía fluorescente usando un anticuerpo anti-HA conjugado directamente con FITC. IFITM3 y hulIFITM3 de pollo se localizan perinuclearmente mientras que chIFITM1 y hulIFITM1 se localizan en todo el citoplasma (Figura 3).

Ejemplo 5 – Atenuación de expresión de IFITM constitutiva en células DF-1 de pollo

El nivel basal de chIFITM3, que se mide mediante RT-PCR cuantitativa, en células DF-1 es relativamente alto, pero el agregado de IFN- γ da como resultado una inducción moderada (Figura 4A). El tratamiento anterior con un ARNip que se dirige a chIFITM3 en células tratadas con IFN- γ da como resultado una caída de log cambio de proporción de 1,47 en expresión. Esta reducción de log cambio de proporción resulta equivalente a un 629% de atenuación en expresión relativa (Figura 4B).

Para investigar de manera adicional la función de chIFITM3 en células de pollo nativas, se investigó su expresión durante la infección por influenza. El porcentaje de células PF-1 infectadas mediante influenza (A/WSN/1933)

aumentó del 14,0% después de ningún tratamiento con ARNip a infección del 31,5% cuando se pretrataron con un ARNip dirigido a chIFITM3 (Figura 4C).

Los inventores evaluaron el nivel constitutivo de expresión de chIFITM3 en células DF-1, mediante RT-PCR cuantitativa con cebadores para chIFITM3 las células DF-1 expresan de manera abundante chIFITM3 (ciclos de umbral [CTs] de 20 para IFITM3 y 22 para GAPDH). A pesar de ser inducido por IFN, el agregado de IFN- γ dio como resultado solamente una inducción moderada, mientras que la adición de IFN- α originó un aumento de 2,67-log₂ (6,4-cambio de proporción) en expresión de chIFITM3 (Fig. 7A).

La expresión de chIFITM3 en células DF-1 se atenuó usando un ARNip diseñado para la transcripción de chIFITM3. El tratamiento con este ARNip en células DF-1 no estimuladas dio como resultado una reducción de 1,23-log₂ (2,4-cambio de proporción) en el nivel de transcripción, sin cambios en la abundancia de transcripción de chIFITM3 con un ARNip no específico. La atenuación de chIFITM3 endógeno dio como resultado un aumento mayor que 2-cambio de proporción en la infección de células DF-1 mediante virus de influenza A competente para replicación (A/WSN/1933) (Fig. 5B), que se evaluó mediante análisis citométrico de expresión de NP.

Además, la sobreexpresión de chIFITM3 en células DF-1 redujo la replicación viral en una media del 55% (Fig. 7D), y ensayos de placa muestran que la carga viral se redujo de 1,3x10⁶ PFU ml⁻¹ a 3,1x10⁵ PFU ml⁻¹ después de sobreexpresión de chIFITM3 (Fig. 7E). En conjunto, estos resultados muestran que el chIFITM3 resulta capaz de restringir la entrada de IAV en células DF-1.

Ejemplo 6 – Expresión de chIFITM en un panel de tejido de ARN

Los cebadores específicos con respecto a chIFITM1, 2 o 3 se usaron para amplificar transcripciones de ARNm usando RT-PCR en un rango de tipos de tejido. La expresión de IFITM2 y 3 se expresó de manera constitutiva en todas las líneas celulares que se evaluaron (Figura 5), pero la expresión de IFITM1 se confinó a la bolsa (un órgano que se necesita para el desarrollo de célula B), el tracto gastrointestinal, la amígdala cecal y la tráquea.

Materiales y métodos

Plásmidos. Todos los genes de IFITM se clonaron en los sitios BamHI y NotI de pSIN-BNHA y secuencias que se confirmaron mediante secuenciación capilar (GATC biotech).

Condiciones de cultivo celular, las células A549 se desarrollaron en F-12 (Invitrogen) y HEK293T y las células DF-1 se desarrollaron en DMEM (Invitrogen), todos los medios se complementaron con FBS al 10% v/v (Biosera).

Generación de líneas celulares que expresan IFITM. Las secuencias de gen de IFITM de pollo y humano se ordenaron a partir de GeneArt (Life Technologies) y se optimizaron los codones para expresión en células humanas. El casete génico se insertó en un plásmido lentiviral, pSIN-BNHA, que aseguraría que una etiqueta HA C-terminal siguiera la proteína IFITM. El lentivirus se constituyó mediante una transfección con plásmido 3 de células HEK293-T, que se desarrollaron para confluir en un plato de 10 cm. OptiMEM (200 μ l, Gibco) se mezcló con 10 μ l de Fugene-6 (Roche). El ADN para transfección se elaboró en un volumen final de 15 μ l de Tris-EDTA (TE), que contenía 1 μ g de un vector de expresión de gag-pol (p8.91), 1 μ g de un vector de expresión de VSV-G (pMDG) y 1,5 μ g de vector que expresa el transgen (pSIN-BNHA). El ADN se agregó a la solución de OptiMEM y se incubó durante 15 minutos (min). Una vez que el medio se retiró a partir de las células y se reemplazó con 8 ml de DMEM, FBS al 10%, la mezcla de ADN se agregó gota a gota a las células. Después de 24 horas (h) a 37 °C y CO₂ al 5%, el medio se retiró y se reemplazó con 8 ml de DMEM, FBS al 10%, y se incubó durante 24 h adicionales. El virus empaquetado se cosechó a 48 y 72 h después de transfección mediante la recolección de sobrenadante y filtro usando un filtro de 0,45 μ m (Millex). Alícuotas (1 ml) se congelaron a -80 °C. Los lentivirus se usaron para transducir células epiteliales de pulmón A549 humanas y producir una población mezclada.

Microscopía confocal. Las células se sembraron a 1_105/pozo en cubreobjetos en una placa de 12 pozos 1 día antes de la transfección con un plásmido que codifica IFITM (1 μ gADNcon 3 μ l de Fugene [Promega]). Las células se fijaron con metanol al 100% durante 10 min bloqueándose a continuación en albúmina de suero bovino al 1% (BSA) durante 30 min. El epítipo HA se volvió diana mediante un anticuerpo anti-HA conjugado con Alexa Fluor 550 (ab117513), y se visualizaron endosomas mediante un anticuerpo Lamp1 con especificidad de humano (ab25630; Abcam) o de pollo (LEP100 IgG; Developmental Studies Hybridoma Bank), continuando con incubación con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (ab96871; Abcam).

Clonación de célula única. Todos los pozos de una placa de 96 pozos de fondo plano, transparente (Corning) se rellenaron con 100 μ l de medio de cultivo, excepto el pozo A1. Se agregaron 200 μ l de suspensión celular (2x10⁴ células/ml) al pozo A1, continuando con una dilución en serie 1:2 fuera del pozo H1. Se agregaron 100 μ l adicionales de medio de cultivo a todos los pozos en la columna 1 y se llevó a cabo otra dilución en serie a lo largo de cada hilera de la placa hasta la columna 12. Se agregaron 100 μ l adicionales de medio a todos los pozos en la placa de 96 pozos para llevar el volumen final de cada pozo a 200 μ l antes de la incubación de la placa a 37 °C durante 4-5 días. Los pozos con solo un clon en ellos se marcaron y se permitió su expansión, antes de la cosecha en una placa

de 24 pozos y se permitió que alcanzaran confluencia. Las células se prepararon para análisis de citometría de flujo y las colonias con un nivel alto de expresión de HA se transfirieron a matraces T25.

5 Análisis de citometría de flujo. El medio de cada pozo se recolectó en un tubo Eppendorf de 2 ml. Las células se separaron a partir del plástico usando 300 μ l de Tripsina-EDTA al 0,25% (Invitrogen), se neutralizaron con 300 μ l de medio de cultivo celular, FBS al 10 % y se agruparon con el sobrenadante. Las células se expandieron a 2000 g durante 5 min, el sedimento se resuspendió en 100 μ l de PBS y se transfirió a placa de fondo en V de 96 pozos (Nunc). La placa se centrifugó de nuevo y las células se fijaron y se permeabilizaron en 100 μ l de regulador Cytotfix/Cytoperm™ (Becton Dickinson) y se lavaron de acuerdo con las pautas del fabricante. Las células se resuspendieron en el anticuerpo primario (Tabla S4) y se incubaron durante 1 h a 4 °C, continuando con dos rondas de lavado. Las células se resuspendieron posteriormente en el anticuerpo secundario conjugado con una proteína fluorescente y se incubaron en la oscuridad durante 1 h, a menos que el anticuerpo primario tuviera un marcador fluorescente conjugado. Las células se lavaron de nuevo, resuspendieron en 300 μ l de PBS antes de análisis mediante citometría de flujo (FACSCalibur II, Becton Dickinson). Las células que expresaron GFP se fijaron con paraformaldehído al 4% v/v (USB) durante 20 min, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 300 μ l de PBS antes del análisis mediante citometría de flujo.

20 Infección de líneas celulares que expresan IFTTM con virus pseudotipados. Las líneas celulares A549 que expresan IFITM de pollo o de humano se sembraron a 3×10^3 células/pozo en placas de 96 pozos, un día antes de la infección con ya sea lyssavirus pseudotipados que expresan GFP (RABV Virus estándar de desafío-11 (CVS-11; EU352767), virus del murciélago de Lagos (LBV.NIG56-RV1; HM623779) y virus de makola (MOKV.98/071 RA361; GQ500108) o virus de influenza pseudotipados que expresa luciferasa (HA1 (AF117241), HA4 (D90302), HA5 (EF541394), H7 (AJ491720), y H10 (CY014671)). La expresión de GFP, como una medida de infección de lentivirus, se midió mediante microscopía fluorescente en las 48 h posteriores a la infección continuando con fijación con paraformaldehído al 4% v/v (USB) durante 20 min. Las células se lavaron con 100 μ l de solución de PBS/ Hoechst (Life Technologies, 200 ng/ μ l) y se adhirió un sello de placa. Las células se analizaron para determinar la proporción de células que expresan GFP (Cellomics ArrayScan VTI, Thermofisher), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La actividad de luciferasa, como una medida de infección de lentivirus, se determinó en las 48 h posteriores a la exposición usando 50 μ l del reactivo Bright-Glo™ (Promega). Se permitió que las células lisaran durante 2 min antes de que el nivel de actividad de luciferasa se midiera usando el FLUOstar omega (BMG Labtech), los niveles de GFP y luciferasa se informaron con respecto a la infección de células A549 en la ausencia de sobreexpresión de proteína IFITM. El porcentaje de células infectadas que expresan proteínas IFITM se registra como una proporción de la infección en células A549 no transducidas (normalizadas al 100%).

35 Análisis de células fluorescentes de Cellomics. Las células se sembraron de manera dispersa (3×10^3 /pozo de una placa de 96 pozos de fondo plano transparente, Corning) y se infectaron con un virus que expresa GFP, 48 h después las células se lavaron en 100 μ l de PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% v/v (USB) durante 20 min. Las células se lavaron con 100 μ l de solución de PBS/Hoechst (Invitrogen, 200 ng/ μ l) y se adhirió un sello de placa. Las células se analizaron para determinar la proporción de células que expresan GFP (Cellomics ArrayScan VTI, Thermofisher), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 Ensayos de reportero Luciferasa. Las células se sembraron a 3×10^3 /pozo en placas de 96 pozos de fondo plano blancas, (NUNC) y se dejaron durante 24 h a 37 °C. Se agregaron un volumen apropiado de virus pseudotipado que expresa la cubierta de proteína de un virus de influenza y un gen reportero luciferasa a las células y se incubaron durante 48 h a 37 °C. Las células se retiraron a partir de la incubadora para alcanzar temperatura ambiente antes de que se agregaran 50 μ l de reactivo Bright-Glo™ (Promega) a cada pozo. Se permitió que las células lisaran durante 2 min antes de que el nivel de actividad de luciferasa se midiera usando el FLUOstar omega (BMG labtech).

50 Estudios de atenuación de ARNip. Las células DF-1 se sembraron a 5×10^4 /pozo en una placa de 24 pozos. Las células se expusieron a ARNips contra chIFITM3 (gegaagtacctgaacatcacg) o un ARNip no específico (uuccccaacgugucacgugu) que se diluyó en Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen), durante 48 h. Las células se estimularon mediante adición de ya sea 200 ng/ml de IFN- γ de pollo (Kingfisher biotech #RP0115c) por unas 24 h adicionales o el virus A de influenza (A/WSN/1933 (WSN/33)) durante 1 h a un MOI de ARN 0,1. El ARN se extrajo (RNAeasy minikit, Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo RT-PCR (QuantiTect Multiplex RT-PCR kit, Qiagen) usando sondas y cebadores a partir de ABI (GADPH de pollo, 4448489 y pollo_IFITM3; ensayo personalizado) véase Tabla S1. La infección de influenza se midió mediante análisis de citometría de flujo (véase más arriba) usando un anticuerpo anti-NP (ab20921, AbCam).

60 Ensayos de placas. El material para someterse a ensayo se diluyó en serie en DMEM libre de suero y se usó para infectar células MDCK en placas de 12 pozos. Después de 1 h de incubación, el inóculo se retiró, y las células se recubrieron con DMEM que contiene BSA al 0,2% (Sigma-Aldrich), Avicel al 1,25% (FMC Biopolymer), y 1 μ g de tripsina ml^{-1} . Después de 2 días, se retiró el recubrimiento, y las células se fijaron con solución salina formal al 4%-PBS durante 20 min antes de colorearse con solución de azul de toluidina al 0,1% (Sigma-Aldrich) de manera tal que el número de PFU pudo calcularse.

5 Expresión de proteínas IFITM en diferentes tejidos de pollo. Se retiraron tejidos de pollos Rhode Island rojos (RIR) libres de patógenos específicos (SPF) de 6 a 9 semanas de vida, de manera específica timo, bazo, bolsa de Fabricio, glándula de Harder, amígdala cecal, divertículo de Meckel, médula ósea, cerebro, músculo, corazón, hígado, riñón, pulmón, y piel. El ARN se trató con Dnasa y se llevó a cabo transcripción inversa (transcriptasa inversa SuperScript III, Invitrogen). El ADNc a partir de cada tejido se amplificó mediante PCR usando los siguientes conjuntos de cebadores: chIFITM1 (F'-AGCACACCAQCATCAACATGC, R'-CTACGAAGTCCTTGCGATGA), chIFITM2 (F'-AGGTGAGCATCGCGCTGCAC, R'-ACCGCCGAGCACCTTCCAGG) y chIFITM3 (F' GGAGTCCCACCGATATGAAC, R'-GGCGTCTCCACCGTGACCA). Los cebadores que amplifican GAPDH (F'-ACTGTCAAGGCTGAGAACGG, R'-GCTGAGGGAGCTGAGATGA) se designaron para expandir un límite intrón-
10 exón, lo que permitió detección de y diferenciación entre ADNc y amplificación de ADNg, y se usó como una control de carga.

REIVINDICACIONES

1. Una célula aviar que tiene expresión y/o actividad reducida de IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta en comparación con una célula de tipo salvaje equivalente no tratada o no modificada, en la que dicha célula aviar que tiene expresión y/o actividad reducida de uno o más de dichos polipéptidos resulta más susceptible a infección viral en comparación con dicha célula de tipo salvaje equivalente no tratada o no modificada.
2. Una célula aviar de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene expresión y/o actividad reducida de uno o más de: IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta; y IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta; en comparación con una célula de tipo salvaje equivalente no tratada o no modificada.
3. La célula aviar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la célula aviar puede encontrarse dentro de un embrión aviar, deriva a partir de un embrión aviar o es una línea celular aviar, en la que, de manera opcional, la célula aviar es un fibroblasto embrionario de pollo (CEF).
4. Una célula aviar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:
- (a) la célula aviar comprende una versión mutante de IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta, y, de manera opcional, que comprende adicionalmente una versión mutante de una o más de: IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta; en la que la versión mutante se asocia con una resistencia reducida a infección viral;
- (b) la secuencia de nucleótidos que codifica para IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta; y, de manera opcional, la secuencia de nucleótidos que codifica para una o más de IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta, no se presenta en su genoma; o
- (c) la expresión de IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta; y, de manera opcional, la expresión de una o más de IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta se reduce mediante ARN de interferencia (ARNi).
5. Un método para propagar un virus que comprende las siguientes etapas:
- (i) transducción de una célula aviar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con un virus; y;
- (ii) pase de la célula con el fin de propagar el virus.
6. Un método para producir una vacuna que comprende las siguientes etapas:
- (i) propagación de un virus de acuerdo con la reivindicación 5; y,
- (ii) incorporación del virus propagado en una vacuna.
7. Un método para generar un virus atenuado que comprende las siguientes etapas:
- (i) transducción de una célula aviar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con un virus; y,
- (ii) pase de la célula aviar de manera tal que el virus completa múltiples rondas de infección y se vuelve atenuado.
8. Un método para producir una vacuna que comprende las siguientes etapas:
- (i) atenuación de un virus de acuerdo con la reivindicación 7;
- (ii) propagación del virus atenuado; y
- (iii) incorporación del virus generado en (ii) en una vacuna.
9. Un animal aviar transgénico:

- 5 (a) en el que la expresión y/o actividad de IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta; y, de manera opcional, una o más de IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta se reduce, se atenúa o se bloquea;
- 10 (b) cuyas células germinales y células somáticas comprenden una versión heterogénea de una secuencia de nucleótidos que codifican para IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y, de manera opcional, una o más de IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta; cuya secuencia(s) de nucleótidos se introdujo en dicho animal, o un antepasado de dicho animal, en una etapa embrionaria; o
- 15 (c) en el que el número de copias de uno o más gen(es) que codifican IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta; y, de manera opcional, una o más de IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta aumenta.
- 20 10. Un animal transgénico de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el animal aviar es un animal aviar doméstico, de manera opcional, un pollo.
11. Una célula aviar de acuerdo con la reivindicación 1 que deriva a partir de una animal aviar transgénico de acuerdo con la reivindicación 9 o 10.
- 25 12. Un método para investigar la resistencia innata de un animal aviar con respecto a infección viral que comprende la etapa de investigar la secuencia de nucleótidos que codifica para IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta; y, de manera opcional, una o más de IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta para
- 30 variación de secuencia y/o investigación del número de copias de la secuencia de nucleótidos en el genoma.
13. Un método para seleccionar un animal aviar que tiene resistencia a infección viral a partir de una pluralidad de animales aviares de la misma especie, que comprende las siguientes etapas:
- 35 (i) investigación de la secuencia de nucleótidos que codifica IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta; y, de manera opcional, una o más de IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta en cuanto a la
- 40 variación de secuencia y/o el número de copias de la secuencia de nucleótidos en el genoma;
- (ii) selección de un animal aviar que tiene una secuencia de nucleótidos de IFITM2 y/o un número de copias; y, de manera opcional, uno o más de una secuencia de nucleótidos de IFITM1 e IFITM3 y/o el número de copias que se
- 45 asocian con resistencia a la infección viral, en el que, de manera opcional, la pluralidad de animales aviares exhibe variación genética y/o variación en el número de copias en la locus de IFITM.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la infección viral se encuentra mediada por un virus que ingresa a través de endosomas ácidos, en el que, de manera opcional, la infección viral se encuentra mediada por el virus de influenza aviar (AIV), Virus de Bronquitis Infecciosa (IBV), Virus de Enfermedad Infecciosa de la Bolsa (IBDV) o Virus de Enfermedad de Newcastle (NDV).
- 50 15. Un polipéptido de IFITM2 de pollo (SEQ ID No. 2) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta; y, de manera opcional, uno o más de un polipéptido de IFITM1 de pollo (SEQ ID No. 1) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta y de polipéptido de IFITM3 de pollo (SEQ ID No. 3) o una variante con al menos el 90% de identidad de secuencia con respecto a esta, para uso en la
- 55 prevención o tratamiento de enfermedad viral.

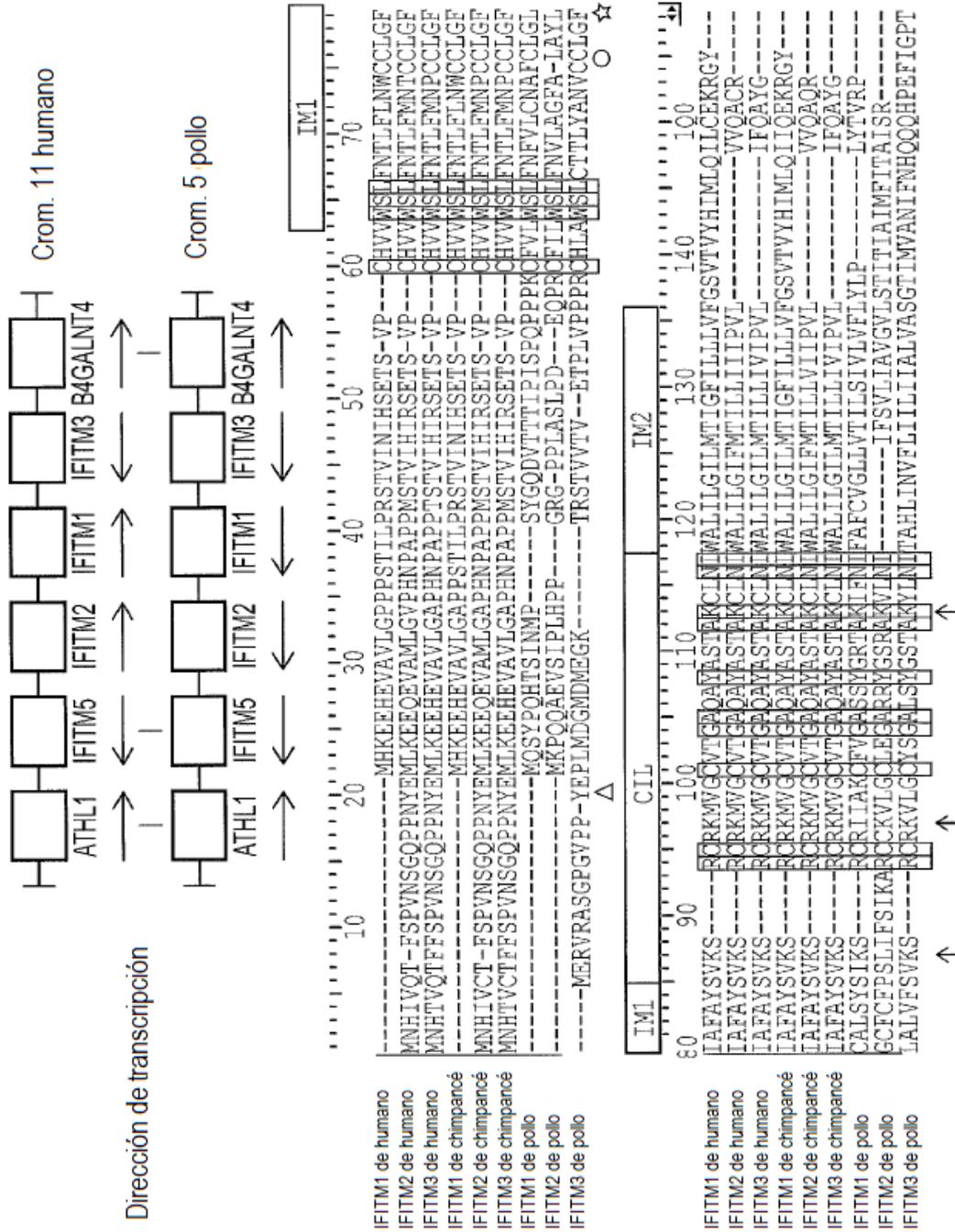


FIG. 1

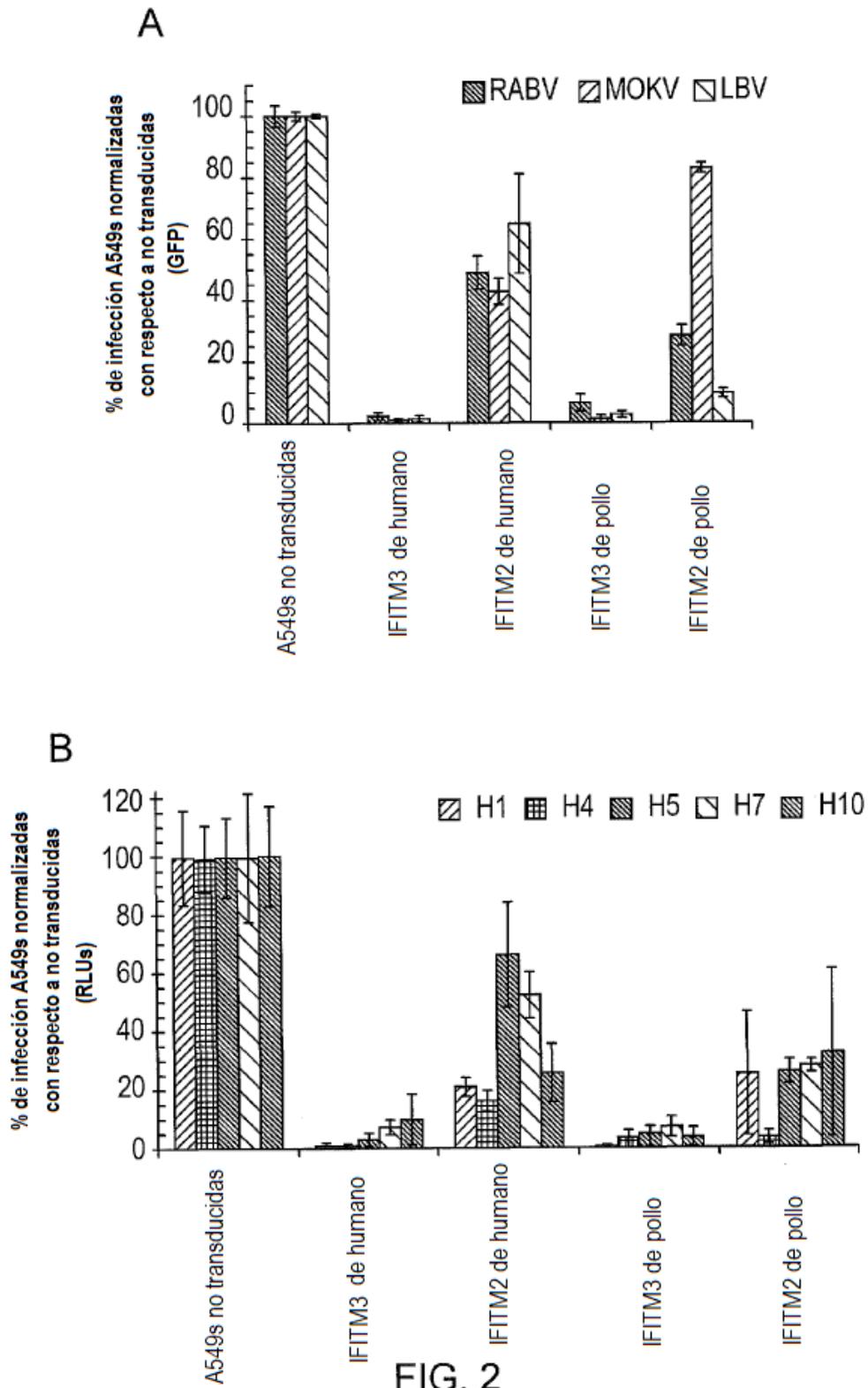


FIG. 2

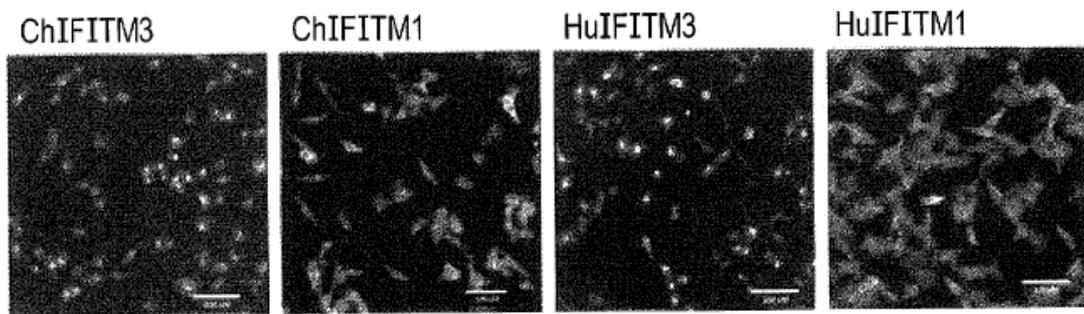


FIG. 3

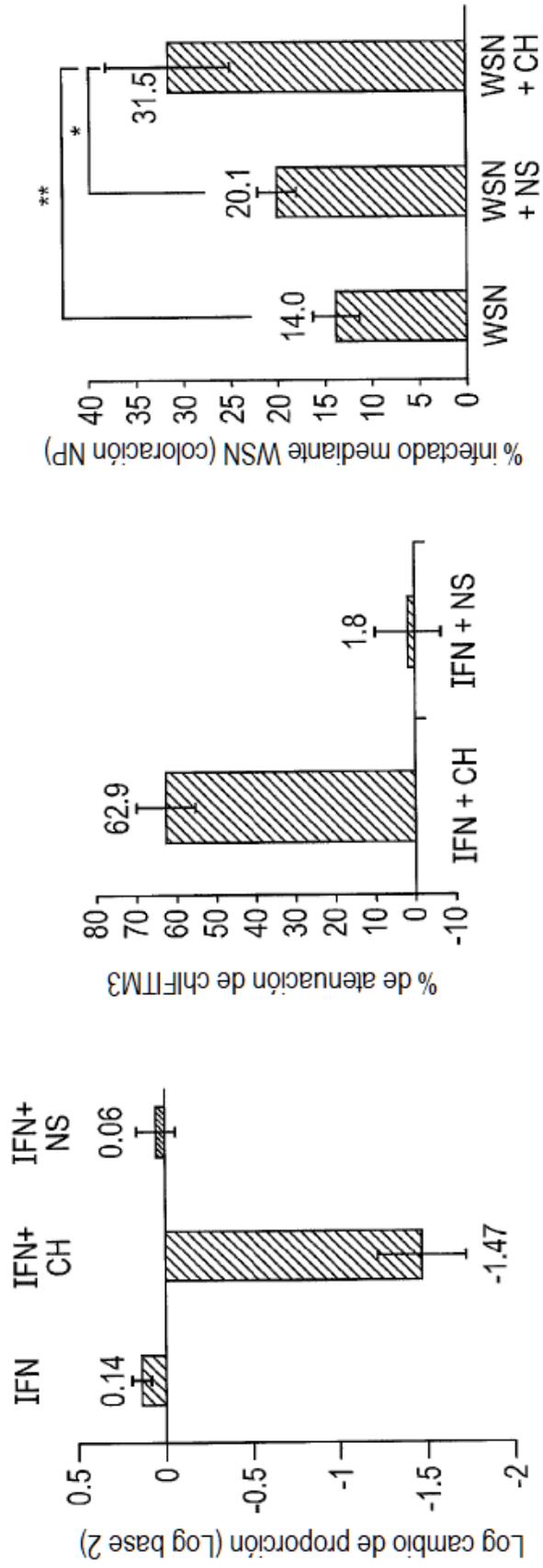


FIG. 4

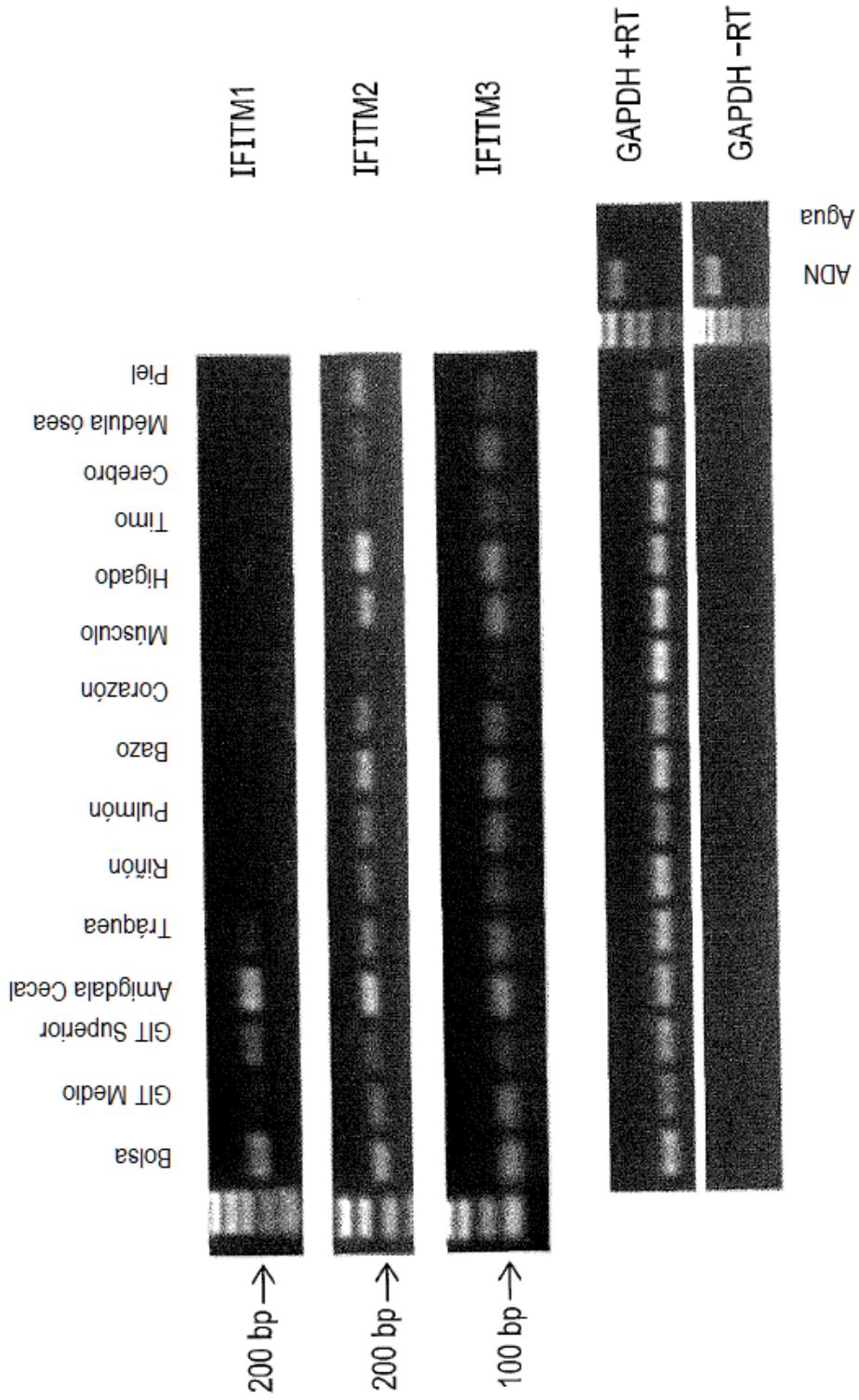


FIG. 5

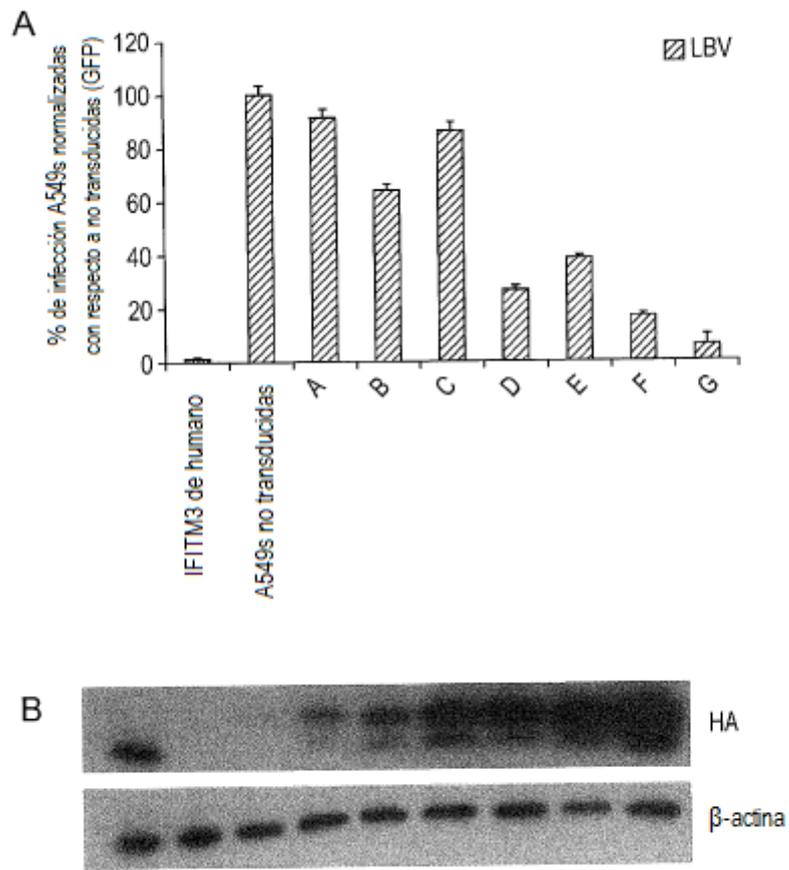


FIG. 6

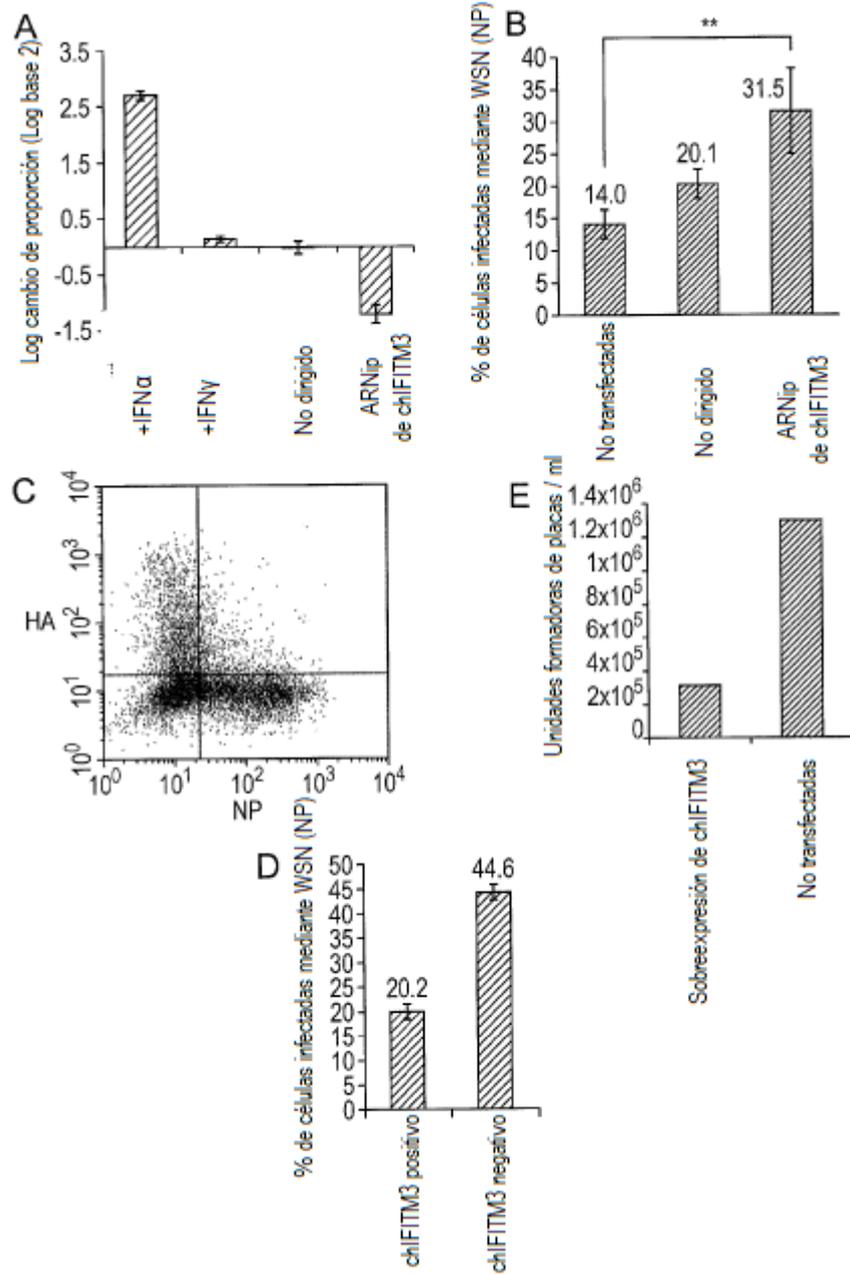


FIG. 7