

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 125**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/16** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2006 PCT/US2006/038340**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2007 WO07044284**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2006 E 06815963 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 1931698**

54 Título: **Producción rápida de virus de título elevado**

30 Prioridad:

**05.10.2005 US 723659 P**

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

**21.02.2020**

73 Titular/es:

**ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
121 Seaport Boulevard  
Boston, MA 02210, US**

72 Inventor/es:

**HARVEY, ALEX J.**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

**Observaciones:**

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

ES 2 744 125 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

Producción rápida de virus de título elevado

5 **Información de la solicitud relacionada**

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional US No. 60/723.659, presentada el 5 de octubre de 2005.

10 **Antecedentes**

[0002] La presente descripción se dirige a la producción de partículas virales de retrovirus que son capaces de transducir células, por ejemplo, células de aves, incluyendo las células germinales. En particular, se pueden producir partículas de vectores retrovirales deficientes en replicación de acuerdo con la descripción.

15 [0003] Los retrovirus deficientes en replicación son particularmente útiles en metodologías recombinantes, tales como los procedimientos de terapia génica y en la producción de animales transgénicos, por ejemplo, aves transgénicas. Un animal transgénico particularmente útil que puede ser producido usando retrovirus deficiente en la replicación es el pollo transgénico.

20 [0004] La producción de un huevo aviar comienza con la formación de un gran yema en el ovario de la gallina con el óvulo no fertilizado formado en el saco vitelino. Después de la ovulación, la yema y el óvulo pasan al infundíbulo del oviducto donde es fertilizado, si los espermatozoides están presentes, y a continuación se mueve en el magnum del oviducto que se alinea con células de glándulas tubulares. Estas células secretan las proteínas de clara de huevo, incluyendo la ovoalbúmina, ovomucoide, ovinhibidor, conalbúmina, ovomucina y lisozima, en el lumen del magnum donde se depositan sobre el embrión aviar y la yema. Los investigadores han tenido éxito en la producción de aves transgénicas en las que las células de glándulas tubulares producen la proteína exógena y la secretan en el lumen del oviducto junto con la proteína de clara de huevo para empaquetarse en un óvulo. Véase, por ejemplo, Harvey et al, Nature Biotechnology (2002) vol 20, pág. 396-399, y la patente de Estados Unidos Nº 6.730.822, concedida el 4 de mayo de 2004. Este sistema ofrece un potencial excepcional como biorreactor de proteínas debido a los altos niveles de producción de proteínas, la promesa del plegado correcto y la modificación post-traducción de la proteína diana, la facilidad de recuperación del producto, y el periodo de desarrollo más corto de los pollos en comparación con otra especie animal utilizada para la expresión génica heteróloga. Significativamente, la producción retroviral en animales transgénicos, tales como pollos, puede estar limitada por el tamaño del inserto permitido por el retrovirus. Típicamente, los insertos contenidos en los retrovirus se limitan a de 2 a 3 kb. La producción de virus competentes para la integración se inhibe cuando se superan las limitaciones del tamaño del inserto. Los procedimientos importantes que se utilizan para producir aves transgénicas, tales como pollos, utilizando retrovirus implican la introducción de partículas retrovirales deficientes en la replicación, aunque competentes para la integración, en células embrionarias.

40 [0005] Los vectores retrovirales deficientes en la replicación carecen de ciertos genes necesarios para la reproducción exitosa del virus. Tradicionalmente, para producir vectores retrovirales deficientes en la replicación, las secuencias de nucleótidos que codifican retrovirus deficientes en la replicación han sido transfectadas en células que producen de forma estable los productos de los genes necesarios para la replicación de los retrovirus deficientes en la replicación. Es decir, ciertas secuencias de nucleótidos necesarias para la replicación de los retrovirus están ausentes en los retrovirus pero están presentes en el genoma de la célula en la que se producen las partículas virales. Un sistema que se ha utilizado para producir retrovirus ALV deficientes en la replicación implica el uso de células Senta y células Isolde (Cosset et al (1993) Virology vol 195, p 385-395). El proceso implica primero transfectar secuencias de nucleótidos que codifican el retrovirus deficiente en la replicación en las células Senta que producen de forma estable las proteínas gag, pol y envE. El título viral obtenido en las células Senta es típicamente < 1000/ml. Para aumentar el título, las partículas virales producidas en las células Senta se usan para transducir las células Isolde que producen de forma estable las proteínas gag, pol y proteínas envA. El retrovirus producido de esta manera puede contener un gen de resistencia a neomicina que permite la selección de clones o colonias individuales de Isolde, algunos de los cuales producirán partículas en altos títulos > 10.000/ml. A pesar de la producción de una cantidad utilizable en la producción de partículas virales, los títulos son todavía relativamente bajos usando este procedimiento. Además, el proceso es laborioso y consume mucho tiempo, tardando típicamente cerca de tres meses.

50 [0006] Soneoka et al (1995) Nucleic acids research vol 23 (4) pág. 628-633 da a conocer un sistema de expresión de tres plásmidos transitorio para la producción de vectores retrovirales de alta títulos en el que se utilizan orígenes de replicación de SV40 en todos los componentes retrovirales, junto con las células huésped que expresan el antígeno T grande de SV40 para dirigir la expresión de los componentes de empaquetamiento.

60 [0007] Lo que se necesita son nuevos procedimientos de producción de partículas virales que requieran menos tiempo y menos mano de obra y permitan la inserción de secuencias de nucleótidos más grandes en el genoma receptor y den como resultado altos títulos.

65 **Características**

5 [0008] Se ha desarrollado un sistema de producción de retrovirus y se describe en este documento en el que se pueden producir partículas retrovirales deficientes en la replicación usando una cantidad mínima de mano de obra, se pueden producir en hasta solo 2 días, pueden producir títulos típicamente diez veces o más mayor que los obtenidos mediante procedimientos convencionales y proporciona un aumento sustancial en el tamaño del inserto de nucleótidos que puede introducirse en el vector retroviral mediante la delección de hasta tres genes estructurales principales, es decir, los genes de las proteínas gag (típicamente aproximadamente 2000 nucleótidos), pol (típicamente aproximadamente 2300 nucleótidos) y env (típicamente aproximadamente 1500 nucleótidos). Brevemente, una secuencia de nucleótidos que codifica un retrovirus o un vector retroviral deficientes en la replicación se introduce en una célula, tal como una célula de fibroblasto, junto con una secuencia de nucleótidos que proporciona la replicación del retrovirus o vector retroviral deficientes en la replicación, en particular, se introducen en la célula las secuencias de nucleótidos que codifican dos o más de las proteínas gag, pol y env. En un caso particularmente útil de la descripción, se requieren las secuencias de nucleótidos que codifican las tres proteínas gag, pol y env para la replicación del vector viral deficiente en la replicación y se introducen en la célula.

15 [0009] La presente invención proporciona un procedimiento de producción de partículas virales, comprendiendo el procedimiento: introducir de forma transitoria en una línea celular DF-1 una secuencia de nucleótidos que codifica un vector retroviral aviar en el que el vector retroviral aviar es un vector ALV deficiente en la replicación; introducir de forma transitoria en la línea celular DF-1 secuencias de nucleótidos que codifican productos necesarios para la replicación del vector retroviral deficiente en la replicación, siendo los productos las proteínas gag, pol y VSV-G, en el que la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican gag y pol están presentes en un plásmido y la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican VSV-G están presentes en otro plásmido, y en el que gag, pol y VSV-G están bajo el control del promotor CMV; y recoger las partículas virales.

25 [0010] La presente invención también proporciona un procedimiento de producción de un ave transgénica, comprendiendo el procedimiento: introducir de forma transitoria en una línea celular DF-1 una secuencia de nucleótidos que codifica un vector retroviral aviar en el que el vector retroviral aviar es el vector ALV deficiente en la replicación; introducir de forma transitoria en la línea celular DF-1 secuencias de nucleótidos que codifican productos necesarios para la replicación del vector retroviral deficiente en la replicación, siendo los productos las proteínas gag, pol y VSV-G, en el que la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican gag y pol están presentes en un plásmido y la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican VSV-G están presentes en otro plásmido, y en el que gag, pol y VSV-G están bajo el control del promotor CMV; recoger las partículas virales; introducir las partículas virales en una célula de embrión aviar; y obtener un ave transgénica a partir del embrión.

35 [0011] La presente invención proporciona además un procedimiento de producción de proteína exógena, comprendiendo el procedimiento: introducir de forma transitoria en una línea celular DF-1 una secuencia de nucleótidos que codifica un vector retroviral aviar en el que el vector retroviral aviar es el vector ALV deficiente en la replicación; y en el que el vector retroviral aviar contiene una secuencia codificante para una proteína exógena unida operativamente a un promotor; introducir de forma transitoria en la línea celular DF-1 secuencias de nucleótidos que codifican productos necesarios para la replicación del vector retroviral deficiente en la replicación, siendo los productos las proteínas gag, pol y VSV-G, en el que la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican gag y pol están presentes en un plásmido y la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican VSV-G están presentes en otro plásmido, y en el que gag, pol y VSV-G están bajo el control del promotor CMV; recoger las partículas virales; introducir las partículas virales en una célula de embrión avia; y obtener una proteína exógena de un huevo puesto por un ave transgénica obtenida a partir del embrión.

[0012] Los procedimientos de la invención y ciertas realizaciones del mismo se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

50 [0013] En un caso, los procedimientos de la descripción incluyen introducir, por ejemplo, transfectar (por ejemplo, una transfección transitoria) en una célula una secuencia de nucleótidos que codifica un vector retroviral en el que el vector retroviral es deficiente en la replicación (por ejemplo, una única secuencia de nucleótidos que contiene un polinucleótido que codifica un retrovirus deficiente en la replicación); introducir, por ejemplo, transfectar en la célula dos o más secuencias de nucleótidos que están bajo el control de promotores que son funcionales en la célula, en la que las secuencias de nucleótidos codifican productos necesarios para la replicación del virus deficiente en la replicación, tales como secuencias de nucleótidos que codifican proteínas gag, pol y env; y recoger las partículas virales.

60 [0014] En un caso particularmente útil de la invención, cada secuencia de nucleótido introducida en la célula (es decir, secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican el vector retroviral y la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican productos necesarios para la replicación del virus deficiente en la replicación) se introduce de manera transitoria. Es decir, no se espera que las secuencias de nucleótidos se repliquen en la célula y no se espera que se integren en el genoma celular. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos se pueden introducir en la célula contenida en uno o más vectores de plásmidos bacterianos. La descripción también contempla la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican productos necesarios para la replicación del virus deficiente en la replicación que se introduce en la célula de una manera transitoria y la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican el vector

retroviral que se introduce en la célula de una manera que proporciona la integración estable de la secuencia o secuencias de nucleótidos en el genoma de la célula. Son bien conocidos en la técnica procedimientos que proporcionan la integración estable de secuencias de nucleótidos deseadas en el genoma de las células, por ejemplo, las células de líneas celulares. Por ejemplo, se pueden utilizar vectores retrovirales deficientes en la replicación para la integración estable en un genoma celular.

**[0015]** La secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican productos necesarios para la replicación del virus deficiente en la replicación pueden introducirse en la célula antes de la introducción de la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican el vector retroviral; la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican los productos necesarios para la replicación del virus deficiente en la replicación pueden ser introducidas en la célula aproximadamente al mismo tiempo que la introducción de la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican el vector retroviral; o la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican los productos necesarios para la replicación del virus deficiente en la replicación se pueden introducir en la célula después de la introducción de la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican el vector retroviral. En un caso de la descripción, las secuencias de nucleótidos que codifican productos que proporcionan la replicación del vector retroviral deficiente en la replicación están contenidas en uno o más plásmidos, por ejemplo, un plásmido para cada secuencia de nucleótidos. En ciertos casos útiles de la descripción, el vector retroviral deficiente en la replicación está contenido en un plásmido. Cuando las secuencias de nucleótidos están contenidas en un plásmido de acuerdo con la descripción, por lo general, estas secuencias se introducirán de forma transitoria en la célula.

**[0016]** Ciertas células y líneas celulares que pueden ser muy útiles en la presente descripción son células aviares (por ejemplo, células de fibroblastos aviares) y líneas celulares aviares (por ejemplo, líneas de células de fibroblastos aviares) obtenidas de aves, tales como, pollo, pavo, pato, ganso, codornices, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y aves no voladoras incluyendo avestruz, emú y casuario. En un caso particularmente útil de la descripción, se utiliza una línea celular de fibroblastos de pollo. Sin embargo, la descripción no se limita a la utilización de células de fibroblastos y contempla específicamente cualquier línea de células útiles, tales como líneas celulares de ratón, líneas celulares humanas, líneas celulares de hámster, tales como células CHO y líneas celulares de pollo, tales como LMH, células LMH2a.

**[0017]** En un caso particularmente útil de la descripción, la secuencia de nucleótidos que codifica un vector retroviral deficiente en la replicación codifica un vector retroviral basado en un retrovirus aviar. Ejemplos de retrovirus aviares incluyen, sin limitación, virus de leucemia aviar/leucosis aviar (ALV), por ejemplo, y sin limitación, RAV-0, RAV-1, RAV-2; virus de sarcoma aviar (ASV); virus de sarcoma aviar/de leucemia aguda (ASLV), incluyendo, sin limitación, virus del sarcoma de Rous (RSV); virus del sarcoma de Fujinami (FSV); virus de mieloblastosis aviar (AMV); virus de eritroblastosis aviar (AEV); virus de mielocitomatosis aviar (MCV), por ejemplo, y sin limitación, MC29; virus de la reticuloendoteliosis (REV), por ejemplo, y sin limitación, virus de necrosis del bazo (SNV). La descripción también contempla que la secuencia de nucleótidos que codifica un vector retroviral deficiente en la replicación puede codificar cualquier vector retroviral útil, incluyendo, sin limitación, vectores retrovirales basados en el virus de leucemia murina (MLV); virus del sarcoma murino de Molony (MMSV); virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV); y lentivirus (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV).

**[0018]** En un caso particularmente útil de la descripción, la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican los productos necesarios para la replicación del virus deficiente en la replicación es una secuencia de nucleótidos obtenida o derivada del genoma de un retrovirus aviar. Ejemplos de retrovirus aviares contemplados para tal uso incluyen, sin limitación, virus de leucemia aviar/leucosis aviar (ALV), por ejemplo, y sin limitación, RAV-0, RAV-1, RAV-2; virus de sarcoma aviar (ASV); virus de sarcoma aviar/de leucemia aguda (ASLV), incluyendo, sin limitación, virus del sarcoma de Rous (RSV); virus del sarcoma de Fujinami (FSV); virus de mieloblastosis aviar (AMV); virus de eritroblastosis aviar (AEV); virus de mielocitomatosis aviar (MCV), por ejemplo, y sin limitación, MC29; virus de la reticuloendoteliosis (REV), por ejemplo, y sin limitación, virus de necrosis del bazo (SNV). La descripción también contempla la secuencia de nucleótidos que codifica un producto necesario para la replicación del virus deficiente en la replicación, siendo la secuencia de nucleótidos obtenida o derivada del genoma de cualquier retrovirus útil, incluyendo, sin limitación, virus de leucemia murina (MLV); virus del sarcoma murino de Molony (MMSV); virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV); y lentivirus (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV).

**[0019]** Se incluyen en un aspecto específico de la descripción procedimientos de producción de una partícula viral que comprende introducir (por ejemplo, transfectar) en una secuencia de nucleótidos de la línea celular de fibroblastos requerida para la replicación del vector retroviral defectuoso en la replicación, por ejemplo, las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas gag, pol y env, en las que las secuencias que codifican las proteínas gag, pol y env están bajo el control de un promotor que es funcional en la línea celular de fibroblastos; introducir (por ejemplo, transfectar) en la línea celular de fibroblastos una secuencia de nucleótidos que codifica un vector retroviral deficiente en la replicación; y la recoger las partículas virales. En un caso de la descripción, las secuencias codificantes de las proteínas gag, pol y env necesarias para la replicación del vector retroviral de replicación defectuosa están contenidas en uno o más plásmidos. Por ejemplo, las secuencias codificantes de las proteínas gag, pol y env pueden estar todas contenidas en un plásmido o cada una puede estar contenida en un plásmido separado. En otro ejemplo, dos de las

secuencias codificantes de las proteínas de gag, pol y env (por ejemplo, gag y pol) pueden estar presentes en un plásmido y la tercera puede estar presente en otro plásmido (por ejemplo, env). En un caso de la descripción, la secuencia de nucleótidos que codifica el vector retroviral es un provirus. Es decir, la secuencia de nucleótidos que codifica el vector retroviral es ADN que se ha integrado en un genoma de célula huésped. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el vector retroviral está presente en un plásmido.

[0020] En un caso particularmente útil de la descripción, las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas gag, pol y env son de un retrovirus aviar. Ejemplos de retrovirus aviares incluyen, sin limitación, virus de leucemia aviar/leucosis aviar (ALV), por ejemplo, y sin limitación, RAV-0, RAV-1, RAV-2; virus de sarcoma aviar (ASV); virus de sarcoma aviar/de leucemia aguda (ASLV), incluyendo, sin limitación, virus del sarcoma de Rous (RSV); virus del sarcoma de Fujinami (FSV); virus de mieloblastosis aviar (AMV); virus de eritroblastosis aviar (AEV); virus de mielocitomatosis aviar (MCV), por ejemplo, y sin limitación, MC29; virus de la reticuloendoteliosis (REV), por ejemplo, y sin limitación, virus de necrosis del bazo (SNV). También se contempla que las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas gag, pol y env necesarias para la replicación del vector retroviral defectuoso de la replicación pueden derivar u obtenerse de cualquier vector retroviral útil, incluyendo, sin limitación, virus de leucemia murina (MLV); virus del sarcoma murino de Molony (MMSV); virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV); y lentivirus (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia simia (SIV). En ciertos casos de la descripción, las secuencias de nucleótidos necesarias para la replicación del vector retroviral defectuoso en la replicación pueden no ser todas del mismo virus. Por ejemplo, una proteína gag pueden ser del virus de la leucosis aviar (ALV), una proteína pol puede ser del virus sarcoma murino de Molony (MMSV) y una proteína env puede ser de virus de eritroblastosis aviar (AEV). En otro ejemplo, una proteína gag pueden ser del virus de sarcoma murino de Molony (MMSV), una proteína env puede ser del virus de la leucosis aviar (ALV). Estos son sólo ejemplos que se proporcionan con fines ilustrativos y la descripción no se limita a los mismos.

[0021] Aunque ejemplos específicos de la descripción requieren tres secuencias de nucleótidos para la replicación del vector retroviral defectuoso en la replicación, por ejemplo, secuencias que codifican las proteínas gag, pol y env, la descripción no está limitada a las mismas. Por ejemplo, sólo una o dos secuencias de nucleótidos pueden ser necesarias para proporcionar productos necesarios para la replicación del vector retroviral defectuoso en la replicación.

[0022] En un aspecto, la invención se refiere a procedimientos de producción de aves transgénicas. Los procedimientos incluyen recoger partículas virales producidas de acuerdo con la invención e introducir las partículas retrovirales recogidas en células embrionarias aviares, tales como embriones en etapa temprana, por ejemplo, embriones en los estadios I a XII, y posteriormente obtener un polluelo eclosionado derivado de las células de embriones.

[0023] Ciertas referencias que pueden ser relevantes para la presente invención incluyen: Burns, J.C., T. Friedmann, et al. (1993). "Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cell" Proc Natl Acad Sci USA 90(17): 8033-7; Chen, C. M., D. M. Smith, et al. (1999). "Production and design of more effective avian replication-incompetent retroviral vectors." Dev Biol 214(2): 370-84; Cosset et al (1991) "Improvements of Virus de la leucosis aviar (ALV)-Based Retrovirus Vectors by Using Different cis-Acting Sequences from ALVs" J. of Virology 65(6): 3388-3394; Schaefer-Klein, J., I. Givol, et al. (1998). "The EV-O-derived cell line DF-1 supports the efficient replication of avian leukosis-sarcoma viruses and vectors." Virology 248(2): 305-11; Patente de Estados Unidos No. 6.096.534, concedida el 1 de agosto de 2000; Patente de Estados Unidos No. 5.672.485, concedida el 30 de septiembre de 1997; Patente de Estados Unidos No. 5.985.642, concedida el 16 de noviembre de 1999; y la patente de Estados Unidos N° 5.879.924, concedida el 9 de marzo de 1999.

[0024] Cualquier combinación de características descritas en el presente documento se incluye dentro de la presente descripción, siempre que las características incluidas en dicha combinación no sean mutuamente inconsistentes. Tales combinaciones serán evidentes basándose en esta memoria descriptiva y en el conocimiento de un experto en la técnica.

### **Descripción breve de las figuras**

[0025] La Figura 1 muestra un mapa de pCMV-gagpol que contiene secuencias de codificación para la proteína gag de RSV y la proteína pol de RSV.

La Figura 2 muestra un mapa de pNLB-CMV-EPO que contiene la secuencia de codificación del vector pNLB deficiente en la replicación que contiene un casete de expresión que comprende un promotor de CMV y una secuencia de codificación de eritropoyetina (EPO 166 aminoácidos).

La Figura 3 muestra un vector pDRIVE que contiene una secuencia de nucleótidos útil para alterar la secuencia de codificación de la eritropoyetina en el vector pNLB-CMV-EPO a la forma de codificación de 165 aminoácidos.

La Figura 4 muestra un mapa de PDrive-des-Arg166-EPO que contiene la secuencia codificante para la forma de 165 aminoácidos de la eritropoyetina humana (arginina terminal eliminada).

La Figura 5 muestra pVSV-G comercialmente disponible.

**Descripción detallada**

**[0026]** Ciertas definiciones se exponen en el presente documento para ilustrar y definir el significado y alcance de los diversos términos utilizados para describir la presente descripción.

**[0027]** El término "aviar" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier especie, subespecie o cepa de organismo de la clase taxonómica avia, tal como, pero no limitado a, pollo, pavo, pato, ganso, codorniz, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y aves no voladoras incluyendo avestruz, emú y casuario. El término incluye las diversas cepas conocidas de Gallus gallus, o pollos, (por ejemplo, White Leghorn, Brown Leghorn, Barred-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Menorca, Amrox, California Gray), así como las cepas de pavos, faisanes, codornices, patos, avestruces y otras aves de corral criadas habitualmente en cantidades comerciales. También incluye un organismo aviar individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo etapas embrionarias y fetales. El término "aviar" también puede significar "perteneciente a un ave", como "una célula aviar (de aves)."

**[0028]** Un "ácido nucleico o secuencia de polinucleótido o secuencia de nucleótidos" incluye, pero no se limita a, ARNm, ADNc, ADN genómico, y las secuencias de ADN y ARN sintéticos, que comprende la bases de nucleósidos naturales adenina, guanina, citosina, timidina, y uracilo. El término también abarca secuencias que tienen una o más bases modificadas, tales como, sin limitación, pseudo uridina, 2-amino purina, desoxi uridina y desoxiinosina.

**[0029]** "Proteínas terapéuticas" o "proteínas farmacéuticas" incluyen una secuencia de aminoácidos que, en su totalidad o en parte, forman un fármaco.

**[0030]** "Transgén" es una secuencia de ADN insertada en un genoma, es decir, una secuencia de ADN exógeno. Un transgén puede referirse a toda la secuencia que se inserta, por ejemplo, los retrovirus insertados más cualquier secuencia transportada por el retrovirus. "Transgén" también puede referirse a la secuencia de interés transportada por el retrovirus, por ejemplo, una secuencia codificante y el promotor o, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos entre las LTR de los retrovirus insertados.

**[0031]** La frase "basado en" o "en base a" como en un vector retroviral que se basa en un retrovirus en particular o basado en una secuencia de nucleótidos de un retrovirus en particular quiere decir que el genoma del vector retroviral contiene una parte sustancial de la secuencia de nucleótidos del genoma del retrovirus en particular. La porción sustancial puede ser un gen o secuencia de nucleótidos en particular, tal como la secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas gag, pol y/o env u otra secuencia de nucleótidos estructural o funcional del genoma del virus, tal como secuencias que codifican las LTR, o puede ser sustancialmente el genoma del retrovirus completo, por ejemplo, la mayoría (por ejemplo, más de 60% o más de 70% o más de 80% o más de 90%) o la totalidad del genoma de retrovirus, tal como será evidente a partir del contexto en la memoria como el conocimiento de un experto en la técnica. Los ejemplos de vectores retrovirales que se basan en un retrovirus son los vectores retrovirales NL (por ejemplo, NLB) que se basan en el retrovirus ALV, tal como se describe en Cosset et al, Journal of Virology (1991) vol 65, págs. 3388 a 3394. Los vectores NL, tales como NLB, NLD y NLA, se contemplan para su uso en procedimientos de la presente invención.

**[0032]** Una "secuencia de codificación" o "marco de lectura abierto" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se puede transcribir y traducir (en el caso de ADN) o traducirse (en el caso de ARNm) en un polipéptido in vitro o in vivo cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio de la traducción en el extremo 5' terminal (amino) y un codón de parada de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia de terminación de la transcripción por lo general se encuentra 3' de la secuencia de codificación. Una secuencia de codificación puede estar flanqueada en los extremos 5' y/o 3' por regiones no traducidas.

**[0033]** Las "secuencias de control" o "secuencias reguladoras" de ácido nucleico se refieren a secuencias promotoras, codones de inicio de la traducción y codones de parada, sitios de unión a ribosomas, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en dirección 5', potenciadores, y similares, según sea necesario y suficiente para la transcripción y traducción de una secuencia de codificación determinada en una célula huésped definida. Los ejemplos de secuencias de control adecuadas para las células eucariotas son promotores, señales de poliadenilación y potenciadores. Todas estas secuencias de control no necesitan estar presentes en un vector recombinante, siempre que las necesarias y suficientes para la transcripción y traducción del gen deseado estén presentes.

**[0034]** "Unido operativamente o de manera operativa" se refiere a la configuración de las secuencias codificantes y de control para realizar la función deseada. De este modo, las secuencias de control unidas operativamente a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Una secuencia codificante está unida operativamente a, o bajo el control de, regiones reguladoras de la transcripción en una célula cuando la ADN polimerasa se unirá a la secuencia promotora y transcribirá la secuencia codificante en ARNm que puede traducirse en la proteína codificada. Las secuencias de control no necesitan estar contiguas con la secuencia codificante, siempre que funcionen para dirigir la expresión de la misma. De este modo, por ejemplo, pueden estar

presentes secuencias intermedias no traducidas, aunque transcritas, entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora todavía puede considerarse "unida operativamente" a la secuencia codificante.

5 **[0035]** Los términos "heteróloga" y "exógena" cuando se refieren a secuencias de ácido nucleico, tales como secuencias codificantes y secuencias de control, designan secuencias que normalmente no están asociadas con una región de una construcción recombinante o con un locus cromosómico particular y/o no están normalmente asociadas con una célula particular. Por lo tanto, una región "exógena" de una construcción de ácido nucleico es un segmento identificable de ácido nucleico dentro de o unida a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región exógena de una construcción podría incluir una secuencia codificante flanqueada por secuencias que no se encuentran en asociación con la secuencia codificante en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia codificante exógena es una construcción donde la secuencia codificante en sí no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). Del mismo modo, una célula huésped transformada con una construcción o ácido nucleico que no está normalmente presente en la célula huésped se consideraría exógena para los propósitos de esta descripción

15 **[0036]** "Proteína exógena" o "proteína heteróloga", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína no presente de forma natural en un tejido o célula particular, una proteína que es el producto de expresión de una construcción o transgén de expresión exógena, o una proteína no presente de forma natural en una cantidad determinada en un tejido o célula particular. Una proteína que es exógena a un huevo es una proteína que normalmente no se encuentra en el huevo. Por ejemplo, una proteína exógena a un huevo puede ser una proteína que está presente en el huevo como resultado de la expresión de una secuencia codificante presente en un transgén del animal que pone el huevo.

25 **[0037]** Los productos de expresión descritos en este documento pueden consistir en material proteico que tiene una estructura química definida. Sin embargo, la estructura precisa depende de una serie de factores, en particular modificaciones químicas comunes a las proteínas. Por ejemplo, dado que todas las proteínas contienen grupos amino y carboxilo ionizables, la proteína se puede obtener en forma de sal ácida o básica, o en forma neutra. La secuencia de aminoácidos primaria puede derivatizarse usando moléculas de azúcar (glicosilación) o mediante otras derivatizaciones químicas que implican la unión covalente o iónica con, por ejemplo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares, que se producen a menudo a través de la asociación con sacáridos. Estas modificaciones pueden tener lugar in vitro, o in vivo, siendo este último realizado por una célula huésped a través de sistemas de procesamiento post-traduccionales. Tales modificaciones pueden aumentar o disminuir la actividad biológica de la molécula, y tales moléculas químicamente modificadas también pretenden estar dentro del alcance de la descripción.

35 **[0038]** "Vector" significa un polinucleótido comprendido de un ADN o ARN de una sola hebra, de doble hebra, circular o superenrollado. Un vector típico puede incluir los siguientes elementos unidos operativamente a distancias apropiadas para permitir la expresión de genes funcionales: origen de replicación, promotor, potenciador, secuencia líder de ARNm 5', sitio de unión ribosomal, casete de ácido nucleico, sitios de terminación y de poliadenilación, y secuencias marcadoras seleccionables. Uno o más de estos elementos pueden omitirse en aplicaciones específicas. El casete de ácido nucleico puede incluir uno o más sitios de restricción para la inserción de la secuencia de ácido nucleico a expresar. En un vector funcional, el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de ácido nucleico a expresar incluyendo los sitios de inicio y terminación de la traducción. Un intrón puede estar opcionalmente incluido en la construcción, por ejemplo, 5' a la secuencia codificante. Un vector se construye de modo que la secuencia codificante en particular se encuentra en el vector con las secuencias reguladoras apropiadas, siendo la posición y la orientación de la secuencia codificante con respecto a las secuencias de control tales que la secuencia codificante se transcribe bajo el "control" de las secuencias de control o reguladoras. La modificación de las secuencias que codifican la proteína particular de interés puede ser deseable para lograr este fin. Por ejemplo, en algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de modo que se puede unir a las secuencias de control con la orientación apropiada; o para mantener el marco de lectura. Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden ligarse a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector. Alternativamente, la secuencia codificante puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias control y un sitio de restricción apropiado que está en marco de lectura con y bajo el control regulador de las secuencias de control.

55 **[0039]** Un "vector retroviral" es un retrovirus o un retrovirus modificado o virus que se puede utilizar con las secuencias de nucleótidos lanzadera en una célula. El término virus, vector viral, retrovirus y vector retroviral se pueden usar indistintamente en toda la memoria.

60 **[0040]** Un "promotor" es un sitio en el ADN al que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen. En algunos casos de la descripción, el promotor se modificará mediante la adición o delección de secuencias, o se reemplazará por secuencias alternativas, incluyendo secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Muchos promotores eucariotas contienen dos tipos de secuencias de reconocimiento: la caja TATA y elementos promotores en dirección 5'. El primero, situado en dirección 5' del sitio de iniciación de la transcripción, está implicado en dirigir la ARN polimerasa para iniciar la transcripción en el sitio correcto, mientras que el último parece determinar la tasa de transcripción y está en dirección 5' de la caja TATA. Los elementos potenciadores también pueden estimular la transcripción a partir de promotores enlazados, pero muchos funcionan exclusivamente en un tipo de célula particular. Muchos elementos

- potenciadores/promotores derivados de virus, por ejemplo, el promotor SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV) y el promotor del virus de la leucemia murina (MLV), son todos activos en una amplia gama de tipos de células, y se denominan "constitutivos" o "ubicuos". Un ejemplo de un promotor no constitutivo es el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV). La secuencia de ácido nucleico insertada en el sitio de clonación puede tener cualquier marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de interés, con la condición de que, cuando la secuencia de codificación codifica un polipéptido de interés, debe carecer de sitios de empalme crípticos que puedan bloquear la producción de moléculas de ARNm adecuadas y/o producir moléculas de ARNm empalmadas de forma aberrante o anormales.
- 5
- 10 **[0041]** Un "gen marcador" es un gen que codifica una proteína que permite la identificación y el aislamiento de células transfectadas correctamente. Las secuencias marcadoras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, genes de la proteína fluorescente verde, amarillo y azul (GFP, YFP, BFP y, respectivamente). Otros marcadores adecuados incluyen genes de timidina quinasa (tk), dihidrofolato reductasa (DHFR) y aminoglucósido fosfotransferasa (APH). El último imparte resistencia a los antibióticos de aminoglucósidos, tales como kanamicina, neomicina y geneticina. Estos y otros genes marcadores, tales como los que codifican cloranfenicol acetiltransferasa (CAT),  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal), se pueden incorporar en el casete de ácido nucleico primario junto con el gen que expresa la proteína deseada, o los marcadores de selección pueden estar contenidos en vectores separados y se cotransfectan.
- 15
- 20 **[0042]** El término "plásmido", como se usa en este documento, típicamente se refiere a un vector que no se puede reproducir en una célula eucariota y típicamente no se integra en el genoma de una célula eucariota. Los plásmidos son particularmente útiles en la producción de la transfección transitoria.
- 25 **[0043]** Un "gen informador" es un gen marcador que "informa" de su actividad en una célula mediante la presencia de la proteína que codifica.
- 30 **[0044]** Un virus o vector viral "deficiente en la replicación" es un virus o vector viral que carece de un elemento de su genoma que se requiere para la replicación.
- 35 **[0045]** Una "partícula retroviral", "partícula transductora", o "partícula de transducción" se refiere a un virus o retrovirus defectuoso en la replicación o competente en la replicación capaz de transducir el ADN o ARN no viral en una célula.
- 40 **[0046]** Los términos "transformación", "transducción" y "transfección" indican todos la introducción de un polinucleótido en una célula.
- 45 **[0047]** "Magnum" es esa parte del oviducto entre el infundíbulo y el istmo que contiene células de glándulas tubulares que sintetizan y secretan las proteínas de la clara del huevo.
- 50 **[0048]** El término "optimizado" se utiliza en el contexto de "secuencia de codificación optimizada", en el que los codones utilizados con más frecuencia para cada aminoácido particular que se encuentra en las proteínas de la clara del huevo ovalbúmina, lisozima, ovomucoide y ovotransferrina, se utilizan en el diseño de la secuencia de polinucleótido optimizada, que codifica la proteína exógena, que se pueden insertar en vectores retrovirales o partículas producidas de acuerdo con la presente descripción. Más específicamente, la secuencia de ADN optimizada se basa en el uso de codones optimizados del oviducto de gallina y se puede producir usando el programa BACKTRANSLATE del Paquete Wisconsin, Versión 9.1 (Genetics Computer Group Inc., Madison, Wis.) con una tabla de uso de codones compilada de las proteínas ovalbúmina, lisozima, ovomucoide y ovotransferrina del pollo (*Gallus gallus*). Por ejemplo, el porcentaje de uso para los cuatro codones del aminoácido alanina en las cuatro proteínas de la clara de huevo es 34% para GCU, 31% para GCC, 26% para GCA, y 8% para GCG. Por lo tanto, GCU se utiliza como el codón para la mayoría de las alaninas en la secuencia codificante de IFN- $\alpha$  2b humana optimizada, la secuencia de aminoácidos de la cual es bien conocida en la técnica. Los vectores que contienen el gen para IFN- $\alpha$  2b humana optimizada se utilizan para crear aves transgénicas que expresan IFN- $\alpha$  2b derivada de aves de corral transgénicas (TPD IFN- $\alpha$  2b) en sus tejidos y huevos. De manera similar, se emplea el procedimiento anterior para el diseño de la secuencia de polinucleótidos de la eritropoyetina humana optimizada (EPO) con el fin de crear aves transgénicas que expresan eritropoyetina derivada de aves de corral transgénicas (TPD EPO) en sus tejidos y huevos.
- 55 **[0049]** La descripción se dirige a la producción de partículas virales capaces de transducción de células, por ejemplo, células de aves, incluyendo células embrionarias. En particular, los vectores retrovirales deficientes en la replicación se pueden producir de acuerdo con la descripción.
- 60 **[0050]** La descripción contempla la aplicación de cualquier célula útil para emplear de acuerdo con la presente descripción, tal como células aviares. En un caso particularmente útil de la descripción, las células usadas en este documento son inmortales; es decir, las células son capaces de un crecimiento continuo en cultivo.
- 65 **[0051]** Las células de fibroblastos (es decir, líneas celulares de fibroblastos) han demostrado ser particularmente útiles, tal como se describe en el presente documento, aunque la descripción no se limita a las mismas. Por ejemplo, la descripción contempla el uso de células de fibroblastos humanas, células de fibroblastos de conejo, células de fibroblastos de la especie bovina, células de fibroblastos de reptiles, células de fibroblastos de peces u otras células

de fibroblastos útiles. En un aspecto particularmente útil de la descripción, se emplean células de fibroblastos de aves. La descripción no se limita al uso de cualquier célula de fibroblasto aviar particular; sin embargo, ejemplos de aves de las que pueden derivar las células de fibroblastos para uso de acuerdo con la descripción incluyen, sin limitación, pavos, patos, gansos, codornices, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y aves no voladoras que incluyen avestruz, emú y casuario. Un tipo particularmente útil de célula de fibroblasto aviar para su uso tal como se describe en el presente documento es la célula de fibroblasto de pollo. Se pueden utilizar células de fibroblastos de cualquier variedad de pollo (es decir, Gallus gallus), tales como, pero no limitado a, White Leghorn, Brown Livorno, Barred-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Menorca, Amrox y California Gray.

**[0052]** Las células fibroblásticas son típicamente células presentes en o células que dan lugar a tejido conectivo. En un aspecto, las células de fibroblastos son células que dan lugar a colágeno. Células de fibroblastos se pueden definir como células que secretan una matriz extracelular rica en colágeno. Las células de fibroblastos pueden derivar de una variedad de fuentes. Por ejemplo, la descripción contempla células de fibroblastos obtenidas de tejido, tal como tejido muscular y de órganos, tal como el hígado, la piel y los pulmones. En un caso, la descripción contempla el uso de células de fibroblastos de embrión, tales como células de fibroblastos de embrión de pollo, por ejemplo, líneas celulares de fibroblastos de embrión de pollo inmortalizadas. Una línea celular de fibroblastos particularmente útil (DF-1) se da a conocer en la patente de Estados Unidos No. 5.672.485, concedida el 30 de septiembre de 1.997.

**[0053]** La descripción contempla la introducción de determinadas secuencias de nucleótidos en las células; es decir, secuencias de nucleótidos que codifican retrovirus deficientes en la replicación y secuencias de nucleótidos que codifican los productos necesarios para la replicación del retrovirus deficiente en la replicación, por ejemplo, dos o más proteínas gag, pol y env. Los productos requeridos son típicamente biomoléculas que son necesarias para la replicación o propagación del retrovirus. Por ejemplo, y sin limitación, las proteínas necesarias para la replicación o la propagación de los retrovirus pueden ser: polimerasa viral; una o más proteínas contenidas en la envoltura viral; una o más proteínas contenidas en la cápside.

**[0054]** Las secuencias de nucleótidos introducidas en las células pueden estar en cualquier forma útil. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos pueden ser ADN o ARN. Las secuencias de nucleótidos introducidas en las células pueden estar en forma lineal o en forma circular. En un caso, las secuencias de nucleótidos están contenidas en un vector circular. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el vector retroviral aviar es ADN.

**[0055]** Se puede emplear cualquier vector útil en la presente descripción. Típicamente, los vectores de la descripción no están diseñados para integrarse en el genoma de células utilizadas para la producción y también están diseñados para no replicarse dentro de la célula. Muchos vectores disponibles comercialmente, tales como plásmidos o fagémidos están disponibles y pueden usarse de acuerdo con la descripción, tales como pBluescript®, pBR322, pUC19, pDRIVE y otros.

**[0056]** Las secuencias de nucleótidos se introducen de forma transitoria en la célula mediante cualquier procedimiento útil. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos se pueden introducir en las células usando, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, sonicación, bombardeo de micropartículas, así como el uso de dendrímeros, PEI, polilisina y poliamina y otras técnicas, cada una como se entiende por un técnico en la materia. En una realización particularmente útil, la introducción de las secuencias de nucleótidos en las células es mediante transfección, por ejemplo, lipofección. Los procedimientos para transfectar células mediante lipofección son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de reactivos de lipofección que se pueden utilizar de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, DMR1 C, FuGENE y Lipofectamine™.

**[0057]** Mediante los procedimientos de la presente invención, los transgenes contenidos en las partículas virales producidas de acuerdo con la presente invención, se pueden introducir en células blastodérmicas embrionarias aviares, para producir un pollo transgénico, pavo transgénico, codorniz transgénico y otras especies aviares, que llevan el transgén en el material genético de su tejido de línea germinal. Las células blastodérmicas pueden ser células de la etapa I a XII, o el equivalente de las mismas, y son típicamente cerca de la etapa X (por ejemplo, etapa VII a la etapa XII). Las partículas retrovirales producidas como se describe en el presente documento también se contemplan para su uso en la transducción de células germinales primordiales de embriones en etapa posterior, incluyendo embriones de la etapa 13 a la etapa 30. Típicamente, aunque no exclusivamente, las células blastodérmicas están presentes en el interior de un huevo de cáscara dura. Las células útiles para la producción de aves transgénicas incluyen células denominadas células germinales embrionarias (EG), células madre embrionarias (ES) y células germinales primordiales (PGC). Se contempla que las células blastodérmicas embrionarias pueden ser recién aisladas, mantenerse en cultivo o, en una realización particularmente útil, residen in situ dentro de un embrión.

**[0058]** Los ejemplos de partículas virales que pueden producirse de acuerdo con la invención incluyen partículas virales deficientes en la replicación que contienen una secuencia codificante para una proteína útil que está unida a un promotor que proporciona la expresión de la proteína útil en una célula huésped, por ejemplo, una célula de un animal transgénico. Por ejemplo, la proteína útil puede ser una proteína humana u otra proteína útil, tal como las descritas en el presente documento. En una realización, las partículas virales se pueden utilizar para producir proteínas exógenas en tejidos específicos de un ave, por ejemplo, en el tejido de oviducto de un ave. En una realización

particularmente útil, las partículas virales se utilizan en procedimientos para producir aves que ponen huevos que contienen proteína exógena.

5 **[0059]** En un caso particular de la descripción, un vector retroviral aviar, tal como un vector basado en ALV, tal como NLB, se cotransfecta en una línea celular de fibroblastos (por ejemplo, una línea celular de fibroblastos de pollo), tal como las células DF-1 (por ejemplo, a través de lipofección) junto con un vector de expresión de gag-pol del virus del sarcoma de Rous (RSV) y un tercer vector que expresa una proteína de la envoltura, por ejemplo, una proteína de envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) o de ALV (envA). Después de 48 horas, el medio se recoge y contiene un título elevado de partículas retrovirales a base de ALV. Las partículas de virus se pueden concentrar mediante centrifugación para lograr títulos aún más altos. En cierto caso de la descripción, las células se tratan con butirato de sodio que proporciona un aumento adicional en el título viral.

15 **[0060]** En una realización, en el genoma de las partículas virales producidas como se describe en el presente documento, la secuencia codificante de proteína exógena y el promotor están ambos posicionados entre las LTR 5' y 3'. El vector puede incluir una secuencia de nucleótidos marcadora, en el que la secuencia de nucleótidos marcadora está unida operativamente a un promotor.

20 **[0061]** En un caso, los vectores virales producidos de acuerdo con la descripción incluyen una secuencia codificante de péptido señal que está operativamente unida a la secuencia codificante de la proteína exógena, de modo que después de la traducción en una célula, el péptido señal dirigirá la secreción de la proteína exógena expresada por el vector en la clara de huevo y la proteína exógena se empaquetará en un huevo de cáscara dura.

25 **[0062]** En ciertos casos, la introducción de un vector de la presente descripción en las células blastodérmicas embrionarias se realiza con células blastodérmicas embrionarias que son recién aisladas o están en cultivo. Las células transgénicas se inyectan a continuación en la cavidad subgerminal bajo un blastodermo receptor en un huevo. En algunos casos, sin embargo, el vector se libera directamente en la cavidad subgerminal de un embrión blastodérmico in situ.

30 **[0063]** En una realización de la invención, las partículas virales utilizadas para transfectar células blastodérmicas y generar la integración estable en el genoma aviar contienen una secuencia codificante y un promotor en relación operativa y posicional para expresar la secuencia codificante en la célula de glándula tubular del magnum del oviducto aviar, en el que la secuencia codificante codifica una proteína exógena que se deposita en la clara de huevo de un huevo de cáscara dura. El promotor puede ser una porción de un promotor que es particularmente activo (es decir, altamente expresado) en las células de glándulas tubulares, tales como el promotor de ovoalbúmina, el promotor de ovomucoide o el promotor de lisozima. Por lo tanto, en una realización, el promotor es un promotor no constitutivo. La invención contempla el truncamiento de tales promotores y/o la condensación de los elementos reguladores críticos de los promotores de manera que se retienen las secuencias requeridas para la expresión en las células de glándulas tubulares del magnum del oviducto, mientras que son lo suficientemente pequeños que pueden incorporarse fácilmente en el genoma de las partículas virales. La invención también contempla el uso de un promotor de fusión. En otra realización particularmente útil, el promotor es un promotor constitutivo, por ejemplo, y sin limitación, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de virus de sarcoma de Rous (RSV), un promotor de virus de leucemia murina (MLV) o un promotor de beta-actina o un promotor de LTR.

45 **[0064]** En un caso de la descripción, el promotor es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV), un promotor del virus de leucemia murina (MLV), un promotor de beta-actina, un promotor de virus de tumor mamario de ratón (MMTV), un promotor de LTR, un promotor de ovoalbúmina, un promotor de lisozima, un promotor de conalbúmina, un promotor de ovomucoide, un promotor de ovomucina y un promotor de ovotransferrina o combinaciones de los mismos. En un caso de la descripción, el promotor contiene un segmento de una región promotora, tal como un segmento del promotor de ovalbumina, lisozima, conalbúmina, ovomucoide, ovomucina y ovotransferrina. En un ejemplo particularmente útil de la invención, el promotor contiene al menos una parte del promotor de CMV.

55 **[0065]** Si se desea, las partículas transductoras (es decir, partículas de transducción) producidas de acuerdo con la presente invención se pueden titular mediante cualquier procedimiento útil tal como se entiende por un experto en la técnica. Por ejemplo, si el genoma viral contiene un marcador, tal como un gen de resistencia a neomicina, las partículas se pueden titular mediante transducción de células y dilución en serie, seguido de emplacado y recuento de colonias. En una realización, el título se determina mediante hibridación con el genoma viral (por ejemplo, densitometría cuantitativa de una transferencia sondada del ácido nucleico viral (ARN o ADN), tal como se entiende por los expertos en la técnica). También se puede utilizar análisis de inmunofluorescencia o ELISA para cuantificar la proteína de la cubierta viral y PCR cuantitativa del genoma viral, por ejemplo, PCR cuantitativa del producto de transcripción inversa del genoma viral.

60 **[0066]** En un caso, las partículas virales de la descripción se introducen en células blastodérmicas aviares mediante procedimientos de "windowing" del huevo, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de Speksnijder (patente de Estados Unidos No. 5,897,998). Es decir, las partículas virales se introducen en las células blastodérmicas in situ, por ejemplo, mediante la introducción en la cavidad subgerminal del embrión. Después de la introducción (por ejemplo,

inyección), los huevos eclosionan después de aproximadamente 21 días. Por lo general, se seleccionan las aves macho para el cruce. Con el fin de cribar los gallos G0 que contienen el transgén (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos introducida) en su esperma, el ADN se extrae de muestras de esperma de gallo. Los gallos G0 con los niveles más altos del transgén en sus muestras de esperma se pueden cruzar con gallinas no transgénicas mediante inseminación artificial. Se criban muestras de ADN de la sangre para detectar la presencia del transgén y en el caso de aves producidas para la producción de proteína exógena, la sangre puede someterse a ensayo (por ejemplo, ELISA) para detectar la proteína exógena. Si se confirma la presencia de la proteína exógena, el esperma de los gallos transgénicos G1 se puede utilizar para la inseminación artificial de gallinas no transgénicas. Un cierto porcentaje de la descendencia G2 contendrá el transgén (por ejemplo, aproximadamente 50%).

**[0067]** Las aves transgénicas producidas a partir de las células blastodérmicas se conocen como fundadoras. Algunas fundadoras llevarán el transgén en las células de las glándulas tubulares en el magnum de sus oviductos. Estas aves pueden expresar la proteína exógena codificada por el transgén en sus oviductos. La proteína exógena puede también estar presente en otros tejidos (por ejemplo, sangre), además del oviducto. Si la proteína exógena contiene la secuencia o secuencias señal apropiadas, puede secretarse en el lumen del oviducto y en la clara del huevo. Algunas fundadoras son fundadoras de la línea germinal. Una fundadora de la línea germinal es una fundadora que porta el transgén en el material genético de su tejido de línea germinal, y puede transportar o no el transgén en las células de glándulas tubulares que expresan la proteína exógena. Por lo tanto, de acuerdo con la descripción, el ave transgénica puede tener células de glándulas tubulares que expresan la proteína exógena. Sin importar si la fundadora contiene el material genético en sus células de glándulas tubulares, si la fundadora es una fundadora de la línea germinal algunas de su descendencia serán completamente transgénicas (es decir, no quiméricas) y tendrán células de glándulas tubulares que expresan la proteína exógena. En ciertas realizaciones, la descendencia puede expresar un fenotipo determinado por la expresión del gen exógeno en un solo un tejido o tejidos específicos del ave, por ejemplo, mediante el uso de un promotor específico de tejido.

**[0068]** En un ejemplo específico, para la producción de pollos transgénicos, tal como se describe en el presente documento, un promotor de CMV se unió a la secuencia codificante de eritropoyetina (forma de 165 aminoácidos; véase, por ejemplo, *Pharmacotherapy* (1990) Suplemento al volumen 10, No. 2, pág. 3S a 8S) para formar una casete que se insertó en un vector de ALV. El vector retroviral se produjo de forma transitoria y se concentró hasta aproximadamente  $1 \times 10^7$  partículas/ml. Se inyectaron de 3 a 7  $\mu$ l de virus concentrado en la cavidad subgerminal de 21 huevos no incubados de la línea SPF de Charles River en la ventana. Los pollitos fueron eclosionados y criados hasta la madurez sexual. Los machos fueron seleccionados para detectar la presencia del transgén en su ADN de esperma mediante PCR cuantitativa para el gen de interés, en este caso EPO.

**[0069]** En una realización, las partículas retrovirales producidas, tal como se describe en el presente documento, se utilizan para producir aves transgénicas utilizadas para expresar, en gran rendimiento y a bajo coste, una amplia variedad de proteínas deseadas, incluyendo las que se utilizan como productos farmacéuticos humanos y animales, productos de diagnóstico y aditivos para piensos de ganado. Por ejemplo, la descripción incluye aves transgénicas que producen dichas proteínas y los huevos puestos por las aves transgénicas que contienen la proteína, por ejemplo, en la clara del huevo. La presente invención contempla el uso en la producción de cualquier proteína deseada incluyendo proteínas farmacéuticas con el requisito de que la secuencia codificante de la proteína se puede introducir en una célula de oviducto de acuerdo con la presente invención. En una realización particularmente útil, las proteínas producidas, tal como se describe en el presente documento, son proteínas humanas, es decir, proteínas producidas por los seres humanos.

**[0070]** La invención, por lo tanto, incluye procedimientos para producir proteínas multiméricas incluyendo inmunoglobulinas, tales como anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de las mismas. De este modo, en una realización de la presente invención, la proteína multimérica es una inmunoglobulina, en la que el primer y segundo polipéptidos heterólogos son cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, respectivamente.

**[0071]** En ciertas realizaciones, un polipéptido de inmunoglobulina codificado por la unidad de transcripción de al menos un vector de expresión puede ser un polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una región variable o una variante de la misma, y puede comprender además una región D, una región J, una región C, o una combinación de las mismas. Un polipéptido de inmunoglobulina producido tal como se describe en el presente documento también puede ser un polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una región variable o una variante de la misma, y puede comprender además una región J y una región C. La presente invención también contempla múltiples regiones de inmunoglobulina que se derivan de la misma especie animal, o una mezcla de especies, incluyendo, pero no sólo, humano, ratón, rata, conejo y pollo. En ciertas realizaciones, los anticuerpos son humanos o humanizados.

**[0072]** En otras realizaciones, el polipéptido de inmunoglobulina producido tal como se describe en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina, una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina, y un péptido enlazador formando de este modo un anticuerpo de cadena única capaz de unirse selectivamente a un antígeno.

**[0073]** Ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden ser producidos en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, HERCEPTIN™ (Trastuzumab) (Genentech, CA) que es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; REOPRO™ (abciximab) (Centocor) que es un receptor anti-glicoproteína IIb/IIIa en las plaquetas para la prevención de la formación de coágulos; ZENAPAX™ (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado inmunosupresor para la prevención de rechazo agudo de aloinjerto renal; PANOREX™ que es un anticuerpo murino IgG2a del antígeno de superficie celular anti-17-1A (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anti-idiotipo murino (epítipo GD3); anticuerpo IgG (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico; VITAXIN™ que es un anticuerpo anti-integrina  $\alpha V\beta 3$  humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath 1H/LDP-03 que es un anticuerpo IgG1 anti-CD52 humanizado (LeukoSite); Smart M195 que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN™ que es un anticuerpo IgG1 anti-CD20 quimérico (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); ICM3 que es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 que es un anticuerpo anti-CD80 de primate (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN™, que es un anticuerpo anti-CD20 murino radiomarcado (IDEC/Schering AG); IDEC-131, que es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (IDEC/Eisai); IDEC-151 que es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 que es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 inteligente que es una IgG anti-CD3 humanizada (Protein Design Lab); 5G1.1 que es un anticuerpo anti-factor de complemento 5 (CS) humanizado (Alexion Pharm); D2E7, que es un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humanizado (CATIBASF); CDP870, que es un fragmento Fab anti-TNF- $\alpha$  humanizado (Celltech); IDEC-151 que es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 que es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571, que es un anticuerpo IgG4 anti-TNF- $\alpha$  humanizado (Celltech); LDP-02 que es un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$  humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A que es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ que es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN™ que es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); y CAT-152, que es un anticuerpo anti-TGF- $\beta 2$  humano (Cambridge Ab Tech).

**[0074]** Otros ejemplos específicos de proteínas terapéuticas que se contemplan para la producción, tal como se describe en el presente documento, incluyen, sin limitación, factor VIII, factor VIII con dominio B suprimido, factor VIIa, factor IX, anticoagulantes, hirudina, alteplasa, tpa, reteplasa, tpa, tpa con de 3 de 5 dominios suprimidos, insulina, insulina lispro, insulina aspart, insulina glargina, análogos de insulina de acción prolongada, hgh, glucagones, tsh, folitropina-beta, fsh, gm-csf, pdgh, ifn alpa2a, inf-apha, ifn-beta 1b, ifn-beta 1a, ifn-gammalb, il-2, il-11, hbsag, ospa, mab murino dirigido contra el antígeno de los linfocitos T, mab murino dirigido contra la etiqueta-72, glicoproteína asociada al tumor, fragmentos fab derivados de mab quimérico, fragmento de mab murino dirigido contra antígeno ca125 asociado a tumor, fragmento mab murino dirigido contra antígeno carcinoembrionario humano, cea, fragmento de mab murino dirigido contra miosina cardiaca humana, fragmento de mab murino dirigido contra antígeno psma de superficie del tumor, fragmentos de mab murinos (mezcla de fab/fab2) dirigidos contra hmw-maa, fragmento de mab murino (fab) dirigido contra antígeno asociado a carcinoma, fragmentos de mab (fab) dirigidos contra nca 90, un antígeno de reacción cruzada no específica con granulocitos superficie, mab quimérico dirigido contra el antígeno cd20 encontrado sobre la superficie de los linfocitos B, mab humanizado dirigido contra la cadena alfa del receptor de il2, mab quimérico dirigido contra la cadena alfa del receptor de il2, mab quimérico dirigido contra tnf-alfa, mab humanizado dirigido contra un epítipo en la superficie del virus sincitial respiratorio, mab humanizado dirigido contra her2, es decir, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, mab humano dirigido contra antígeno anti-ctla4 asociado a tumor de citoqueratina, mab quimérico dirigido contra el antígeno de superficie cd20 de los linfocitos b dornasa alfa adasa, beta glucocerebrosidasa, tnf-alfa, proteína de fusión de toxina il-2-difteria, proteína de fusión de tnfr-fragmento lgg laronidasa, adnasas, alefacept, darbepoetina alfa (factor estimulante de colonias), tositumomab, mab murino, alemtuzumab, rasburicasa, agalsidasa beta, teriparatida, derivados de la hormona paratiroidea, adalimumab (lggl), anakinra, modificador biológico, nesiritide, péptido natriurético de tipo b humano (hbnp), factores estimulantes de colonias, pegvisomant, antagonista del receptor de la hormona de crecimiento humana, proteína C activada recombinante, omalizumab, bloqueador de inmunoglobulina E (LGE) y tiuxetan lbritumomab.

**[0075]** La presente invención proporciona específicamente la producción de proteínas humanas útiles, tales como proteínas humanas que tienen aplicación como proteínas farmacéuticas. Por ejemplo, la presente invención proporciona la producción de citocinas humanas (tales como interferón humano (IFN), eritropoyetina humana (EPO), hormona de crecimiento humano, G-CSF humano, GM-CSF humano), anticuerpos humanos y otras proteínas humanas útiles. Otras proteínas que se expresan de manera deseable, tal como se describe en el presente documento, incluyen lisozima,  $\beta$ -caseína, albúmina,  $\alpha$ -1-antitripsina, antitrombina III, colágeno, factores VIII, IX, X, y similares, fibrinógeno, ácido hialurónico, insulina, lactoferrina, proteína C, activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA), enzimas de aditivos alimentarios, somatotropina y quimotripsina. Los anticuerpos modificados genéticamente, tales como inmunotoxinas que se unen a los antígenos de superficie sobre las células tumorales humanas y las destruye, también se pueden expresar para uso como productos farmacéuticos o de diagnóstico.

**[0076]** Los siguientes ejemplos específicos pretenden ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de las reivindicaciones.

## 65 **Ejemplo 1**

**Construcción del vector**

Construcción de pCMV-gagpol

5 **[0077]** Se digirió pRC/CMV (Invitrogen, Inc.) con Not I y Hind III y el vector de 5376 pb linealizado se purificó en gel. La región gag del Virus del Sarcoma de Rous (RSV) se amplificó a partir de RSV utilizando Pfu polimerasa y los cebadores siguientes:

10 RSV-gag-1-2, GGCAAGCTTGGATCAAGCATGGAAGCCGTCATAAAGGT (SEQ ID NO: 1) y RSV-gag-2, TGGGAATTCCTCCTCCTATGC (SEQ ID NO: 2).

15 El producto de PCR del RSV se digirió con EcoRI y Hind III y el fragmento de 1954 pb que contenía la región gag se purificó en gel. La región pol del virus del sarcoma de Rous (RSV) se amplificó con la mezcla de enzimas de elongasa (Invitrogen, Inc.) usando los siguientes cebadores: RSV-pol I, ACGTGGGAGTCACCCGGTCAAACAG (SEQ ID NO: 3) y RSV-Pol2, GGGTCGACGCGGCCGCTTAACCTCTCGTTGGCAGCAAG (SEQ ID NO: 4). El producto de PCR se digirió con EcoRI y NotI y el fragmento de 2873 pb que contenía la región pol se purificó en gel.

20 **[0078]** El pRC/CMV linealizado, el producto de PCR RSV gag y el producto PCR RSV pol se ligaron juntos para producir el vector de 10203 pb pCMV-gagpol (Figura 1).

Construcción de pNLB-CMV-EPO

25 **[0079]** Se digirió pNLB-CMV-hIFN alfa-2b (véase la patente de Estados Unidos No. 6.730.822, concedida el 4 de mayo de 2004 y la solicitud de patente de Estados Unidos N° 11/167.052, presentada el 24 de junio de 2005) con Hind III y EcoRI con el fin de reemplazar la secuencia codificante de hIFN de interés más la secuencia codificante del péptido señal con una secuencia codificante de EPO más péptido señal (SEQ ID NO: 11). Debido a que existen múltiples sitios EcoRI y Hind III en el vector, se utilizó el procedimiento de escisión con endonucleasa de restricción asistida por RecA (RARE) para cortar los sitios deseados. Los siguientes oligonucleótidos se utilizaron en el procedimiento RARE:

30 pnlbEcoRI3805rare (5'-GAC TCC TGG AGC CCG TCA GTA TCG GCG GAA TTC CAG CTG AGC GCC GGT CGC TAC CAT TAC-3') (SEQ ID NO: 5) y  
pnlbHind III3172rare (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CGG AAG CTT TCA CCA TGG CTT TGA CCT TTG CCT TAC-3') (SEQ ID NO: 6).

Se obtuvo un vector linealizado de 8740 pb y se purificó en gel.

35 **[0080]** El inserto de EPO fue preparado mediante PCR de solapamiento de la siguiente manera.

**[0081]** El primer producto de PCR fue producido mediante amplificación de una secuencia de EPO sintética (EPO 1) clonada en un vector de clonación estándar con Pfu polimerasa y los cebadores siguientes: 5'pNLB/Epo (5'-GGGGGAAGCTTTACCATGGGCGTGCACGAG-3') (SEQ ID NO: 7) y pNLB/3'Epo (5'-TCCCCATACTAGACTTTTTACCTATCGCCGGTGC-3') (SEQ ID NO: 8). El segundo producto de PCR fue producido por amplificación de una región de pNLB-CMV-hIFN alfa-2b con Pfu polimerasa y los cebadores siguientes: 3'Epo/pNLB (5'-ACCGCGATAGGTAAGTAAAGTCTAGTATGGG-3') (SEQ ID NO: 9) y pNLB/SapI (5'-GGGGGGCTCTTCTCAGCTGGAATTCGCCGATAC-3') (SEQ ID NO: 10). Los dos productos de PCR se mezclaron y se reamplificaron con los siguientes cebadores: 5'pNLB/Epo (5'-GGGGGAAGCTTTACCATGGGCGTGCACGAG-3') (SEQ ID NO: 7) y pNLB/SapI (5'-GGGGGGCTCTTCTCAGCTGGAATTCGCCGATAC-3') (SEQ ID NO: 10). El producto de PCR de fusión se digirió con Hind III y Eco RI y se purificó en gel un fragmento de 633 pb. Los fragmentos de 8740 pb y 633 pb se ligaron para crear pNLB-CMV-EPO (Figura 2).

50 EPO 1 - secuencia de EPO sintética (610 nt)

**[0082]**

55 AAGCTTTCACCATGGGCGTGCACGAGTGCCCTGCTTGGCTGTGGCTGCTCT  
TGAGCCTGCTCAGCCTGCCTCTGGGCCTGCCTGTGCTGGGCGCTCCTCCAA  
GGCTGATCTGCGATAGCAGGGTGCTGGAGAGGTACCTGCTGGAGGCTAAG  
GAGGCTGAGAACATCACACCGGCTGCGCTGAGCACTGCAGCCTGAACGA  
GAACATCACCGTGCCTGATACCAAGGTGAACTTTTACGCTTGGAAGAGGA  
60 TGGAGGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAGGTGTGGCAGGGCCTGGCTCTGCTG  
AGCGAGGCTGTGCTGAGGGGCCAGGCTCTGCTGGTGAACAGCTCTCAGCC  
TTGGGAGCCTCTGCAGCTGCACGTGGATAAGGCTGTGAGCGGCCTGAGAA  
GCCTGACCACCTGCTGAGGGCTCTGAGGGCTCAGAAGGAGGCTATCAGC  
CCTCCAGATGCTGCAAGCGCTGCCCTCTGAGGACCATCACCGCTGATACC  
65 TTTAGGAAGCTGTTTAGGGTGTACAGCAACTTTCTGAGGGGCAAGCTGAA

GCTGTACACCGGCGAGGCTTGCAGGACCGGCGATAGGTAAAAAGGCCGGC  
CGAGCTC (SEQ ID NO:11)

## 5 Construcción de pNLB-CMV-Des-Arg166-EPO

[0083] Se produce una secuencia codificante de EPO que codifica una forma de 165 aminoácidos de EPO con el codón terminal (que codifica arginina en la posición 166) suprimido. Se sintetizó una región de 179 pb de pNLB-CMV-EPO correspondiente a la secuencia que se extiende desde un sitio Eco47III que reside en la secuencia codificante de EPO a un sitio EcoRI que reside en dirección 3' del codón de parada de EPO en pNLB-CMV-EPO, con el codón de arginina terminal (posición 166) suprimido, de manera que el ácido aspártico (aminoácido 165) será el codón de aminoácido terminal, dando como resultado un fragmento Eco47III/EcoRI de 176 pb. El fragmento se sintetizó por Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa 52241) y se clonó en un vector pDRIVE (Qiagen, Inc), creando pDRIVE-des-Arg166-EPO (Figura 3). El fragmento Eco47III/EcoRI de 176 pb se subclonó en el sitio Eco47III/EcoRI de pNLB-CMV-EPO, creando pNLB-CMV-Des-Arg166-EPO (Figura 4).

### Ejemplo 2

#### Transfección transitoria de células DF-1

[0084] El día antes de la transfección, se sembraron en placas 3,7 x 10<sup>6</sup> células DF-1 en placas de cultivo tisular de 150 mm en medio DF-1 (medio de Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa, L-glutamina, piridoxina HCl, suero bovino fetal al 10%, 10 U/ml de penicilina G y 10 ug/ml de estreptomina) y se cultivaron a 37°C con 6% de CO<sub>2</sub>. El día siguiente, las células se transfectaron de la siguiente manera. Cada placa se lavó con 6 ml de OptiMEM (Invitrogen, Inc.) y se volvió a alimentar con 5 ml de OptiMEM. Se mezclaron 18,4 ug del retrovector, pNLB-CMV-Des-Arg166-EPO, 18,4 ug de pCMV-gagpol y 0,92 ug de pVSV-G en 4,6 ml de OptiMEM en un tubo o botella de 15 ml de poliestireno. Se mezclaron 110 ul de DMRIE-C con 4,6 ml de OptiMEM. Se añadió el lípido/OptiMEM al ADN/OptiMEM. Después de mezclar por inversión o dando vueltas, la mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se añadió a una placa de 150 mm. La placa se incubó a 37°C con 6% de CO<sub>2</sub> durante 3 a 4 horas. La mezcla de transfección se extrajo, la placa se lavó una vez con 6 ml de medio DF-1 y se volvió a alimentar con 20 ml de medio DF-1. En ciertos casos, se puede añadir butirato de sodio en esta etapa (por ejemplo, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 40 mM) y las células se incubaron durante la noche. En tal caso, el medio se extrae la mañana siguiente y las células se lavan de nuevo con medio DF-1. Dicho tratamiento con butirato de sodio puede aumentar el título de partícula viral de aproximadamente 5 a 10 veces por encima del título que de otro modo se obtendría sin el uso de butirato de sodio. La placa se incubó a 37°C con 6% de CO<sub>2</sub> durante 18 a 60 horas y se recogió el medio de la placa vertiéndola y filtrándola a través de un filtro de vacío Millipore Stericup, 0,45 um PVDF 250 ml (cat no. SCHV U02 RE).

[0085] El medio viral filtrado a partir de dos placas de 150 mm transfectadas se vertieron en tubos Beckman SW28 UltraClear (cat no. 344058). El medio se centrifugó en un rotor SW28 a 19,4 krpm durante 2 horas a 4°C. La mayor parte del sobrenadante se eliminó y el medio DF-1 filtrado con un filtro de 0,2 um se añadió a un volumen final de 100 a 400 ul. El sedimento viral se volvió a suspender a 4°C durante 1 a 4 horas o durante la noche. El medio y el sedimento se resuspendieron adicionalmente por trituración con una pipeta Gilman P200 3-4 veces y la resuspensión viral se transfirió a un vial Nunc Cryo y se congeló a -70°C. Para el título, se descongelaron alícuotas de la resuspensión viral en un baño de agua a 37°C, se diluyeron con medio DF-1 y se emplacaron en células Senta o DF-1. De uno a dos días después, se añadió medio que contenía G418 a 200 ug/ml a las células Senta o DF-1. El medio se cambió cada dos a tres días y se contaron las colonias cuando eran claras. El título del virus concentrado fue de aproximadamente 1 x 10<sup>7</sup> (sin tratamiento con butirato de sodio) que es aproximadamente un título 10 veces mayor que el que se obtiene típicamente usando procedimientos tradicionales para producir partículas retrovirales deficientes en la replicación, tales como los procedimientos descritos en la patente US 6,730,822, concedida el 4 de mayo de 2004, que describe el uso de células Senta e Isolda para la producción de vectores retrovirales deficientes en la replicación NLB.

### Ejemplo 3

#### Producción de aves transgénicas

[0086] Se inyectaron 7 ul de la suspensión de virus preparada según el Ejemplo 2 en la cavidad subgerminal de 97 huevos White Leghorn fértiles sin incubar (Charles River, SPAFAS). Eclosionaron 54 pollitos y se criaron hasta la madurez sexual. Se recogió el semen y se extrajo el ADN mediante el procedimiento de Chelex. Se analizaron 100 ng de ADN de esperma, tal como se determina mediante el ensayo PicoGreen (Molecular Probes), para determinar la presencia del transgén de EPO usando la mezcla máster de PCR rápida Applied Biosystems TaqMan® Fast PCR Universal Master Mix y el 7900HT de Applied Biosystems. Los cebadores fueron: SJ-EPO directo, 5'-GCCCTCCAGATGCTGCAA-3' (SEQ ID NO: 12) y SJ-EPO inverso, 5'-CCCTAACAGCTTCCTAAAGGTATCA-3' (SEQ ID NO: 13). La secuencia de la sonda de EPO Taqman fue 5'-CGCTGCCCTCTGAGGACCATC-3' (SEQ ID NO: 14) y se marcó con FAM (6-carboxifluoresceína) en el extremo 5' y TAMRA (N, N, N', N'-tetrametil-6-carboxirodamina) en el extremo 3'. Se encontró que un gallo tenía un nivel significativo del gen de EPO en su

semen. Este gallo fue criado para gallinas de tipo salvaje. Eclosionaron aproximadamente 144 pollitos. Su ADN de la sangre se extrajo y se ensayó para detectar la presencia del transgén usando el ensayo de EPO Taqman. Se encontraron dos pollitos positivos para el transgén. La cantidad del transgén era tal que se calcularía que cada célula tendría una copia del transgén de EPO, como sería de esperar para un G1.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

[0087]

10 <110> AviGenics, Inc.  
 <120> Producción rápida de un virus de título elevado  
 <130> AVI-053PCT  
 <160> 14  
 <170> PatentIn version 3.3  
 15 <210> 1  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Virus del sarcoma de Rous  
 <400> 1  
 20 ggcaagcttg gatcaagcat ggaagccgtc ataaaggt 38  
 <210> 2  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Virus del sarcoma de Rous  
 25 <400> 2  
 tgggaattcc tctcctatg c 21  
 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Virus del sarcoma de Rous  
 30 <400> 3  
 aactgggag tcaccggtc aaacag 26  
 <210> 4  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Virus del sarcoma de Rous  
 <400> 4  
 35 gggtcgacgc ggccgcttaa ctctgttg cagcaag 37  
 <210> 5  
 40 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la leucosis aviar  
 <400> 5  
 45 gactcctgga gcccgctagt atcgcgga tccagctga ggcgggtcg ctaccattac 60  
 <210> 6  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la leucosis aviar  
 <400> 6  
 50 taatagcact cactataggg agaccggaag cttcaccat ggcttgacc tttgccttac 60  
 <210> 7  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 55 <400> 7  
 ggggggaagc tttcaccatg ggcgtgcacg ag 32  
 <210> 8  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 60 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
 tcccatact agactttta cctatgccg gtc 33  
 <210> 9  
 <211> 30  
 65 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 744 125 T3

<400> 9  
 accggcgata ggtaaaaagt ctagtatggg 30  
 <210> 10  
 <211> 35  
 5 <212> ADN  
 <213> Virus de la leucosis aviar  
 <400> 10  
 gggggggctc ttctcagctg gaattccgcc gatac 35  
 <210> 11  
 10 <211> 610  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 aagctttcac catgggcgtg cacgagtgcc ctgcttggtc gtggctgctc ttgagcctgc 60  
 15 tcagcctgcc tctgggcctg cctgtgctgg gcgctcctcc aaggctgatc tgcgatagca 120  
 gggigtctgga gaggtacctg ctggaggcta aggaggctga gaacatcacc accggctgcg 180  
 ctgagcactg cagcctgaac gagaacatca ccgtgcctga taccaagggtg aacttttacg 240  
 20 cttggaagag gatggaggtg ggccagcagg ctgtggaggt gtggcagggc ctggctctgc 300  
 tgagcgaggc tgtgctgagg ggccaggctc tgctggtgaa cagctctcag ccttgggagc 360  
 25 ctctgcagct gcacgtggat aaggctgtga gcggcctgag aagcctgacc accctgctga 420  
 gggctctgag ggctcagaag gaggctatca gccctccaga tgctgcaagc gctgcccctc 480  
 tgaggaccat caccgctgat acctttagga agctgttttag ggtgtacagc aacttttctga 540  
 30 ggggcaagct gaagctgtac accggcgagg cttgcaggac cggcgatagg taaaaggcc 600  
 ggccgagctc 610  
 35 <210> 12  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12  
 40 gccctccaga tgctgcaa 18  
 <210> 13  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 13  
 ccctaaacag ctctctaaag gatatca 26  
 <210> 14  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 50 <213> Homo sapiens  
 <400> 14  
 cgctgcccct ctgaggacca tc 22

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de producción de partículas virales, que comprende:  
 5 introducir de forma transitoria en una línea celular DF-1 una secuencia de nucleótidos que codifica un vector retroviral aviar, en el que el vector retroviral aviar es un vector de ALV deficiente en la replicación;  
 introducir de forma transitoria en la línea celular DF-1 secuencias de nucleótidos que codifican productos necesarios para la replicación del vector retroviral deficiente en la replicación, siendo los productos las proteínas gag, pol y VSV-G, en el que la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican gag y pol están presentes en un plásmido y la  
 10 secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican VSV-G están presentes en otro plásmido, y en el que gag, pol y VSV-G están bajo el control del promotor de CMV; y  
 recoger las partículas virales.
2. Procedimiento, según de la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el vector retroviral aviar es ADN.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el vector de ALV deficiente en la replicación está contenido en un plásmido.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que cada introducción se facilita mediante transfección.
5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el vector retroviral aviar contiene una secuencia codificante para una proteína exógena unida operativamente a un promotor.
6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que la proteína exógena es una proteína terapéutica.
7. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que la proteína exógena es una proteína humana.
8. Procedimiento de producción de un ave transgénica, que comprende:  
 30 introducir de forma transitoria en una línea celular DF-1 una secuencia de nucleótidos que codifica un vector retroviral aviar, en el que el vector retroviral aviar es un vector de ALV deficiente en la replicación;  
 introducir de forma transitoria en la línea celular DF-1 secuencias de nucleótidos que codifican productos necesarios para la replicación del vector retroviral deficiente en la replicación, siendo los productos las proteínas gag, pol y VSV-G, en el que la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican gag y pol están presentes en un plásmido y la  
 35 secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican VSV-G están presentes en otro plásmido, y en el que gag, pol y VSV-G están bajo el control del promotor de CMV;  
 recoger las partículas virales;  
 introducir las partículas virales en una célula de embrión aviar;  
 y obtener un ave transgénica a partir del embrión.
9. Procedimiento de producción de proteína exógena, que comprende:  
 40 introducir de forma transitoria en una línea celular DF-1 una secuencia de nucleótidos que codifica un vector retroviral aviar, en el que el vector retroviral aviar es un vector de ALV deficiente en la replicación, y en el que el vector retroviral aviar contiene una secuencia codificante para una proteína exógena unida operativamente a un promotor;  
 introducir de forma transitoria en la línea celular DF-1 secuencias de nucleótidos que codifican productos necesarios  
 45 para la replicación del vector retroviral deficiente en la replicación, siendo los productos las proteínas gag, pol y VSV-G, en el que la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican gag y pol están presentes en un plásmido y la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican VSV-G están presentes en otro plásmido, y en el que gag, pol y VSV-G están bajo el control del promotor de CMV;  
 recoger las partículas virales;  
 50 introducir las partículas virales en una célula de embrión aviar;  
 y obtener proteína exógena a partir de un huevo puesto por un ave transgénica obtenida a partir del embrión.

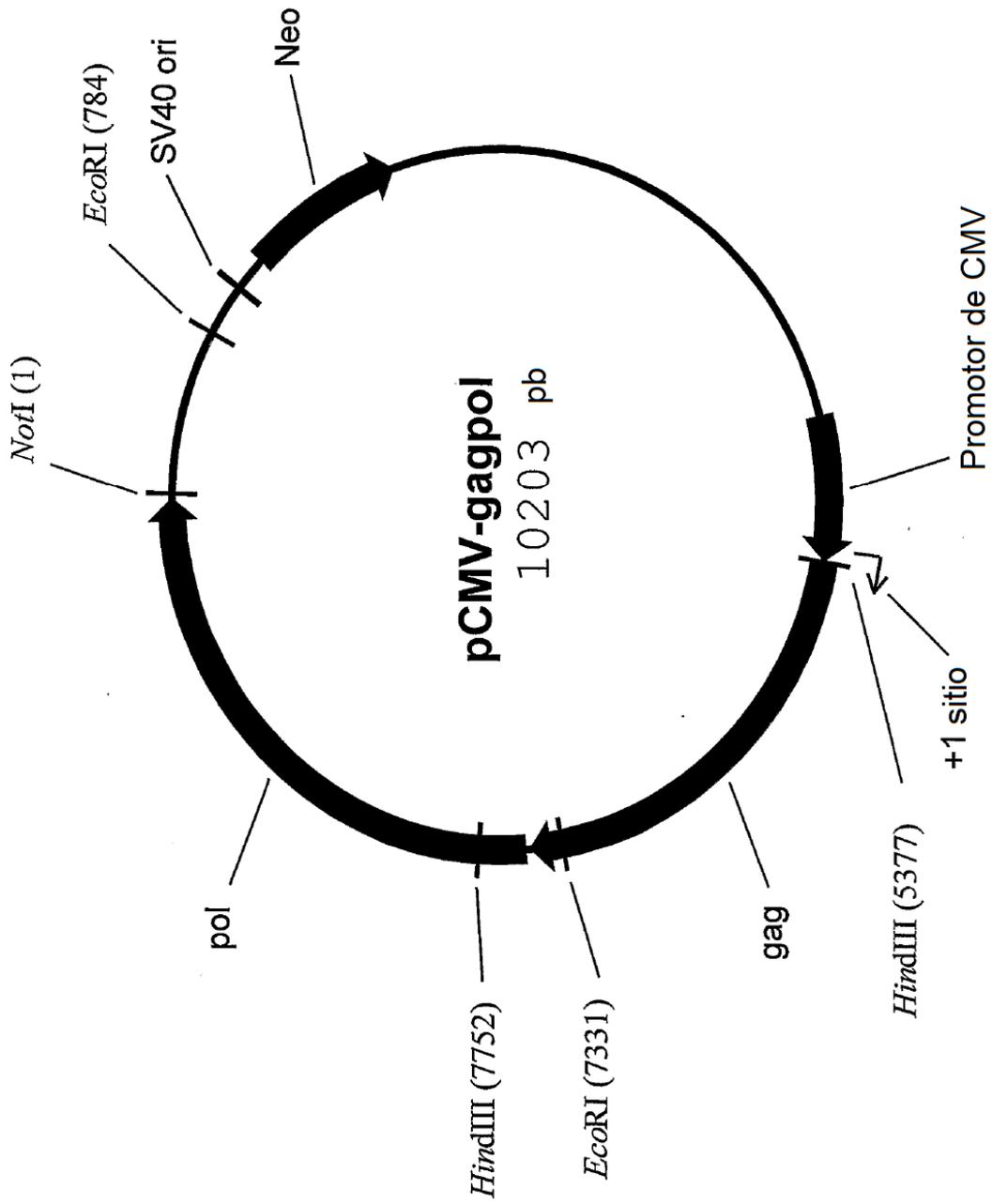


Figura 1

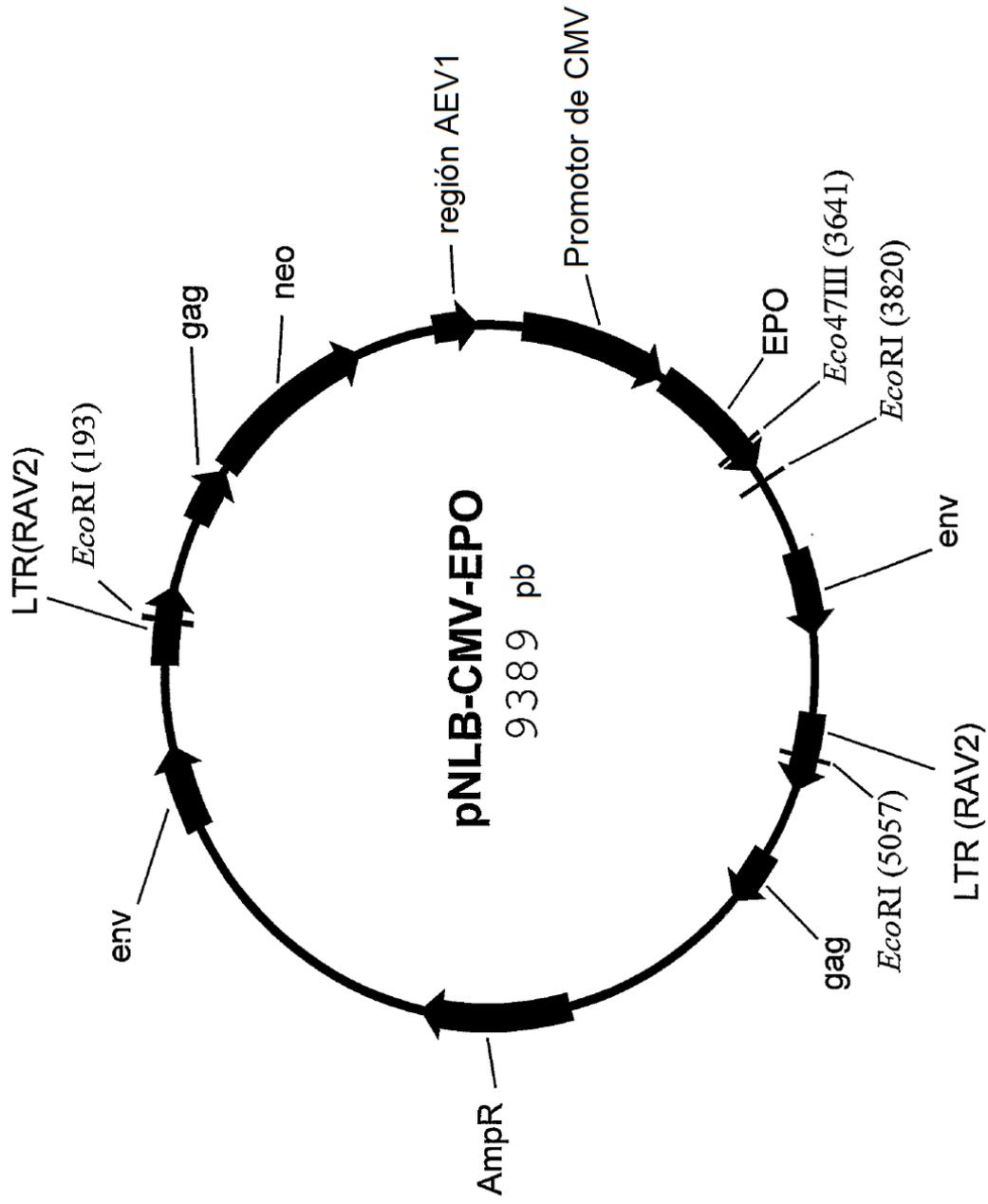
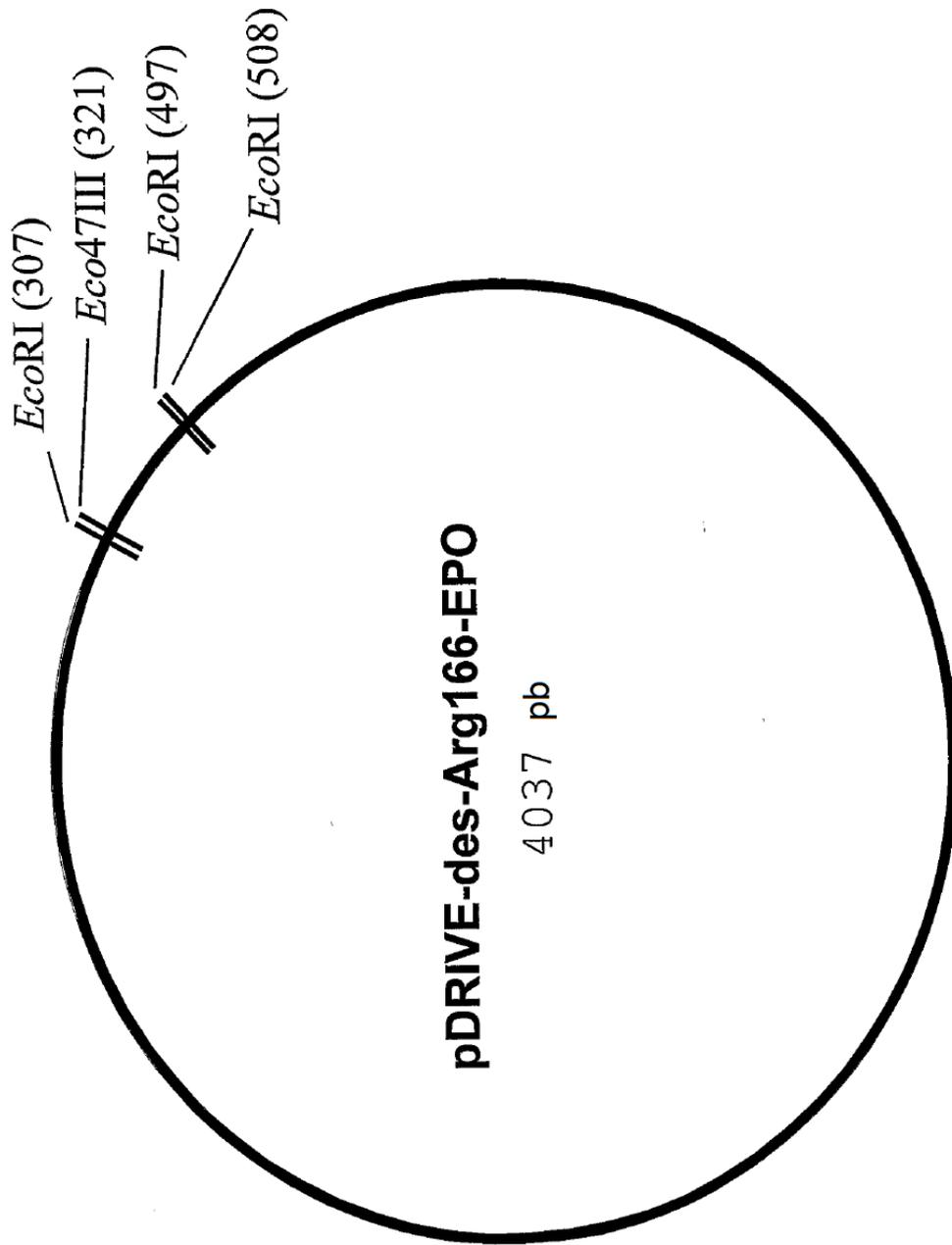


Figura 2



**Figura 3**

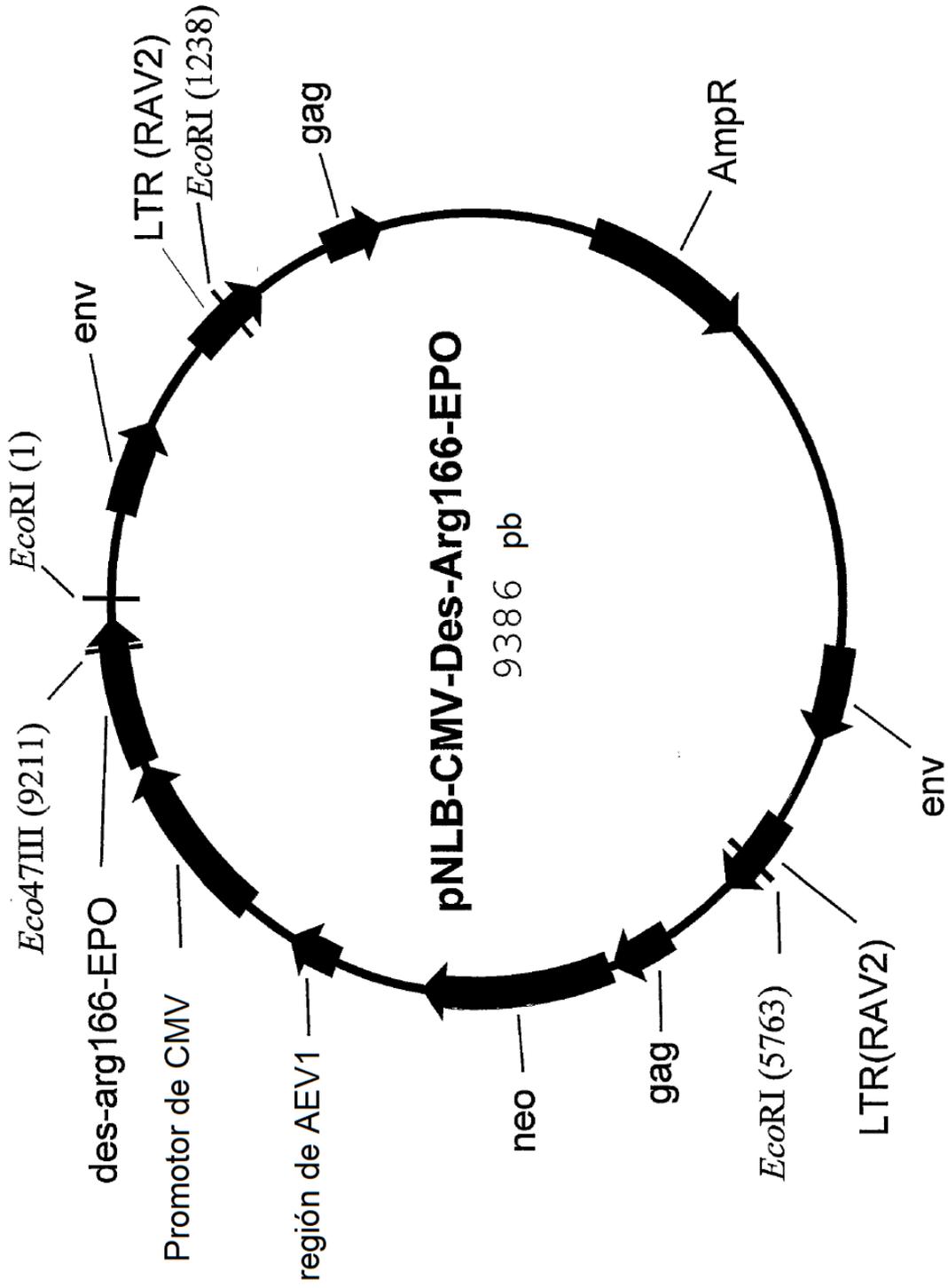
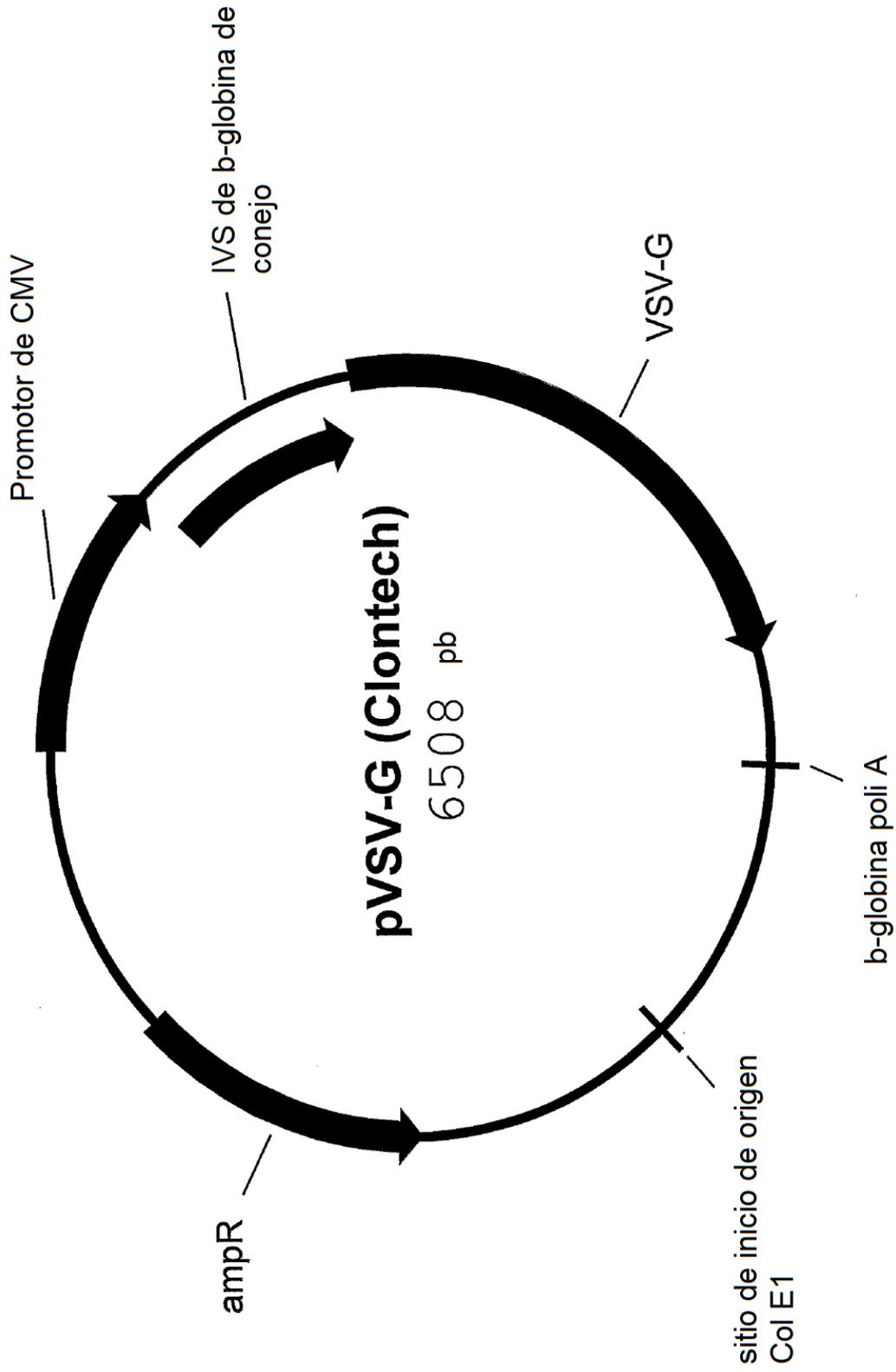


Figura 4



**Figura 5**