



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-67535

1. EXPEDIENTE No.

4. TÍTULO

VIRUS QUIMERICOS QUE PRESENTAN PROTEINAS DE SUPERFICIE

NO NATIVAS Y USO DE LOS MISMOS

1. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 39/00

1. SOLICITANTE

THE MOUNT SINAI MEDICAL CENTER OF NEW YORK UNIVERSITY

DOMICILIO

NEW YORK, ESTADO DE NEW YORK, E.U.A.

4. APODERADO

LUIS FELIPE CASTILLO GIBSON

2. BOGOTÁ, D. C.,

02 JUL. 2008

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-067535- -00000-0000

Fecha: 2008-07-02 15:09:31 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 146



FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

2 Julio 2008

1

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I

☐

Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: THE MOUNT SINAI MEDICAL
CENTER OF NEW YORK
UNIVERSITY

Dirección: One Gustave L. Levy Place

Nacionalidad o domicilio: New York, Estado de
New York, E.U.A.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE

Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12

Teléfono: 285 74 60 Fax: 285 92 67

E-mail info@castillograu.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

Cual _____

Número 79.397.879 de TP 68.995 del
Bogotá C.S.J.

4

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: Peter PALESE - Adolfo GARCIA-SASTRE

Dirección: 414 Highwood Avenue - 16 East 96th Sreet Ap. 3G

Nacionalidad o Domicilio: Leonia, NJ. - New York, NY. (E.U.A.)

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/045859

Fecha: 01/12/06

Publicación Internacional No. WO 2007/064802 A1

Fecha: 07/06/07

6

Título (54) VIRUS QUIMERICOS QUE PRESENTAN PROTEINAS DE SUPERFICIE NO NATIVAS Y
USO DE LOS MISMOS

7

Clasificación Internacional (51) A61K 39/00

8

Prioridad

Si

☒

No

☐

(33) País de origen

E.U.A.

(32) Fecha

02.12.2005 -
22.05.2006

(31) Número de Solicitud

60/741,833 - 60/802,864

9

Comprobante de pago N°:

52046

Fecha:

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

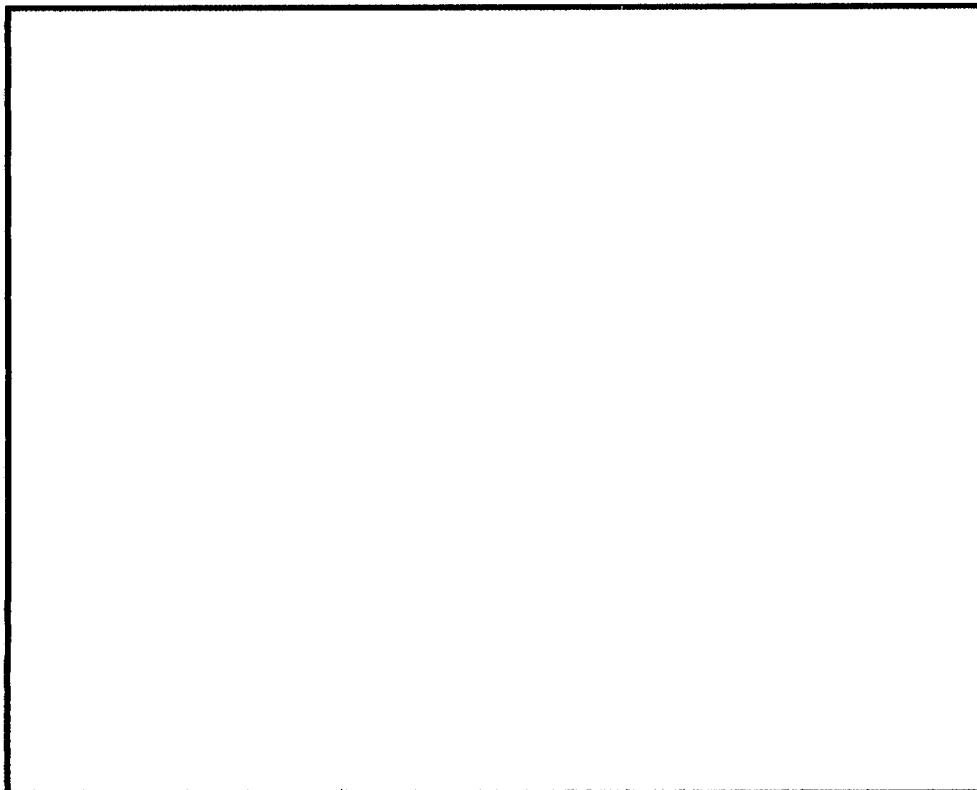
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Documento de Cesión del inventor al solicitante o a su acusante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico.
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

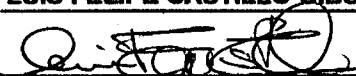
11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de patente,

NOMBRE: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONEFIRMA: C.C. 79'397 879

de Bogotá

T.P. 68,995

del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 52,046
FECHA : JULIO 1 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-067535- -00000-0000

Fecha: 2008-07-02 15:09:31 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 146

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	61633	01/07/2008	18,001,000.00
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	61644	01/07/2008	75,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

VIRUS QUIMÉRICOS QUE PRESENTAN PROTEÍNAS DE SUPERFICIE NO NATIVAS Y USO DE LOS MISMOS

1. CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención provee virus quiméricos ARN de hebra negativa que permiten que un sujeto, por ejemplo, a un ave, sea inmunizado contra dos agentes infecciosos mediante el uso de un solo virus quimérico de la invención. En particular, la presente invención provee virus quimérico de influencias diseñados para expresar e incorporar en sus viriones una proteína de fusión que comprende un ectodominio de una proteína de un agente infeccioso y la transmembrana y dominio citoplásmico de una proteína del virus de influenza. Dichos virus quiméricos inducen una respuesta inmune contra el virus de influenza y el agente infeccioso. La presente invención también provee virus quiméricos de la enfermedad de Newcastle (NDV) diseñados para expresar e incorporar en sus viriones una proteína de fusión que comprende el ectodominio de una proteína de un agente infeccioso y la transmembrana y dominio citoplásmico de una proteína NDV. Dichos virus quiméricos inducen una respuesta inmune contra NDV y el agente infeccioso.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Una serie de virus ADN han sido diseñados genéticamente para dirigir la expresión de proteínas heterólogas en sistemas de células anfitrionas (por ej: virus Vaccinia, baculovirus, etc.). Últimamente se han hecho avances similares con virus ARN de hebra positiva (por ej: poliovirus). Se cree que los productos de expresión de estas construcciones, es decir, el producto del gen heterólogo o el virus quimérico que expresa el producto del gen heterólogo, son potencialmente útiles en formulaciones de vacuna (en vacuna de subunidades o enteras). Un inconveniente en el uso de los virus tales como Vaccinia para la construcción de virus recombinantes o quiméricos para uso en las vacunas es la falta de variación en sus principales epítomos. Esta falta de variabilidad en las cepas virales pone estrictas limitaciones en el uso repetido de vaccinia quimérica, en el sentido de que múltiples vacunas producirán resistencia de anfitrión a la cepa de modo que el virus inoculado no pueda infectar el anfitrión. Por lo tanto, la inoculación de un individuo resistente con vaccinia quimérica no inducirá la estimulación inmune.

Por el contrario, los virus ARN de hebra negativa, son candidatos atractivos para construir virus quiméricos para uso en vacunas. Por ejemplo, se aconsejan los virus ARN de hebra negativa debido a que su amplia variabilidad genética permite la construcción de un vasto repertorio de formulaciones de vacuna que estimulan la inmunidad sin el riesgo de desarrollar una tolerancia.

2.1 Virus ARN de hebra negativa

Las familias de virus que contienen ARN envuelto de una sola hebra del genoma de sentido negativo se clasifican en grupos que tienen genomas no segmentados (Paramyxoviridae, Rhabdoviridae), o los que tienen genomas segmentados (Orthomyxoviridae, Bunyaviridae y Arenaviridae). Más adelante se describen en detalle las familias Paramyxoviridae y Orthomyxoviridae y se usan en los ejemplos de esta invención. La familia Paramyxoviridae contiene los virus del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de parainfluenza, virus Sendai, virus del simio 5, y virus de las paperas. La familia Orthomyxoviridae contiene los virus de influenza, virus tipos A, B y C, así como los virus Thogoto y Dhori y virus de anemia infecciosa del salmón.

2.1.1 Virus de Influenza

Los viriones de influenza comprenden un núcleo interno de ribonucleoproteína (un nucleocápsido helicoidal) que contiene el genoma ARN de una sola hebra, y una envoltura externa de lipoproteína cubierta en el interior por una proteína de matriz (M1). El genoma segmentado del virus A de influenza consiste de ocho moléculas (siete para influenza C) de ARN lineal, de hebra simple de polaridad negativa que codifican diez polipéptidos, que incluyen: las proteínas de polimerasa ARN dependientes de ARN (PB2, PB1 y PA) y nucleoproteína (NP) que forman el nucleocápsido; las proteínas de la membrana de la matriz (M1, M2); dos glicoproteínas de superficie que se proyectan de la envoltura que contiene el lípido; hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA); la proteína no estructural (NS1) y la proteína de exportación nuclear (NEP). La transcripción y replicación del genoma tiene lugar en el núcleo y el ensamble sucede por el brote en la membrana del plasma. Los virus pueden reagrupar genes durante infecciones combinadas.

El virus de influenza adsorbe las células por medio de actividad ligante HA a sialiloligosacáridos en glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular. Luego de la endocitosis del virión, ocurre un cambio conformacional en la molécula HA dentro del endosoma celular que facilita la fusión de la membrana, provocando de este modo el desprendimiento. El nucleocápsido migra al núcleo donde se transcribe el mARN viral. El mARN viral se transcribe por un mecanismo único en el que la endonucleasa viral hace una escisión en los extremos 5' tapados de los mARN heterólogos celulares que luego sirven como primeros para transcripción de plantillas ARN virales por la transcriptasa viral. Las transcripciones terminan en los sitios 15 a 22 bases de los extremos de sus plantillas, donde las secuencias oligo(U) actúan como señales para la adición de tractos poli(A). Las transcripciones de ARN viral luego migran a la membrana celular y se asocian con las proteínas virales de la transmembrana

recientemente transcritas. NA luego parte los residuos de sialil de los medios de carbohidrato de glicoproteínas ligadas a la membrana, lo cual resulta en el encapsulamiento y la liberación celular del virus progenie. De las ocho moléculas ARN virales que se producen de este modo, seis son mensajes monocistrónicos que son trasladados directamente en las proteínas que representan HA, NA, NP y las proteínas de polimerasa viral, PB2, PB1 y PA. Las otras dos transcripciones pasan por empalme, produciendo cada uno dos mARN que son trasladadas en diferentes marcos de lectura para producir M1, M2, NS1 y NEP. En otras palabras, los ocho segmentos ARN virales codifican para diez proteínas: nueve estructurales y una no estructural. La Tabla 1 siguiente presenta un resumen de los genes del virus de influenza y sus productos de proteína.

TABLA 1: SEGMENTOS ARN DEL GENOMA DEL VIRUS DE INFLUENZA Y ASIGNACIONES DE CODIFICACIÓN^a

Segmento	Longitud _b (Nucleótidos)	Polipéptido codificado	Longitud _d (Amino ácidos)	Moléculas por Virión	Comentarios
1	2341	P22	759	30-60	Componente transcriptasa ARN; la tapa ARN de la célula anfitriona se enlaza al componente de transcriptasa ARN; iniciación de transcripción componente transcriptasa ARN
2	2341	PB1	757	30-60	
3	2233	PA	716	30-60	
4	1778	HA	566	500	Hemagglutinina; trímero glicoproteína envuelta; media fijación a células
5	1565	NP	498	1000	Nucleoproteína: asociado con ARN; componente estructural de transcriptasa ARN
6	1413	NA	454	100	Neuraminidasa; tetrámero; glicoproteína envuelta;
7	1027	M1	252	3000	proteína de matriz; recubrimientos dentro de la envoltura.
		M2	96	?	Proteína estructural en la membrana del plasma;
		NS1	230		Proteína no estructural de mARN empalmado
8	890				Proteína no estructural;
		NEP	121	?	Proteína de exportación nuclear; mARN empalmado

a	Adaptado de R.A. Lamb y P.W. Choppin (1983), <i>Annual Review of Biochemistry</i> , Vo. 52, 467-506
b	Para la cepa A/PR/8/34
c	Se determina mediante enfoques bioquímicos y genéticos
d	Se determina por medio de análisis de secuencia nucleótida y secuencia de proteínas

X

La patogenicidad de los virus de influenza es modulada por múltiples virus y factores del anfitrión. Entre los factores del anfitrión que combaten infecciones virales, el sistema interferón tipo I IFN α / β representa un poderoso mecanismo de defensa antiviral innato establecido relativamente a comienzos de la evolución de organismos eucarióticos (García-Sastre, 2002, *Microbes Infect.* 4:647-55). El sistema antiviral IFN α / β implica tres pasos principales: (i) detección de la infección viral y secreción de IFN α / β ; (ii) enlace de IFN α / β a sus receptores e inducción transcripcional de genes estimulados por IFN α / β , y (iii) síntesis de enzimas y proteínas antivirales. Sin embargo, la mayoría de los virus han adquirido información genética específica que codifica moléculas antagonistas IFN α / β , que bloquean de manera efectiva uno o más pasos del sistema antiviral IFN α / β . Los virus de influenza A expresan una proteína no estructural en células infectadas, la proteína NS1 (abajo descrita) que contrarresta la respuesta celular IFN α / β (García-Sastre *et al.*, 1998, *Virology.* 252:324-30).

2.1.1.1 Influenza Aviar de Alta Patogenicidad

En los últimos años se han reportado brotes de influenza aviar altamente patogénica (HPAI) en Asia y Europa (Kawaoka *et al.*, 2005, *Natl. Rev. Microbiol.* 3:591-600; Koopmans *et al.*, 2004, *Lancet* 363_587-593). Los brotes que incluían virus de influenza A, subtipo H5N1 o H7N7 resultaron en infecciones letales en avicultura doméstica y en la muerte de un número limitado de casos humanos (Tweed *et al.*, 2004, *Emerg. Infect. Dis.* 10:2196-2199). Los actuales virus H5N1 han estado circulando entre las aves en China últimamente (Chen *et al.*, 2005, *Nature* 436:191-192), y si bien las aves migratorias se consideran que son el depósito primario de estos virus, se cree que la transmisión de las aves infectadas nuevamente a las aves migratorias ha contribuido a su creciente distribución geográfica. Actualmente, el virus H5N1 ha emergido de Asia, diseminándose en Europa y África (Enserink, 2006, *Science*, 311:932). Se ha demostrado que el sacrificio de las aves ha sido una estrategia exitosa para la erradicación de los brotes de H5N1 en Hong Kong en 1997 y en los Países Bajos en 2003 (Lipatov *et al.*, 2004, *J. Virol* 78:8951-8959). Debido a que las víctimas humanas de los recientes brotes de HPAI han tenido estrecho contacto con las aves infectadas, se supone que la prevención de la transmisión entre especies de los virus de influenza aviar (AIV) puede lograrse mediante la erradicación de AIV en aves por medio de sacrificio. Sin embargo, por razones económicas y prácticas, la sola destrucción de aves infectadas ya no es considerado el método de elección para el control de esta enfermedad. Adicionalmente, por razones éticas y ecológicas, el sacrificio de aves migratorias es considerado una práctica inaceptable. Recientemente, la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) y FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)

f

recomendaron que debería considerarse la vacunación de aves para el control de AIV. Además, se ha reportado que la vacunación de pollos con vacuna H5 inactivada fue exitosa para la interrupción de la transmisión del virus en un estudio de campo (Ellis *et al*, 2004, *Avian Pathol.* 33:405-412). Recientemente, China ha aceptado la vacunación como componente de su programa de control AIV.

La posibilidad de que la cepa H5N1 altamente patogénica pueda volverse transmisible entre seres humanos se referencia en términos de un pandémico global; la OMS no desea estimar la mortalidad global en caso de que el virus H5N1 se recombine en forma humana. Por lo tanto, es clara la necesidad de un método para el manejo de la infección H5N1 en poblaciones agrícolas, de las que se cree que han surgido la mayoría de las transmisiones a seres humanos.

2.1.2 Virus de la Enfermedad de Newcastle

El Virus de la Enfermedad de Newcastle es un virus envuelto que contiene un genoma ARN linear de sentido negativo, no segmentado, de una sola hebra. El ARN genómico contiene genes en el orden de 3'-N-P-M-F-HN-L, que se describen más adelante. El ARN genómico también contiene una secuencia líder en el extremo 3'.

Los elementos estructurales del virión incluyen la envoltura del virus la cual es una bicapa lipídica derivada de la membrana del plasma celular. La glicoproteína, hemaglutinina-neuraminidasa (HN) sobresale de la envoltura, proporcionando actividades de hemaglutinina (por ej: enlazante / fusogénico del receptor) y de neuraminidasa. La glicoproteína de fusión (F), que también interactúa con la membrana viral, es producida primero como un precursor inactivo, luego se divide post-traslacionalmente para producir dos polipéptidos enlazados por bisulfuro. La proteína F activa participa en la penetración de NDV en las células anfitrionas facilitando la fusión de la envoltura viral con la membrana de plasma de la célula anfitriona. La proteína de matriz (M) participa en ensamble viral e interactúa con la membrana viral y con las proteínas nucleocápsidas.

La principal subunidad de proteína del nucleocápsido es la proteína nucleocápsida (N) la cual confiere simetría helicoidal en el cápsido. En asociación con el nucleocápsido están las proteínas P y L. Se cree que la fosfoproteína (P) que está sujeta a fosforilación, tiene una función reguladora en la transcripción, y también puede participar en la metilación, fosforilación y poliadenilación. El gen L que codifica una polimerasa ARN dependiente de ARN se requiere para la síntesis del ARN viral junto con la proteína P. La proteína L que toma casi la mitad de la capacidad codificadora del

9

genoma viral es la más grande de las proteínas virales y desempeña un papel importante tanto en la transcripción como en la replicación.

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

Existe la hipótesis de que la mayoría o todas las proteínas virales que transcriben mARN NDV también hacen su replicación. El mecanismo que regula los usos alternativos (es decir, transcripción o replicación) del mismo complemento de proteínas no ha sido identificado claramente sino que parece que implica la abundancia de formas libres de una o más de las proteínas nucleocápsidas, en particular, la N. Directamente, luego de la penetración del virus, la transcripción es iniciada por la proteína L por medio del ARN de sentido negativo en el nucleocápsido, como plantilla. La síntesis del ARN viral es regulada de modo que produzca mARN monocistrónicos durante la transcripción.

Luego de la transcripción, la replicación del genoma del virus es el segundo evento esencial en infección por virus ARN de hebra negativa. Al igual que con otro virus ARN de hebra negativa, la replicación del genoma viral en el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) es mediada por proteínas especificadas por virus. Los primeros productos de la síntesis ARN replicativa son copias complementarias (es decir, polaridad plus) del ARN del genoma NDV (cARN). Estas copias de hebra plus (antigenomas) difieren de las transcripciones mARN de hebra-plus en la estructura de sus extremos. Al contrario de las transcripciones mARN, los cARN antigenómicos no son tapados y metilados en los extremos 5' y no son truncados y poliadenilados en los extremos 3''. Los cARN son co-terminales con sus plantillas de hebra negativa y contienen toda la información genética en cada segmento ARN genómico en la forma complementaria. Los cARN sirven como plantillas para la síntesis de genomas virales de hebra negativa NDV (vARN).

Tanto los genomas de hebra negativa NDV (vARN) como los antigenomas (cARN) son encapsidados por proteínas nucleocápsidas; las únicas especies ARN no encapsidadas son mARN virales. Para NDV, el citoplasma es el sitio de replicación de ARN viral, como también es el sitio de transcripción. El ensamble de los componentes

virales parece que tiene lugar en la membrana de plasma de la célula anfitriona y el virus maduro es liberado mediante brote.

2.2 Formulaciones inmunogénicas

La tecnología ADN recombinante y las técnicas de diseño de "genética inversa" ofrecen un enfoque único para la producción de virus recombinantes para uso en formulaciones inmunogénicas. En particular, la presente invención provee un método para diseñar un virus ARN de hebra negativa de modo que exprese o muestre no solamente antígenos virales nativos, sino también cualquier antígeno que pueda diseñarse para incorporar en el recubrimiento de la proteína viral. De particular interés son antígenos derivados de organismos infecciosos, salvo influenza. De esta manera, se puede diseñar un virus único como un compuesto inmunogénico útil para provocar, activar o inducir una respuesta inmune que pueda ofrecer protección contra al menos dos patógenos. Dichos virus quiméricos pueden diseñarse además cuando sea necesario para modificar su virulencia, es decir, de modo que puedan atenuarse o atenuarse más. Los virus atenuados de influenza son útiles porque son inmunogénicos y capaces de replicar, pero no son patogénicos.

Se cree que las vacunas vivas inducen la citotoxicidad mejorada, mediadas por células, de reactividad cruzada así como una respuesta anticuerpos humoral, brindando una mejor protección que las vacunas inactivadas (Gorse y Belshe, 1990, *J. Clin. Microbiol.* 28:2539-2550; y Gorse *et al.* 1995, *J. Infect. Dis* 172:1-10). Segundo, es posible que la inmunidad protectora a enfermedades virales implique respuesta IgA mucosal que no se observa con las vacunas tradicionales administradas por medio de intramuscular (Nelson *et. al.*, 1998, *Vaccine* 16:1306-1313). Finalmente, las vacunas vivas también tienen la ventaja de administración intranasal que evita la inflamación y el dolor muscular asociado ocasionalmente con la administración intramuscular de vacunas adyuvantes inactivadas. Se ha reportado que estas vacunas vivas inducen no solo respuestas humorales contra el virus de influenza homotípica, sino también contra la citotoxicidad reactiva cruzada mediada por células. Por ello, la invención ofrece el potencial para desarrollar nuevas y más eficaces formulaciones inmunes, por ej: formulaciones de vacuna, para el diagnóstico, prevención, manejo o tratamiento de patógenos tanto virales como no virales.

3. RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención provee virus ARN quiméricos de hebra negativa diseñados para expresar proteínas de fusión que se incorporan en el virión, métodos para producir dichos virus quiméricos y el uso de dichos virus, por ejemplo, como inmunógenos, en

formulaciones inmunogénicas, o en ensayos *in vitro*. Los virus quiméricos de la invención se caracterizan porque muestran en la superficie del virión, no solo antígenos asociados con el virus sino también la proteína de fusión.

La presente invención provee virus quimérico de influencias y NDV quiméricos que permiten a un sujeto, por ej, a un ave o a un ser humano, ser inmunizado contra dos agentes infecciosos mediante la administración de un virus quimérico de influenza o un NDV quimérico. En un aspecto, el uso de un solo virus para inducir una respuesta inmune reduce la frecuencia de administración de una formulación inmunizadora. En otro aspecto, el uso de un solo virus para inducir una respuesta inmune, reduce el costo de inmunización a sujetos. El costo más bajo de inmunización a sujetos aumenta la posibilidad de que más sujetos puedan ser inmunizados y de este modo, reduce los costos de salud asociados con el tratamiento de sujetos que sufren una infección.

La invención también se refiere al uso de los virus quiméricos de la invención en composiciones (por ej: formulaciones inmunogénicas) para humanos o animales. En particular, los virus quiméricos de la invención pueden usarse como vacunas contra una amplia gama de virus y/o antígenos. Debido a que el virus quimérico está diseñado para expresar epítomos extraños en el virión, las composiciones (por ej: formulaciones de vacuna) que comprenden un virus quimérico de la invención pueden diseñarse para inmunización contra múltiples variantes de cepas, diferentes virus o contra agentes infecciosos o antígenos de enfermedad completamente diferentes (por ej: bacterias, parásitos, hongos o antígenos específicos de tumores). Para introducir las formulaciones del virus atenuado vivo a un sujeto humano o animal para inducir una respuesta de citoquina inmune o apropiada se pueden utilizar muchos métodos. Estos incluyen, más no se limitan a rutas intranasales, intratraqueales, orales, intradérmicas, intramusculares, intraperitoneales, intravenosas y subcutáneas.

Los virus quiméricos de la invención permiten a un sujeto (por ej: aviar) ser inmunizado para dos enfermedades infecciosas mediante la administración de virus quiméricos. En una realización específica, los virus quiméricos de la invención permiten inmunizar aves contra el virus de influenza aviar y el virus de la enfermedad de Newcastle mediante la administración de un virus quimérico de la invención. Los sujetos aviares pueden inmunizarse fácilmente rociándolos con el virus quimérico o administrándoles el virus quimérico en una solución acuosa, como agua que puedan beber.

La presente invención se basa, en parte en el hallazgo de los Solicitantes de que se puede lograr una respuesta inmune efectiva a dos agentes infecciosos mediante el diseño de un virus de influenza para expresar e incorporar en su virión, una proteína de

2

fusión que comprenda los dominios citoplásmicos y de transmembrana de al menos una glicoproteína esencial del virus y el ectodominio de una proteína de un segundo agente infeccioso, en donde la proteína de fusión reemplaza funcionalmente la glicoproteína esencial. En un aspecto, la incorporación de la proteína de fusión en el virión resulta en una respuesta inmune mejorada al ectodominio del segundo agente infeccioso. El diseño de los dominios citoplásmicos y de transmembrana de una glicoproteína esencial del virus en la proteína de fusión permite que ésta se incorpore en el virión. En una realización en particular, la glicoproteína esencial es una o ambas de la proteína HA y/o NA del virus de influenza. En otra realización, la glicoproteína esencial es una o ambas de la proteína HN o F de NDV. El reemplazo funcional de al menos una glicoproteína esencial del virus elimina la preocupación acerca de la limitación del tamaño del genoma viral (por ej., el genoma del virus de influenza). En algunas realizaciones, el reemplazo funcional de al menos una glicoproteína esencial del virus con la proteína de fusión atenúa la replicación viral en los sujetos.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende una proteína de fusión que tiene (i) un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso salvo virus de influenza, fusionado a (ii) un dominio de transmembrana y citoplásmico de una glicoproteína codificada por un gen esencial de un virus de influenza, en donde la proteína de fusión es incorporada en un virus de influenza aviar, en el que la función del gen esencial es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa al virus de influenza aviar. En algunas realizaciones, el gen esencial de un virus de influenza es un gen de hemaglutinina (HA). En otras realizaciones, el gen esencial de un virus de influenza es un gen de neuraminidasa (NA). En algunas realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar es atenuado. De acuerdo con estas realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar puede ser atenuado por mutaciones en el gen NS1.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende una proteína de fusión que tiene (i) un ectodominio de una proteína NDV HN fusionada a (ii) un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico de una proteína NA del virus de influenza, en donde la proteína de fusión es incorporada en un virus de influenza aviar, en el que la función de la proteína NA es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa al virus de influenza aviar. En algunas realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar es atenuado. De acuerdo con estas realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar puede ser atenuado por mutaciones en el gen NS1. Según la invención se puede usar cualquier tipo, subtipo o cepa de virus de influenza aviar.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar que comprende un segmento NA empaquetado del virus de influenza que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en la que el marco de lectura abierto NA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA sean reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno de neuraminidasa de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo N, de modo que la proteína de fusión de neuraminidasa se expresa e incorpora en el virus quimérico de influenza aviar.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento HA empaquetado del virus de influenza que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en la que el marco de lectura abierto HA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio HA sean reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno enlazante fusogénico del receptor de un agente infeccioso aparte del virus de influenza que es anclado por el extremo-C, de modo que la proteína de fusión de hemaglutinina se exprese e incorpore en el virus quimérico de influenza aviar.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento HA empaquetado bicistrónico del virus de influenza, que comprende: (a) un primer un marco de lectura abierto que codifica una proteína de hemaglutinina del virus de influenza aviar, y (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en la que los nucleótidos que codifican el ectodominio de hemaglutinina son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, aparte del virus de influenza, o que codifica un antígeno de enfermedad anclado por el extremo-C, de modo que tanto la hemaglutinina del virus de influenza como la proteína de fusión se expresen e incorporen en el virus quimérico de influenza aviar. En algunas realizaciones, el primer marco de lectura abierto del segmento HA del virus quimérico aviar es modificado para retirar el sitio de escisión polibásica de la hemaglutinina.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento NA empaquetado bicistrónico del virus de influenza que comprende: (a) un primer un marco de lectura abierto que codifica una proteína de neuraminidasa del virus de influenza aviar, y (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en la que los nucleótidos que codifican el ectodominio de neuraminidasa son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, aparte del virus de influenza, o que codifican un antígeno de enfermedad anclado por el extremo-N,

14

de modo que tanto la neuraminidasa del virus de influenza como la proteína de fusión se expresen e incorporen en el virus quimérico de influenza aviar. En algunas realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar comprende un segmento HA que tiene un marco de lectura abierto modificado para retirar el sitio de escisión polibásica de hemaglutinina.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento NA empaquetado del virus de influenza que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en la que el marco de lectura abierto NA es modificado, de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno HN de NDV, de modo que la proteína de fusión de neuraminidasa se exprese e incorpore en el virus quimérico de influenza aviar. La proteína de fusión de neuraminidasa provee la actividad neuraminidasa para el virus quimérico de influenza aviar.

En algunas realizaciones, un virus quimérico de influenza aviar de la invención comprende un segmento empaquetado del gen NS1 que codifica una proteína NS1 modificada que reduce la actividad antagonista de interferon celular del virus. La Sección 5.1.2 presenta ejemplos no limitantes de mutaciones en el gen NS1 que resultan en una proteína NS1 modificada.

La presente invención provee moléculas de ácido nucleico recombinante (por ej: moléculas de ADN recombinante) que codifican el segmento NA de los virus quiméricos de influenza aviar de la invención. La presente invención también provee moléculas de ácido nucleico recombinante (por ej: moléculas de ADN recombinante) que codifican el segmento HA de los virus quiméricos de influenza aviar de la invención. La presente invención provee, además, moléculas de ácido nucleico recombinante (por ej: moléculas de ARN recombinante) que codifican el segmento NA o el segmento HA de los virus quiméricos de influenza aviar de la invención.

La presente invención provee métodos para propagar un virus quimérico de influenza aviar de la invención, que comprende cultivar el virus quimérico de influenza aviar en un huevo embrionado o una línea celular que sea susceptible de infección aviar por el virus de influenza. La presente invención también ofrece métodos para producir una formulación inmunogénica, el método que comprende: (a) propagar un virus quimérico de influenza aviar de la invención en un huevo embrionado o una línea celular que sea susceptible de infección aviar por el virus de influenza; y (b) recoger el virus progenie, en donde el virus es cultivado en cantidades suficientes y bajo condiciones adecuadas para quedar libre de contaminación, de manera que el virus progenie sea apto para usar en formulaciones inmunogénicas, por ej: formulaciones de vacuna.

La presente invención provee un virus quimérico atenuado de influenza, que comprende una proteína de fusión, que tiene (i) un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo virus de influenza, fusionado a (ii) una transmembrana y un dominio citoplásmico de una glicoproteína codificada por un gen esencial de un virus de influenza, en donde la proteína de fusión está incorporada en un virus atenuado de influenza, en el cual la función del gen esencial es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa al virus atenuado de influenza. En algunas realizaciones, el gen esencial de un virus de influenza es un gen de hemaglutinina (HA). En otras realizaciones, el gen esencial de un virus de influenza es un gen de neuraminidasa (NA). El virus quimérico atenuado de influenza puede ser de cualquier tipo, subtipo o cepa de virus de influenza. Por ejemplo, el virus quimérico atenuado de influenza puede ser un virus de influenza A, un virus de influenza B o un virus de influenza C.

La presente invención provee un virus quimérico atenuado de influenza, que comprende un segmento NA empaquetado del virus de influenza que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en la cual el marco de lectura abierto NA se modifica de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno neuraminidasa de un agente infeccioso diferente a la influenza, que está anclado por el extremo-N, de modo que la proteína de fusión neuraminidasa se exprese e incorpore en el virus quimérico atenuado de influenza aviar. En algunas realizaciones, el virus quimérico atenuado de influenza de la invención comprende un segmento HA que tiene un marco de lectura abierto modificado para remover el sitio de escisión polibásica de la hemaglutinina.

La presente invención provee un virus quimérico atenuado de influenza, que comprende un segmento HA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en la cual el marco de lectura abierto HA es modificado, de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio HA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno hemaglutinina de un agente infeccioso diferente a la influenza que está anclado por el extremo-C, de modo que la proteína de fusión de hemaglutinina se exprese e incorpore en el virus quimérico atenuado de influenza.

La presente invención provee un virus quimérico atenuado de influenza, que comprende un segmento HA empaquetado bicistrónico de virus de influenza, que comprende: (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína de hemaglutinina de influenza, y (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en la cual los nucleótidos que codifican el

16

ectodominio de la hemagglutina son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, o que codifican un antígeno de enfermedad que está anclado por el extremo-C, de modo que tanto la hemagglutina de la influenza y la proteína de fusión se expresen e incorporen en el virus quimérico atenuado de influenza. En algunas realizaciones, el primer marco de lectura abierto del segmento HA del virus quimérico atenuado de influenza es modificado para remover el sitio de escisión polibásica de la hemagglutina.

La presente invención provee un virus quimérico atenuado de influenza, que comprende un segmento NA empaquetado bicistrónico del virus de influenza, que comprende: (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína de neuraminidasa de influenza, y (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de neuraminidasa, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio de la neuraminidasa son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, o codifican un antígeno de enfermedad que está anclado por el extremo-N, de modo que la neuraminidasa de la influenza y la proteína de fusión se expresen e incorporen en el virus quimérico atenuado de influenza. En algunas realizaciones, el virus quimérico atenuado de influenza de la invención comprende un segmento HA que tiene un marco de lectura abierto modificado para remover el sitio de escisión polibásica de la hemagglutina.

En algunas realizaciones, el virus quimérico atenuado de influenza de la invención comprende un segmento empaquetado del gen NS1 que codifica una proteína NS1 modificada, que reduce la actividad antagonista de interferón celular del virus.

La presente invención provee moléculas de ácido nucleico recombinante (por ej: moléculas de ADN recombinante) que codifican el segmento NA de los virus quiméricos atenuados de influenza de la invención. La presente invención también provee moléculas de ácido nucleico recombinante (por ej: moléculas de ADN recombinante) que codifican el segmento HA de los virus quiméricos atenuados de influenza de la invención. La presente invención además provee moléculas de ácido nucleico recombinante (por ej: moléculas de ARN recombinante) que codifican el segmento NA o el segmento HA de los virus quiméricos atenuados de influenza de la invención.

La presente invención provee métodos para propagar un virus quimérico atenuado de influenza de la invención, que comprende cultivar el virus quimérico atenuado de influenza en un huevo embrionado o una línea celular que sea susceptible a infección por virus de influenza. La presente invención también ofrece métodos para producir una formulación inmunogénica, el método que comprende: (a) propagar un virus quimérico atenuado de influenza de la invención en un huevo embrionado o una

línea celular que sea susceptible de infección por virus atenuado de influenza; y (b) recolectar el virus progenie, en donde el virus se cultiva en cantidades suficientes y bajo condiciones adecuadas para quedar libre de contaminación, de manera que el virus progenie sea apto para usar en formulaciones inmunogénicas, por ej: formulaciones de vacuna.

La presente invención también provee virus NDV quiméricos. En particular, la presente invención provee un NDV quimérico, que comprende una proteína de fusión, que tiene (i) un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo NDV fusionado a (ii) una transmembrana y dominio citoplásmico de una glicoproteína codificada por un gen esencial de un NDV, en donde la proteína de fusión se incorpora en un NDV, en el cual la función del gen esencial es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa al NDV. En algunas realizaciones, el gen esencial NDV del NDV es el gen que codifica una proteína F. En otras realizaciones, el gen esencial NDV del NDV es el gen que codifica una proteína HN. Según la invención, se puede usar cualquier tipo, subtipo o cepa de NDV.

La presente invención provee un NDV quimérico, que comprende una genoma empaquetado que comprende una secuencia nucleótida que codifica una proteína de fusión de la proteína F que tiene los dominios de transmembrana y citoplásmico de una proteína F y el ectodominio de un antígeno de un agente infeccioso, salvo NDV, o un antígeno de enfermedad que está anclado por el extremo-C, de modo que la proteína de fusión de la proteína F se exprese e incorpore en el NDV quimérico. En algunas realizaciones, el genoma del NDV quimérico comprende una secuencia nucleótida que codifica una proteína F, de modo que la proteína F se exprese e incorpore en el NDV quimérico además de la proteína de fusión de la proteína F. En otras realizaciones, la secuencia nucleótida que codifica la proteína de fusión la proteína NDV F reemplaza la secuencia nucleótida que codifica una proteína NDV F y la proteína de fusión de la proteína F suministra la función de una proteína F para el NDV quimérico.

La presente invención provee un NDV quimérico, que comprende un genoma empaquetado que comprende una secuencia nucleótida que codifica una proteína de fusión HN que tiene los dominios de transmembrana y citoplásmico de una proteína HN y el ectodominio de un antígeno de un agente infeccioso, salvo NDV, o un antígeno de enfermedad que está anclado por el extremo-N, de modo que la proteína de fusión HN se exprese e incorpore en el NDV quimérico. En algunas realizaciones, el genoma del NDV quimérico comprende una secuencia nucleótida que codifica una proteína HN, de modo que la proteína HN se exprese e incorpore en el NDV quimérico además de la proteína de fusión HN NDV. En otras realizaciones, la secuencia nucleótida que codifica la proteína

de fusión HN reemplaza la secuencia nucleótida que codifica la proteína NDV HN y la proteína de fusión HN suministra la función de la proteína HN para el NDV quimérico. La presente invención provee moléculas de ácido nucleico recombinante que codifica la proteína NDV HN o la proteína F.

La presente invención provee métodos para propagar un NDV quimérico de la invención, que comprende cultivar el NDV quimérico en un huevo embrionado o una línea celular que sea susceptible a la infección NDV. La presente invención también provee un método para producir una formulación inmunogénica, el método que comprende: (a) propagar un NDV quimérico de la invención en un huevo embrionado o una línea celular que sea susceptible a la infección NDV; y (b) recoger el virus progenie, en donde el virus se cultiva en cantidades suficientes y bajo condiciones adecuadas para quedar libre de contaminación, de manera que el virus progenie sea apto para usar en formulaciones inmunogénicas, por ej: formulaciones de vacuna.

La presente invención provee huevos embrionados que comprenden los virus quiméricos de la invención. La presente invención también provee líneas celulares que comprenden los virus quiméricos de la invención. La presente invención además provee formulaciones inmunogénicas que comprenden los virus quiméricos de la invención.

La presente invención provee métodos para inducir una respuesta inmune ante uno, dos o más agentes infecciosos en un sujeto, el método que comprende administrar una cantidad efectiva de un virus quimérico de influenza de la invención. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano (por ej: un cerdo, caballo, perro o gato). Aún en otras realizaciones, el sujeto es aviar. En una realización específica, la presente invención provee un método para inducir una respuesta inmune ante uno, dos o más agentes infecciosos en un ave, el método que comprende administrar una cantidad efectiva de un virus quimérico de influenza aviar de la invención.

La presente invención provee métodos para inducir una respuesta inmune ante uno, dos o más agentes infecciosos en un sujeto, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un NDV quimérico de la invención. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano (por ej: un cerdo, caballo, perro o gato). Aún en otras realizaciones, el sujeto es aviar. En una realización específica, la presente invención provee métodos para inducir una respuesta inmune ante uno, dos o más agentes infecciosos en un ave, el método que comprende administrar al ave una cantidad efectiva de un NDV quimérico de la invención.

19

La presente invención provee métodos para inducir una respuesta inmune ante uno, dos o más agentes infecciosos en un sujeto, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un virus quimérico atenuado de influenza de la invención. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano (por ej: un cerdo, caballo, perro o gato). Aún en otras realizaciones, el sujeto es un ave. En una realización específica, la presente invención provee métodos para inducir una respuesta inmune ante uno, dos o más agentes infecciosos en un ser humano, el método que comprende administrar a un ser humano que necesite de ello una cantidad efectiva de un virus quimérico de la invención.

La presente invención provee métodos para inducir una respuesta inmune ante un antígeno de enfermedad, los métodos que comprenden administrar al sujeto una cantidad efectiva de un virus quimérico de la invención. En algunas realizaciones el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto es aviar .

3.1 Terminología

Como se usa en la presente invención, el término "animal" incluye, pero no está limitado a, animales de compañía (por ej: perros y gatos), animales de zoológicos, animales de granja (por ej: rumiantes, no-rumiantes, ganado y aves de corral), animales salvajes y animales de laboratorio (por ej: roedores, como ratas, ratones, conejillos de Indias y conejos), y animales que sean clonados o modificados genéticamente o de otro modo (por ej: animales transgénicos).

Como se usa en la presente invención, el término "entre" cuando se emplea junto con un número se refiere a cualquier número dentro de 1, 5 ó 10% del número referenciado.

Como se usa en la presente invención, la frase "extremo amino" de NS1 se refiere a los amino ácidos del residuo de amino ácidos del extremo amino (residuo amino ácido1) hasta residuos de amino ácidos 115, residuos de amino ácidos 1 a 100, residuos de amino ácidos 1 a 75, residuos de amino ácidos 1 a 50, residuos de amino ácidos 1 a 25, o residuos de amino ácidos 1 a 10 de la proteína NS1 viral de influenza. Las eliminaciones del extremo amino pueden incluir eliminaciones integradas por 5, preferiblemente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 73, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 126, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170 ó 175 residuos de amino ácidos del extremo amino de NS1.

Como se usa en la presente invención, la frase "extremo carboxi" de NS1 se refiere a residuos de amino ácidos 116 hasta el residuo de amino ácido del extremo carboxi, residuos de amino ácidos 101 hasta el residuo amino ácido del extremo carboxi,

residuos de amino ácidos 76 hasta el residuo amino ácido del extremo carboxi, residuos amino ácidos 51 hasta el residuo amino ácido del extremo carboxi, o residuos amino ácidos 26 hasta el residuo amino ácido del extremo carboxi de la proteína NS1 viral de la influenza equina, cuando el extremo amino de NS1 es residuos amino ácidos 1 hasta residuos amino ácido 115, residuos amino ácidos 1 hasta residuos amino ácidos 100, residuos amino ácidos 1 hasta residuos amino ácidos 75, residuos amino ácidos 1 hasta residuos amino ácidos 50, o residuos amino ácidos 1 hasta 25 residuos amino ácidos, respectivamente, de una proteína NS1 viral de influenza. Las eliminaciones del extremo carboxi pueden incluir eliminaciones integradas por 5, preferiblemente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 73, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 126, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170 o 175 residuos amino ácidos del extremo carboxi de NS1.

Como se usa en la presente invención, los términos "enfermedad" y "afección" se usan indistintamente para referirse a una condición en un sujeto e incluyen, pero no están limitados a, afecciones proliferativas (por ej: leucemia, fibrosis, carcinoma (incluidos carcinomas malignos, no-malignos, metastáticos y no-metastáticos) y linfoma), e infecciones de un agente infeccioso (por ej: un virus, bacteria, parásito), o una condición o síntoma asociado con ello.

Como se usa en la presente invención, el término "epítomos" se refiere a sitios, fragmentos o una región de una molécula (por ej: un polipéptido o una proteína) que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un sujeto. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es un sitio, fragmento o región de una molécula (por ej: un polipéptido o una proteína) que produce una respuesta de anticuerpo en un sujeto. Un epítipo que tiene actividad antigénica es un sitio, fragmento o región de una molécula donde un anticuerpo se enlaza inmuno-específicamente según se determine por cualquier método que conozca una persona versada en la técnica, por ejemplo, mediante inmunoensayos.

Como se usa en la presente invención, el término "fragmento" en el contexto de un agente proteináceo se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de amino ácidos de al menos 2 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 5 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 10 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 15 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 20 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 25 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 40 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 50 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 60 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 70 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 80 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 90 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 100 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 125 residuos contiguos de amino

21

ácidos, al menos 150 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 175 residuos contiguos de amino ácidos, al menos 200 residuos contiguos de amino ácidos, o al menos 250 residuos contiguos de amino ácidos de la secuencia de amino ácidos de un péptido, polipéptido o proteína. En una realización, un fragmento de una proteína de longitud completa conserva la actividad de la proteína de longitud completa. En otra realización, el fragmento de la proteína de longitud completa no conserva la actividad de la proteína de longitud completa.

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

El término "secuencia heteróloga" como se usa en la presente invención en el contexto de un agente proteináceo se refiere a una molécula que no se encuentra en la naturaleza asociada con la espina dorsal de virus quimérico o, en particular, la glicoproteína del virus quimérico. El término "secuencia heteróloga" en el contexto de una secuencia de ácido nucleico o molécula de ácido nucleico se refiere a una molécula que no se encuentra en la naturaleza asociada con el genoma de la espina dorsal del virus quimérico.

El término "enlaza inmuno específicamente un antígeno" y términos análogos como se usan en la presente invención se refieren a moléculas que se enlazan específicamente a un antígeno y no se enlazan específicamente a otra molécula (por ej: anticuerpos específicos del antígeno que incluyen anticuerpos modificados (es decir,

anticuerpos que comprenden un dominio constante IgG modificado (por ej: IgG1), o un fragmento FcRn enlazante del mismo (por ej: el dominio Fc o el dominio Fc bisagra)) y anticuerpos no modificados (es decir, anticuerpos que no comprenden un dominio constante IgG modificado (por ej: IgG1), o un fragmento FcRn-enlazante del mismo (por ej: el dominio Fc o dominio Fc bisagra)). Las moléculas que enlazan específicamente un antígeno pueden tener reactividad cruzada con antígenos relacionados. Preferiblemente, una molécula que enlaza específicamente un antígeno no tiene reactividad cruzada con otros antígenos. Una molécula que enlaza específicamente un antígeno puede ser identificada, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas que conozcan personas versadas en la técnica. Una molécula enlaza específicamente un antígeno cuando se enlaza a dicho antígeno con más alta afinidad que con un antígeno de reactividad cruzada como se determine usando técnicas experimentales, como radioinmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA por *enzyme-linked immunoabsorbent assays*). Véase, por ej: Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, Nueva York en las páginas 332 a 336 para una discusión respecto a la especificidad de anticuerpos.

Como se usa en la presente invención, el término "en combinación" en el contexto de la administración de (una) terapia(s) a un sujeto, se refiere al uso de más de una terapia (por ej: más de un agente profiláctico y/o agente terapéutico). El uso del término "en combinación" no restringe el orden en que se administran las terapias (por ej: agentes profilácticos y/o terapéuticos) a un sujeto (por ej: un sujeto con una infección por virus de influenza, e infección NDV, o una condición o síntoma asociado con ello, o un sujeto con otra infección (por ej: otra infección viral)). Una primera terapia (por ej: un primer agente profiláctico o terapéutico) se puede administrar antes de (por ej: 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), conjuntamente con, o posterior a (por ej: 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) la administración de una segunda terapia (por ej: una segundo agente profiláctico o terapéutico) a un sujeto (por ej: un sujeto con una infección por virus de influenza, una infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello, u otra infección (por ej: otra infección viral)).

Como se usa en la presente invención, la frase "actividad antagonista de interferón" de un agente proteináceo se refiere a una proteína o un polipéptido, o fragmento, derivado o análogo del mismo que reduce o inhibe la respuesta inmune de interferón celular. En particular, una proteína o un polipéptido o fragmento, derivado o

análogo del mismo (por ej: NS1 de virus de influenza) que tiene actividad antagonista de interferón reduce o inhibe la expresión y/o actividad del interferón. En una realización específica, la frase "actividad antagonista de interferón" se refiere a una proteína viral o polipéptido, o fragmento, derivado, o análogo del mismo (por ej: una proteína del virus de influenza) que reduce o inhibe la respuesta inmune de interferón celular. Una proteína viral o polipéptido con actividad antagonista de interferón puede afectar preferencialmente la expresión y/o actividad de uno o dos tipos de interferón (IFN). En una realización, se afecta la expresión y/o actividad de IFN- α . En otra realización, se afecta la expresión y/o actividad de IFN- β . En otra realización específica, se afecta la expresión y/o actividad de IFN- γ . En algunas realizaciones, la expresión y/o actividad de IFN- α , IFN- β y/o IFN- γ en un huevo embrionado o una célula se reduce entre 1 y 100 veces, entre 5 y 80 veces, entre 20 y 80 veces, entre 1 y 10 veces, entre 1 y 5 veces, entre 40 y 80 veces, o 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 veces mediante un agente proteínáceo con actividad antagonista de interferón en relación con la expresión y/o actividad de IFN- α , IFN- β , y/o IFN- γ en un huevo embrionado o una célula de control que no expresa o no está en contacto con un agente proteínáceo medido por las técnicas descritas en la presente invención o que conozca una persona versada en la técnica.

Como se usa en la presente invención, las frases "sistemas deficientes en IFN" o "sustratos deficientes en IFN" se refieren a sistemas, por ej: células, líneas celulares y animales, como ratones, pollos, pavos, conejos, ratas, caballos, etc., que no producen uno, dos o más tipos de IFN, o no producen ningún tipo de IFN, o producen bajos niveles de uno, dos o más tipos de IFN o producen niveles bajos de un IFN (es decir, una reducción en una expresión de IFN de 5% a 10%, 10% a 20%, 20% a 30%, 30% a 40%, 40% a 50%, 50% a 60%, 60% a 70%, 70% a 80%, 80% a 90% o más cuando se comparan con sistemas competentes en IFN bajo las mismas condiciones), no responden o responden con menos eficiencia a uno, dos o más tipos de IFN, o no responden a ningún tipo de IFN, y/o son deficientes en la actividad de genes antivirales inducidos por uno, dos o más tipos de IFN, o inducidos por algún tipo de IFN.

Como se usan en la presente invención, los términos "infección", "infección por influenza", "infección por influenza aviar" e "infección NDV" se refieren a todas las etapas del ciclo de vida de un agente de un virus de influenza, un virus de influenza aviar, un NDV u otro agente infeccioso (por ej: otra infección viral o bacterial) en un sujeto (incluido, pero no limitado a la invasión por y la replicación del virus de influenza, virus de influenza aviar, NDV u otro agente infeccioso en una célula o tejido), lo mismo que el estado patológico resultante de la invasión por y replicación del virus de influenza, virus de influenza aviar o NDV. La invasión por y la multiplicación de un virus de

influenza, virus de influenza aviar, NDV u otro agente infeccioso incluye, pero no está limitado a, los siguientes pasos: el docking de los virus (por ej: virus de influenza, virus de influenza aviar o una partícula de NDV) a una célula, fusión de un virus con una membrana celular, la introducción de información genética viral en una célula, la expresión de proteínas virales (por ej: proteínas de virus de influenza, de virus de influenza aviar o de NDV), la producción de partículas virales nuevas (es decir, partículas de virus de influenza, de virus de influenza aviar o de NDV) y la liberación del virus (por ej: partículas de virus de influenza, de virus de influenza aviar o de partículas NDV) de una célula. Una infección respiratoria (por ej: una infección por virus de influenza o NDV) puede ser una infección del tracto respiratorio superior (URI), una infección del tracto respiratorio inferior (LRI), o una combinación de las mismas. En realizaciones específicas, la infección es secundaria (por ej: neumonía secundaria) que se manifiesta después de los síntomas iniciales de la infección primaria (por ej: neumonía viral). Las infecciones secundarias surgen debido a la infección primaria o un síntoma o condición asociada con ello, predisponiendo al sujeto infectado a dicha infección secundaria. En realizaciones específicas, el estado patológico que resultan de la invasión por y la replicación de un virus de influenza, virus de influenza aviar o NDV es un virus de influenza aguda, virus de influenza aviar aguda o enfermedad NDV aguda. Las etapas agudas de las infecciones respiratorias pueden manifestarse como neumonía y/o bronquiolitis, donde los síntomas pueden incluir hipoxia, apnea, distrés respiratorio, respiración rápida, resuello asmático, cianosis, etc. La etapa aguda de las infecciones respiratorias (por ej: virus de influenza e infecciones NDV) requiere que un individuo afectado obtenga intervención médica, como hospitalización, administración de oxígeno, intubación y/o ventilación.

Como se usa en la presente invención, el término "aislado", en el contexto de virus, se refiere a un virus que se deriva de un virus parental simple. Un virus puede ser aislado utilizando métodos rutinarios conocidos por una persona versada en el área incluidos, pero no limitados a, aquellos basados en purificación de placa y dilución limitada.

Como se usa en la presente invención, el término "aislado" en el contexto de moléculas de ácido nucleico se refiere a una molécula de ácido nucleico que se separa de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", como una molécula de cADN, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. En una realización preferida, se aísla una molécula de ácido nucleico que codifica una

proteína viral.

Como se usan en la presente invención, los términos "manejar," "que maneja," y "manejo" se refieren a los efectos benéficos que un sujeto deriva de una terapia (por ej: un agente profiláctico o terapéutico), que no resulta en una cura de la enfermedad (por ej: infección). En algunas realizaciones, a un sujeto se le administran una o más terapias (por ej: agentes profilácticos o terapéuticos, como un anticuerpo de la invención) para "manejar" una infección por virus de influenza, virus de influenza aviar o infección NDV o una infección con otro agente infeccioso, uno o más síntomas de los mismos, o una condición asociada con, potenciada por, o que potencie una infección por virus de influenza o infección NDV o infección con otro agente infeccioso, en cuanto a prevenir el avance o empeoramiento de la infección.

Como se usa en la presente invención, la frase "multiplicidad de infección" o "MOI" es el número promedio de virus por célula infectada. La MOI se determina al dividir el número de virus agregado (ml agregado x Pfu) por el número de células agregadas (ml agregado x células /ml).

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

Como se usan en la presente invención, los términos "ácidos nucleicos", "secuencia nucleótidas" y "moléculas de ácido nucleico" incluyen moléculas de ADN (por ej: cADN o ADN genómico), moléculas de ARN (por ej: mARN), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas ADN/ARN híbridas, y análogos de moléculas ADN o ARN. Dichos análogos pueden generarse usando, por ejemplo, análogos nucleótidos, que incluyen, pero no están limitados a, bases de inosina o tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden espinas dorsales modificadas que llevan atributos benéficos a las moléculas como, por ejemplo, resistencia de la nucleasa o una capacidad incrementada para cruzar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o las secuencias de nucleótidos pueden ser de hebra simple, de hebra doble, pueden contener porciones de hebra simple y hebra doble, y pueden contener porciones de hebra triple, pero preferiblemente es ADN de hebra doble.

Como se usan en la presente invención, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la prevención de la recurrencia o aparición de síntomas o una

reducción en uno o más síntomas de una enfermedad (por ej: infección viral u otra enfermedad infecciosa) en un sujeto, como resultado de la administración de una terapia (por ej: un agente profiláctico o terapéutico). Por ejemplo, en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto por una infección, "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la inhibición o una reducción en el desarrollo o la aparición de los síntomas de una infección (por ej: una infección por virus de influenza, por infección NDV o una condición asociada con ello o una infección diferente a la causada por un virus de influenza o infección NDV o una condición asociada con ello), o la prevención de la recurrencia, aparición de síntomas o desarrollo de uno más síntomas de una infección (por ej: una infección por virus de influenza, una infección NDV o una condición asociada con ello o una infección diferente a la causada por un virus de influenza, una infección NDV o una condición asociada con ello), en un sujeto, que resulte de la administración de una terapia (por ej: un agente profiláctico o terapéutico), o la administración de una combinación de terapias (por ej: una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos).

Como se usa en la presente invención, el término "antígeno protector" en el contexto de un agente infeccioso incluye cualquier molécula que pueda provocar una respuesta inmune de protección cuando se administra a un sujeto, la cual se dirige contra el agente infeccioso.

Como se usa en la presente invención, los términos "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente(s) que se pueda usar en la prevención de una enfermedad (por ej: una infección) o un síntoma de la misma (por ej: una infección por virus de influenza, una infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello, o una infección causada por un virus diferente a un virus de influenza, de una infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello). Preferiblemente, un agente profiláctico es un agente conocido por ser útil para, haber sido usado o que en la actualidad se está usando para prevenir o impedir el surgimiento de los síntomas iniciales, el desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o un síntoma de la misma (por ej: una infección o una condición o un síntoma asociado con ello).

Como se usa en la presente invención, la frase "purificado" en el contexto de virus se refiere a un virus que está sustancialmente libre de material celular y medio de cultivo de la célula o tejido fuente, del cual se deriva el virus. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de virus en las cuales el virus se separa de los componentes de las células de las cuales es aislado o producido de manera recombinante. Por lo tanto, el virus que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tiene menos de entre 30%, 20%, 10% o 5%

(por peso seco) de proteína celular (también referida en la presente invención como una "proteína contaminante"). El virus también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, que el medio de cultivo representa menos de entre 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación del virus. Un virus puede ser purificado usando métodos rutinarios conocidos por una persona versada en la técnica, incluidos pero no limitados a cromatografía y centrifugación.

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

Como se usa en la presente invención, el término "sinérgico" en el contexto de la administración o el resultado o terapias, se refiere a la combinación de terapias (por ej: agentes profilácticos o terapéuticos) que es más efectivo que los efectos acumulados de dos o más terapias simples (por ej., uno o más agentes profilácticos o terapéuticos). Un efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ej: una combinación de agente profilácticos o terapéuticos) permite el uso de dosis menores de una o más terapias (por ej: uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) y/o administración menos frecuente de dichas terapias a un sujeto con una enfermedad (por ej: una infección por virus de influenza, una infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello, o una infección salvo una infección por virus de influenza, infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello). La capacidad para utilizar dosis menores de terapias (por ej: agentes profilácticos o terapéuticos) y/o administrar dichas terapias con menos frecuencia reduce la toxicidad asociada con la administración de dichas terapias a un sujeto sin reducir la eficacia de las mismas en la prevención o tratamiento de una enfermedad (por ej: una infección por virus de influenza o una condición o síntoma

asociado con ello, o una infección salvo una infección por virus de influenza, infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello). Además, un efecto sinérgico puede resultar en un mejoramiento en la eficacia de las terapias (por ej: agentes profilácticos o terapéuticos) en la prevención, manejo o tratamiento de una enfermedad (por ej: una infección por virus de influenza, una infección NDV o una condición o síntomas asociado con ello, o una infección salvo una infección por virus de influenza, una infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello). Finalmente, el efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ej: agentes profilácticos o terapéuticos) puede evitar o reducir efectos secundarios adversos o indeseados asociados con el uso de una sola terapia.

Como se usa en la presente invención, los términos "terapias" y "terapia" pueden referirse a cualquier protocolo(s), método(s), y/o agente(s) que se puedan usar en la prevención, tratamiento, manejo o mejoría de una enfermedad (por ej: cáncer, una infección por virus de influenza, una infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello, o una infección salvo una infección por virus de influenza, o infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello). En algunas realizaciones, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a terapia biológica, terapia de apoyo, y/u otras terapias útiles en el tratamiento, manejo, prevención o mejoría de una enfermedad, una infección o una condición o síntoma asociado con ello, que conozca una persona versada en la técnica.

Como se usa en la presente invención, los términos "agente terapéutico" y "agentes terapéuticos" se refieren a cualquier agente(s) que se puedan usar en la prevención, tratamiento, manejo o mejoría de una enfermedad (por ej: una infección o un síntoma del mismo (por ej: una infección por influenza, una infección NDV o una condición o síntomas asociados con ello, una infección salvo una infección por virus de influenza, infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello)). Preferiblemente, un agente terapéutico es un agente que se conoce por ser útil para, por haber sido usado o por ser usado actualmente para la prevención, tratamiento, manejo o mejoría de una enfermedad o síntoma asociado con ello (por ej: una infección por influenza, infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello, una infección salvo una infección por virus de influenza, infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello).

Como se usa en la presente invención, los términos "tratar," "tratamiento," y "que trata" en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto para una enfermedad, se refieren a la erradicación, reducción o mejoría de los síntomas de dicha enfermedad. Con respecto a infecciones (por ej: virus de influenza o virus NDV), tratamiento se

refiere a la erradicación o control de la replicación de un agente infeccioso (por ej: un virus), la reducción en la cantidad de un agente infeccioso (por ej: la reducción en el título del virus), la reducción o mejoría de la progresión, gravedad, y/o duración de una infección (por ej: una infección por influenza, infección NDV o una condición o síntomas asociados con ello, una infección salvo una infección por virus de influenza, infección NDV o una condición o síntoma asociado con ello), o la mejoría de uno o más síntomas que resulten de la administración de una o más terapias (incluida, pero no limitada a, la administración de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos). Con respecto al cáncer, tratamiento se refiere a la erradicación, retiro, modificación o control de tejido canceroso primario, regional o metastático que resulte de la administración de uno o más agentes terapéuticos de la invención. En algunas realizaciones, dichos términos se refieren a minimizar o demorar la difusión del cáncer que resulta de la administración de uno o más agentes terapéuticos de la invención, a un sujeto con dicha enfermedad. En otras realizaciones, tales términos se refieren a eliminación de células que causan la enfermedad.

4. DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

La construcción codifica nucleótidos de la región 3' no codificada de WSN NA vARN, la región codificada NA que corresponde a los dominios de la cola citoplásmica y de transmembrana de una proteína NA más el primer amino ácido del ectodominio NA, la región codificada de una proteína NDV B1 HN (ectodominio solamente), dos codones secuenciales (de detención), los nucleótidos no trasladados del marco de lectura WSN NA y la región 5' no codificada de WSN vARN.

FIG. 2. Representación esquemática de alteración en la secuencia polibásica de amino ácidos de HA

La secuencia nucleótida identificados como H5N1 HA representa a los nucleótidos 1013 a 1045 (SEQ ID NO:13; secuencia de amino ácidos SEQ ID NO:14) del marco de lectura abierto de la glicoproteína de superficie HA de Influenza A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Los nucleótidos 1026 a 1038 fueron reemplazados sólo con el nucleótido citosina usando PCR de excisión y mutagénesis dirigida al sitio que resulta en la secuencia nucleótida de HA avirulenta (SEQ ID NO:15; secuencia de amino ácidos SEQ ID NO:16). El cambio de secuencia corresponde al reemplazo de la secuencia polibásica de 5 amino ácidos sólo con el amino ácido treonina.

FIG. 3. Representación esquemática de alteración en la secuencia de

ácido nucleico de HA

La secuencia identificada como HA avirulenta representa los nucleótidos 1013 a 1033 del marco de lectura abierto de una glicoproteína de superficie HA basada en secuencias de consenso de las proteínas HA de Influenza A/Vietnam/1203/04 (H5N1) avirulenta (SEQ ID NO: 15; secuencia de amino ácidos SEQ ID NO: 16). Los residuos de adenosina sin revestimiento fueron reemplazados de modo que las mutaciones fueron sinónimas, lo cual resulta en la secuencia nucleótida SEQ ID NO:17 y la secuencia de amino ácidos SEQ ID NO:16.

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

A. La región de codificación del segmento del gen NS de H5N1 es 833 nucleótidos. B. La construcción pPol1VN1203 NSI-126 tiene una eliminación en el gen NS de los nucleótidos 379 a 456 de la región de codificación, la inserción de 3 codones de detención y un sitio de restricción *Bgl*II. C. La construcción pPol1VN1203 NS1-99 tiene una eliminación en el gen NS de los nucleótidos 298 a 456 de la región de codificación, la inserción de 4 codones de detención, un sitio de restricción *Bgl*II y un sitio de restricción *Pac*I. D. La construcción pPol1VN1203 NS1-73 tiene una eliminación en el gen NS de los nucleótidos 219 a 456 de la región de codificación, la inserción de 4 codones de detención, un sitio de restricción *Bgl*II y un sitio de restricción *Pac*I.

FIG. 5. Esquema de pNDV/B1

La secuencia ilustrada está flanqueada en el extremo 3' por un promotor T7 y en el extremo 5' por un ribosoma HDV y un terminador T7. El sitio de inserción entre los genes P y M comprende un sitio de restricción único *Xba*I.

FIG. 6. Análisis Western blot de la expresión KGFR en rNDV quimérico

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

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

Los virus quiméricos rNDV (línea 1), rNDV-KGFR (línea 2) y rNDV-KGFR/F-

CT (línea 3) se cultivaron en huevos de pollo embrionados de 10 días de edad. Los virus purificados sometidos a análisis de Western blot usando un anti-KGFR de ratón y un HRPO anti-ratón como los anticuerpos primario y secundario, respectivamente.

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

(A) Representación esquemática del genoma rNDVB1 con dos o tres cambios de amino ácidos en el sitio de escisión de sus proteínas F. El enlace péptido que se escinde en una proteína F está indicado con una barra diagonal. (B) Formación de sincitia en células CEF infectadas por rNDV con proteínas F modificadas. Las células CEF infectaron una multiplicidad de infección de 0,001, con virus rNDVB1, rNDV/F2aa y rNDV/F3aa. La expansión viral se monitoreó cada 24 horas por ensayo de inmunofluorescencia.

FIG. 9. Construcción y caracterización del vector fusogénico rNDV que expresa una proteína HPAI H7 H A

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

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención provee virus quiméricos ARN de hebra negativa diseñados para expresar proteínas de fusión que se incorporan en el virión, métodos para producir dichos virus quiméricos y el uso de esos virus, por ejemplo como inmunógenos, en formulaciones inmunogénicas, o en ensayos *in vitro*. Los virus quiméricos de la invención se caracterizan por desplegar, en la superficie del virión, no solamente antígenos asociados con el virus sino también la proteína de fusión.

Los virus que pueden ser diseñados según los métodos de la invención pueden ser cualquier virus envuelto. En una realización específica, los virus que pueden ser diseñados según los métodos de la invención tienen genomas segmentados o no

segmentados, genomas de una hebra o de doble hebra, y expresan al menos una glicoproteína esencial (por ej: NA, HA, HN o F) que se incorpora en la envoltura viral. Los virus para uso según los métodos de la invención pueden ser seleccionados de cepas, variantes o mutantes que se encuentran naturalmente; virus mutagenizados (por ej: por exposición a radiación UV, mutágenos, y/o números de pases); reasortantes (para virus con genomas segmentados); y/o virus genéticamente diseñados. Por ejemplo, los virus mutantes pueden ser generados mediante variación natural, exposición a radiación UV, exposición a mutágenos químicos, mediante pases en anfitriones no permisivos, por reagrupamiento (es decir, por coinfección de un virus segmentado atenuado con otra cepa que tiene los antígenos deseados), y/o por ingeniería genética (por ej: usando "genética inversa "). Ejemplos no limitantes de virus con genomas segmentados para uso según los métodos de la invención incluyen virus de la familia orthomyxoviridae (por ej: virus de influenza), bunyaviridae (por ej: Bunyamwera), reoviridae y arenaviridae (por ej: fiebre de Lassa). Ejemplos no limitantes de virus con genomas no segmentados para uso según los métodos de la invención incluyen coronaviridae (*por ej:* virus corona humano (SARS)), hepadnaviridae (por ej: virus de la hepatitis A, B o C), herpesviridae (por ej: virus de herpes simplex), poxviridae (por ej: viruela), rhabdoviridae (por ej: virus de la estomatitis vesicular virus (VSV), virus Sendai y rabias), paramyxoviridae (por ej: sarampión y virus sincitial respiratorio), y filoviridae (virus Marburg y Ébola). En algunas realizaciones, el virus segmentado es el virus de influenza. En otras realizaciones, el virus NO segmentado es NDV.

En algunas realizaciones, los virus seleccionados para uso en la invención son atenuados y/o tienen actividad antagonista de IFN defectuoso; es decir, son infecciosos y pueden replicarse *in vivo*, pero solamente generan títulos bajos que resultan en niveles subclínicos de infección que son no patogénicos. Los virus pueden ser atenuados por cualquier método conocido en la técnica y/o ejemplificado en la presente invención, por ej: diseñar el virus para incluir una mutación en el gen NS1 o incluir una modificación en la secuencia de amino ácidos polibásica antes del sitio de escisión en la proteína HA. Estos virus atenuados diseñados según la invención son, por lo tanto, candidatos ideales para formulaciones inmunogénicas, por ej: vacunas con virus vivos. Cuando se administran a un sujeto, los virus quiméricos atenuados de la invención pueden generar una respuesta inmune y provocar inmunidad en el virus y en la proteína de fusión o no nativa. En algunas realizaciones, una proteína no nativa se deriva de un patógeno. Por extensión, la administración de un virus quimérico a un sujeto genera una respuesta inmune y/o inmunidad a dicho patógeno además de al virus.

La invención también se relaciona con el uso del virus quimérico de la invención en composiciones (por ej: formulaciones inmunogénicas) para seres humanos o animales

(por ej: aviares). En particular, los virus quiméricos que son atenuados se pueden usar como vacunas contra una amplia gama de virus y/o enfermedades. Debido a que al virus quimérico se diseña para expresar secuencias de genes heterólogos como epítomos extraños en el virión, las composiciones que comprenden un virus quimérico de la invención (por ej: formulaciones de vacuna) pueden diseñarse para inmunización contra múltiples variantes de cepas, virus diferentes o contra agentes infecciosos completamente diferentes o antígenos de enfermedad (por ej: bacterias, parásitos, hongos o antígenos específicos de tumores) de los cuales se derivan las secuencias de genes heterólogos. Se pueden usar muchos métodos para introducir las formulaciones de virus vivo atenuado a un sujeto humano o animal para inducir una respuesta de citoquina adecuada o inmune. Estas incluyen, pero no están limitadas a, rutas intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea.

5.1 Virus quiméricos de influenza

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

La presente invención abarca el diseño de un virus de influenza aviar, de modo que el genoma codifica una proteína de fusión y, cuando la proteína se expresa, se incorpora en el virión. Cualquier tipo, subtipo o cepa de virus de influenza aviar que pueda ser diseñado para expresar e incorporar una proteína de fusión en el virión de influenza aviar puede ser seleccionado y usado según la invención incluidas, pero no limitado a, cepas, variantes o mutantes que ocurren naturalmente, virus mutagenizados, reasortantes y/o virus diseñados genéticamente. En una realización específica, los virus de influenza aviar de la invención no ocurren naturalmente. En otra realización específica, los virus de influenza aviar de la invención son virus diseñados genéticamente. Ejemplos no limitantes de virus de influenza aviar incluyen Influenza A subtipo H5N1, H6N2, H7N3, H9N2 y H10N7.

La manipulación genética del virus de influenza requiere diseñar al menos uno de los ocho segmentos de ARN viral que comprenden el genoma viral. La mutagénesis del genoma se puede lograr mediante técnicas de "ingeniería inversa" (véase sección 5.4). Sin embargo, la plasticidad del genoma de la influenza se limita al número de segmentos y a la longitud de los segmentos que pueden estar integrados establemente en el virus. La estabilidad total de insertos largos es desconocida y los segmentos que comprenden dichos insertos, o porciones de ellos, pueden perderse debido a reagrupación viral después de unas pocas generaciones. Por tanto, en una realización preferida de la invención, el virus de influenza aviar se diseña de manera que una de sus dos proteínas de superficie principales es reemplazada por una proteína de fusión.

En consecuencia, la presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende al menos una proteína de fusión que comprende un ectodominio (ED) de una proteína de un agente infeccioso diferente a un virus de influenza y los dominios citoplásmico (CT) y de transmembrana (TM) o el dominio de transmembrana (TM) de al menos una glicoproteína esencial del virus de influenza, en donde al menos una proteína de fusión reemplaza funcionalmente al menos una glicoproteína esencial del virus de influenza aviar. En otras palabras, el virus de influenza aviar sirve como la "espinas dorsal" que se diseña para expresar e incorporar en su virión la proteína de fusión en lugar de una glicoproteína esencial del virus de influenza aviar. La inclusión de los dominios TM y CT o el dominio TM de una glicoproteína del virus de influenza que corresponde a la glicoproteína esencial del virus de influenza aviar reemplazado funcionalmente por la proteína de fusión permite a la proteína de fusión incorporarse en el virión del virus de influenza aviar. Los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión puede corresponder a o derivarse de algún virus de influenza que permite a la proteína de fusión incorporarse en el virión de espina dorsal del virus de influenza aviar.

En algunas realizaciones, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o al dominio TM de un tipo, subtipo o cepa del virus de influenza aviar salvo virus de influenza aviar de espina dorsal. En otras realizaciones, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o el dominio TM de un virus de influenza salvo un virus de influenza aviar. En otras realizaciones, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o el dominio TM de la espina dorsal del virus de influenza aviar.

El virión de influenza aviar comprende dos glicoproteínas de superficie importantes: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (N), las cuales comprenden un dominio citoplásmico, un dominio de transmembrana y un ectodominio. En consecuencia, en algunas realizaciones, los dominios TM y CT de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT de una proteína HA o una proteína NA de un virus de influenza. Como el dominio CT de HA o NA puede no ser necesario para la incorporación de la proteína de fusión en el virión del virus de influenza aviar, en algunas realizaciones se diseña la proteína de fusión para contener solamente el dominio TM de HA o NA. Por ejemplo, se ha demostrado que el dominio CT de NA es innecesario para el empaquetado adecuado de esta proteína en las envolturas virales de influenza A (García-Sastre *et. al.*, 1995, *Virus Res.* 37:37-47, el cual se incorpora en su totalidad mediante referencia en la presente invención). Por lo tanto, cuando los dominios estructurales que corresponden a los de una proteína NA se utilizan en la

creación de la proteína de fusión, la invención abarca diseñar la proteína de fusión para que contenga solamente un dominio TM correspondiente a una proteína NA del virus de influenza. De acuerdo con ello, en una realización de la invención, la proteína de fusión se diseña para contener solamente un dominio TM, el cual corresponde al dominio TM de una proteína NA de un virus de influenza.

Los dominios TM y CT de las proteínas HA y NA del virus de influenza son estructuralmente distintos en que los dominios están localizados en el extremo-C de la proteína HA y el extremo-N de la proteína NA. Además de la diferencia de orientación de los dos dominios en cada clase de glicoproteína de superficie, los dominios estructurales HA y CT pueden comprender diferencias aún desconocidas en la funcionalidad, dependientes de su ubicación relativa dentro de una cadena polipéptida. Por lo tanto, cuando la proteína de fusión se va a diseñar en el virus de influenza aviar, la orientación del ectodominio del agente infeccioso se fusionará a los dominios TM y CT o el dominio TM de una glicoproteína del virus de influenza guiará la selección de los dominios TM y CT o el dominio TM. Por ejemplo, cuando el ectodominio de un agente infeccioso está anclado por el extremo-N, se pueden usar los dominios TM y CT de una proteína NA del virus de influenza,

HA y NA presentan actividades en competencia con respecto a la fusión y liberación celular, respectivamente, que son necesarias para la infectividad y propagación del virus. HA se enlaza al ácido N-AcetilNeuramínico (NeuNAc; ácido siálico) en una superficie celular que conduce a la aceptación del virus en una célula anfitriona, mientras NA cliva los medios del ácido siálico desde la superficie celular que lleva a la liberación del virus progenie de una célula infectada. La interrupción de cualquiera de estas actividades resulta en un virus no funcional. En consecuencia, para mantener la competencia viral, cuando se reemplaza una glicoproteína de superficie, su función en el virus quimérico debe ser suministrada por la proteína de fusión. En una realización de la invención, el virus quimérico de influenza aviar comprende una proteína de fusión que exhibe actividad de neuraminidasa. En otra realización de la invención, el virus quimérico de influenza aviar comprende una proteína de fusión que exhibe actividad enlazante del receptor. En otra realización de la invención, el virus quimérico de influenza aviar comprende dos proteínas de fusión, una de las cuales exhibe actividad de neuraminidasa, y la otra exhibe actividad enlazante del receptor. En otras realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar comprende una proteína de fusión que comprende un epítipo de un agente infeccioso heterólogo, la proteína de fusión exhibe actividad de neuraminidasa o actividad enlazante del receptor. En otra realización de la invención, el virus quimérico de influenza aviar comprende una proteína de fusión que exhibe actividad enlazante del receptor. En una realización específica, el virus

quimérico de influenza aviar comprende una proteína de superficie que contiene el ectodominio de una proteína HN del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y los dominios TM y CT de la proteína NA de la influenza A/WSN/33, cuyo ectodominio HN exhibe actividad de neuraminidasa. En otras realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar comprende una proteína de superficie que contiene el ectodominio de la proteína HA de un virus de influenza heterólogo (por ej: la proteína H7 HA o la proteína H9 HA). HA y NA se codifican mediante segmentos separados del genoma viral y el reemplazo de toda la región de codificación de la proteína nativa elimina la mayoría de restricciones de longitud en la secuencia de codificación de la proteína introducida.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende el dominio de transmembrana más 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuos inmediatamente adyacentes del ectodominio de una glicoproteína esencial del virus de influenza. Por ejemplo, en una realización específica, la proteína de fusión comprende el dominio de transmembrana de una proteína NA del virus de influenza, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuos inmediatamente adyacentes del ectodominio de la proteína NA del virus de influenza NA, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso salvo virus de influenza, en donde la proteína de fusión reemplaza funcionalmente la proteína NA. En otra realización específica, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y de transmembrana de una proteína NA de un virus de influenza, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuos del ectodominio de la proteína NA del virus de influenza que están inmediatamente adyacentes al dominio de transmembrana de la proteína NA del virus de influenza, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso salvo virus de influenza, de modo que la proteína de fusión reemplaza funcionalmente la proteína NA. En otra realización, la proteína de fusión comprende el dominio de transmembrana o los dominios citoplásmico y de transmembrana de una proteína NA, el dominio de tallo completo, o un fragmento del mismo, de una proteína NA que precede su cabeza globular, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso salvo virus de influenza, donde la proteína de fusión reemplaza funcionalmente a la proteína NA. En otra realización específica, la proteína de fusión comprende el dominio de transmembrana de una proteína HA de un virus de influenza, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuos inmediatamente adyacentes del ectodominio de la proteína HA del virus de influenza, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso salvo virus de influenza, donde la proteína de fusión reemplaza funcionalmente la proteína HA. En otra realización específica, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y de transmembrana de la proteína HA de un virus de influenza, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuos del ectodominio de la proteína HA del virus de influenza que están inmediatamente adyacentes al dominio de transmembrana de la proteína HA

del virus de influenza, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso salvo virus de influenza, donde la proteína de fusión reemplaza funcionalmente a la proteína HA.

En algunas realizaciones, la al menos una proteína de fusión del virus quimérico de influenza aviar de la invención no comprende el ectodominio completo de una proteína heteróloga (por ej: comprende un fragmento antigénico del ectodominio de una proteína de un agente infeccioso heterólogo), y puede comprender o no, además, uno o más fragmentos del ectodominio de una glicoproteína nativa esencial. En consecuencia, en ciertas realizaciones, el ectodominio de la proteína de fusión puede comprender un fragmento del ectodominio de una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En otras realizaciones, el ectodominio de la proteína de fusión puede comprender fragmentos de una glicoproteína nativa esencial y de una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En realizaciones donde la proteína de fusión reemplaza una glicoproteína de superficie esencial, la función de la glicoproteína de superficie debe suministrarla la proteína de fusión, es decir, la proteína de fusión debe exhibir la funcionalidad de la glicoproteína de superficie que está reemplazando.

La presente invención abarca secuencia nucleótidas (es decir, segmentos recombinantes) que codifican las proteínas de fusión descritas en esta Sección 5.1.1. En realizaciones preferidas, los segmentos recombinantes que comprenden ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en la Sección 5.1.1 comprenden las señales de incorporación 3' y 5' que se requieren para la replicación, transcripción y empaquetado adecuados de las vARN (Fujii *et. al.*, 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2002-2007; Zheng, *et. al.*, 1996, *Virology* 217:242-251, los cuales están incorporados en su totalidad mediante referencia en la presente invención). Por lo tanto, en una realización preferida, los segmentos recombinantes de la invención usan las secuencias 3' y 5' no codificadas y/o no trasladadas de segmentos de virus dentro del mismo tipo o cepa viral, como la espina dorsal del virus de influenza aviar. En realizaciones específicas, los segmentos recombinantes comprenden ácido nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en esta Sección, 5.1.1, que comprende la región 3' no codificada de un virus de influenza vARN NA, la región codificada NA que corresponde a los dominios CT y TM de la proteína NA, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuos del ectodominio de la proteína NA del virus de influenza que están inmediatamente adyacentes al dominio de transmembrana de la proteína NA del virus de influenza, las regiones no trasladadas del marco de lectura de la proteína NA y la región 5' no codificada de la vARN NA.

Como una alternativa para reemplazar las proteínas NA o HA del virus de

influenza aviar, se pueden usar técnicas de "genética inversa " y bicistrónica para producir un virus quimérico de influenza que comprende un ectodominio, o un fragmento del mismo, de una proteína de un agente infeccioso salvo virus de influenza, y los dominios TM y/o CT de un virus de influenza. Véase, por ej: Patente de EE.UU. No. 6.887.699, Patente de EE.UU. No. 6.001.634, Patente de EE.UU. No. 5.854.037 y Patente de EE.UU. No. 5.820.871, cada una de las cuales está incorporada en su totalidad mediante referencia en la presente invención. Los enfoques bicistrónicos implican insertar la región de codificación de la proteína de fusión en el marco de lectura abierto de una proteína necesaria del virus y su codón de detención. La inserción está flanqueada por un IRES y cualesquier secuencias no trasladadas de la proteína necesaria en la cual está insertada, y no debe interrumpir el marco de lectura abierto, la señal de empaquetado, los promotores de poliadenilación o transcripcionales de la proteína viral necesaria. Cualesquier IRES bien conocido en la técnica o descrito en la presente invención puede usarse según la invención (por ej: el IRES del gen BiP, nucleótidos 372 a 592 de la entrada de la base de datos GenBank HUMGRP78; o el IRES del virus de encefalomiocarditis (EMCV), nucleótidos 1430 a 2115 de la entrada de la base de datos GenBank CQ867238.). Dado que la función de HA o NA no se reemplaza cuando se utiliza el enfoque bicistrónico, la porción del ectodominio de la proteína de fusión no está limitada a una proteína que provee la función de la proteína HA o NA reemplazada. El ectodominio de dicha proteína de fusión puede corresponder a cualquier molécula heteróloga, o comprender un fragmento de cualquier molécula heteróloga, incluida pero no limitada a antígenos, antígenos de enfermedad y antígenos derivados de una proteína de un agente infeccioso (por ej: un antígeno protector asociado con agentes infecciosos virales, bacteriales o parasitarios). Ejemplos no limitantes de antígenos derivados de o asociados con agentes infecciosos para uso según los métodos de la invención, se presentan en la Sección 5.3, más adelante.

El reemplazo de una proteína de superficie necesaria del virus de espina dorsal o la introducción de un segmento recombinante en el genoma viral puede atenuar el virus quimérico resultante, el cual exhibirá replicación deficiente en relación con el tipo silvestre. En algunas realizaciones de la invención, se desea la atenuación del virus quimérico para que éste se mantenga, al menos parcialmente, infeccioso y pueda replicarse *in vivo*, pero solamente genera títulos bajos que resultan en niveles subclínicos de infección que son no patogénicos. Dichos virus quiméricos atenuados son especialmente aptos para realizaciones de la invención en donde el virus se administra a un sujeto para actuar como un inmunógeno, por ej: una vacuna viva. Los virus pueden atenuarse por cualquier método conocido en la técnica y/o ejemplificado en la presente invención, por ej: diseñar el virus para que comprenda una mutación en el gen NS1 o una

modificación en la secuencia polibásica de amino ácidos antes del sitio de escisión en la proteína HA (véase Patente de EE.UU. No. 6,468.544; Patente de EE.UU. No. 6.669.943; Li *et. al.*, 1999, *J. Infect, Dis.* 179:1132-1138, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad mediante referencia en la presente invención).

En una realización, un virus quimérico atenuado de influenza aviar de la invención comprende un genoma que comprende una mutación en el gen NS1 del virus de espina dorsal de influenza aviar, que es conocido en otros virus de influenza por disminuir la capacidad del producto del gen NS1 para antagonizar una respuesta de interferón celular. En otra realización, un virus quimérico atenuado de influenza aviar de la invención comprende un genoma que comprende una mutación en el gen HA del virus de espina dorsal de influenza aviar, que es conocido en otros virus de influenza por disminuir o eliminar la capacidad de las proteasas celulares para clivar la proteína en su forma activa y con ello, reducir o eliminar la infectividad y fusión inducida de HA. Aúnen otra realización, un virus quimérico atenuado de influenza aviar de la invención comprende un genoma que comprende una mutación en el gen HA y el gen NS1 del virus de espina dorsal de influenza aviar, los cuales son conocidos en otros virus de influenza bien sea separados o combinados por reducir o disminuir la actividad viral. Los títulos de los virus de influenza aviar atenuados-quiméricos y tipo silvestre se pueden determinar utilizando cualquier técnica bien conocida en la técnica o descrita en la presente invención, (por ej: ensayos de hemaglutinación, ensayos de placas, dosis infecciosas en huevos (EID50), dosis infecciosas de cultivo de tejido (TCID50), etc.) y los virus pueden propagarse bajo las condiciones descritas en la presente invención o bien conocidas en la técnica (por ej: en células CEF, células MDCK (por ej: en MEM, 10% v/v suero fetal bovino (FCS), 1% penicilina / estreptomicina a 37°C en una incubadora humidificada a 5% de CO₂) o huevos de pollo embrionados (por ej: en una incubadora estacionaria a 37°C con 55% de humedad relativa). Alternativamente, los virus pueden ser propagados en células (por ej: células CEF, células MDCK, etc.) que se cultivan en medio de suero libre o suero reducido (por ej: tripsina TPCK).

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

La presente invención abarca el diseño de un virus atenuado de influenza de modo que una proteína de fusión es codificada por el genoma y, cuando se expresa, es incorporada en el virión. En otras palabras, la invención abarca el uso de un virus atenuado de influenza (el virus parental) como la "espina dorsal" que está diseñado para expresar e incorporar en su virión la proteína de fusión. Cualquier tipo o cepa del virus atenuado de influenza incluidas, pero no limitadas a, cepas, variantes o mutantes que

ocurren naturalmente, virus mutagenizados, reasortantes y/o virus modificados genéticamente pueden usarse como la espina dorsal del que está diseñado para expresar e incorporar en su virión la proteína de fusión. En una realización específica, los virus de influenza parentales para uso según la invención no son virus que ocurran naturalmente. En otra realización específica, los virus de influenza parentales para uso según la invención son virus diseñados genéticamente.

Los virus de influenza para uso como la espina dorsal del virus según la invención pueden tener naturalmente un fenotipo atenuado o pueden ser diseñados para comprender una mutación asociada con un fenotipo atenuado, en donde dicha mutación es conocida en la técnica o está descrita en la presente invención (por ej: una mutación en la proteína NS1 viral o la proteína HA viral). En realizaciones específicas, el virus atenuado es el de influenza A. En otras realizaciones, el virus atenuado es el de influenza B. Aún en otras realizaciones, el virus atenuado es el de influenza C. Ejemplos no limitantes del virus de influenza que pueden ser diseñados según la invención incluyen Influenza A subtipo H10N4, subtipo H10N5, subtipo H10N7, subtipo H10N8, subtipo H10N9, subtipo H11N1, subtipo H11N13, subtipo H11N2, subtipo H11N4, subtipo H11N6, subtipo H11N8, subtipo H11N9, subtipo H12N1, subtipo H12N4, subtipo H12N5, subtipo H12N8, subtipo H13N2, subtipo H13N3, subtipo H13N6, subtipo H13N7, subtipo H14N5, subtipo H14N6, subtipo H15N8, subtipo H15N9, subtipo H16N3, subtipo H1N1, subtipo H1N2, subtipo H1N3, subtipo H1N6, subtipo H1N9, subtipo H2N1, subtipo H2N2, subtipo H2N3, subtipo H2N5, subtipo H2N7, subtipo H2N8, subtipo H2N9, subtipo H3N1, subtipo H3N2, subtipo H3N3, subtipo H3N4, subtipo H3N5, subtipo H3N6, subtipo H3N8, subtipo H3N9, subtipo H4N1, subtipo H4N2, subtipo H4N3, subtipo H4N4, subtipo H4N5, subtipo H4N6, subtipo H4N8, subtipo H4N9, subtipo H5N1, subtipo H5N2, subtipo H5N3, subtipo H5N4, subtipo H5N6, subtipo H5N7, subtipo H5N8, subtipo H5N9, subtipo H6N1, subtipo H6N2, subtipo H6N3, subtipo H6N4, subtipo H6N5, subtipo H6N6, subtipo H6N7, subtipo H6N8, subtipo H6N9, subtipo H7N1, subtipo H7N2, subtipo H7N3, subtipo H7N4, subtipo H7N5, subtipo H7N7, subtipo H7N8, subtipo H7N9, subtipo H8N4, subtipo H8N5, subtipo H9N1, subtipo H9N2, subtipo H9N3, subtipo H9N5, subtipo H9N6, subtipo H9N7, subtipo H9N8, o subtipo H9N9; Influenza B cepa Aichi/5/88, cepa Akita/27/2001, cepa Akita/5/2001, cepa Alaska/16/2000, cepa Alaska/1777/2005, cepa Argentina/69/2001, cepa Arizona/146/2005, cepa Arizona/148/2005, cepa Bangkok/163/90, cepa Bangkok/34/99, cepa Bangkok/460/03, cepa Bangkok/54/99, cepa Barcelona/215/03, cepa Beijing/15/84, cepa Beijing/184/93, cepa Beijing/243/97, cepa Beijing/43/75, cepa Beijing/5/76, cepa Beijing/76/98, cepa Bélgica/WV106/2002, cepa Bélgica/WV107/2002, cepa Bélgica/WV109/2002, cepa Bélgica/WV114/2002, cepa

Bélgica/WV122/2002, cepa Bonn/43, cepa Brasil/952/2001, cepa Bucarest/795/03, cepa Buenos Aires/161/00), cepa Buenos Aires/9/95, cepa Buenos Aires/SW16/97, cepa Buenos Aires/VL518/99, cepa Canadá/464/2001, cepa Canadá/464/2002, cepa Chaco/366/00, cepa Chaco/R113/00, cepa Cheju/303/03, cepa Chiba/447/98, cepa Chongqing/3/2000, cepa clínica aislada SA1 Tailandia/2002, cepa clínica aislada SA10 Tailandia/2002, cepa clínica aislada SA100 Filipinas/2002, cepa clínica aislada SA101 Filipinas/2002, cepa clínica aislada SA110 Filipinas/2002), cepa clínica aislada SA112 Filipinas/2002, cepa clínica aislada SA113 Filipinas/2002, cepa clínica aislada SA114 Filipinas/2002, cepa clínica aislada SA2 Tailandia/2002, cepa clínica aislada SA20 Tailandia/2002, cepa clínica aislada SA38 Filipinas/2002, cepa clínica aislada SA39 Tailandia/2002, cepa clínica aislada SA99 Filipinas/2002, cepa CNIC/27/2001, cepa Colorado/2597/2004, cepa Córdoba/VA418/99, cepa Checoslovaquia/16/89, cepa Checoslovaquia/69/90, cepa Daeku/10/97, cepa Daeku/45/97, cepa Daeku/47/97, cepa Daeku/9/97, cepa B/Du/4/78, cepa B/Durban/39/98, cepa Durban/43/98, cepa Durban/44/98, cepa B/Durban/52/98, cepa Durban/55/98, cepa Durban/56/98, cepa Inglaterra/1716/2005, cepa Inglaterra/2054/2005), cepa Inglaterra/23/04, cepa Finlandia/154/2002, cepa Finlandia/159/2002, cepa Finlandia/160/2002, cepa Finlandia/161/2002, cepa Finlandia/162/03, cepa Finlandia/162/2002, cepa Finlandia/162/91, cepa Finlandia/164/2003, cepa Finlandia/172/91, cepa Finlandia/173/2003, cepa Finlandia/176/2003, cepa Finlandia/184/91, cepa Finlandia/188/2003, cepa Finlandia/190/2003, cepa Finlandia/220/2003, cepa Finlandia/WV5/2002, cepa Fujian/36/82, cepa Ginebra/5079/03, cepa Génova/11/02, cepa Génova/2/02, cepa Génova/21/02, cepa Génova/54/02, cepa Génova/55/02, cepa Guangdong/05/94, cepa Guangdong/08/93, cepa Guangdong/5/94, cepa Guangdong/55/89, cepa Guangdong/8/93, cepa Guangzhou/7/97, cepa Guangzhou/86/92, cepa Guangzhou/87/92, cepa Gyeonggi/592/2005, cepa Hannover/2/90, cepa Harbin/07/94, cepa Hawaii/10/2001, cepa Hawaii/1990/2004, cepa Hawaii/38/2001, cepa Hawaii/9/2001, cepa Hebei/19/94, cepa Hebei/3/94), cepa Henan/22/97, cepa Hiroshima/23/2001, cepa Hong Kong/110/99, cepa Hong Kong/1115/2002, cepa Hong Kong/112/2001, cepa Hong Kong/123/2001, cepa Hong Kong/1351/2002, cepa Hong Kong/1434/2002, cepa Hong Kong/147/99, cepa Hong Kong/156/99, cepa Hong Kong/157/99, cepa Hong Kong/22/2001, cepa Hong Kong/22/89, cepa Hong Kong/336/2001, cepa Hong Kong/666/2001, cepa Hong Kong/9/89, cepa Houston/1/91, cepa Houston/1/96, cepa Houston/2/96, cepa Hunan/4/72, cepa Ibaraki/2/85, cepa Incheon/297/2005, cepa India/3/89, cepa India/77276/2001, cepa Israel/95/03, cepa Israel/WV187/2002, cepa Japón/1224/2005, cepa Jiangsu/10/03, cepa Johannesburgo/1/99, cepa Johannesburgo/96/01, cepa Kadoma/1076/99, cepa Kadoma/122/99, cepa Kagoshima/15/94, cepa Kansas/22992/99, cepa Khazkov/224/91,

cepa Kobe/1/2002, cepa, cepa Kouchi/193/99, cepa Lacio/1/02, cepa Lee/40, cepa Leningrado/129/91, cepa Lisboa/2/90), cepa Los Ángeles/1/02, cepa Lusaka/270/99, cepa Lyon/1271/96, cepa Malasia/83077/2001, cepa Maputo/1/99, cepa Mar del Plata/595/99, cepa Maryland/1/01, cepa Memphis/1/01, cepa Memphis/12/97-MA, cepa Michigan/22572/99, cepa Mie/1/93, cepa Milán/1/01, cepa Minsk/318/90, cepa Moscú/3/03, cepa Nagoya/20/99, cepa Nanchang/1/00, cepa Nashville/107/93, cepa Nashville/45/91, cepa Nebraska/2/01, cepa Países Bajos/801/90, cepa Países Bajos/429/98, cepa Nueva York/1/2002, cepa NIB/48/90, cepa Ningxia/45/83, cepa Noruega/1/84, cepa Omán/16299/2001, cepa Osaka/1059/97, cepa Osaka/983/97-V2, cepa Oslo/1329/2002, cepa Oslo/1846/2002, cepa Panamá/45/90, cepa París/329/90, cepa Parma/23/02, cepa Perth/211/2001, cepa Perú/1364/2004, cepa Filipinas/5072/2001, cepa Pusan/270/99, cepa Quebec/173/98, cepa Quebec/465/98, cepa Quebec/7/01, cepa Roma/1/03, cepa Saga/S172/99, cepa Seúl/13/95, cepa Seúl/37/91, cepa Shangdong/7/97, cepa Shanghai/361/2002), cepa Shiga/T30/98, cepa Sichuan/379/99, cepa Singapur/222/79, cepa España/WV27/2002, cepa Estocolmo/10/90, cepa Suiza/5441/90, cepa Taiwán/0409/00, cepa Taiwán/0722/02, cepa Taiwán/97271/2001, cepa Teherán/80/02, cepa Tokio/6/98, cepa Trieste/28/02, cepa Ulan Ude/4/02, cepa Reino Unido/34304/99, cepa USSR/100/83, cepa Victoria/103/89, cepa Viena/1/99, cepa Wuhan/356/2000, cepa WV194/2002, cepa Xuanwu/23/82, cepa Yamagata/1311/2003, cepa Yamagata/K500/2001, cepa Alaska/12/96, cepa GA/86, cepa NAGASAKI/1/87, cepa Tokio/942/96, o cepa Rochester/02/2001; Influenza C cepa Aichi/1/81, cepa Ann Arbor/1/50, cepa Aomori/74, cepa California/78, cepa Inglaterra/83, cepa Grecia/79, cepa Hiroshima/246/2000, cepa Hiroshima/252/2000, cepa Hyogo/1/83, cepa Johannesburgo/66, cepa Kanagawa/1/76, cepa Kyoto/1/79, cepa Mississippi/80, cepa Miyagi/1/97, cepa Miyagi/5/2000, cepa Miyagi/9/96, cepa Nara/2/85, cepa Nueva Jersey/76, cepa cerdo/Beijing/115/81, Saitama/3/2000), cepa Shizuoka/79, cepa Yamagata/2/98, cepa Yamagata/6/2000, cepa Yamagata/9/96, cepa BERLIN/1/85, cepa INGLATERRA/892/8, cepa GRANDES LAGOS/1167/54, cepa JJ/50, cepa CERDO/BEIJING/10/81, cepa CERDO/BEIJING/439/82), cepa TAYLOR/1233/47 o cepa CEPA C/YAMAGATA/10/81.

En una realización, el virus atenuado de influenza (el virus parental) usado según la invención tiene una capacidad deficiente para antagonizar el interferón celular (IFN). En una realización específica, el virus atenuado de influenza (el virus parental) usado según la invención es un tipo o cepa de virus de influenza que comprende una mutación en el gen NS1 que resulta en una capacidad deficiente del virus para antagonizar la respuesta de interferón celular. Ejemplos de los tipos de mutaciones que se pueden introducir en el gen NS1 del virus de influenza incluye eliminaciones, sustituciones,

inserciones y combinaciones del mismo. Una o más mutaciones pueden introducirse en cualquier lugar a lo largo del gen NS1 (por ej: el extremo-N, el extremo-C o en alguna parte entre ellos) y/o el elemento regulatorio del gen NS1. En una realización específica, un virus atenuado de influenza (el virus parental) usado según la invención comprende un genoma que tiene un gen NS1 del virus de influenza con una mutación en el extremo-N. En otra realización, un virus atenuado de influenza (el virus parental) comprende un genoma que tiene un gen NS1 del virus de influenza con una mutación en el extremo-C. En otra realización, un virus atenuado de influenza (el virus parental) usado según la invención comprende un genoma que tiene una mutación en el gen NS1 del virus de influenza lo cual resulta en una eliminación de 5, preferiblemente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 126, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170 o 175 residuos de amino ácidos del extremo-C del NS1, o una eliminación de entre 5 a 170, 25 a 170, 50 a 170, 100 a 170, 100 a, o 105 a 160 residuos de amino ácidos del extremo-C. En otra realización, un virus atenuado de influenza (el virus parental) usado según la invención comprende un genoma que tiene una mutación en el gen NS1 del virus de influenza lo cual resulta en una eliminación de todos los residuos de amino ácidos, excepto los residuos de amino ácidos 1 a 126, residuos de amino ácidos 1 a 120, residuos de amino ácidos 1 a 115, residuos de amino ácidos 1 a 110, residuos de amino ácidos 1 a 100, residuos de amino ácidos 1 a 99, residuos de amino ácidos 1 a 95, residuos de amino ácidos 1 a 85, residuos de amino ácidos 1 a 80, residuos de amino ácidos 1 a 75, residuos de amino ácidos 1 a 73, residuos de amino ácidos 1 a 70, residuos de amino ácidos 1 a 65 o residuos de amino ácidos 1 a 60, en donde el amino ácido del extremo-N es el número 1.

En una realización, un virus atenuado de influenza de la invención comprende un genoma que comprende una mutación en el gen NS1 de la espina dorsal de virus de influenza, que disminuye la capacidad del producto del gen NS1 para antagonizar una respuesta de interferón celular, y permite el virus atenuado, en una multiplicidad de infección (MOI) de entre 0,0005 y 0,001, 0,001 y 0,01, 0,01 y 0,1, o 0,1 y 1, o una MOI de 0,0005, 0,0007, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, o 6,0, para cultivar títulos entre 1 y 100 veces, entre 5 y 80 veces, entre y 80 veces, o entre 40 y 80 veces, entre 1 y 10 veces, entre 1 y 5 veces, entre 1 y 4 veces, entre 1 y 3 veces, entre 1 y 2 veces, o entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 veces menor que el virus de influenza tipo silvestre en células (por ej: células de origen humano, de ratón, rata, porcino, canino, caballar o aviar (por ej: HEp-2, A549, 293T, células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) o fibroblastos de embrión de pollo (CEF)), determinados entre 2 y 10 días, 3 y 7 días, 3 y 5 días, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días post-infección cuando se propagó bajo

44

las mismas condiciones. Los títulos del virus atenuado de influenza y tipo silvestre pueden determinarse utilizando cualquier técnica bien conocida en el área o descrita en la presente invención, (por ej: ensayos de hemaglutinación, ensayos de placa, dosis de huevos infectados (EID₅₀), dosis infecciosas en cultivo de tejido (TCID₅₀), etc.) y los virus pueden propagarse bajo condiciones descritas en la presente invención o bien conocidas en la técnica (por ej: en células CEF, células MDCK (por ej: en MEM, 10% v/v suero bovino fetal (FCS), 1% penicilina/ estreptomycin a 37°C en una incubadora humidificada a 5% CO₂) o huevos de pollo embrionados (por ej: en una incubadora estacionaria a 37°C con 55% de humedad relativa). Alternativamente, los virus puede propagarse en células (por ej: células CEF, células MDCK, etc.) que se cultivan en medio de suero libre o reducido (por ej: tripsina TPCK).

En otra realización, el virus atenuado de influenza (el virus parental) usado según la invención comprende un genoma que comprende una mutación en el gen HA de la espina dorsal de virus de influenza que disminuye o elimina la capacidad de las proteasas celulares para clivar la proteína en su forma activa. Ejemplos de los tipos de mutaciones que pueden introducirse en el gen HA de la influenza incluyen eliminaciones, sustituciones, inserciones o combinaciones del mismo. Las una o más mutaciones preferiblemente se introducen en el sitio de escisión de HA (por ej: nucleótidos 1013 a 1039 de la entrada de GenBank AY818135). En general, las mutaciones que disminuyen la clivabilidad de la proteína HA determinada por los métodos estándar en CEF se correlacionan con la disminución de la virulencia en ensayos *in vivo* (Horimoto y Kawaoka, 1994, 68:3120-3128; el cual se incorpora en su totalidad mediante referencia en la presente invención). En una realización específica, un virus atenuado de influenza (el virus parental) usado según la invención comprende un genoma que tiene una mutación en el gen HA del virus de influenza lo cual resulta en la sustitución de los nucleótidos 1026 a 1038 sólo con el nucleótido timina. En otra realización, un virus atenuado de influenza de la invención comprende un genoma que comprende una mutación en el gen HA de la espina dorsal de virus de influenza que disminuye o elimina la capacidad de las proteasas celulares para clivar la proteína en su forma activa, y permite el virus atenuado, en una multiplicidad de infección (MOI) de entre 0,0005 y 0,001, 0,001 y 0,01, 0,01 y 0,1, o 0,1 y 1, o una MOI de 0,0005, 0,0007, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, o 6,0, para cultivar títulos entre 1 y 100 veces, entre 5 y 80 veces, entre 20 y 80 veces, o entre 40 y 80 veces, entre 1 y 10 veces, entre 1 y 5 veces, entre 1 y 4 veces, entre 1 y 3 veces, entre 1 y 2 veces, o entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 veces menor que el virus de influenza tipo silvestre, en células (por ej: células de origen humano, de ratón, rata, porcino, canino, caballar o aviar (por ej: HEp-2, A549,

293T, células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) o fibroblastos de embrión de pollo (CEF)), determinados entre 2 y 10 días, 3 y 7 días, 3 y 5 días, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días post-infección cuando se propaga bajo las mismas condiciones. La proteína HA que comprende una mutación de esta clase no es distinta antigénicamente de la proteína HA parental del tipo silvestre; es decir, todos los anticuerpos contra la proteína HA tipo silvestre reaccionarán con la proteína HA mutada y todos los anticuerpos contra la proteína HA mutada reaccionarán con la proteína HA tipo silvestre. Los títulos de virus atenuado de influenza y tipo silvestre puede determinarse utilizando cualquier técnica reconocida o descrita en la presente invención, (por ej: ensayos de hemaglutinación, ensayos de placa, dosis infecciosas en huevos (EID50), dosis infecciosas en cultivo de tejido (TCID50), etc.) y los virus pueden propagarse bajo las condiciones descritas en la presente invención o reconocidas en la técnica (por ej: en células CEF, células MDCK (por ej: en MEM, 10% v/v suero bovino fetal (FCS), 1% penicilina/ estreptomycin a 37°C en una incubadora humidificada a 5% CO₂) o huevos de pollo embrionados (por ej: en una incubadora estacionaria a 37°C con 55% de humedad relativa). Alternativamente, los virus pueden propagarse en células (por ej: células CEF, células MDCK, etc.) que se cultivan en medio de suero libre o reducido (por ej: TPCK tripsina).

En otra realización, el virus atenuado de influenza (el virus parental) usado según la invención comprende un genoma que comprende: (i) una mutación en el gen HA de virus de espina dorsal de influenza que disminuye o elimina la capacidad de las proteasas celulares para clivar la proteína en su forma activa, y (ii) una mutación en el gen NS1 que resulta en una capacidad defectuosa del virus para antagonizar la respuesta de interferón celular. En otra realización, un virus atenuado de influenza de la invención comprende un genoma que comprende una mutación en el gen HA y el gen NS1 de virus de espina dorsal de influenza que permite el virus atenuado, a una multiplicidad de infección (MOI) de entre 0,0005 y 0,001, 0,001 y 0,01, 0,01 y 0,1, o 0,1 y 1, o una MOI de 0,0005, 0,0007, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, o 6,0, para cultivar títulos entre 1 y 100 veces, entre 5 y 80 veces, entre 20 y 80 veces, o entre 40 y 80 veces, entre 1 y 10 veces, entre 1 y 5 veces, entre 1 y 4 veces, entre 1 y 3 veces, entre 1 y 2 veces, o entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 veces menor que el virus de influenza tipo silvestre en células (por ej: células de origen humano, de ratón, rata, porcino, canino, caballar o aviar (por ej: HEp-2, A549, 293T, células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) o fibroblastos de embrión de pollo (CEF)), determinados entre 2 y 10 días, 3 y 7 días, 3 y 5 días, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días post-infección cuando se propaga bajo las mismas condiciones.

La presente invención provee un virus quimérico atenuado de influenza, que

comprende al menos una proteína de fusión que tiene un ectodominio (ED), o fragmento del mismo, de un agente infeccioso salvo un virus de influenza y los dominios citoplásmico (CT) y de transmembrana (TM) o el dominio de transmembrana de una glicoproteína esencial del virus de influenza, donde al menos una proteína de fusión reemplaza funcionalmente al menos una glicoproteína esencial del virus de influenza. En otras palabras, el virus atenuado de influenza sirve como la "espinas dorsal" diseñada para expresar e incorporar en su virión al menos una proteína de fusión en lugar de una glicoproteína esencial del virus de influenza. La inclusión de los dominios TM y CT o el dominio TM de una glicoproteína del virus de influenza que corresponde a la glicoproteína esencial del virus de influenza reemplazada funcionalmente por la proteína de fusión permite a la proteína de fusión incorporarse en el virión del virus atenuado de influenza. Los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión pueden corresponder a o derivarse de cualquier virus de influenza que permite a la proteína de fusión incorporarse en el virión de la espinas dorsal del virus atenuado de influenza.

En algunas realizaciones, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o el dominio TM de un tipo, subtipo o cepa del virus de influenza salvo virus atenuado de influenza de espinas dorsal. En otras realizaciones, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o el dominio TM de un virus de influenza de una especie diferente del virus atenuado de influenza de espinas dorsal. En realizaciones preferidas, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o el dominio TM de la espinas dorsal del virus atenuado de influenza.

En algunas realizaciones, los dominios TM y CT de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT de una proteína HA o una proteína NA de un virus de influenza. Como el dominio CT de HA o NA puede no ser necesario para la incorporación de la proteína de fusión en el virión del virus de influenza, en algunas realizaciones, la proteína de fusión se diseña para contener solamente el dominio TM de HA o NA.

Los dominios TM y CT de las proteínas HA y NA del virus de influenza son estructuralmente distintos en que están localizados en el extremo-C de la proteína HA y en el extremo-N de la proteína NA. Aparte de la diferencia en la orientación de los dos dominios en cada clase de glicoproteína de superficie, los dominios estructurales HA y CT pueden comprender diferencias aún desconocidas en la funcionalidad, dependiendo de su ubicación relativa dentro de una cadena polipeptídica. Por lo tanto, cuando la proteína de fusión se diseña en el virus atenuado de influenza, la orientación del

ectodominio, o fragmento del mismo, del agente infeccioso que se va a fusionar con los dominios TM y CT o el dominio TM de una glicoproteína del virus de influenza guiará la selección de los dominios TM y CT o el dominio TM.

Para mantener la competencia viral, donde se reemplaza una glicoproteína de superficie, su función en el virus quimérico debe suministrarla la proteína de fusión. En una realización de la invención, el virus quimérico atenuado de influenza comprende una proteína de fusión que exhibe actividad de neuraminidasa. En otra realización de la invención, el virus quimérico atenuado de influenza comprende una proteína de fusión que exhibe actividad enlazante del receptor. En otra realización de la invención, el virus quimérico atenuado comprende dos proteínas de fusión, una de las cuales exhibe actividad de neuraminidasa y la otra exhibe actividad enlazante del receptor. En otra realización de la invención, el virus quimérico atenuado de influenza comprende una proteína de fusión que comprende un fragmento de una proteína de un agente infeccioso heterólogo; dicha proteína exhibe actividad de neuraminidasa o actividad enlazante del receptor. En una realización específica, el virus quimérico atenuado de influenza comprende una proteína de superficie que contiene el ectodominio de la proteína HN del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y los dominios TM y CT de la proteína NA de Influenza A/WSN/33, cuyo ectodominio HN exhibe actividad de neuraminidasa. En otras realizaciones, el virus quimérico atenuado de influenza comprende una proteína de fusión que contiene el ectodominio de la proteína HA de subtipo o cepa de influenza heteróloga (por ej: el ectodominio de HA H7 o ectodominio de HA H9).

En algunas realizaciones, la al menos una proteína de fusión del virus quimérico atenuado de influenza de la invención no comprende el ectodominio completo de una proteína heteróloga (por ej: comprende un fragmento antigénico o protector del ectodominio de una proteína de un agente infeccioso heterólogo), y puede comprender o no uno o más fragmentos del ectodominio de una glicoproteína esencial nativa. En consecuencia, en algunas realizaciones, el ectodominio de la proteína de fusión puede comprender un fragmento del ectodominio de una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En otras realizaciones, el ectodominio de la proteína de fusión puede comprender fragmentos de una glicoproteína nativa esencial y una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En realizaciones donde la proteína de fusión reemplaza una glicoproteína de superficie esencial, la función de la glicoproteína de superficie debe ser suministrada por la proteína de fusión, es decir, la proteína de fusión debe exhibir la funcionalidad de la glicoproteína de superficie que está reemplazando.

El ectodominio de las proteínas de fusión descritas en esta Sección 5.1.2 puede corresponder a o derivarse de una glicoproteína, o fragmento de la misma, de un agente

infeccioso (incluidos agentes infecciosos virales, bacteriales y parasitarios). Ejemplos no limitantes de glicoproteínas de agente infeccioso se encuentran en la Sección 5.3, más adelante.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende el dominio de transmembrana más 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuos inmediatamente adyacentes del ectodominio de una glicoproteína esencial del virus de influenza. En una realización específica, la proteína de fusión comprende el dominio de transmembrana de la proteína NA del virus de influenza, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuo(s) inmediatamente adyacentes del ectodominio de la proteína NA del virus de influenza, y el ectodominio, o fragmento del mismo de un agente infeccioso salvo virus de influenza, de modo que la proteína de fusión puede reemplazar funcionalmente la proteína NA. En otra realización específica, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y de transmembrana de la proteína NA del virus de influenza, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de influenza que son inmediatamente adyacentes al dominio de transmembrana de la proteína NA del virus de influenza, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso salvo virus de influenza, de modo que la proteína de fusión pueda reemplazar funcionalmente la proteína NA. En otra realización, la proteína de fusión comprende el dominio de transmembrana o los dominios citoplásmico y de transmembrana de una proteína NA, el dominio de tallo completo, o un fragmento del mismo, de una proteína NA que precede su cabeza globular, y el ectodominio, o fragmento del mismo de un agente infeccioso salvo virus de influenza, de modo que la proteína de fusión reemplaza funcionalmente la proteína NA. En otra realización específica, la proteína de fusión comprende el dominio de transmembrana de una proteína HA del virus de influenza, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 2 o 1 residuo(s) inmediatamente adyacentes del ectodominio de la proteína HA del virus de influenza, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso salvo virus de influenza, de modo que la proteína de fusión reemplaza funcionalmente la proteína HA. En otra realización específica, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y de transmembrana de una proteína HA del virus de influenza, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína HA del virus de influenza que son inmediatamente adyacentes al dominio de transmembrana de la proteína HA del virus de influenza, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso salvo virus de influenza, de modo que una proteína de fusión pueda reemplazar funcionalmente la proteína HA.

La presente invención abarca secuencias nucleótidas (es decir, segmentos recombinantes) que codifican las proteínas de fusión descritas en esta Sección 5.1.2. En realizaciones preferidas, los segmentos recombinantes comprenden ácidos nucleicos que

codifican las proteínas de fusión descritas en la Sección 5.1.2 comprenden las señales de incorporación 3' y 5' que se requieren para la replicación, transcripción y empaquetado adecuados de los vARN (Fujii *et. al.*, 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2002-2007; Zheng, *et. al.*, 1996, *Virology* 217:242-251, los cuales están incorporados en su totalidad mediante referencia en la presente invención). En una realización preferida, los segmentos recombinantes de la invención por lo tanto usan las secuencias 3' y 5' no codificadas y/o no trasladadas de segmentos de virus dentro del mismo tipo o cepa viral como el virus atenuado de influenza de espina dorsal. En realizaciones específicas, los segmentos recombinantes comprenden ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en la Sección 5.1.2 que comprenden la región 3' no codificada de un vARN NA del virus de influenza, la región codificada NA correspondiente a los dominios CT y TM de la proteína NA, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de influenza que son inmediatamente adyacentes al dominio de transmembrana de la proteína NA del virus de influenza, las regiones no trasladadas del marco de lectura de la proteína NA y la región 5' no codificada de la vARN NA. En algunas realizaciones, los segmentos recombinantes comprenden ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en la Sección 5.1.2 que comprenden el dominio de tallo completo o fragmento del mismo, de una proteína NA que precede su cabeza globular.

Como una alternativa para reemplazar las proteínas NA o HA de un virus atenuado de influenza pueden usarse técnicas de "genética inversa" y bicistrónicas para producir un virus quimérico de influenza que comprende un ectodominio de un agente infeccioso salvo virus de influenza, o un antígeno de enfermedad y los dominios TM y/o CT de un virus de influenza. Véase, por ej: Patente de EE.UU. No. 6.887.699, Patente de EE.UU. No. 6.001.634, Patente de EE.UU. No. 5.854,037 y Patente de EE.UU. No. 5.820.871, cada una de las cuales está incorporada en su totalidad mediante referencia en la presente invención. Ejemplos no limitantes de moléculas heterólogas como antígenos de enfermedad y antígenos derivados de un agente infeccioso que pueden usarse según los métodos de la invención (por ej: antígenos asociados con una enfermedad o proteínas virales) se encuentran en la sección 5.3, más adelante.

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

La presente invención abarca el diseño de un virus de influenza aviar de modo que una proteína de fusión que comprende el ectodominio de la proteína HN del virus de la enfermedad de Newcastle se codifica mediante el genoma y, cuando se expresa, se incorpora en el virión. Cualquier tipo o cepa del virus de influenza aviar que pueda ser

50

diseñado para expresar e incorporar la proteína de fusión en el virión de influenza aviar puede seleccionarse y usarse según la invención incluido, pero no limitado a, cepas, variantes o mutantes que ocurren naturalmente, virus mutagenizados, reasortantes y/o virus diseñados genéticamente. Ejemplos no limitantes de virus de influenza aviar incluyen Influenza A subtipo H5N1, H6N2, H7N3, H9N2 o H10N7.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende una proteína de fusión que tiene un ectodominio (ED) de la proteína HN del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y los dominios citoplásmico (CT) y de transmembrana (TM) o el dominio de transmembrana de una proteína NA del virus de influenza, donde la proteína de fusión reemplaza funcionalmente la proteína NA del virus de influenza aviar. En otras palabras, el virus de influenza aviar sirve como la “espina dorsal” que se diseña para expresar e incorporar en su virión la proteína de fusión en lugar de la proteína NA del virus de influenza aviar. La inclusión de los dominios TM y CT o el dominio TM de una proteína NA del virus de influenza en la proteína de fusión permite que la proteína de fusión se incorpore en el virión del virus de influenza aviar. Los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión pueden corresponder o derivarse de cualquier virus de influenza que permita que la proteína de fusión se incorpore en el virión del virus de influenza aviar de espina dorsal.

Las secuencias de codificación de los dominios TM y CT para uso según la invención pueden obtenerse o derivarse de la secuencia publicada de cualquier proteína NA de cualquier cepa o subtipo de influenza (por ej: entrada GenBank AY651447, de la cepa A/Vietnam/1203/2004(H5N1); entrada GenBank AY96877, de la cepa A/pavo/Canadá/63 (H6N2); entrada GenBank AY706954, de la cepa A/pato/Hainan/4/2004 (H6N2); entrada GenBank AY646080, de la cepa A/pollo/Columbia Británica/GSC_humanB/04 (H7N3); o entrada GenBank DQ064434, de la cepa A/pollo/Beijing/8/98 (H9N2)). En algunas realizaciones, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o el dominio TM de un tipo o cepa del virus de influenza aviar salvo virus de influenza aviar de espina dorsal. En otras realizaciones, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o el dominio TM de un virus de influenza, salvo virus de influenza aviar. En realizaciones preferidas, los dominios TM y CT o el dominio TM de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT o el dominio TM de la espina dorsal de virus de influenza aviar. En una realización específica, los dominios TM y CT de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y CT de la proteína NA de Influenza A/WSN/33.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende el dominio de

5

transmembrana de una proteína NA del virus de influenza, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuo(s) inmediatamente adyacentes del ectodominio de la proteína NA del virus de influenza, y el ectodominio de una proteína NDV HN. En otra realización específica, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y de transmembrana de una proteína NA del virus de influenza, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de influenza que son inmediatamente adyacentes al dominio de transmembrana de la proteína NA del virus de influenza, y el ectodominio de una proteína NDV HN. En otra realización específica, la proteína de fusión comprende el dominio de tallo completo, o un fragmento del mismo, de una proteína NA que precede su cabeza globular y el ectodominio de una proteína NDV HN. En otras realizaciones específicas, la proteína de fusión comprende el dominio de transmembrana o los dominios citoplásmico y de transmembrana de una proteína NA, y además comprende el dominio de tallo completo, o un fragmento del mismo, de una proteína NA que precede su cabeza globular y el ectodominio de una proteína NDV HN.

Como una alternativa para reemplazar la proteína NA del virus de influenza aviar, pueden usarse técnicas de "genética inversa" y bicistrónicas para producir un virus quimérico de influenza aviar que comprende un ectodominio de una proteína NDV HN y los dominios TM y/o CT de un virus de influenza. Véase, por ej: Patente de EE.UU. No. 6.887.699, Patente de EE.UU. No. 6.001.634, Patente de EE.UU. No. 5.854.037 y Patente de EE.UU. No. 5.820.871, cada una de las cuales está incorporada en su totalidad mediante referencia en la presente invención.

La presente invención abarca secuencias nucleótidas (es decir, segmentos recombinantes) que codifican las proteínas de fusión descritas en esta Sección 5.1.3. En realizaciones preferidas, los segmentos recombinantes comprenden ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión descritas en la Sección 5.1.3 que comprenden las señales de incorporación 3' y 5' que se requieren para la replicación, transcripción y empaquetado adecuado de los vARN (Fujii *et. al.*, 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2002-2007; Zheng, *et. al.*, 1996, *Virology* 217:242-251, las cuales están incorporadas en su totalidad mediante referencia en la presente invención). En una realización preferida, los segmentos recombinantes de la invención por lo tanto usan las secuencias 3' y 5' no codificadas y/o no trasladadas de segmentos de virus dentro del mismo tipo o cepa viral del virus de influenza aviar de espina dorsal. En realizaciones específicas, el segmento recombinante comprende ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en la Sección 5.1.3 comprenden la región 3' no codificada de un virus de influenza NA vARN, la región codificada NA que corresponde a los dominios CT y TM de la proteína NA, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína NA del virus de influenza que son inmediatamente

adyacentes al dominio de transmembrana de la proteína NA del virus de influenza, las regiones no trasladadas del marco de lectura de la proteína NA y la región 5' no codificada de la NA vARN. En otra realización específica, un segmento recombinante comprende, orden 3' a 5', la región 3' no codificada de la WSN NA vARN (19 nucleótidos), nucleótidos que codifican residuos de amino ácidos 1 a 36 (108 nucleótidos) de la región de codificación NA, nucleótidos que codifican residuos de amino ácidos 51 a 568 de la proteína NDV B1 HN, dos codones secuenciales de detención, 157 nucleótidos del marco de lectura no trasladado WSN NA, y la región 5' no codificada de WSN vARN (28 nucleótidos). Véase Figura 1.

El reemplazo de la proteína NA del virus de influenza de espina dorsal o la introducción de un segmento recombinante en el genoma viral puede atenuar el virus quimérico resultante, es decir, el virus quimérico exhibirá replicación deficiente en relación con el tipo silvestre. En algunas realizaciones de la invención, se desea la atenuación del virus quimérico de modo que se mantenga, al menos parcialmente, infeccioso y pueda replicarse *in vivo*, pero solamente genera títulos bajos que resultan en niveles subclínicos de infección que son no patogénicos. Estos virus quiméricos atenuados son especialmente aptos para realizaciones de la invención en donde el virus es administrado a un sujeto para actuar como un inmunógeno, por ej: una vacuna viva. Los virus pueden ser atenuados por cualquier método conocido en la técnica y/o ejemplificado en la presente invención, por ej: diseñar el virus para que comprenda una mutación en el gen NS1 o una modificación en la secuencia polibásica de amino ácidos antes del sitio de escisión en una proteína HA (véase Patente de EE.UU. No. 6.468.544; Patente de EE.UU. No. 6.669.943; Li *et. al.*, *J. Infect. Dis.* 179:1132-1138, cada una de las cuales está incorporada en su totalidad mediante referencia en la presente invención).

En una realización, un virus quimérico atenuado de influenza aviar de la invención comprende un genoma que comprende una mutación en el gen NS1 del virus de espina dorsal de influenza aviar, que es conocido en otros virus de influenza por disminuir la capacidad del producto del gen NS1 para antagonizar una respuesta de interferón celular. En otra realización, un virus quimérico atenuado de influenza aviar de la invención comprende un genoma que comprende a mutación en el gen HA del virus de espina dorsal de influenza aviar, que es conocido en otros virus de influenza por disminuir o eliminar las capacidad de las proteasas celulares para clivar la proteína en su forma activa y con ello reducir o eliminar la ineffectividad y fusión inducida HA. Aún en otra realización, un virus quimérico atenuado de influenza aviar de la invención comprende un genoma que comprende una mutación en el gen HA y en el gen NS1 del virus de espina dorsal de influenza aviar, que se conocen en otros virus de influenza bien sea por separado o cuando se combinan; por reducir o disminuir la actividad viral. Los títulos de

virus de influenza aviar quiméricos-atenuados y tipo silvestre pueden determinarse utilizando cualquier técnica conocida en la técnica o descrita en la presente invención, (por ej: ensayos de hemaglutinación, ensayos de placa, dosis infecciosas en huevos (EID50), dosis infecciosas de cultivo de tejido (TCID50), etc.) y los virus se propagan bajo las condiciones descritas en la presente invención o conocidas en la técnica (por ej: en células CEF, células MDCK (por ej: en MEM, 10% v/v suero bovino fetal (FCS), 1 % penicilina / estreptomicina a 37°C en una incubadora humidificada a 5% CO₂) o huevos de pollo embrionados (por ej: en una incubadora estacionaria a 37°C con 55% de humedad relativa). Alternativamente, los virus se propagan en células (por ej: células CEF, células MDCK, etc.) que se cultivan en medio de suero libre o reducido (por ej: TPCK tripsina).

5.2 Virus quimérico de la enfermedad de Newcastle

La presente invención abarca el diseño de un virus de la enfermedad de Newcastle ("NDV") de modo que al menos una proteína de fusión es codificada por el genoma y, cuando se expresa, se incorpora en el virión. Cualquier tipo o cepa NDV que pueda diseñarse para expresar e incorporar la al menos una proteína de fusión en el virión NDV se puede seleccionar y usar según la invención incluidas, pero no limitado a, cepas, variantes o mutantes que ocurran naturalmente, virus mutagenizados, reasortantes y/o virus diseñados genéticamente. En una realización específica, el NDV es un virus que ocurre naturalmente. En otra realización específica, el NDV es un virus diseñado genéticamente. Por ejemplo, como se describe en la presente invención, las cepas mutantes del NDV recombinante, rNDV/F2aa y rNDV/F3aa, en las cuales el sitio de escisión de una proteína F se reemplazó con uno que contenga uno o dos residuos adicionales de arginina, permitiendo que el sitio de escisión mutante a ser activado mediante proteasas expresadas ubicuamente de la familia furina se utilice según los métodos de la invención. Ejemplos no limitantes de NDV que se pueden usar según los métodos de la invención incluyen BI, LaSota, YG97, MET95 y F48E9. En una realización específica, el NDV quimérico o rNDV de la invención comprende una proteína de fusión que contiene el ectodominio de una proteína HA de influenza; en un ejemplo específico según esta realización, la proteína HA de influenza es la proteína HA de la influenza H7.

La presente invención provee un NDV quimérico, que comprende al menos una proteína de fusión que tiene un ectodominio (ED), o fragmento del mismo, de una proteína de un agente infeccioso salvo una proteína NDV y los dominios citoplásmico (CT) y/o de transmembrana (TM) de una glicoproteína NDV esencial. La presente invención también provee un NDV quimérico, que comprende al menos una proteína de

5

fusión que tiene un ED, o fragmento del mismo, y el dominio TM de una proteína de un agente infeccioso diferente de una glicoproteína NDV y el CT de una glicoproteína NDV esencial. La presente invención además provee un NDV quimérico, que comprende una proteína de fusión que tiene un ED, o fragmento del mismo, y un dominio CT de una proteína de un agente infeccioso diferente de una glicoproteína NDV y un dominio TM de una glicoproteína NDV esencial. En otras palabras, el virus NDV sirve como la "espina dorsal" que se diseña para expresar e incorporar en su virión la proteína de fusión. La inclusión de los dominios TM y/o CT de una glicoproteína NDV esencial en la proteína de fusión permite que la proteína de fusión se incorpore en el virión del NDV. Los dominios TM y/o CT de una proteína de fusión pueden corresponder o derivarse de cualquier NDV que permita que la proteína de fusión se incorpore en el virión de espina dorsal de NDV.

En algunas realizaciones, los dominios TM y/o CT de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y/o CT de un tipo o cepa de NDV salvo NDV de espina dorsal. En realizaciones preferidas, los dominios TM y/o CT de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y/o CT de espina dorsal de NDV.

El virión NDV comprende dos glicoproteínas de superficie principales: proteína de fusión (F) y hemaglutinina-neuraminidasa (HN), ambas comprenden un dominio citoplásmico, un dominio de transmembrana y un ectodominio. En consecuencia, en algunas realizaciones, los dominios TM y/o CT de la proteína de fusión corresponden a los dominios TM y/o CT de una proteína F o de una proteína HN de un NDV.

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

En algunas realizaciones, la al menos una proteína de fusión del NDV quimérico comprende el dominio TM y 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuos inmediatamente adyacentes del ectodominio de una glicoproteína esencial NDV. Por ejemplo, en una realización específica, la proteína de fusión comprende el dominio de transmembrana de una proteína NDV F, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuo(s) inmediatamente adyacentes del ectodominio de la proteína NDV F, y el ectodominio, o fragmento del mismo de un agente infeccioso diferente del NDV de modo que la proteína de fusión reemplaza funcionalmente la proteína F. En otra realización específica, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y de transmembrana de una proteína NDV

5

F, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuo(s) del ectodominio de la proteína NDV F que son inmediatamente adyacentes al dominio de transmembrana de la proteína NDV F, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso salvo NDV, de modo que la proteína de fusión reemplaza funcionalmente la proteína F. En otra realización específica, una proteína de fusión comprende el dominio de transmembrana de una proteína NDV HN, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuo(s) inmediatamente adyacente del ectodominio de la proteína NDV HN, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso salvo NDV, de modo que la proteína de fusión reemplaza funcionalmente la proteína HN. En otra realización específica, la proteína de fusión comprende los dominios citoplásmico y de transmembrana de una proteína NDV HN, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2 o 1 residuo(s) del ectodominio de una proteína NDV HN que son inmediatamente adyacentes al dominio de transmembrana de la proteína NDV HN, y el ectodominio, o fragmento del mismo, de un agente infeccioso salvo NDV, de modo que la proteína de fusión reemplaza funcionalmente la proteína HN.

En algunas realizaciones, una glicoproteína de superficie NDV (es decir, proteína HN o F) es reemplazada por una proteína de fusión que provee las funciones requeridas de la glicoproteína NDV. Según estas realizaciones, el ectodominio de la proteína de fusión debe seleccionarse de modo que suministrará las funciones requeridas de la glicoproteína NDV reemplazada. En otras realizaciones, la proteína de fusión se expresa e incorpora en el virión del NDV además de las glicoproteínas de superficie NDV nativas.

En algunas realizaciones, la al menos una proteína de fusión del NDV quimérico de la invención no comprende el ectodominio completo de una proteína heteróloga (por ej: comprende un fragmento antigénico del ectodominio de una proteína de un agente infeccioso heterólogo), y pueden comprender o no, además, uno o más fragmentos del ectodominio de una glicoproteína esencial nativa. En consecuencia, en algunas realizaciones, el ectodominio de la proteína de fusión puede comprender un fragmento del ectodominio de una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En otras realizaciones, el ectodominio de la proteína de fusión puede comprender fragmentos de una glicoproteína esencial nativa y de una proteína de un agente infeccioso heterólogo. En realizaciones donde la proteína de fusión reemplaza una glicoproteína de superficie esencial, la función de la glicoproteína de superficie debe proveerla la proteína de fusión, es decir, la proteína de fusión debe exhibir la funcionalidad de la glicoproteína de superficie que está reemplazando.

Considerando que no se requiere que la proteína de fusión descrita en esta Sección 5.2 reemplace la función de una glicoproteína viral necesaria, el ectodominio de

la proteína de fusión puede corresponder o derivarse de cualquier molécula heteróloga incluido, pero no limitado a, cualquier antígeno de agente infeccioso (incluidos antígenos de agentes infecciosos virales, bacteriales y parasitarios) y cualquier antígeno de enfermedad. Ejemplos no limitantes de antígenos de agentes infecciosos y/o antígenos de enfermedad se encuentran en la Sección 5.3, más adelante.

La presente invención abarca secuencias nucleótidas que codifican las proteínas de fusión descritas en esta Sección 5.2. En realizaciones específicas, una secuencia nucleótida comprende ácidos nucleicos que codifican una secuencia Kozak, seguida por el extremo del gen, nucleótido intercistónico (T), y la secuencia inicial del gen de la proteína F de NDV, seguida por la región 5' no trasladada y ORF de la proteína HA de H7N2.

En realizaciones preferidas, las cepas de NDV usadas según la invención son las cepas lentogénicas del virus, es decir, aquellas cepas que típicamente exhiben baja virulencia o infección asintomática en aves, por ej: cepa B1, cepa LaSota o cepa Met95. La invención también abarca el uso de cepas altamente virulentas de NDV, por ej: cepas YG97 o F48E9 o NDV que han sido modificadas mediante recombinación genética usando métodos conocidos en la técnica o ejemplificados en la presente invención. En una realización específica, la invención abarca el uso de un NDV donde la proteína NDV F ha sido modificada genéticamente en el sitio de escisión, para aumentar la actividad fusogénica. En un ejemplo específico según esta invención, la proteína F modificada comprende dos a tres mutaciones de amino ácidos en el sitio de escisión F. El reemplazo de una proteína de superficie necesaria del virus de espina dorsal o la introducción de una secuencia nucleótida que codifica una proteína de fusión en el genoma viral puede atenuar, o atenuar más, el virus quimérico resultante, es decir, el virus quimérico exhibirá replicación deficiente en relación con el tipo silvestre. En algunas realizaciones de la invención se desea la atenuación, o atenuación adicional, del virus quimérico de modo que permanezca, al menos parcialmente, infeccioso y pueda replicarse *in vivo*, pero solamente genere títulos bajos que resulten en niveles subclínicos de infección que son no patogénicos. Dichos virus quiméricos atenuados son especialmente aptos para realizaciones de la invención, en donde el virus se administra a un sujeto para actuar como un inmunógeno, por ej: una vacuna viva. Los virus pueden atenuarse por cualquier método conocido en la técnica.

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

Según la invención, cualquier molécula heteróloga puede diseñarse en la espina dorsal del virus para producir una respuesta inmune ante dicha molécula. En una

realización específica, un antígeno de un patógeno infeccioso o asociado con alguna enfermedad que pueda producir una respuesta inmune puede diseñarse en un NDV y/o espina dorsal de virus de influenza. En una realización específica, el antígeno es una glicoproteína. En algunas realizaciones preferidas, el antígeno puede reemplazar funcionalmente una glicoproteína esencial de un virus de influenza y/o NDV. En realizaciones específicas, el antígeno exhibe actividades de neuraminidasa o hemaglutinina (por ej: enlazante / fusogénico del receptor). Para seleccionar la espina dorsal viral para expresar el antígeno, se considera la orientación del nucleótido que codifica el antígeno. Por ejemplo, cuando el antígeno está anclado naturalmente por medio de su extremo amino, los dominios TM y CT o el dominio TM para diseñar la proteína de fusión corresponderán a los dominios TM y CT o el dominio TM de una proteína viral necesaria del virus de espina dorsal, o virus relacionado, que también está naturalmente anclado por medio de su extremo amino, por ej: la proteína N de influenza o la proteína HN de NDV.

En una realización específica, un antígeno viral se diseña en un NDV o espina dorsal de virus de influenza. Ejemplos no limitantes de antígenos virales incluyen antígenos de adenoviridae (por ej: mastadenovirus y aviadenovirus), herpesviridae (por ej: virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, virus del herpes simplex 5, virus del herpes simplex 6, virus de Epstein-Barr, HHV6-HHV8 y citomegalovirus), leviviridae (por ej: levivirus, enterobacteria fase MS2, allosevirus), poxviridae (por ej: chordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus, y entomopoxvirinae), papovaviridae (por ej: poliomavirus y papilomavirus), paramyxoviridae (por ej: paramyxovirus, virus de parainfluenza 1, morbillivirus (por ej: virus de sarampión), rubulavirus (por ej: virus de parotiditis), pneumonovirinae (por ej: pneumovirus, virus sincitial respiratorio humano), virus sincitial respiratorio humano y metapneumovirus (por ej: pneumovirus aviar y metapneumovirus humano)), picornaviridae (por ej: enterovirus, rinovirus, hepatovirus (por ej: virus de la hepatitis A humana), cardiovirus, y aphovirus), reoviridae (por ej: orthoreovirus, orbivirus, rotavirus, cypovirus, fivirus, phytoreovirus, y oryzavirus), retroviridae (por ej: retrovirus de mamíferos tipo B, retrovirus de mamíferos tipo C, retrovirus aviares tipo C, grupo de retrovirus tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus (por ej: virus de inmunodeficiencia humana 1 y virus de inmunodeficiencia humana 2 (por ej: HIV gp 160), spumavirus), flaviviridae (por ej: virus de hepatitis C, virus del dengue, virus del Nilo Occidental), hepadnaviridae (por ej: virus de hepatitis B), togaviridae (por ej: alphavirus (por ej: virus sindbis) y rubivirus (por ej: virus de la rubéola)), rhabdoviridae (por ej: vesiculovirus, lyssavirus, ephemerovirus, cytorhabdovirus, y necleorhabdovirus), arenaviridae (por ej: arenavirus, virus de la

58

coriomeningitis linfocítica, virus Ippy y virus de Lassa), y coronaviridae (por ej: coronavirus y torovirus). En una realización específica, el antígeno viral es HIV gp120, HIV nef, glicoproteína RSV F, glicoproteína RSV G, neuraminidasa de virus de influenza, hemaglutinina de virus de influenza, HTLV tax, glicoproteína del virus del herpes simplex (por ej: gB, gC, gD, y gE) o antígeno de superficie de hepatitis B, proteína E del virus de la hepatitis C o proteína spike coronavirus. En algunas realizaciones, el antígeno viral no es gp 41. En algunas realizaciones, el antígeno viral se deriva de un paramyxovirus. En otras realizaciones alternativas, el antígeno viral no se deriva de un paramyxovirus. En algunas realizaciones, el antígeno viral se deriva del virus de parainfluenza tipo 1 para seres humanos, virus de parainfluenza humana tipos 3, un RSV o del virus Sendai. En otras realizaciones alternativas, el antígeno viral no se deriva del virus de parainfluenza tipo 1, virus de parainfluenza tipo 3, un RSV o del virus Sendai. En realizaciones específicas, la espina dorsal del virus es un virus de influenza y el antígeno diseñado en la espina dorsal del virus de influenza no es un antígeno de influenza. En otras realizaciones especificadas, la espina dorsal del virus es un NDV y el antígeno diseñado en la espina dorsal NDV no es un antígeno NDV.

En otra realización, un antígeno bacterial (por ej: proteína de la cubierta bacterial o el antígeno protector asociado con dicha bacteria) se diseña en un NDV o espina dorsal de virus de influenza. Ejemplos no limitantes de antígenos bacteriales incluyen antígenos de bacterias de la familia Aquaspirillum, familia Azospirillum, familia Azotobacteraceae, familia Bacteroidaceae, especie Bartonella, familia Bdellovibrio, especie Campylobacter, especie Chlamydia (por ej: Chlamydia pneumoniae), clostridium, familia Enterobacteriaceae (por ej: especie Citrobacter, Edwardsiella, Enterobacter aerogenes, especie Erwinia, Escherichia coli, especie Hafnia, especie Klebsiella, especie Morganella, Proteus vulgaris, Providencia, especie Salmonella, Serratia marcescens, y Shigella flexneri), familia Gardinella, Haemophilus influenzae, familia Halobacteriaceae, familia Helicobacter, familia Legionellaceae, especie Listeria, familia Methylococcaceae, mycobacteria (por ej: Mycobacterium tuberculosis), familia Neisseriaceae, familia Oceanospirillum, familia Pasteurellaceae, especie Pneumococcus, especie Pseudomonas, familia Rhizobiaceae, familia Spirillum, familia Spirosomaceae, Staphylococcus (por ej: Staphylococcus aureus resistente a la meticilina y Staphylococcus pyrogenes), Streptococcus (por ej: Streptococcus enteritidis, Streptococcus fasciae, y Streptococcus pneumoniae), familia Vampirovibr Helicobacter, familia Yersinia, Bacillus anthracis y familia Vampirovibrio.

En otras realizaciones, un antígeno protector asociado con un parásito (por ej: un protozoo) se diseña en un NDV o espina dorsal de virus de influenza. Cualquier antígeno asociado con un parásito o antígeno protector de un parásito (por ej: un

protozoario) puede usarse según los métodos de la invención. Ejemplos no limitantes de antígenos parásitos incluyen antígenos de un parásito como una ameba, un parásito de la malaria, Plasmodium, Trypanosoma cruzi.

En otra realización, un antígeno fangal se diseña en un NDV o espina dorsal de virus de influenza. Ejemplos no limitantes de antígenos fungales incluyen antígenos de hongos de la especie Absidia (por ej: Absidia corymbifera y Absidia ramosa), especie Aspergillus, (por ej: Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger y Aspergillus terreus), Basidiobolus ranarum, Blastomyces dermatitidis, especie Candida (por ej: Candida albicans, Candida glabrata, Candida kerr, Candida krusei, Candida parapsilosis, Candida pseudotropicalis, Candida quilliermondii, Candida rugosa, Candida stellatoidea y Candida tropicalis), Coccidioides immitis, especie Conidiobolus, Cryptococcus neoforms, especie Cunninghamella, dermatofitos, Histoplasma capsulatum, Microsporium gypseum, Mucor pusillus, Paracoccidioides brasiliensis, Pseudallescheria boydii, Rhinosporidium seeberi, Pneumocystis carinii, especie Rhizopus (por ej: Rhizopus arrhizus, Rhizopus oryzae y Rhizopus microsporus), especie Saccharomyces, Sporothrix schenckii, zigomicetos y clases como Zygomycetes, Ascomycetes, los Basidiomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes.

En otra realización, un antígeno asociado con un tumor se diseñó en un NDV o espina dorsal de virus de influenza. Cualquier antígeno de tumor asociado conocido en la técnica puede usarse según los métodos de la invención. Ejemplos no limitantes de antígenos asociados con tumores incluyen MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, p-15, MART-1/MelanA, TRP-1 (gp75), Tirosinasa, kinasa 4 dependiente de ciclina, β -catenina, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, E6 del virus del papiloma humano, E7 virus del papiloma humano, MUC-1, caspasa-8, CD5, CD20, CEA, mucin-1, Lewis^x, CA-125, receptor del factor de crecimiento epidérmico, p185^{HER2}, IL-2R, Fap- α , tenascina, antígenos asociados con una metaloproteínasa, y CAMPATH-1, .

5.4 Construcción y propagación de virus quiméricos de la invención

Los virus quiméricos de la invención pueden generarse usando la técnica de genética inversa. La técnica de genética inversa implica la preparación de ARN virales recombinantes sintéticos que contienen las regiones no codificadas del ARN viral de hebra negativa, que son esenciales para el reconocimiento por polimerasas virales y para las señales de empaquetado necesarias para generar un virión maduro. Los ARN recombinantes se sintetizan de una plantilla de ADN recombinante y se reconstituyen *in vitro* con complejo de polimerasa viral purificado para formar ribonucleoproteínas recombinantes (RNP) que pueden usarse para transfectar células. Se logra una

transfección más eficiente si las proteínas de polimerasa viral están presentes durante la transcripción de los ARN sintéticos *in vitro* o *in vivo*. Los RNP recombinantes sintéticos pueden rescatarse en partículas de virus infeccioso. Las técnicas anteriores están descritas en la Patente de EE.UU. No. 5.166.057 expedida en Noviembre 24, 1992; Patente de EE.UU. No. 5.854.037 expedida en Diciembre 29, 1998; en la Publicación de Patentes Europeas EP 0702085A1, publicada en Febrero 20, 1996; Serial de Aplicación de Patente de EE.UU. No. 09/152.845; en Publicaciones de Patentes Internacionales PCT W097/12032 publicado en Abril 3, 1997; W096/34625 publicado en Noviembre 7, 1996; Publicación de Patentes Europeas EP A780475; WO 99/02657 publicado en Enero 21, 1999; WO 98/53078 publicado en Noviembre 26, 1998; WO 98/02530 publicado en Enero 22, 1998, WO 99/15672 publicado en Abril 1, 1999; WO 98/13501 publicado en Abril 2, 1998; WO 97/06270 publicado en Febrero 20, 1997; y EPO 780 475A1 publicado en Junio 25, 1997, cada una de las cuales está incorporada en su totalidad mediante referencia en la presente invención.

La tecnología de plásmido libre de auxiliar también puede utilizarse para diseñar un virus quimérico de la invención. En síntesis, con respecto al virus de influenza, los cADN de longitud total de segmentos virales se amplifican usando primeros PCR que incluyen sitios de restricción únicos, los cuales permiten la inserción del producto PCR en un plásmido vector (Flandorfer *et. al.*, 2003, *J. Virol.* 77:9116-9123; Nakaya *et. al.*, 2001, *J. Virol.* 75:11868-11873; las cuales están incorporadas en su totalidad mediante referencia en la presente invención). El plásmido vector está diseñado para posicionar el producto PCR entre un promotor I de polimerasa del ARN humano truncado y una secuencia ribosómica del virus delta de la hepatitis, de modo que una transcripción negativa exacta (sentido vARN) se produce desde el promotor I de polimerasa. Los plásmidos vectores separados que comprenden cada segmento viral al igual que los vectores de expresión que comprenden proteínas virales necesarias son transfectados en células que llevan a la producción de partículas virales recombinantes. Para una descripción detallada de la tecnología de plásmido libre de auxiliar, véase, por ej., International Publication No. WO 01/04333; Patente de EE.UU. No. 6.649.372; Fodor *et. al.*, 1999, *J. Virol.* 73:9679-9682; Hoffmann *et. al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6108-6113; y Neumann *et. al.*, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9345-9350, que están incorporados en su totalidad mediante referencia en la presente invención. De manera similar, con respecto al genoma de segmento único de NDV, se construyó un cADN completo de la cepa Hitchner B1, se insertó en un plásmido vector y se diseñó para contener un sitio de restricción único entre los genes P y M. La proteína de fusión diseñada según la invención puede insertarse luego en el genoma viral en el sitio de restricción único. El segmento único se posicionó entre un promotor T7 y el ribosoma

61

del virus delta de la hepatitis para producir una transcripción negativa exacta de la polimerasa T7. El plásmido vector y los vectores de expresión que comprenden las proteínas virales necesarias son transfectados en células que llevan a la producción de partículas virales recombinantes (véase Swayne *et. al.*, 2003, *Avian Dis.* 47:1047-1050 y Swayne *et. al.*, 2001, *J. Virol.* 11868-11873, cada uno de los cuales está incorporado en su totalidad mediante referencia).

Los virus quiméricos de influenza de la invención pueden diseñarse para contener segmentos de ARN que son bicistrónicos. Las técnicas bicistrónicas permiten el diseño de secuencias de codificación de proteínas múltiples en un mARN único hasta el uso de secuencias IRES. Las secuencias IRES dirigen el reclutamiento interno de los ribosomas a la molécula de ARN y permiten la traslación descendente de una manera independiente de la tapa. En síntesis, una región de codificación de una proteína está insertada en el ORF de una segunda proteína. La inserción está flanqueada por un IRES y cualesquier secuencias de señales no trasladadas necesarias para la expresión y/o función adecuada. La inserción no debe interrumpir el marco de lectura abierto, poliadenilación o promotores transcripcionales de la segunda proteína (véase por ej: Garcia-Sastre *et. al.*, 1994, *J. Virol.* 68:6254-6261 y Garcia-Sastre *et. al.*, 1994 *Dev. Biol. Stand.* 82:237-246), cada una de las cuales está incorporada en su totalidad mediante referencia en la presente invención.

5.4.1 Propagación de los virus quiméricos

Los virus quiméricos de influenza de la presente invención pueden propagarse en cualquier sustrato que permita los virus para cultivar títulos que permitan el uso de los virus quiméricos descritos en la presente invención. En una realización, el sustrato permite los virus quiméricos para cultivar títulos comparables a aquellos determinados para los virus tipo silvestre correspondientes. En una realización específica, los virus quiméricos atenuados de influenza de la invención se propagan en sustratos deficientes en IFN.

Los virus quiméricos de la invención pueden cultivarse en células (por ej: células aviares, de pollo, etc.) que son susceptibles a infección por los virus, huevos embrionados o animales (por ej: aves). Dichos métodos son bien conocidos por personas versadas en la técnica. En una realización específica, las células usadas para propagar virus atenuados de influenza con una actividad antagonista de interferón reducida son deficientes en IFN. En una realización, los virus quiméricos aviares de la invención son propagados en células de pollo o huevos embrionados. Las células de pollo representativas incluyen, pero no están limitadas a, fibroblastos de embriones de pollo o células de riñón de embrión de pollo.

62

Los virus quiméricos de la invención pueden propagarse en huevos embrionados, por ej: de 6 a 14 días de edad. Huevos embrionados jóvenes o inmaduros pueden usarse para propagar virus quiméricos atenuados de influenza de la invención. Huevos embrionados inmaduros incluyen huevos con menos de diez días de edad, por ej: huevos de 6 a 9 días que son deficientes en IFN. Los huevos embrionados inmaduros también incluyen huevos que simulan huevos artificialmente inmaduros hasta de, pero menos de, diez días de edad, como resultado de alteraciones en las condiciones de crecimiento, por ej: cambios en las temperaturas de incubación; tratamiento con drogas; o alguna otra alteración que resulta en un huevo con un desarrollo retardado, de modo que el sistema IFN no está totalmente desarrollado en comparación con huevos de diez a doce días de edad. Los virus quiméricos de la invención pueden propagarse en diferentes sitios del huevo embrionado, por ej: la cavidad alantoica. Para una discusión detallada sobre el crecimiento y propagación de virus, en particular virus atenuados de influenza con actividad antagonista de interferón reducida, véase, por ej: Patente de EE.UU. No. 6.852.522 y Patente de EE.UU. No. 6.852.522, las cuales están incorporadas en su totalidad mediante referencia en la presente invención.

Para aislamiento de virus, el virus quimérico se retira del cultivo celular y se separa de los componentes celulares, típicamente procedimientos de aclaración bien conocidos, por ej: como centrifugación de gradiente y cromatografía de columna, y además puede ser purificado como se desee usando procedimientos bien conocidos por personas versadas en la técnica, por ej: ensayos de placa.

5.5 Usos de virus quiméricos

Los virus quiméricos de la invención pueden usarse en la inmunización activa en un sujeto. En un aspecto, los virus quiméricos de la invención pueden usarse para prevenir, manejar y / o tratar una o más enfermedades. En un aspecto específico, los virus quiméricos de la invención pueden usarse para prevenir, manejar y/o tratar infecciones de dos agentes infecciosos. Véase la Sección 5.5.1 para una descripción de la formulación inmunogénica y usos de esas formulaciones para inducir una respuesta inmune en un sujeto. Los virus quiméricos de la invención también pueden usarse para producir anticuerpos los cuales pueden usarse en inmunoensayos de diagnóstico, inmunoterapia pasiva, y generación de anticuerpos antiidiotípicos. Por ejemplo, un virus quimérico de influenza que comprende una proteína de fusión que tiene un ectodominio de un agente infeccioso salvo un virus de influenza puede administrarse a un sujeto (por ej: un ratón, rata, cerdo, caballo, burro, ave o humano) para generar anticuerpos para la espina dorsal de influenza y el agente infeccioso que entonces puede ser aislado y usado en ensayos de diagnóstico, inmunoterapia pasiva y generación de anticuerpos

antiidiotípicos. Los anticuerpos generados pueden ser aislados mediante técnicas estándar conocidas (por ej: cromatografía de inmutioafinidad, centrifugación, precipitación, etc.) y usados en inmunoensayos de diagnóstico, inmunoterapia pasiva y generación de anticuerpos antiidiotípicos. Antes de ser usados en inmunoterapia pasiva, los anticuerpos aislados pueden ser modificados por ej: los anticuerpos pueden ser quimerizados o humanizados. Véase, por ej: Patente de EE.UU. Nos. 4.444.887 y 4716.111; y Publicación Internacional Nos. WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, W098/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741, cada uno de los cuales está incorporado en su totalidad mediante referencia en la presente invención, para revisiones sobre la generación de anticuerpos quiméricos y humanizados.

Para anticuerpos producidos por los virus quiméricos para uso en inmunización pasiva, la dosis administrada a un sujeto típicamente está entre 0,0001 mg/kg y 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosis administrada a un paciente está entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,25 mg/kg, 0,0001 y 0,15 mg/kg, 0,0001 y 0,10 mg/kg, 0,001 y 0,5 mg/kg, 0,01 y 0,25 mg/kg o 0,01 y 0,10 mg/kg del peso corporal del sujeto. Los anticuerpos que abarca la invención pueden ser administrados con otras composiciones profilácticas o terapéuticas otra vez para la inmunización o tratamiento, manejo o prevención de una enfermedad o condición infecciosa, o un síntoma de la misma. La administración de dosis de anticuerpos de la invención puede ser con inyección en bolus o suministrado más lentamente por IV (por ej: más de 5 minutos, cerca de 15 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 45 minutos, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 4 horas, o cerca de 6 horas). Las dosis de los anticuerpos de la invención también pueden repetirse por ej: a diario, cada 2 días, cada 3 días, cada semana, cada 2 semanas, cada 3 semanas, cada 6 semanas, cada 9 semanas, cada 12 semanas, cada 4 meses, cada 6 meses, cada 12 meses, cada 18 meses, o cada 2 años) durante el curso del tratamiento (por ej: 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 10 meses, 12 meses, 16 meses, 20 meses, o 24 meses o más). En algunas realizaciones, los anticuerpos producidos por los virus quiméricos de la invención pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea, o, alternativamente, por vía oral o intranasal. Los anticuerpos que abarca la invención pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida.

Los anticuerpos aislados de sujetos a los que se administró un virus quimérico de la invención también pueden usarse para monitorear el tratamiento y/o la progresión de la enfermedad. Cualquier sistema de inmunoensayo conocido en la técnica puede usarse para este propósito, incluido pero no limitado a sistemas de ensayo competitivos y no

competitivos usando técnicas como radioinmunoensayos, ELISA (ensayos inunoabsorbentes ligados a enzimas), inmunoensayos tipo "sándwich", reacciones de precipitina en difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, para nombrar unos pocos.

Los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención también pueden usarse en la producción de anticuerpos antiidiotípicos. El anticuerpo antiidiotípico entonces puede usarse para inmunización, para producir una subpoblación de anticuerpos que enlacen un antígeno inicial de influenza quimérico (Jerne, 1974, *Ann. Immunol.* (Paris) 125c:373; Jerne *et. al.*, 1982, *EMBO J.* 1:234).

En procedimientos de inmunización, la cantidad de inmunógeno a usar y el cronograma de inmunización lo determinará un médico versado en la técnica y se administrará mediante referencia a la respuesta inmune y títulos de anticuerpos del sujeto.

5.5.1 Formulaciones inmunogénicas

La invención también abarca el uso de los virus quiméricos de la invención en formulaciones inmunogénicas, por ej: formulaciones de vacuna. En casos donde las formulaciones inmunogénicas comprenden un virus quimérico de influenza, las formulaciones pueden usarse en métodos de prevención, manejo, neutralización, tratamiento y/o mejoría de la infección por virus de influenza, y/o infecciones por otro agente infeccioso y/o una enfermedad. En casos donde las formulaciones inmunogénicas comprenden un NDV quimérico, las formulaciones pueden usarse en métodos de prevención, manejo, neutralización, tratamiento y/o mejoría de una infección NDV, infecciones por otro agente infeccioso y/o una enfermedad.

Las formulaciones inmunogénicas pueden comprender un virus quimérico vivo o inactivado de la invención. El virus quimérico puede inactivarse por métodos bien conocidos por una persona versada en la técnica. Métodos comunes usan formalina y calor para la inactivación. Véase, por ej: Patente de EE.UU. No. 6.635.246, que está incorporada en su totalidad mediante referencia en la presente invención. Otros métodos incluyen los descritos en las Patentes de EE.UU. Nos. 5.891.705; 5.106.619 y 4.693.981, incorporadas en su totalidad mediante referencia en la presente invención.

Una formulación inmunogénica viva puede preferirse debido a que la multiplicación en el sujeto lleva a un estímulo prolongado de clase y magnitud similar al que ocurre en infecciones naturales, y por lo tanto, confiere inmunidad sustancial y

56

duradera. La producción de dichas formulaciones inmunogénicas recombinantes vivas puede lograrse usando métodos convencionales que involucran la propagación del virus quimérico en cultivos celulares o en huevos embrionados (por ej: huevos de pollo embrionados) seguida de purificación. Además, los virus quiméricos pueden inducir una respuesta a IFN robusta que tiene otras consecuencias biológicas *in vivo*, permitiendo tener protección contra infecciones posteriores.

En una realización preferida, las formulaciones inmunogénicas de la presente invención comprenden una cantidad efectiva de un virus quimérico de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia regulatoria del gobierno federal o estatal o que se encuentra en la lista de la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término "portadora" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra composición farmacéutica (por ej: formulación inmunogénica o de vacuna). Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa acuosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Ejemplos de portadores farmacéuticos aptos están descritos en *Remington's Pharmaceutical Sciences* de E.W. Martin. La formulación debe ajustarse al modo de administración. La formulación particular también puede depender de si el virus quimérico está vivo o inactivado.

Las formulaciones inmunogénicas de la invención pueden administrarse a un sujeto sano, es decir, un sujeto que no tiene una enfermedad o que no ha estado y actualmente no está infectado con uno o ambos agentes infecciosos. En una realización, las formulaciones inmunogénicas son administradas a un sujeto sano, es decir, un sujeto que no tiene una enfermedad y no ha estado y no está actualmente infectado con uno o ambos agentes infecciosos, pero está en riesgo de adquirir dicha enfermedad (por ej: una infección viral). En una realización, las formulaciones inmunogénicas de la invención son administradas a un sujeto que no tiene una enfermedad, o no tiene y no está infectado con uno de los agentes infecciosos ante el cual el virus quimérico induce una respuesta inmune. En otra realización, las formulaciones inmunogénicas de la invención son administradas a un sujeto que no tiene y no está infectado con ambos agentes infecciosos ante los cuales el virus quimérico induce una respuesta inmune. Las formulaciones inmunogénicas de la invención también pueden administrarse a un sujeto que es y/o ha sido infectado con uno o ambos agentes infecciosos o de otro tipo, subtipo o cepa de los

agentes ante los cuales el virus quimérico induce una respuesta inmune.

Para introducir las formulaciones inmunogénicas, por ej: formulaciones de vacuna descritas antes, pueden usarse muchos métodos, incluidos, pero no limitados a, rutas intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, conjuntival y subcutánea. En aves, los métodos pueden incluir inoculación de coanas. Como una alternativa a la administración parenteral, la invención también abarca rutas de administración masiva con fines agrícolas, como a través del agua potable o en aerosol. Puede ser preferible introducir la formulación inmunogénica del virus quimérico de influenza por medio de la ruta natural de infección del virus tipo silvestre. Alternativamente, puede ser preferible introducir el virus quimérico de la invención por la ruta natural de la infección del agente del cual se deriva la proteína de fusión. La capacidad del virus quimérico para inducir una respuesta inmune secretora vigorosa y celular puede usarse ventajosamente. Por ejemplo, la infección del tracto respiratorio con virus quiméricos puede inducir una fuerte respuesta inmune secretora, por ejemplo, en el sistema urogenital, con protección concomitante contra una enfermedad particular que causa el agente. Además, en una realización preferida puede ser deseable introducir las formulaciones farmacéuticas de la invención en los pulmones por cualquier ruta adecuada. También puede emplearse la administración pulmonar, por ej: mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente en aerosol para uso de ese modo.

En algunas realizaciones, una formulación inmunogénica de la invención no resulta en la protección completa contra una infección (por ej: una infección viral o una infección por un agente infeccioso no viral), pero resulta en un título más bajo o un número reducido del patógeno (por ej: un virus) comparado con un sujeto no tratado. En algunas realizaciones, la administración de las formulaciones inmunogénicas de la invención resulta en una reducción de 0,5 veces, 1 vez, 2 veces, 4 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 125 veces, 150 veces, 175 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 750 veces, o 1,000 veces o mayor en el título del patógeno en relación con un sujeto no tratado. Los beneficios de una reducción en el título, número o carga total del patógeno incluyen, pero no están limitados a, menos severidad de los síntomas de la infección y una reducción en la duración de la enfermedad o la condición asociada con la infección.

En algunas realizaciones, una formulación inmunogénica de la invención se usa para proteger contra una enfermedad (por ej: una infección) en sujetos sanos. En una realización específica, una formulación inmunogénica de la invención se usa para proteger contra una infección por virus de influenza y/o al menos otro agente infeccioso

que no sea un virus de influenza y/o proteger contra una enfermedad o síntoma asociado con la infección en un sujeto sano. En otras realizaciones, una formulación inmunogénica de la invención se usa para proteger contra la infección por NDV y/o al menos otro agente infeccioso y/o proteger contra una enfermedad o síntoma asociado con ello en sujetos sanos. Ejemplos no limitantes de dichos otros agentes infecciosos son: virus del papiloma, virus del herpes, retrovirus (por ej: HIV), virus de hepatitis, rinovirus, virus sincitial respiratorio, NDV, citomegalovirus, adenovirus, Clostridia sp., Salmonella sp., Staphylococcus sp., Enterococcus sp., Vibrio sp., E. coli, Streptococcus equi, Micoplasma pneumoniae, Klebsiella pneumoniae y Pseudomonas aeruginosa, y Dermatophilus congolensis, o un protozoo como la ameba, el parásito de la malaria o el Trypanosoma cruzi.

El efecto profiláctico y/o terapéutico de las formulaciones inmunogénicas de la invención se basa, en parte, en lograr o inducir una respuesta inmune (por ej: una respuesta inmune humoral). En un aspecto, las formulaciones inmunogénicas inducen un título de suero detectable de un anticuerpo contra antígenos del virus quimérico en el sujeto o un modelo animal (por ej: modelo de ratón, rata o canino). El título del suero de un anticuerpo puede determinarse usando técnicas conocidas por una persona versada en la técnica, por ej: inmunoensayos como los ELISA. En una realización; los anticuerpos se enlazan específicamente a un antígeno de la espina dorsal del virus quimérico. En otras realizaciones, los anticuerpos se enlazan específicamente a un antígeno de la al menos una proteína de fusión, es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con un agente infeccioso o una enfermedad. En una realización específica, los anticuerpos generados por la administración de una formulación inmunogénica de la invención son anticuerpos neutralizantes.

En una realización, la administración de un virus quimérico de la invención a un sujeto o modelo animal resulta en un título de suero de entre 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 175 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 225 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 275 $\mu\text{g/ml}$, o 300 $\mu\text{g/ml}$ o más de un anticuerpo que se enlaza específicamente a un antígeno de la espina dorsal del virus quimérico. En otras realizaciones, la administración de un virus quimérico de la invención a un sujeto o modelo animal resulta en un título de suero de 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 175 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 225 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 275 $\mu\text{g/ml}$, o 300 $\mu\text{g/ml}$ o más de un anticuerpo que se enlaza específicamente a un antígeno de proteína de fusión, es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con un agente infeccioso o una enfermedad. Preferiblemente un título de suero de entre 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 20

56
μg/ml, 25 μg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml o 300 mg/ml o más de dichos anticuerpos se logran entre 20 días (preferiblemente 25, 30, 35 ó 40 días) después de la administración de una primera dosis de una formulación inmunogénica de la invención y sin administración de otras dosis de la formulación. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, cuya respuesta luego se correlaciona o se extrapola a una respuesta predicha en el sujeto, por ej: un ser humano.

En una realización, la presente invención provee métodos para prevenir al menos una enfermedad (por ej: una infección por influenza y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea influenza) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus quimérico de influenza de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de una enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 μg/ml, 20 μg/ml, 30 μg/ml, 40 μg/ml, 50 μg/ml, 60 μg/ml, 70 μg/ml, 80 μg/ml, 100 μg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno específicamente a un antígeno o epítipo de la espina dorsal del virus quimérico 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración. En otra realización, la presente invención provee métodos para prevenir al menos una enfermedad (por ej: una infección por influenza y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea influenza) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus quimérico de influenza de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 μg/ml, 20 μg/ml, 30 μg/ml, 40 μg/ml, 50 μg/ml, 60 μg/ml, 70 μg/ml, 80 μg/ml, 100 μg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno específicamente a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) a 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, cuya respuesta entonces se correlaciona o extrapola con una respuesta predicha en el sujeto, por ej: un ser humano. En una realización, la presente invención provee métodos para prevenir una infección por influenza aviar y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea influenza aviar en un ave, el método que comprende administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un virus quimérico de influenza aviar de la invención, el cual comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia de proteínas heterólogas, para dicho sujeto de una cantidad

efectiva del virus quimérico aviar de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno del virus quimérico y/ o anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En algunas realizaciones, la dosis del virus quimérico de influenza administrado al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En una realización, la presente invención provee métodos para tratar al menos una enfermedad (por ej: una infección por influenza y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea influenza) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus quimérico de influenza de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta de un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno o epítipo de la espina dorsal del virus quimérico 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En otra realización, la presente invención provee métodos para tratar al menos una enfermedad (por ej: una infección por influenza y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea influenza) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus quimérico de influenza de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) a 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, cuya respuesta entonces se correlaciona o extrapola a una respuesta predicha en el sujeto, por ej: un ser humano. En una realización, la presente invención provee métodos para tratar una infección por influenza aviar y/o

20

infecciones por otro agente infeccioso que no sea influenza aviar en un ave, el método que comprende administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un virus quimérico de influenza aviar de la invención, el cual comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia de proteínas heterólogas, para dicho sujeto de una cantidad efectiva del virus quimérico aviar de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno específicamente a un antígeno del virus quimérico y/ o anticuerpos que se enlazan inmuno específicamente a un antígeno de la proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En algunas realizaciones, la dosis del virus quimérico de influenza administrada al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En una realización, la presente invención provee métodos para manejar y/o mejorar al menos una enfermedad (por ej: una infección por influenza y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea influenza) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus quimérico de influenza de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno específicamente a un antígeno o epítipo de la espina dorsal del virus quimérico a 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En otra realización, la presente invención provee métodos para manejar y/o mejorar al menos una enfermedad (por ej: una infección por influenza y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea influenza) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus quimérico de influenza de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno específicamente a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) a 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después

de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, dicha respuesta entonces se correlaciona o extrapola a una respuesta predicha en el sujeto, por ej: un ser humano. En una realización, la presente invención provee métodos para manejar y/o mejorar una infección por influenza aviar y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea influenza aviar en un ave, el método que comprende administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un virus quimérico de influenza aviar de la invención, el cual comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia de proteínas heterólogas, para dicho sujeto de una cantidad efectiva del virus quimérico aviar de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno del virus quimérico y/ o anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno de una proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En algunas realizaciones, la dosis del virus quimérico de influenza administrada al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En una realización, la presente invención provee métodos para prevenir al menos una enfermedad (por ej: una infección NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno o epítipo de la espina dorsal del virus quimérico 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En otra realización, la presente invención provee métodos para prevenir al menos una enfermedad (por ej: una infección NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende a NDV quimérico de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40

2

μg/ml, 50 μg/ml, 60 μg/ml, 70 μg/ml, 80 μg/ml, 100 μg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, dicha respuesta entonces se correlaciona o extrapola a una respuesta predicha en el sujeto, por ej: un ser humano. En una realización, la presente invención provee métodos para prevenir una infección NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV en un ave, el método que comprende administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, le cual comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia de proteínas heterólogas, a dicho sujeto de una cantidad efectiva del virus quimérico de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 μg/ml, 20 μg/ml, 30 μg/ml, 40 μg/ml, 50 μg/ml, 60 μg/ml, 70 μg/ml, 80 μg/ml, 100 μg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno del virus quimérico y/ o anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En algunas realizaciones, la dosis del virus quimérico de influenza administrada al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En una realización, la presente invención provee métodos para tratar al menos una enfermedad (por ej: una infección NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 μg/ml, 20 μg/ml, 30 μg/ml, 40 μg/ml, 50 μg/ml, 60 μg/ml, 70 μg/ml, 80 μg/ml, 100 μg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno o epítipo de la espina dorsal del virus quimérico 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En otra realización, la presente invención provee métodos para tratar al menos una enfermedad (por ej: una infección NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende

un NDV quimérico de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) a 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, dicha respuesta entonces se correlaciona o extrapola a una respuesta predicha en el sujeto, por ej: un ser humano. En una realización, la presente invención provee métodos para tratar una infección NDV y/o infecciones de otro agente infeccioso que no sea NDV en un ave, el método que comprende administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, el cual comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia de proteínas heterólogas, para dicho sujeto de una cantidad efectiva del virus quimérico de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno del virus quimérico y/o anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En algunas realizaciones, la dosis del virus quimérico de influenza administrado al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En una realización, la presente invención provee métodos para manejar y/o mejorar al menos una enfermedad (por ej: una infección NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno o epítipo de la espina dorsal del virus quimérico 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En otra realización, la presente invención provee métodos para

un NDV quimérico de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) a 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, dicha respuesta entonces se correlaciona o extrapola a una respuesta predicha en el sujeto, por ej: un ser humano. En una realización, la presente invención provee métodos para tratar una infección NDV y/o infecciones de otro agente infeccioso que no sea NDV en un ave, el método que comprende administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, el cual comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia de proteínas heterólogas, para dicho sujeto de una cantidad efectiva del virus quimérico de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno del virus quimérico y/o anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En algunas realizaciones, la dosis del virus quimérico de influenza administrado al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En una realización, la presente invención provee métodos para manejar y/o mejorar al menos una enfermedad (por ej: una infección NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno o epítipo de la espina dorsal del virus quimérico 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En otra realización, la presente invención provee métodos para

manejar y/o mejorar al menos una enfermedad (por ej: una infección NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una primera dosis de una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, el cual comprende una proteína de fusión de una secuencia heteróloga (por ej: un antígeno de enfermedad), en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión (es decir, un antígeno del ectodominio de la proteína introducida asociada con una enfermedad) a 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. La respuesta inmune puede determinarse en el sujeto o en un modelo animal, dicha respuesta entonces se correlaciona o extrapola a una respuesta predicha en el sujeto, por ej: un ser humano. En una realización, la presente invención provee métodos para manejar y/o mejorar una infección NDV y/o infecciones por otro agente infeccioso que no sea NDV en un ave, el método que comprende administrar una primera dosis de una formulación inmunogénica que comprende un NDV quimérico de la invención, dicho NDV quimérico comprende una proteína de fusión que contiene una secuencia de proteínas heterólogas, para dicho sujeto de una cantidad efectiva del virus quimérico de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en un título de suero de entre 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml o mayor de anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno del virus quimérico y/o anticuerpos que se enlazan inmuno-específicamente a un antígeno de la proteína de fusión 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de la primera administración y antes de cualquier administración posterior. En algunas realizaciones, la dosis del virus quimérico de influenza administrado al sujeto o modelo animal es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

La presente invención también provee métodos para prevenir, tratar y/o manejar al menos una enfermedad, los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus quimérico de influenza de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en una reducción de la mortalidad, reducción de la hospitalización, reducción de la severidad de la enfermedad y/o reducción de los síntomas clínicos de la enfermedad en relación con un sujeto a quien no se administró la formulación inmunogénica de la invención. En algunas realizaciones el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones,

la dosis del virus quimérico de influenza administrado al sujeto es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu.

En otra realización, la presente invención provee métodos para prevenir, tratar y/o manejar al menos una enfermedad (por ej: una infección por influenza aviar y/o infección por otro agente infeccioso que no sea influenza aviar) en un sujeto (preferiblemente ave); los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende un virus quimérico de influenza aviar de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en una reducción en el título o número de agentes infecciosos, reducción en mortalidad, reducción en hospitalización, reducción en la gravedad de la infección y/o reducción en los síntomas clínicos de la infección en relación con un sujeto a quien no se ha administrado la formulación inmunogénica de la invención. En algunas realizaciones, la dosis del virus quimérico de influenza aviar administrada al sujeto es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu. En algunas realizaciones, la administración de la formulación inmunogénica de la invención resulta en una reducción de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% o más en la replicación del agente infeccioso en relación con un sujeto a quien no se administró la formulación inmunogénica de la invención como se determinó a 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de dicha administración por cualquier método conocido en la técnica o ejemplificado en la presente invención (por ej: determinación de título viral). En otras realizaciones, la administración de una formulación inmunogénica de la invención resulta en una reducción de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 o 100 veces en la replicación del agente infeccioso o la carga del agente infeccioso en relación con un sujeto a quien no se administró una formulación inmunogénica de la invención como se determinó a 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de dicha administración por cualquier método conocido en la técnica o ejemplificado en la presente invención (por ej: determinación de título viral o carga bacterial y/o concentración).

En otra realización, la presente invención provee métodos para prevenir, tratar y/o mejorar al menos una enfermedad (por ej: una infección NDV y/o infección por otro agente infeccioso que no sea NDV) en un sujeto (por ej: un ave), los métodos que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una formulación inmunogénica que comprende a virus quimérico NDV de la invención, en donde la cantidad efectiva es la cantidad que resulta en una reducción en el título o número de agentes infecciosos, reducción en la mortalidad, reducción en la hospitalización,

reducción en la gravedad de la infección y/o reducción en los síntomas clínicos de la infección en relación con un sujeto a quien no se administró la formulación inmunogénica de la invención. En algunas realizaciones, la dosis del virus quimérico NDV administrado al sujeto es 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu. En algunas realizaciones, la administración de la formulación inmunogénica de la invención resulta en una reducción de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% o más, en la replicación del agente infeccioso en relación con un sujeto a quien no se administró la formulación inmunogénica de la invención como se determinó a 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de dicha administración por cualquier método conocido en la técnica o ejemplificado en la presente invención (por ej: determinación de título viral). En otras realizaciones, la administración de la formulación inmunogénica de la invención resulta en una reducción 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, o 100 veces en la replicación del agente infeccioso o la carga del agente infeccioso en relación con un sujeto a quien no se administró la formulación inmunogénica de la invención como se determinó a 2 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días o, preferiblemente, 30 días después de dicha administración por cualquier método conocido en la técnica o ejemplificado en la presente invención (por ej: determinación de título viral).

La cantidad de la formulación inmunogénica de la invención que será efectiva en el tratamiento, prevención y/o mejoría de una enfermedad en particular (por ej: infección viral) dependerá de la naturaleza de la enfermedad, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente pueden emplearse ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los rangos de dosificación óptimos. La dosis precisa a ser empleada en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y la gravedad de la infección o afección, y deberá decidirse de acuerdo con el criterio del médico experto y de las circunstancias de cada sujeto. Sin embargo, los rangos de dosis adecuados para la administración generalmente están entre 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} pfu, y más preferiblemente entre 10^4 y 10^{12} , y pueden administrarse a un sujeto una, dos, tres o más veces con la frecuencia de intervalos que sea necesaria. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta de dosis de sistemas de prueba en modelo animal o *in vitro*.

En varias realizaciones, las formulaciones inmunogénicas de la invención o los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención son administrados a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ej: terapias antivirales o inmunomodulatorias) para la prevención de al menos una enfermedad (por ej: una

78

infección por influenza y/o infección por otro agente infeccioso que no sea virus de influenza). En otras realizaciones, las formulaciones inmunogénicas de la invención o los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención son administrados a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ej: terapias antivirales o inmunomodulatorias) para el tratamiento de al menos una enfermedad (por ej: una infección por influenza y/o infección por otro agente infeccioso que no sea virus de influenza). Aún en otras realizaciones, las formulaciones inmunogénicas de la invención o los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención son administrados a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ej: terapias antiviral o inmunomodulatoria) para el manejo y/o mejoría de al menos una enfermedad (por ej: una infección por influenza y/o infección por otro agente infeccioso que no sea virus de influenza). En una realización específica, las formulaciones inmunogénicas de la invención o los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención son administradas a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ej: terapias antiviral o inmunomodulatoria) para la prevención de una infección por influenza aviar y/o infección por otro agente infeccioso que no sea virus de influenza aviar. En otra realización específica, las formulaciones inmunogénicas de la invención o los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención son administrados a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ej: terapia antiviral o inmunomodulatoria) para el tratamiento de una infección por influenza aviar y/o infección por otro agente infeccioso que no sea virus de influenza aviar. Aún en otras realizaciones, las formulaciones inmunogénicas de la invención o los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención son administrados a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ej: terapia antiviral o inmunomodulatoria) para la prevención de una infección NDV y/o infección por otro agente infeccioso que no sea NDV. Aún en otras realizaciones, las formulaciones inmunogénicas de la invención o anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención son administrados a un sujeto en combinación con una o más terapias (por ej: terapia antiviral o inmunomodulatoria) para el tratamiento de una infección NDV y/o infección por otro agente infeccioso que no sea NDV. En algunas realizaciones, las terapias (por ej: agentes profilácticos o terapéuticos) son administradas a menos de 5 minutos de diferencia, a menos de 30 minutos de diferencia, a 1 hora de diferencia, a cerca de 1 hora de diferencia, entre 1 y 2 horas de diferencia, entre 2 y 3 horas de diferencia, entre 3 y 4 horas de diferencia, entre 4 y 5 horas de diferencia, entre 5 y 6 horas de diferencia, entre 6 y 7 horas de diferencia, entre 7 y 8 horas de diferencia, entre 8 y 9 horas de diferencia, entre 9 y 10 horas de diferencia, entre 10 y 11 horas de diferencia, entre 11 y 12 horas de diferencia, entre 12 y 18 horas de diferencia, 18 y 24 horas de diferencia, 24 y 36 horas de diferencia, 36 y 48 horas de diferencia, 48 y 52 horas de diferencia, 52 y 60 horas de

79

diferencia, 60 y 72 horas de diferencia, 72 y 84 horas de diferencia, 84 y 96 horas de diferencia, o 96 y 120 horas de diferencia. En realizaciones preferidas, dos o más terapias son administradas en la misma visita del paciente.

Cualquier agente antiviral conocido por una persona versada en la técnica puede usarse en las formulaciones (por ej: formulaciones de vacuna) y los métodos de la invención. Ejemplos no limitantes de agentes antivirales incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, anticuerpos de proteínas de fusión, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y moléculas pequeñas que inhiben y/o reducen el vínculo de un virus a su receptor, la internalización de un virus en un célula, la replicación de un virus, o la liberación de un virus de una célula. En particular, los agentes antivirales incluyen, pero no están limitados a, análogos nucleósidos (por ej: zidovudine, aciclovir, gangciclovir, vidarabine, idoxuridine, trifluridine y ribavirin), foscarnet, amantadine, rimantadine, saquinavir, indinavir, ritonavir, interferones alfa y otros interferones, y AZT.

En realizaciones específicas, el agente antiviral es un agente inmunomodulatorio que es inmuno-específico para un antígeno viral. Como se usa en la presente invención, el término "antígeno viral" incluye, pero no está limitado a, cualquier péptido, polipéptido y proteína virales (por ej: HIV gp120, HIV nef, glicoproteína RSV F, glicoproteína RSV G, neuraminidasa del virus de influenza, hemaglutinina del virus de influenza, HTLV tax, glicoproteína del virus del herpes simplex (por ej: gB, gC, gD, y gE) y antígeno de superficie de la hepatitis B) que pueden provocar una respuesta inmune. Anticuerpos útiles en esta invención para el tratamiento de una infección viral incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos contra antígenos de virus patógenos, incluidos como ejemplo y no por limitación: adenoviridae (por ej: mastadenovirus y aviadenovirus), herpesviridae (por ej: virus del herpes simplex 1, virus del herpes simplex 2, virus del herpes simplex 5, y virus del herpes simplex 6), leviviridae (por ej: levivirus, enterobacteria fase MS2, allovirus), poxviridae (por ej: chordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus, y entomopoxvirinae), papovaviridae (por ej: polyomavirus y papillomavirus), paramyxoviridae (por ej: paramyxovirus, paravirus de influenza 1, morbillivirus (por ej: virus del sarampión), rubulavirus (por ej: virus de parotiditis), pneumonovirinae (e.g, pneumovirus, virus sincitial respiratorio humano), y metapneumovirus (por ej: pneumovirus aviar y metapneumovirus humano)), picornaviridae (por ej: enterovirus, rinovirus, hepatovirus (por ej: virus de la hepatitis A humana), cardiovirus, y aphovirus), reoviridae (por ej: orthoreovirus, orbivirus, rotavirus, cypovirus, fivirus, phytoreovirus, y oryzavirus), retroviridae (por ej: retrovirus tipo B mamíferos, retrovirus tipo C mamíferos, retrovirus tipo C aviar, grupo de retrovirus tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus (por ej: virus

de inmunodeficiencia humana 1 y virus de inmunodeficiencia humana 2), spumavirus), flaviviridae (por ej: virus de la hepatitis C, virus del dengue, virus del Nilo Occidental), hepadnaviridae (por ej: virus de la hepatitis B), togaviridae (por ej: alfavirus (por ej: virus Sindbis) y rubivirus (por ej: virus de la rubéola)), rhabdoviridae (por ej: vesiculovirus, lyssavirus, ephemerovirus, cytorhabdovirus, y necleorhabdovirus), arenaviridae (por ej: arenavirus, virus de coriomeningitis linfocítica, virus Ippy, y virus de Lassa), y coronaviridae (por ej: coronavirus y torovirus).

Agentes antibacteriales y terapias bien conocidas por una persona versada en la técnica para la prevención, tratamiento, manejo, o mejoría de infecciones bacteriales pueden usarse en las composiciones (por ej: formulaciones inmunogénicas) y métodos de la invención. Ejemplos no limitantes de agentes antibacteriales incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y moléculas pequeñas que inhiben o reducen una infección bacterial, inhiben o reducen la replicación de bacterias, o inhiben o reducen la transmisión de la bacteria a otros sujetos. En particular, ejemplos de agentes antibacteriales incluyen, pero no limitados a, penicilina, cefalosporina, imipenem, axtreonam, vancomicina, cycloserine, bacitracin, cloramfenicol, erithromicina, clindamicina, tetraciclina, estreptomycin, tobramicina, gentamicina, amikacina, kanamicina, neomicina, espectinomycin, trimethoprim, norfloxacin, rifampin, polymyxin, amfotericina B, nistatina, ketocanazole, isoniazida, metronidazole, y pentamidina. Las terapias anti-bacteriales y sus dosis, rutas de administración y uso recomendado son conocidos en la técnica y han sido descritos en literatura como *Physician's Desk Reference* (56 ed., 2002). Información adicional sobre infecciones respiratorias y terapias antibacteriales está disponible en el *Cecil Textbook de Medicine* (18 ed., 1988).

Agentes y terapias antifungales bien conocidos para una persona versada en la técnica, para la prevención, manejo, tratamiento y/o mejoría de una infección fungal o uno o más síntomas de ello (por ej: una infección respiratoria fungal) puede usarse en las composiciones (por ej: formulaciones inmunogénicas) y métodos de la invención. Ejemplos no limitantes de agentes antifungales incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, y pequeñas moléculas que inhiben y/o reducen la infección fungal, inhiben y/o reducen la replicación de los hongos, o inhiben y/o reducen la expansión de hongos a otros sujetos. Ejemplos específicos de agentes antifungales incluyen, pero no están limitados a, medicamentos de azole (por ej: miconazole, ketoconazole (NIZORAL®), acetato caspofungin (CANCIDAS®), imidazole, triazoles (por ej: fluconazole (DIFLUCAN®)), y itraconazole (SPORANOX®)), poleno (por ej:

81

nistatina, anfotericina B (FUNGIZONE ®), anfotericina B complejo lipídico ("ABLC")(ABELCET®), anfotericina B dispersión coloidal ("ABCD")(AMPHOTEC®), anfotericina B liposómica (AMBISONE®), yoduro de potasio (KI), pirimidina (por ej: flucitosina (ANCOBON®), y voriconazole (VFEND®). Terapias antifungales y sus dosis, rutas de administración y uso recomendado son conocidos en la técnica y han sido descritos en literatura como Dodds *et. al.*, 2000 *Pharmacotherapy* 20(11) 1335-1355, el *Physician's Desk Reference* (57 ed., 2003) y el *Merck Manual of Diagnosis and Terapia* (17 ed., 1999).

En algunas realizaciones, una formulación inmunogénica de la invención es administrada a un sujeto como una dosis única seguida por una segunda dosis 3 a 6 semanas más tarde. De acuerdo con estas realizaciones, al sujeto pueden administrarse inoculaciones booster con intervalos de 6 a 12 meses después de la segunda inoculación. En una realización, el sujeto es un mamífero. En una realización, el sujeto es un ave. Aún en otra realización, el sujeto es un ser humano. En una realización más preferida, el sujeto es un pollo en riesgo de contraer infección NDV o infección por virus de influenza aviar.

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

5.6 Ensayos biológicos

5.6.1 Ensayos In Vitro

El crecimiento de los virus quiméricos de la presente invención puede evaluarse por cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente invención (por ej: en cultivos celulares (por ej: cultivos de células embrionales de riñón de pollo o cultivos de fibroblastos de embrión de pollo (CEF)). El crecimiento de los virus quiméricos atenuados de la invención puede evaluarse en células competentes en IFN y deficientes en IFN. En una realización específica, las células CEF son infectadas en una MOI de 0,0005 y 0,001, 0,001 y 0,01, 0,01 y 0,1, 0,1 y 1, o 1 y 10, o una MOI de 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 o 10 e incubadas con medio de suero libre suplementado con 5% de fluido alantoico. Los títulos virales son determinados en el sobrenadante por HA en placas en células CEF como se describe más adelante. Otras células en las cuales pueden evaluarse los títulos virales incluyen, pero no están limitadas a, células EFK-2, células Vero, células endoteliales primarias de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC), línea celular epitelial humana H292 y células HeLa.

2

La incorporación de la proteína de fusión en el virión de los virus quiméricos de la presente invención puede evaluarse por cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente invención (por ej: en cultivo celular, cultivo en modelo animal o viral en huevos embrionados). Por ejemplo, partículas virales del cultivo celular del fluido alantoico de huevos embrionados pueden purificarse por centrifugación mediante un cojín de sacarosa y posteriormente analizarse para expresión de proteína de fusión con Western blotting, usando métodos bien conocidos en la técnica.

Los ensayos virales incluyen los que miden replicación viral alterada (según sea determinado, por ej: por formación de placas) o la producción de proteínas virales (según sea determinado, por ej: mediante análisis de Western blot) o ARN virales (según sea determinado, por ej: by RT-PCR o análisis Northern blot) en células cultivadas *in vitro* usando métodos que son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la presente invención o fragmentos del mismo pueden caracterizarse en una variedad de formas bien conocidas por una persona versada en la técnica (por ej: ELISA, proyección de resonancia de plasmón superficial (*Surface Plasmon resonance display* (BIAcore)), Western blot, inmunofluorescencia, inmunomanchado y/o microneutralización). En particular, los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden ensayarse para la capacidad de enlazarse inmuno-específicamente a un antígeno quimérico de virus de espina dorsal o un antígeno o epítipo de la proteína de fusión. Un ensayo de estos puede realizarse en solución (por ej: Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13:412-421), en perlas (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), en pedazos (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), en bacterias (Patente de EE.UU. No. 5.223.409), en esporas (Patentes de EE.UU. Nos. 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), en plásmidos (Cull *et. al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) o en fagos (Scott y Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Cwirla *et. al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; y Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-3 10) (todas estas referencias están incorporadas en su totalidad en la presente invención). Los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la presente invención o fragmentos de los mismos han sido identificados para enlazarse inmuno-específicamente a un antígeno del virus quimérico de espina dorsal o un antígeno o epítipo de la proteína de fusión que después se ensaya para su especificidad ante dicho antígeno.

Los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden ensayarse para el enlace inmuno-específico a un antígeno del virus quimérico de la invención (por ej: un antígeno o epítipo del virus quimérico de espina dorsal o un antígeno o epítipo de la proteína de fusión (por ej: un

antígeno asociado con una enfermedad)) y reactividad cruzada con otros antígenos por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse para analizar enlace inmuno específico y reactividad cruzada incluyen, pero no están limitados a sistemas de ensayo competitivo y no competitivo utilizando técnicas como Western blots, radioinmunoensayos, ELISA (*enzyme linked immunosorbent assays*), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, para nombrar unos pocos. Tales ensayos son de rutina y bien conocidos en la técnica (véase, por ej: Ausubel *et. al.*, eds., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, que se incorpora en su totalidad mediante referencia en la presente invención). Ejemplos de inmunoensayos se describen brevemente más adelante (pero no se pretenden a manera de limitación).

Los protocolos de inmunoprecipitación generalmente comprenden la desintegración por medio de lisinas de una población de células en un tamponador de lisis como el tamponador RIPA (1% NP-40 o Triton X-100, 1% sodio deoxycholate, 0,1% SDS, 0,15 M NaCl, 0,01 M fosfato de sodio a pH 7,2, 1% Trasylol) complementado con proteína fosfatasa y/o inhibidores de la proteasa (por ej: EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), agregando el anticuerpo de interés al lisato celular, incubando por un tiempo (por ej: 1 a 4 horas) a 40° C, agregando proteína A y/o perlas de proteína G-sefarosa al lisato celular, incubando por cerca de una hora o más a 40° C, lavando las perlas en tamponador de lisis y volviendo a suspender las perlas en un tamponador de muestra/SDS. La capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno en particular puede evaluarse mediante, por ej: análisis de Western blot. Una persona versada en la técnica conocimiento en cuanto a los parámetros que pueden modificarse para aumentar el enlace del anticuerpo a un antígeno y disminuir el fondo (por ej: pre-limpiando el lisato celular con perlas de sefarosa). Para discusión adicional con respecto a los protocolos de inmunoprecipitación, véase por ej: Ausubel *et. al.*, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.16.1.

El análisis de Western blot generalmente comprende preparar muestras de proteínas, electroforesis de las muestras de proteínas en un gel de poliacrilamida (por ej: 8% a 20% SDS-PAGE dependiendo del peso molecular del antígeno), transfiriendo la muestra de proteína del gel de poliacrilamida a una membrana como nitrocelulosa, PVDF o nylon, incubando la membrana en solución de bloqueo (por ej: PBS con 3% de BSA o leche sin grasa), lavando la membrana en tamponador de lavado (por ej: PBS-

84

Tween 20), incubando la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tamponador de bloqueo, lavando la membrana en tamponador de lavado, incubando la membrana con un anticuerpo secundario (el cual reconoce el anticuerpo primario, por ej: un anticuerpo antihumano) conjugado a un sustrato enzimático (por ej: peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) o molécula radioactiva (por ej: ^{32}P o ^{125}I) diluido en tamponador de bloqueo, lavando la membrana en tamponador de lavado, y detectando la presencia del antígeno. Una persona versada en la técnica tendría conocimiento de los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada y reducir el ruido de fondo. Para discusión adicional con respecto a los protocolos Western blot véase, por ej: Ausubel *et. al.*, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.8.1.

ELISA comprende preparar el antígeno, cubriendo con el antígeno el pozo de una placa de microtítulos de 96 pozos, agregando el anticuerpo de interés conjugado a un compuesto detectable como un sustrato enzimático (por ej: peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pozo e incubando por un tiempo, y detectando la presencia del antígeno. En los ensayos ELISA, el anticuerpo de interés no tiene que ser conjugado a un compuesto detectable; en cambio, un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo de interés) conjugado a un compuesto detectable puede agregarse al pozo. Además, en lugar de cubrir el pozo con el antígeno, se puede cubrir con el anticuerpo. En este caso, a un compuesto detectable puede agregarse un segundo anticuerpo conjugado después de agregar el antígeno de interés al pozo cubierto. Una persona versada en la técnica tendría conocimiento de los parámetros que pueden ser modificados para aumentar la señal detectada lo mismo que otras variaciones de los ensayos ELISA, conocidos en la técnica. En una realización preferida, un ELISA se puede realizar cubriendo una placa de microtítulos de 96 pozos altamente enlazante (Costar) con $2\mu\text{g/ml}$ de rhu-IL-9 en PBS de un día para otro. Después de tres lavados con PBS, la placa se incuba tres veces con diluciones seriales de Fab a 25°C por 1 hora. Después de otros tres lavados con PBS, se agrega $1\mu\text{g/ml}$ de conjugada fosfatasa kappa alcalina antihumano y la placa se incuba durante 1 hora a 25°C . Después de tres lavadas con PBST, la actividad de la fosfatasa alcalina está determinada en el sustrato $50\mu\text{l/AMP/PPMP}$. Las reacciones se detienen y la adsorbancia a 560 nm se determina con un lector de microplaca VMAX. Para discusión adicional con respecto a ELISA, véase, por ej: Ausubel *et. al.*, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1.

La afinidad enlazante de un anticuerpo a un antígeno y la sustracción (off-rate) de una interacción anticuerpo-antígeno puede determinarse mediante ensayos de enlace competitivos. Un ejemplo de un ensayo de enlace competitivo es un radioinmunoensayo

que comprende la incubación de antígeno marcado (por ej: ^3H o ^{125}I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades mayores de antígeno no marcado y la detección del anticuerpo enlazado al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo para un polipéptido IL-9 y sustracciones (off-rate) de enlace se determinan a partir de los datos mediante el análisis scatchard plot. La competencia con un segundo anticuerpo también puede determinarse usando radioinmunoensayos. En este caso, un polipéptido IL-9 se incuba con un anticuerpo de la presente invención conjugado a un compuesto marcado (por ej: ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades mayores de un segundo anticuerpo no marcado.

En una realización preferida, el análisis cinético de BIAcore se utiliza para determinar el enlace y las sustracciones de anticuerpos de la invención a un antígeno del virus quimérico de la invención (por ej: un antígeno o epítipo de la espina dorsal del virus quimérico o un antígeno o epítipo de la proteína de fusión (*por ej:* un antígeno asociado con una enfermedad)). El análisis cinético de BIAcore comprende analizar el enlace y la disociación del polipéptido que comprende el antígeno de interés de pedazos con anticuerpos inmovilizados generados por los virus quiméricos de la invención en su superficie. Un estudio cinético de BIAcore típico implica la inyección de 250 μL de un reactivo anticuerpo (mAb, Fab) a concentración variada en tamponador HBS que contiene 0,005% Tween-20 sobre una superficie de chip sensor, en el que se ha inmovilizado el antígeno. La tasa de flujo se mantiene constante a 75 $\mu\text{L}/\text{min}$. Los datos de disociación se recogen durante 15 min o más, según sea necesario. Después de cada ciclo de inyección /disociación, el mAb enlazado se retira de la superficie del antígeno usando 1 minuto de pulsaciones breves de ácido diluido, habitualmente 10 a 100 mM HCl, aunque se emplean otros regenerantes según garanticen las circunstancias. Más específicamente, la medida de las tasas de asociación, k_{on} , y disociación, k_{off} , el polipéptido que comprende el antígeno está directamente inmovilizado en la superficie de chip sensor mediante el uso de químicas estándar del acoplamiento del amino, en otras palabras el método EDC/NHS (EDC= N-dietilaminopropil)-carbodiimida). En síntesis, una solución de 5 a 10 nM del polipéptido que comprende el antígeno en 10mM NaOAc, pH4 o pH5 se prepara y se pasa sobre la superficie EDC/NHS-activada, hasta que aproximadamente entre 30 y 50 RU de antígeno son inmovilizadas. Después de esto, los ésteres activos sin reaccionar se “taparon” con una inyección de 1M Et-NH₂. Una superficie en blanco, sin antígeno, se prepara bajo condiciones de inmovilización idénticas con propósitos de referencia. Luego de que se ha preparado una superficie conveniente, se prepara una serie de dilución adecuada de cada uno de los reactivos anticuerpos en HBS/Tween-20, y se pasa sobre las superficies del antígeno y la célula de referencia, las cuales se conectan en serie. El rango de concentraciones de anticuerpos

46

que se preparan varía, dependiendo de cuál se estime que será la constante de equilibrio de enlace, KD. Como se describió antes, el anticuerpo de enlace se retira después de cada ciclo de inyección /disociación usando un regenerante adecuado.

Los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención o fragmentos de los mismos también pueden ensayarse por su capacidad para inhibir el enlace de un antígeno del virus quimérico de la invención (por ej: un antígeno o epítipo de espina dorsal de virus quimérico o un antígeno o epítipo de la proteína de fusión (por ej: un antígeno asociado con una enfermedad)) a un receptor celular anfitrión usando técnicas conocidas por personas versadas en la técnica. Por ejemplo, las células que expresan receptores conocidos por enlazar dichos antígenos pueden contactarse con el antígeno en presencia o ausencia de un anticuerpo generado por los virus quiméricos de la invención o fragmento de los mismos y la capacidad del anticuerpo o fragmento del mismo para inhibir el enlace del antígeno pueden medirse mediante, por ejemplo, citometría de flujo o un ensayo de centelleo. El antígeno o el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo pueden marcarse con un compuesto detectable como una marca radiactiva (por ej: ^{32}P , ^{35}S , y ^{125}I) o una marca de fluorescencia (por ej: isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloifocianina, oftaldehído y fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre el antígeno y un receptor celular. Alternativamente, la capacidad de los anticuerpos generados por los virus quiméricos de la invención o fragmentos de los mismos para inhibir un antígeno del virus quimérico de la invención (por ej: un antígeno o epítipo de espina dorsal de virus quimérico o un antígeno o epítipo de la proteína de fusión (por ej: un antígeno asociado con una enfermedad)) de enlazarse a un receptor puede determinarse en ensayos con células libres. Por ejemplo, un polipéptido que comprende el antígeno puede contactarse con un anticuerpo o fragmento del mismo y se puede determinar la capacidad del anticuerpo o fragmento del anticuerpo para inhibir el polipéptido de enlazarse a un receptor celular. Preferiblemente, el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo se inmoviliza en un soporte sólido y el polipéptido se marca con un compuesto detectable. Alternativamente, un polipéptido que comprende el antígeno se inmoviliza en un soporte sólido y el anticuerpo o fragmento del mismo se marca con un compuesto detectable.

5.6.2 Ensayos *in vivo*

La virulencia de los virus quiméricos de la presente invención puede evaluarse en un sujeto, en particular aves, o en un modelo animal del mismo. En un ejemplo, la capacidad para inducir lesiones pulmonares y causar infección en un modelo animal de infección con el virus se compara con los virus tipo silvestre y mock. Las lesiones pulmonares pueden evaluarse como un porcentaje de los lóbulos pulmonares que están

saludables mediante inspección visual. A los animales se les aplica eutanasia 5 días p.i. mediante administración intravenosa de pentobarbital, y se extraen los pulmones en su totalidad. El porcentaje de la superficie de cada lóbulo pulmonar que está afectado por lesiones macroscópicas se estima visualmente. Los porcentajes se promedian para obtener un valor medio para los 7 lóbulos pulmonares de cada animal. En otros ensayos, pueden probarse hisopos nasales para determinar la carga o título del virus. Los hisopos nasales pueden tomarse durante la necropsia para determinar la carga viral post-infección.

Para cuantificar el virus en muestras de tejido, dichas muestras se homogenizan en una solución salina tamponada con fosfato (PBS), y diluciones de homogenados aclarados adsorbidos por 1 hora a 37°C en monocapas de células por ej: CEF o células MDCK). Luego, las monocapas infectadas se cubren con una capa de una solución de un medio esencial mínimo que contiene 0,1 % de albúmina de suero bovino (BSA), 0,01% de DEAE-dextran, 0,1% de NaHCO₃ y 1% de agar. Las láminas se incuban de 2 a 3 días hasta que se puedan visualizar las placas. Los ensayos en dosis infecciosas de cultivo (TCID) para titular virus de muestras infectadas PR8 se realizan como sigue. Las monocapas de células confluentes, (por ej: CEF o células MDCK) en placas de 96 pozos son incubadas con diluciones log de tejido aclarado en el medio. Dos a tres días después de la inoculación, cantidades de 0,05ml de cada pocillo son evaluadas para determinar el crecimiento viral mediante ensayo de hemaglutinación (ensayo HA).

Aún en otros ensayos, las evaluaciones histopatológicas se realizan después de la infección. Turbinatos nasales y de la tráquea pueden examinarse para establecer cambios epiteliales e inflamación subepitelial. Los pulmones pueden examinarse para establecer cambios epiteliales bronquiolares e inflamación peribronquiolar en bronquiolos grandes, medianos, pequeños o terminales. Los alvéolos también son evaluados para establecer cambios inflamatorios. Los bronquiolos medios se califican en una escala de 0 a 3+ como sigue: 0 (normal: recubiertos por células epiteliales columnares medias a grandes con bordes apicales ciliados y núcleos basales y pseudoestratificados; inflamación mínima); 1+ (capa epitelial columnar e incluso en el contorno solamente con proliferación levemente incrementada; cilios aún visibles en muchas células); 2+ (cambios prominentes en la capa epitelial que oscilan entre atenuación hasta proliferación marcada; células desorganizadas y contorno de capa irregular en el borde luminal); 3+ (capa epitelial marcadamente afectada y desorganizada con células necróticas visibles en el lumen; algunos bronquiolos atenuados y otros en marcada proliferación reactiva).

La tráquea se califica en una escala de 0 a 2.5+ como sigue: 0 (normal: recubierta

46

por células epiteliales columnares medias a grandes con bordes apicales ciliados y núcleos basales y pseudoestratificados. Citoplasma evidente entre el borde apical y el núcleo. Pequeños focos ocasionales con células escamosas); 1+ (metaplasia escamosa focal de la capa epitelial); 2+ (metaplasia escamosa difusa en gran parte de la capa epitelial, los cilios pueden ser evidentes focalmente); 2.5+ (metaplasia escamosa difusa con muy pocos cilios evidentes).

La inmunohistoquímica del virus se realiza usando un anticuerpo monoclonal viral específico (por ej: anticuerpos monoclonales NP-, N- o HN específicos). El manchado se califica de 0 a 3+ como sigue: 0 (células no infectadas); 0,5+ (pocas células infectadas); 1+ (pocas células infectadas, como células individuales ampliamente separadas); 1.5+ (pocas células infectadas, como células individuales ampliamente separadas y en pequeños racimos); 2+ (cantidades moderadas de células infectadas, usualmente afectando racimos de células adyacentes en porciones de la capa epitelial que recubre los bronquiolos, o en pequeños focos sublobulares en los alvéolos); 3+ (numerosas células infectadas, que afectan la mayoría de la capa epitelial de los bronquiolos, o se extienden en grande focos sublobulares en los alvéolos).

5.6.3 Determinar título viral

El título viral se determina inoculando diluciones seriales de virus quimérico en cultivos celulares (por ej: CEF o MDCK), embriones de pollo o animales vivos (por ej: aves). Después de la incubación del virus por un tiempo especificado, el virus es aislado usando métodos estándar.

El ensayo HA puede realizarse en placas de 96 pozos con fondo en V. Se incuban en PBS soluciones dobles seriales de cada muestra, durante 1 h en hielo con un volumen igual de una suspensión de 0,5% eritrocitos de pollo en PBS. Los pozos positivos contienen una capa homogénea adherente de eritrocitos de pollo; los pozos negativos contienen un granulado no adherente.

La cuantificación física del título del virus puede realizarse usando PCR aplicado a sobrenadantes virales (Quinn & Trevor, 1997; Morgan *et. al.*, 1990), ensayos de hemaglutinación, dosis infecciosas de cultivo de tejido (TCID₅₀) o dosis infecciosas en huevos (EID₅₀).

5.6.4 Estudios de toxicidad

La toxicidad y/o eficacia de las composiciones (por ej: formulaciones inmunogénicas) de la presente invención pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales experimentales, por ej: para

89

determinar la LD50 (la dosis letal para 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La tasa de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón de LD50/ED50. Las terapias que presentan índices terapéuticos grandes son preferidas. Aunque pueden usarse terapias que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de entrega que tenga como objetivos a dichos agentes en el sitio del tejido afectado, para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos con cultivos celulares y estudios animales pueden usarse para formular un rango de dosis de las terapias para uso en sujetos. La dosis de dichos agentes se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones en circulación que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango, dependiendo de la forma empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier terapia utilizada en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente en los ensayos con cultivos celulares. Una dosis se puede formular en modelos animales para lograr un rango de concentración de plasma en circulación que incluya la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición media-máxima de los síntomas) determinada en el cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar con más exactitud dosis útiles en sujetos (por ej: caballos). Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto desempeño

Además, cualesquier ensayos conocidos por personas versadas en la técnica pueden usarse para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de una composición (por ej., formulación de vacuna), una terapia de combinación divulgada en la presente invención para infección viral o una condición o síntomas asociados con ello, una infección diferente de una infección viral o una condición o síntoma asociado con ello, o una condición en la cual un virus quimérico atenuado de la invención se utiliza como un vector para inducir una respuesta inmune a un antígeno asociado con la condición.

5.7 Realizaciones específicas de la invención

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende una proteína de fusión, que tiene

- (i) Un ectodominio que comprende una secuencia péptida heteróloga, la cual comprende al menos un epítipo de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, o de un antígeno asociado con una enfermedad fusionado a

- 90
- (ii) una transmembrana y dominio citoplásmico de una glicoproteína codificada por un gen esencial de un virus de influenza,

en donde la proteína de fusión está incorporada en un virus de influenza aviar, en el cual la función del gen esencial es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa para el virus de influenza aviar. En algunas realizaciones, el gen esencial de un virus de influenza es un gen hemaglutinina (HA). En otras realizaciones, el gen esencial de un virus de influenza es un gen neuraminidasa (NA). En algunas realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar es atenuado. De acuerdo con estas realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar puede ser atenuado por mutaciones en el gen NS1.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende una proteína de fusión, que tiene

- (i) un ectodominio de una proteína NDV HN fusionado a
- (ii) una transmembrana y dominio citoplásmico de una proteína NA del virus de influenza,

en donde la proteína de fusión está incorporada en un virus de influenza aviar, en el cual la función de la proteína NA es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa al virus de influenza aviar. En algunas realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar es atenuado. De acuerdo con estas realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar puede ser atenuado mediante mutaciones en el gen NS1.

La presente invención provee un virus quimérico atenuado de influenza, que comprende una proteína de fusión, que tiene

- (i) un ectodominio que comprende una secuencia péptida heteróloga, la cual comprende al menos un epítipo de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, o de un antígeno asociado con una enfermedad de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, fusionado a
- (ii) una transmembrana y dominio citoplásmico de una glicoproteína codificada por un gen esencial de un virus de influenza,

en donde la proteína de fusión está incorporada en un virus atenuado de influenza, en el cual la función del gen esencial es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa al virus atenuado de influenza. En algunas realizaciones, el gen esencial de un virus de influenza es un gen hemaglutinina (HA). En otras realizaciones,

el gen esencial de un virus de influenza es un gen neuraminidasa (NA).

La presente invención provee a NDV quimérico, que comprende una proteína de fusión, que tiene

- (i) un ectodominio que comprende una secuencia péptida heteróloga, la cual comprende al menos un epítipo de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo NDV, o de un antígeno asociado con una enfermedad fusionado a
- (ii) una transmembrana y dominio citoplásmico de una glicoproteína codificada por un gen esencial de un NDV,

en donde la proteína de fusión se incorpora en un NDV, en el cual la función del gen esencial es suministrada por la proteína de fusión o por la glicoproteína nativa al NDV.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento NA empaquetado del virus de influenza que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en la cual el marco de lectura abierto NA se modifica de manera que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno neuraminidasa de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-N, de modo que la proteína de fusión neuraminidasa se expresa e incorpora en el virus quimérico de influenza aviar.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento HA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión hemaglutinina, en la cual el marco de lectura abierto HA se modifica de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio HA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno hemaglutinina de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-C, de modo que la proteína de fusión de hemaglutinina se expresa e incorpora en el virus quimérico de influenza aviar.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento HA empaquetado bicistrónico de virus de influenza, que comprende:

- (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína hemaglutinina de influenza aviar, y
- (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión hemaglutinina, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio

92

de hemaglutinina son reemplazados por nucleótidos que codifican una secuencia péptida heteróloga, la cual comprende al menos un epítipo de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, o de un antígeno asociado con una enfermedad que está anclado por el extremo-C,

de modo que la hemaglutinina y la proteína de fusión de la influenza son expresadas e incorporadas en el virus quimérico de influenza aviar.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento NA empaquetado bicistrónico de virus de influenza, que comprende:

- (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína neuraminidasa de influenza aviar, y
- (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio de neuraminidasa son reemplazados por nucleótidos que codifican una secuencia péptida heteróloga, la cual comprende al menos un epítipo de un antígeno protector de un agente infeccioso, diferente de influenza, o de un antígeno asociado con una enfermedad que está anclado por el extremo-N,

de modo que la neuraminidasa y la proteína de fusión de la influenza son expresadas e incorporadas en el virus quimérico de influenza aviar.

La presente invención provee un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento NA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en la cual el marco de lectura abierto NA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno HN de NDV, de modo que la proteína de fusión neuraminidasa es expresada e incorporada en el virus quimérico de influenza aviar.

En algunas realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar de los párrafos 209 a 211 y 213 a 217 los cuales comprenden un segmento empaquetado del gen NS1 que codifica una proteína NS1 modificada que reduce la actividad antagonista de interferón celular del virus, En otras realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar de los párrafos 209 a 211 y 213 a 217 que comprende un segmento HA que tiene un marco de lectura abierto modificado para remover el sitio de escisión polibásica de la hemaglutinina. Aún en otras realizaciones, el virus quimérico de influenza aviar del párrafo 215, en el cual el primer marco de lectura abierto es modificado para retirar el

M

sitio de escisión polibásica de la hemaglutinina.

La presente invención provee una molécula recombinante de ácido nucleico (por ej: moléculas de ADN recombinante) que codifica el segmento NA de los parágrafos 213 y 216. La presente invención también provee moléculas de ácido nucleico recombinante (por ej: moléculas de ADN recombinante) que codifican el segmento HA de los parágrafos 214 a 215.

La presente invención provee métodos para propagar los virus quiméricos de influenza aviar de los parágrafos 209 a 211 y 213 a 218, que comprende cultivar los virus quiméricos de influenza aviar en un huevo embrionado o una línea celular que sea susceptible de una infección por virus de influenza aviar. La presente invención también provee métodos para producir una formulación inmunogénica, el método que comprende:

- (a) propagar el virus quimérico de influenza aviar de los parágrafos 209 a 211 y 213 a 218 en un huevo embrionado o una línea celular que sea susceptible de una infección por virus de influenza aviar; y
- (b) recolectar el virus progenie,

en donde el virus se cultiva en cantidades suficientes y bajo condiciones adecuadas para quedar libre de contaminación, de modo que el virus progenie sea adecuado para usar en una formulación inmunogénica, por ej: formulación de vacuna.

La presente invención provee un virus quimérico atenuado de influenza, que comprende un segmento NA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en el cual el marco de lectura abierto NA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno neuraminidasa de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-N, de modo que la proteína de fusión neuraminidasa es expresada e incorporada en el virus quimérico atenuado de influenza aviar.

La presente invención provee un virus quimérico atenuado de influenza, que comprende un segmento HA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en la cual el marco de lectura abierto HA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio HA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno hemaglutinina de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-C, de modo que la proteína de fusión hemaglutinina es expresada e incorporada en el

94

virus quimérico atenuado de influenza.

La presente invención provee un virus quimérico atenuado de influenza aviar, que comprende un segmento HA empaquetado bicistrónico de virus de influenza, que comprende:

- (a) un primer marco de lectura abierto que codifica que codifica una proteína hemaglutinina de influenza aviar, y
- (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión hemaglutinina, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio de la hemaglutinina son reemplazados por nucleótidos que codifican una proteína heteróloga, dicha proteína que contiene un epítipo de un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, o de un antígeno que está asociado con una enfermedad, dicha proteína de fusión anclada por el extremo-C,

de modo que la hemaglutinina y la proteína de fusión de la influenza son expresadas e incorporadas en el virus quimérico atenuado de influenza.

La presente invención provee un virus quimérico atenuado de influenza, que comprende un segmento NA empaquetado bicistrónico de virus de influenza, que comprende:

- (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína neuraminidasa de influenza aviar, y
- (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio de neuraminidasa son reemplazados por nucleótidos que codifican una proteína heteróloga, dicha proteína contiene un epítipo de un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, o de un antígeno que está asociado con una enfermedad, dicha proteína de fusión anclada por el extremo-N,

de modo que la neuraminidasa y la proteína de fusión de la influenza son expresadas e incorporadas en el virus quimérico atenuado de influenza.

En algunas realizaciones, el virus quimérico atenuado de influenza de los párrafos 221 a 224, el cual comprende un segmento empaquetado del gen NS1 que codifica una proteína NS1 modificada que reduce la actividad antagonista de interferón celular del virus. En algunas otras realizaciones, el virus quimérico atenuado de influenza de los párrafos 221 a 224, el cual comprende un segmento HA que tiene un marco de

lectura abierto modificado para remover el sitio de escisión polibásica de la hemaglutinina. En otras realizaciones, el virus quimérico atenuado de influenza del párrafo 223, en el cual el primer marco de lectura abierto es modificado para remover el sitio de escisión polibásica de la hemaglutinina.

La presente invención provee moléculas de ADN recombinante que codifican el segmento NA de los párrafos 221 y 224. La presente invención también provee moléculas de ADN recombinante que codifican el segmento HA de los párrafos 222 a 223.

La presente invención provee métodos para propagar los virus quiméricos atenuados de influenza de los párrafos 221 a 225, que comprende cultivar los virus quiméricos atenuados de influenza en un huevo embrionado o una línea celular que sea susceptible a infección con el virus de influenza aviar. La presente invención también provee métodos para producir una formulación inmunogénica, el método que comprende:

- (a) propagar el virus quimérico atenuado de influenza de los párrafos 211 y 221 a 225 en un huevo embrionado o una célula que es susceptible a infección por virus atenuado de influenza; y
- (b) recolectar el virus progenie,

en donde el virus se cultiva en cantidades suficientes y bajo condiciones adecuadas para que esté libre de contaminación, de modo que el virus progenie sea apto para usar en una formulación inmunogénica, por ej: formulación de vacuna.

La presente invención provee a NDV quimérico, que comprende un genoma empaquetado que comprende una secuencia nucleótida que codifica una proteína de fusión de la proteína F que tiene los dominios de transmembrana y citoplásmico de una proteína F y el ectodominio de un antígeno de un agente infeccioso salvo NDV que está anclado por el extremo C, de modo que la proteína de fusión de la proteína F es expresada e incorporada en el NDV quimérico.

La presente invención provee un NDV quimérico, que comprende un genoma empaquetado que comprende una secuencia nucleótida que codifica una proteína de fusión HN que tiene los dominios de transmembrana y citoplásmico de una proteína HN y el ectodominio de un antígeno de un agente infeccioso salvo NDV que está anclado por el extremo N, de modo que una proteína de fusión HN es expresada e incorporada en el NDV quimérico.

En algunas realizaciones, el genoma del NDV quimérico de los párrafos 213 y 228 a 229 comprende una secuencia nucleótida que codifica una proteína F, de modo que la proteína F es expresada e incorporada en el NDV quimérico, en adición a la proteína de fusión de la proteína F. En otras realizaciones, la secuencia nucleótida que codifica la proteína de fusión de la proteína NDV F reemplaza la secuencia nucleótida que codifica la proteína NDV F y la proteína de fusión de la proteína F provee la función de la proteína F para el NDV quimérico del párrafo 228.

En algunas realizaciones, el genoma del NDV quimérico de los párrafos 212 y 223 a 224 comprende una secuencia nucleótida que codifica una proteína HN, de modo que la proteína HN es expresada e incorporada en el NDV quimérico. En otras realizaciones, la secuencia nucleótida que codifica la proteína de fusión HN reemplaza la secuencia nucleótida que codifica la proteína NDV HN y la proteína de fusión HN provee la función de la proteína HN para el NDV quimérico del párrafo 229.

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

- (a) propagar el NDV quimérico de los párrafos 212 y 228 a 229 en un huevo embrionado o una célula; y
- (b) recolectar el virus progenie,

en donde el virus se cultiva en cantidades suficientes y bajo condiciones adecuadas para quedar libre de contaminación, de modo que el virus progenie sea apto para usar en una formulación inmunogénica, por ej: formulación de vacuna.

La presente invención provee huevos embrionados que comprenden los virus quiméricos de los párrafos 209 a 210, 212 a 218 y 228 a 229. La presente invención también provee líneas celulares que comprenden los virus quiméricos de los párrafos 209 a 210, 212 a 218 y 228 a 229. La presente invención además provee formulaciones inmunogénicas que comprenden los virus quiméricos de los párrafos 209 a 210, 212 a 218 y 228 a 229.

La presente invención provee un huevo embrionado que comprende los virus quiméricos atenuados de los párrafos 211 y 221 a 225. La presente invención también provee líneas celulares que comprenden los virus quiméricos atenuados de los párrafos 211 y 221 a 225. La presente invención además provee formulaciones inmunogénicas

97

que comprenden los virus quiméricos atenuados de los párrafos 211 y 221 a 225.

La presente invención provee métodos para inducir una respuesta inmune de dos agentes infecciosos en un ave, el método que comprende administrar una cantidad efectiva de un virus quimérico de influenza aviar de los párrafos 209 a 210 y 213 a 218. La presente invención también ofrece métodos para inducir una respuesta inmune de dos agentes infecciosos en un ave, el método que comprende administrar una cantidad efectiva de un NDV quimérico de los párrafos 212 y 228 a 229. La presente invención además provee métodos para inducir una respuesta inmune a dos agentes infecciosos en un sujeto, el método que comprende administrar una cantidad efectiva de un virus quimérico atenuado de influenza de los párrafos 211 y 221 a 225. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano (por ej: un cerdo, caballo, perro, gato o bovino). Aún en otras realizaciones, el sujeto es un sujeto aviar.

6. EJEMPLOS

6.1 Diseño de virus quimérico de influenza aviar que presenta un epítipo del virus de la enfermedad de Newcastle

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

6.1.1 Materiales y Métodos

6.1.1.1 Construcción de plásmidos

Todas las construcciones de plásmidos para rescate sólo en plásmido de virus recombinantes se clonaron usando la misma estrategia. Los cADN de longitud completa de segmentos virales fueron amplificados usando PCR con primers que incluyeron sitios de restricción *SapI*, los cuales permitieron la inserción del producto PCR en los sitios *SapI* del plásmido pPol1-SapI-Rb (Flandorfer *et. al.*, 2003, *J. Virol.* 77:9116-9123; Nakaya *et. al.*, 2001, *J. Virol.* 75:11868-11873; ambos están incorporados en su totalidad mediante referencia en la presente invención). Las secuencias de todos los insertos PCR fueron confirmadas (instalación de secuenciación ADN Monte Sinaí, NY), y los cambios de nucleótido que se habían introducido por PCR fueron corregidos usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange XL (Stragene, La Jolla, CA) cuando fue

adecuado. Las secuencias de GenBank para la Influenza A/Vietnam/1203/04 (H5N1), Influenza A/WSN/33 (WSN) y NDV se presentan en la Tabla 2

TABLA 2. Número de acceso a GenBank de segmentos de virus

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

6.1.1.2 Construcción de segmento viral quimérico

Un cADN que codifica el ectodominio NDV B1 HN y los dominios de la cola citoplásmica (CT) y de transmembrana (TM) de la neuraminidasa (NA) de influenza A/WSN/33 (A/Vietnam/1203/04 -A/WSN/33 NA_(CT+TM)-NDV B1 HN_(ecto)) se construyó usando técnicas recombinantes reconocidas. La construcción codifica 19 nucleótidos de la región 3' no codificada del WSN NA vARN, nucleótidos que codifican los amino ácidos 1 a 36 (108 nucleótidos) de la región codificada NA, correspondiente a los dominios de cola citoplásmica y de transmembrana de la proteína NA más el primer amino ácido del ectodominio NA, seguido por nucleótidos que codifican amino ácidos 51 a 568 de la proteína NDV B1 HN (ectodominio HN), dos codones secuenciales de detención, 157 nucleótidos no trasladados del marco de lectura WSN NA y la región 5' no codificada de WSN vARN (FIG.1).

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

Las construcciones de plásmidos se crearon para producir, mediante rescate sólo en plásmido, un virus quimérico basado en H5N1 (el virus anfitrión) diseñado para presentar una glicoproteína de superficie NDV. El segmento de H5N1 que codifica la glicoproteína de superficie NA se seleccionó para ser reemplazado con un segmento recombinante que comprende una secuencia nucleótida que codifica los dominios CT y

99

TM de la proteína NA más el primer amino ácido del ectodominio NA de A/WSN/33 y el ectodominio de la proteína HN de NDV-B1. La proteína de fusión, A/Vietnam/1203/04 -A/WSN/33 NA_(CT+TM)-NDV B1 HN_(ecto), suministra la actividad de neuraminidasa para el virus quimérico de influenza aviar. Véase la FIG.1 para un esquema del segmento quimérico.

Los siete segmentos restantes de H5N1 listados en la Tabla 2 (NS, M, NP, HA, PA, PB1 y PB2) fueron clonados en pPol1 para producir pPol1VN1203-NS, pPol1VN1203-M, pPol1VN1203-NP, pPol1VN1203-HA, pPol1VN1203-PA, pPol1VN1203-PB1 y pPol1VN1203-PB2, respectivamente, para garantizar la atenuación del virus quimérico H5N1, el segmento que codifica H5N1 HA fue alterado para convertir la secuencia de amino ácidos polibásica nativa inmediatamente antes del sitio de escisión HA (nucleótidos 1013 a 1039 de la secuencia de codificación H5N1 HA) para una secuencia de consenso basada en cepas aviares avirulentas de influenza A H5. La secuencia de amino ácidos en esta región fue alterada de QRERRRKKRG (SEQ ID NO:11; amino ácidos 2 a 11 de SEQ ID NO:14) a QRETRG (SEQ ID NO: 12; amino ácidos 2 a 7 de SEQ ID NO:16), reemplazando los amino ácidos subrayados con treonina (FIG. 2). El uso del codón en esta región fue alterado además para reducir el número de residuos de adenosina, para minimizar la oportunidad de reintroducción de residuos de adenosina en esta secuencia por errores de la ADN polimerasa o “polymerase slippage” y la introducción resultante de residuos de amino ácidos básicos en el sitio de escisión HA. Solamente se introdujeron mutaciones sinónimas en la secuencia HA avirulenta (FIG. 3). El segmento resultante que codifica la glicoproteína HA alterada, que corresponde a cepas de influenza A de baja virulencia, fue clonada en un plásmido pPol1 como se describió previamente, pPol1VN1203-HALO. Con excepción de PB1 y PB2, los productos de gen codificado por los segmentos de H5N1 no fueron alterados de las secuencias de Genbank. Las secuencias de PB1 y PB2 fueron alteradas como un resultado de la introducción de los sitios de restricción *SapI*. Una sustitución no sinónima con el nucleótido guanina en la posición 32 de la secuencia de codificación de PB1 resultó en una mutación lisina a arginina; la sustitución no sinónima con el nucleótido timina en la posición 1393 de la secuencia de codificación de PB2 resultó en una mutación prolina a serina. Todos los productos de gen de H5N1 tienen un residuo de adenosina en la posición 4 del vARN.

Además de la construcción de plásmido que codifica H5N1 NS tipo silvestre NS, pPol1VN1203-NS, tres construcciones pPol1 que codifican versiones truncadas de manera diferente del segmento del gen H5N1 NS también fueron generadas. Las construcciones adicionales que codifican versiones alteradas del segmento NS pueden usarse para atenuar más adelante el virus quimérico resultante (véase, por ej: Patente de

100

EE.UU. 6.669.943, que está incorporada en su totalidad en la presente invención mediante referencia). Las tres construcciones variaron en el número de amino ácidos de la proteína NS1 (del extremo amino) que son expresadas por la construcción del plásmido. pPol1VN1203 NS1-126, pPol1VN1203 NS1-99 y pPol1VN1203 NS1-73 por lo tanto codifica solamente los primeros 126, solamente los primeros 99 y solamente los primeros 73 amino ácidos del extremo amino de la proteína NS1 del tipo silvestre, respectivamente. La mutagénesis para generar construcciones truncadas no afectó el marco de lectura abierto de NEP (FIG. 4).

6.1.1.4 Rescate de virus infecciosos de construcciones de plásmidos

Los virus quiméricos recombinantes de la invención son rescatados por cualquier medio descrito en la presente invención o conocido en la técnica. Por ejemplo, las células 293T, HEP-2 o A549 pueden ser transfectadas con ocho de los plásmidos pPol1 descritos, seleccionados para lograr un nivel deseado de atenuación viral y de modo que los ocho segmentos están representados, es decir, las células son transfectadas con pPol1VN WSN-NA_(CT+TM)-NDV B1 HN_(ecto); pPol1VN1203-HA o pPol1VN1203-HALO; pPol1VN1203-NS, pPol1VN1203 NS1-126, pPol1VN1203 NS1-99 o pPol1VN1203 NS1-73; pPol1VN1203-M; pPol1VN1203-NP; pPol1VN1203-PA; pPol1VN1203-PB1 y pPol1VN1203-PB2. Las células además son transfectadas con plásmidos de expresión eucariótica que codifican NA, PA, PB 1 y PB2, los cuales son requeridos para replicación y transcripción de los vARN. Después de incubación de un día para otro, las células transfectadas pueden cocultivarse con fibroblastos de embriones de pollo para amplificar el virus producido. Después de una incubación adicional de 2 a 3 días, el sobrenadante del cocultivo puede inyectarse en las cavidades alantoicas de huevos de pollo embrionados de 9 o 10 días de edad para propagación. Para virus atenuados, pueden usarse huevos de 7 días de edad que no tienen un sistema de interferón competente. El cultivo de los virus puede confirmarse por ensayo recogiendo el fluido alantoico para hemaglutinación, según protocolos estándar conocidos en la técnica.

6.2 Diseño de virus quimérico de la enfermedad de Newcastle que presenta un epítipo extraño

El siguiente ejemplo describe la producción de NDV quiméricos ejemplares. En particular, el ejemplo describe el diseño de un NDV quimérico para expresar e incorporar en su virión una proteína de fusión que los dominios de transmembrana y citoplásmico de una proteína de NDV necesaria y el ectodominio de un virus de influenza aviar. El ejemplo demuestra que un virus quimérico de esta clase induce protección contra la

infección subsiguiente por el virus de influenza y el NDV.

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

6.2.1 Materiales y Métodos

6.2.1.1 Líneas celulares

Las células MDCK, HEp-2 y A549 fueron cultivadas en el Medio Tagle Modificado de Dulbecco (*Modified Eagle Medium de Dulbecco* - DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% penicilina/estreptomicina. El cADN de longitud completa de la cepa Hitchner B1 de NDV ha sido publicado bajo el número de acceso de Genbank AF375823 (Nakaya *et. al.*, 2001, *J. Virol.* 75:11868-11873, en cual está incorporado en su totalidad en la presente invención mediante referencia).

6.2.1.2 Construcción de plásmidos

El diseño de cADN recombinante de NDV para codificar una proteína externa ha sido descrito (Nakaya *et. al.*, 2001, *J. Virol.* 75:11868-11873). En síntesis, el cADN de longitud completa de NDV se introduce en un plásmido entre el promotor T7 y el ribosoma del virus delta de la hepatitis (HDV) y el terminador T7 para crear pNDV/B1. El cADN NDV tiene un sitio *Xba*II entre los genes P y M que permite la introducción de secuencias extrañas como una unidad extratranscripcional en el genoma NDV (FIG. 5). Todos los genes insertados están diseñados para contener, secuencialmente, un extremo del gen; 5'-TTAGAAAAAA-3' (SEQ ID NO:18); nucleótido intercistrónico T; y la secuencia de inicio del gen; 5'-ACGGGTAGAA-3' (SEQ ID NO: 19) (la secuencia GE/GS).

Los virus rNDV/B1-KGFR, rNDV/B1-KGFR/F-CT y rNDV/B1-H7HA/F-TMCT fueron generados mediante genética inversa de las copias de cADN de longitud completa de la cepa NDV Hitchner B1. Para construir estos virus, el KGFR o HA H7 (proteína HA de influenza A subtipo H7N2) ORF fue clonado como una unidad transcripcional extra entre los genes P y M genes de cADN NDV/B1, como se describe para otros ORF (Nakaya *et. al.*, 2001, *J. Virol.* 75:11868-11873 y Nakaya *et al.*, 2004, *J. Virol.* 78:9366-9375, los cuales están incorporados en su totalidad en la presente invención mediante referencia). KGFR y HA H7 son proteínas de transmembrana, cada una comprende un dominio TM y CT. En la construcción KGFR/F-CT, el dominio CT de la proteína KGFR fue reemplazado por el de la proteína F de NDV. En la construcción HA H7/F-TMCT,

los dominios TM y CT de la proteína H7 HA fueron reemplazados por los de la proteína F de NDV. Los virus NDV recombinantes fueron rescatados del cADN y propagados usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica (véase, por ej: Swayne *et. al.*, 2003, *Avian Dis.* 47: 1047-1053 y Nakaya *et. al.*, 2001, las cuales están incorporadas en su totalidad en la presente invención mediante referencia). La inserción de las nuevas unidades transcripcionales en los virus recombinantes fue confirmada mediante transcripción inversa PCD seguida por análisis de secuenciación.

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

6.2.1.3 Análisis Western Blot y biológico

Los virus de extractos alantoicos o celulares fueron purificados con ultracentrifugación mediante un cojín de sacarosa al 30%. Los niveles de proteína incorporada fueron monitoreados mediante análisis Western blot usando técnicas de rutina y anticuerpo específicas.

La capacidad del NDV quimérico para presentar el KGFR de la proteína no viral *in vivo* se determinó mediante inmunización de ratones BALB/c con 3×10^7 pfu del virus quimérico por vía intraperitoneal, seguida por una inmunización booster usando la misma dosis tres semanas más tarde. Dos semanas después de la segunda inmunización, se probó suero de los animales inoculados para determinar la presencia de anticuerpos para KGFR por inmunomanchado de células MDCK transfectadas con un plásmido que codifica KGFR.

Un sistema *in vitro* fue diseñado para evaluar si la inmunización con el rNDV

comprende el híbrido HA H7/F-TMCT pudo brindar protección contra infección subsiguiente por H7 o NDV. Se inmunizaron pollos de dos semanas por el método ocular con 100 μ l de tres vacunas, rNDV, rNDV – H7 HA/F-TMCT y Sham. A las 4 semanas de edad, 100 μ l que comprenden $10^{5.1}$ dosis media de embrión infectado de HP AIV (A/Steele/ACC-10/59 [H7N7]) fue administrado a través de la coana. Se observó a las aves en busca de señales y lesiones de infección HP AIV. Se registró la mortalidad, y a todos los sobrevivientes se les aplicó eutanasia con pentobarbital sódico (100 mg/kg) a las 6 semanas de edad.

6.2.2 Resultados

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

Los virus quiméricos rNDVB1-KGFR y rNDV/B1-KGFR/F-CT se cultivaron en la cavidad alantoica de huevos de pollo embrionados de 10 días de edad. Los purificados se probaron para establecer la presencia de KGFR o KGFR/F-CT mediante análisis Western blot, usando un anticuerpo anti-KGFR de ratones. Se detectó una respuesta positiva en las muestras aisladas de huevos inoculados con rNDV/B1-KGFR/F-CT pero no con rNDV/B1-KGFR (FIG. 6).

Cada uno de estos virus quiméricos también se usó para inmunizar tres ratones BALB/c. El suero de los animales inmunizados se ensayó para establecer la presencia de anticuerpos KGFR. Los animales inmunizados con virus rNDV/B1-KGFR no desarrollaron niveles detectables de anticuerpos KGFR usando este ensayo. En contraste, los tres animales inmunizados con virus rNDV/B1-KGFR/F-CT fueron positivos con este ensayo para la presencia de anticuerpos KGFR.

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

Los dominios TM y CT de H7 HA del tipo silvestre fueron reemplazados por los dominios TM y CT de la proteína NDV F para generar una proteína HA híbrida, H7HA_{ecto}-NDV/F_(TM+CT). En un análisis Western blot, el rNDV de control que expresa el ORF completo de H7 HA, rNDV-H7HA, y el rNDV quimérico que expresa el híbrido H7HA_{ecto}-NDV/F_(TM+CT), rNDV-H7HA_{ecto}-NDV/F_(TM+CT), generaron una reacción positiva ante el anticuerpo H7; sin embargo, la señal de rNDV- H7HA_{ecto}-NDV/F_(TM+CT) visiblemente fue muchas veces más fuerte (FIG. 7). Cuando los pollos se inmunizaron una vez con rNDV- H7HA_{ecto}-NDV/F_(TM+CT) fueron retados posteriormente con una dosis letal de H7 influenza, 9 de cada 10 (90%) pollos inmunizados, sobrevivieron. Cuando los pollos inmunizados una vez con rNDV-H7HA_{ecto}-NDV/F_(TM+CT) fueron

104

retados posteriormente con una dosis letal de NDV, 10 de cada 10 (100%) pollos inmunizados sobrevivieron.

6.3. Diseño de virus quimérico de la enfermedad de Newcastle que presenta un epítipo extraño

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

6.3.1 Materiales y Métodos

Excepto cuando esté indicado de otro modo, todos los Materiales y Métodos descritos en la sección son idénticos a los que están descritos y ejemplificados en el Ejemplo 6.2, anterior.

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

Los virus NDV recombinantes, rNDV/F2aa y rNDV/F3aa, que tienen dos o tres mutaciones de amino ácidos en el sitio de escisión F de la cepa NDV Hitchner B1 fueron generados por genética inversa. En síntesis, para generar rNDV/F2aa, el fragmento PCR fue generado con el uso de primeros, hacia delante: F2aa-1(+) 5'-GGA TCC CGG TTG GCG CCC TCC AGG (SEQ ID NO:24), hacia atrás, F2aa-1(-) 5'-AAG GCG CCt CTG TCT CCg CCC TCC AGA TGT AGT CAC AG-3' (SEQ ID NO:25) y el clon NDV B1 de longitud completa, plásmido pT7NDV/B1, como plantilla. El siguiente fragmento PCR se generó usando primeros, hacia delante F2aa-2(+) 5'-GGc GGA GAC AGa GGC GCC TTA TAG GCG CCA TTA TTG G-3' (SEQ ID NO:26), hacia atrás, F2aa-2(-) 5'-CCA TAT TCC CAC CAG CTA GAT TGT-3' (SEQ ID NO:27) y el pT7NDV/B1 como plantilla. Los nucleótidos que se muestran en minúscula son mutados para modificar la secuencia de amino ácidos del sitio de escisión de la proteína F de la cepa NDV/B1 (GGRQGR[L] a GRRQRR[L]. Estos dos fragmentos de PCR superpuestos (la superposición está subrayada en las secuencias primeras) fueron combinados por PCR con primeros, F2aa-1(+) y F2aa-2(-). El fragmento PCR resultante, que contiene el gen F completo, se clonó en pSL1180 (Amersham Pharmacia Biotech) y se denominó pSLF2aa. El fragmento *StuI-NoI* (nt 4646 a 4952) de pSLF2aa se sacó para reemplazar el fragmento correspondiente en el plásmido pT7NDV/B1, resultando en la formación del plásmido pT7NDV/F2aa, que se usó para generar el virus rNDV/F2aa mediante genética inversa. Para la generación de rNDV/F3aa, la mutagénesis de PCR se realizó

con la misma estrategia descrita previamente usando primeros, hacia delante, F3aa-1(+) 5'-GGA TCC CGG TTG GCG CCC TCC AGG-3' (SEQ ID NO:28); hacia atrás, F3aa-1(-) 5'-AAa GCG CCt CTG TCT CCg CCC TCC AGA TGT AGT CAC AG-3' (SEQ ID NO:29); hacia delante, F3aa-2(+) 5'-GGc GGA GAC AGa GGC GCt TTA TAG GCG CCA TTA TTG G-3' (SEQ ID NO:30); hacia atrás, F3aa-2(-) 5'-CCA TAT TCC CAC CAG CTA GAT TGT-3' (SEQ ID NO:31) (los nucleótidos mutados están en minúsculas) y el pT7NDV/B1 como plantilla. Estos dos fragmentos PCR superpuestos (la región superpuesta está subrayada en las secuencias primeras) se combinaron con PCR usando primeros F3aa-1(+) y F3aa-2(-), lo cual resulta en la modificación del sitio de escisión de GGRQGR↓L a GRRQRR↓F. El fragmento *StuI-NotI* (nt 4646 a 4952) de pSLF3aa se sacó para reemplazar el fragmento correspondiente en el plásmido pT7NDV/B1, resultando en la formación del plásmido pT7NDV/F3aa, el cual se utilizó para generar el virus rNDV/F3aa.

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

Para construir el gen H7 HA quimérico como una unidad transcripcional extra del genoma rNDV/F3aa, el fragmento que contiene la transmembrana (TM) y la cola citoplásmica (CYTO) del gen NDV F se produjo inicialmente con PCR usando primeros, *Hpa*NDV F(TM+CYTO)P, 5'-cgGT TAA CCT CAT TAC CTA TAT CGT TTT GAC T-3' (SEQ ID NO:32) y *Sac**Nhe*NDVF(TM+CYTO)M, 5'-cg GAG CTC AAG CTA GCT TAT CAC ATT TTT GTA GTG GCT CTC ATC TG-3' (SEQ ID NO:33) y el plásmido que contiene el gen NDV F como una plantilla. Este producto PCR fue digerido con *SacI* y *HpaI*, y después se clonó en el plásmido, p*Nhe*-NDV-GE/GS que posee la señal del extremo y del inicio del gen de NDV, resultando en la formación del plásmido, p*Nhe*-NDV-GE/GS-NDVF(TM+CYTO). Como el paso siguiente, permitir la conexión del fragmento que contiene el ectodominio H7 HA con el fragmento del TM y la región CYTO de NDV F, el ectodominio H7HA se produjo con PCR usando los primeros, *Spe*H7(ECTO)P, 5'-cgACT AGT CCG CCA CCA TGA ACA CTC AAA TTC TGG CAT TCA T-5' (SEQ ID NO:34), *Hpa*H7(ECTO)M, 5'-cgG TTA ACG TCT TTG TAT CCA CTA CTC AAT TTC AC-3' (SEQ ID NO:35) y el plásmido que contiene el gen H7 HA de A/pollo/NY/13142-5/94(H7N2) como plantilla. Este producto PCR se digirió con *Spe I* y *Hpa I*, y después se insertó en el plásmido casete, p*Nhe*-NDV-GE/GS-NDVF(TM+CYTO). En un paso final, el plásmido casete, p*Nhe*-NDV-GE/GS-NDV F(TM+CYTO) fue digerido con *Nhe I* para cortar el gen H7 HA quimérico. Este fragmento de ADN se clonó entre los genes P y M de pT7NDV/F3aa, formando pT7NDV/F3aa-quiméricoH7. El virus rNDV/F3aa que expresa la proteína H7 HA quimérica se rescató luego de pT7NDV/F3aa-quiméricoH7 usando los métodos descritos

106
previamente.

6.3.1.3 Cinética del crecimiento viral

Los virus rNDV/B1, rNDV/F2aa, rNDV/F3aa, rNDV/B1-H7 o rNDV/F3aa-quiméricoH7 (100 PFU/huevo) fueron inoculados en huevos de pollo embrionados de 10 días de edad. Se recogieron los fluidos alantoicos para determinar títulos virales en diferentes puntos en el tiempo (24 horas, 48 horas y 72 horas). El 50% de la dosis infectiva de cultivo del tejido (TCID₅₀) de cada virus presente en el fluido alantóico se determinó por ensayo de inmunofluorescencia (IFA). Para este propósito, placas de noventa y seis pozos con células Vero fueron infectadas con diluciones 10 veces seriales de las muestras, y la presencia de proteínas NDV o proteína H7 HA quimérica se determinó con IFA.

6.3.2 Ensayos de inmunofluorescencia

6.3.2.1 Ensayos de inmunofluorescencia

Las células MDCK infectadas con virus de influenza transfectado se fijaron y permeabilizaron con metanol helado. Los antígenos virales se detectaron con anticuerpo monoclonal anti-NDV HN (7B1), anticuerpo monoclonal H1 HA anti-influenza (2G9) y suero policlonal H5 HA anti-influenza. Para el análisis del crecimiento de NDV y la expresión de la proteína viral, se infectaron células Vero confluentes con los virus recombinantes, y se recogieron en diferentes momentos (24, 48, y 72 horas). Las células infectadas se fijaron con formaldehído al 2.5% con 0,1 % de Triton X-100. Las células fijadas se trataron con anticuerpo policlonal NDV anti-conejo o suero policlonal AIV H7 anti-pollo, se lavaron y tiñeron con isotiocianato de fluoresceína (FITC)-inmunoglobulinas anti-pollo conjugadas (DAKO) para proteína AIV H7 HA o inmunoglobulinas anti-conejo Texas Red-conjugadas (Sonda Molecular) para las proteínas virales NDV. La expresión de la proteína viral se examinó con microscopio de fluorescencia.

6.3.2.2 Media de tiempo muerto

Para verificar la patogenicidad de virus recombinantes en huevos embrionados de pollo, se determinó la media de tiempo muerto (MDT). En síntesis, cinco huevos embrionados de pollo de 10 días de edad fueron infectados con diluciones 10 veces seriales de virus. Los huevos se incubaron a 37°C y se monitorearon dos veces diarias durante 7 días. Se registró el tiempo para matar los embriones. La dilución más alta que mató a todos los embriones se determinó como la dosis letal mínima. El MDT se calculó como el tiempo medio para que la dosis letal mínima matara a los embriones.

6.3.2.3 Inmunización y desafío de pollos

Pollos Leghorn blancos fueron vacunados una vez o dos veces por vía ocular en el saco conjuntival con $10^{5.7-6.1}$ dosis medias de embriones de pollo infectados (EID₅₀) de rNDV/F3aa-quiméricoH7, o dos veces con $10^{5.7-6.3}$ EID₅₀ de NDV/B1 (pNDV) parental, o dos veces con medio estéril de tejido de cultivo (sham) a 2 y 4 semanas de edad. A 6 semanas de edad, los pollos fueron retados intranasalmente con la cepa Fontana de NDV velogénico (vvNDV) ($10^{5.1}$ EID₅₀ por ave) o A/Human/Steele/59 (H7N7) HPAI ($10^{5.1}$ EID₅₀ por ave). Los sobrevivientes fueron desangrados y se les aplicó eutanasia 14 días después del reto. Los títulos serológicos por inhibición de hemaglutinación (HI) se determinaron usando procedimientos estándar.

6.3.3 Resultados

6.3.3.1 Generación de mutantes rNDV fusogénicos

Para mejorar las características fusogénicas de la espina dorsal rNDV, se desarrollaron dos mutantes rNDV, virus rNDV/F2aa y rNDV/F3aa, en los cuales el sitio de escisión de una proteína F fue reemplazado con uno de dos sitios de escisión multibásicos variantes, los cuales pueden activarse mediante proteasas expresadas ubicuamente (por ej: proteasas de furina) (Fig. 8A). La infección de células de fibroblasto de embrión de pollo (CEF) con rNDV/F2aa y rNDV/F3aa, y no con rNDV/B1, resultó en formación de sincitia en ausencia de proteasa agregada exógenamente (Fig. 8B). Además, rNDV/F3aa indujo la sincitia más rápidamente en células CEF que rNDV/F2aa. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la expansión mejorada del virus en animales inmunizados puede aumentar la inmunogenicidad contra la proteína extraña insertada. Por lo tanto, el rNDV/F3aa fusogénico se seleccionó como un vector de espina dorsal para desarrollar una vacuna bivalente diseñada para proteger a las aves de corral contra AIV y NDV.

6.3.3.2 Análisis de la media de tiempo muerto de vectores plataforma rNDV en huevos de pollo embrionados

El NDV puede clasificarse como altamente virulento (velogénico), intermedio (mesogénico), o no-virulento (lentogénico) con base en su patogenicidad en pollos. Dado que la presencia de una proteína F con un sitio de escisión multibásico es conocida por ser un factor de virulencia NDV, evaluamos la patogenicidad de rNDV con proteína F modificada en huevos de pollo embrionados de 10 días de edad. La media de tiempo muerto (MDT) de embriones de pollo infectados con NDV se correlaciona con la virulencia *in vivo*. Las cepas lentogénicas (que causan infecciones asintomáticas en aves) se caracterizan por MDT de más de 90 horas, las cepas mesogénicas (que causan

168

enfermedad respiratoria en aves) tiene MDT entre 60 y 90 horas, y las cepas velogénicas (que causan enfermedad severa en aves) tienen MDT menor de 60 horas. El MDT de rNDV/F2aa fue indicativo de una cepa lentogénica, mientras que el de rNDV/F3aa fue típico de una cepa mesogénica. Ninguna de estas cepas tuvo MDT típico de una cepa altamente patogénica (velogénica) (Tabla 3).

Tabla 3. MDT de rNDV en huevos de pollo embrionados

Virus	Requerimiento de tripsina (cultivo celular)	Inoculación ED ₅₀	MDT, hr
rNDVB 1	Sí	10	113
		1	122
rNDV/F2aa	No	10	100
		1	104
rNDV/F3aa	No	10	80
		1	84
rNDV/B1-H7	Sí	10	Vivo
		1	Vivo
rNDV/3aa-quiméricoH7	No	10	128
		1	140

Con base en estos datos, el vector rNDV/F3aa no representaría una amenaza para aves y por lo tanto es apto como una espina dorsal para desarrollar una vacuna bivalente para la protección de aves de corral contra AIV y NDV.

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

El gen que codifica la proteína H7 HA de A/pollo/NY/131425/94(H7N2) se incorporó en el vector rNDV/F3aa como se describe previamente, resultando en la formación de rNDV/F3aa-quiméricoH7 (Fig. 9A). La cinética del crecimiento de rNDV/F3aaquiméricoH7 en huevos de pollo embrionados se comparó con la del rNDV/F3aa parental (Fig. 9B). El virus que expresa la proteína H7 HA quimérica creció más lentamente que el virus sin que los insertos y títulos fueron un log más bajo. Es interesante que, el MDT de este virus fue el de una cepa lentogénica (128 ~ 140 horas) (Tabla 3). La expresión de la proteína H7 HA quimérica de rNDV/F3aa-quiméricoH7 fue confirmada mediante Western blotting de células Vero infectadas 36 horas después de la

infección (Fig. 9C).

6.3.3.4 Incorporación mejorada de la proteína AIV H7 HA en viriones rNDV

Para determinar si la expresión de la proteína H7 HA quimérica que contiene las regiones heterólogas de la transmembrana y la cola citoplásmica de la proteína NDV F se asociaría con la incorporación ampliada en viriones rNDV, los viriones rNDV/B1-H7 y rNDV/F3aaquiméricoH7 fueron purificados como se describe en § 6.3. Las cantidades de proteína H7 HA o proteína viral NDV de rNDV/B1-H7 o rNDV/F3aa-quiméricoH7 fueron medidas por Western blotting usando anticuerpo policlonal AIV H7 anti-pollo o suero policlonal NDV anti-conejo. Como se esperó, la incorporación de la proteína H7 HA quimérica en viriones rNDV se aumentó significativamente en comparación con la de proteína wt H7 HA (Fig. 9D). Este dato sugiere que las regiones de transmembrana y cola citoplásmica de la proteína NDV F puede desempeñar un papel importante en la incorporación mejorada de la proteína externa en la superficie viral.

6.3.3.5 Inmunización y reto de pollos

Después de una o dos vacunaciones con rNDV/F3aa-quiméricoH7, 50% a 80% de los pollos tuvieron títulos de inhibición de hemaglutinación (HI) para H7 AIV y 90% a 100% de los pollos tuvieron títulos HI para NDV (Tablas 4A y B). Aunque todos los pollos inmunizados dos veces con el NDV/B 1 (pNDV) parental tuvieron títulos HI para NDV, ninguno tuvo títulos para H7 AIV. Todos los medios de cultivo de tejido estéril (sham) que infectaron a las aves carecían de títulos HI para cada virus. Cuando se retaron con vvNDV, 100% de los pollos inmunizados con rNDV/F3aa-quiméricoH7 y pNDV estuvieron protegidos. En comparación, 90% de los pollos vacunados con rNDV/F3aa-quiméricoH7 estuvieron protegidos contra el virus HPAI H7, pero ninguno de los pollos vacunados con pNDV estuvieron protegidos contra el virus HPAI H7 virus. En contraste, 100% y 70% de aves infectadas sham, murieron cuando se retaron con virus vvNDV y HPAI H7, respectivamente. Los sobrevivientes crearon una respuesta amnésica evidente como un aumento de cuatro veces o más en el título HI para el virus de reto respectivo, excepto para los tres sobrevivientes en el grupo de reto del virus sham-HPAI H7, que no tuvieron evidencia serológica de estar infectados.

Tabla 4A Serología HI de pollos inmunizados con virus quiméricos antes del reto

Grupo de vacuna*	Antígeno AIV/H7	Antígeno NDV
rNDV/F3aa-quiméricoH7, 1X	8/10(11)	10/10(49)
rNDV/F3aa-quiméricoH7, 1X	7/10(10)	10/10(49)
rNDV/F3aa-quiméricoH7, 2X	8/10(13)	9/10(56)
rNDV/F3aa-quiméricoH7, 2X	5/10(9)	9/10(60)
pNDV, 2X	0/10	10/10(34)
pNDV, 2X	0/10	10/10(56)
Sham, 2X	0/10	0/10
Sham, 2X	0/10	0/10

Tabla 4B Serología HI de pollos inmunizados con virus quiméricos después del reto (14 días después del reto)

Grupo de vacuna*	Virus del desafío	No. de sobrevivientes	Antígeno AIV/H7	Antígeno NDV
rNDV/F3aa-quiméricoH7, 1X	vNDV	10/10	9/10(15)	10/10(416)
rNDV/F3aa-quiméricoH7, 1X	HPAIV	9/10	9/9(2.048)	9/9(37)
rNDV/F3aa-quiméricoH7, 2X	vNDV	10/10	7/10(17)	10/10(315)
rNDV/F3aa-quiméricoH7, 2X	HPAIV	9/10	8/8(955)	8/8(30)
pNDV, 2X	vNDV	10/10	0/10	10/10(294)
pNDV, 2X	HPAIV	0/10	NA	NA
Sham, 2X	vNDV	0/10	NA	NA
Sham, 2X	HPAIV	3/10	0/3	0/3

Sham= fluido de cultivo de tejido estéril

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

La serología HI es conocida como el número de pollos con suero HI positivo/número de pollos vacunados; valores entre paréntesis son media geométrica de los títulos (GMT)

*n = 10 aves por grupo, 1X = una vacunación, 2X = 2 vacunaciones

La publicación titulada *Engineered Viral Vaccine Constructs with Dual Specificity: Avian Influenza y Newcastle Disease*, de Man-Seong Park *et. al.*, en PNAS 103:8203-8208 (2006) está incorporada en su totalidad en la presente invención mediante referencia.

6.4 Equivalentes

La presente invención no está limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas, las cuales están dirigidas a ser ilustraciones únicas de aspectos

individuales de la invención, y los métodos y componentes funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de las demostradas y descritas en la presente invención serán evidentes para aquellas personas versadas en la técnica de la descripción anterior y que acompañan los dibujos. Se pretende que esas modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones anexadas.

A lo largo de esta solicitud se han citado varias publicaciones. Sus contenidos están incorporados en su totalidad mediante referencia en la presente solicitud para todos los efectos.

REIVINDICACIONES:

1. Un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento NA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en el cual el marco de lectura abierto NA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno neuraminidasa de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-N, de modo que la proteína de fusión neuraminidasa es expresada e incorporada en el virus quimérico de influenza aviar.
2. Un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento HA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión hemaglutinina, en la cual el marco de lectura abierto HA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio HA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno enlazante /fusogénico del receptor de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-C, de modo que la proteína de fusión hemaglutinina es expresada e incorporada en el virus quimérico de influenza aviar.
3. Un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento HA empaquetado bicistrónico de virus de influenza, que comprende:
 - (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína hemaglutinina de influenza aviar, y
 - (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio de la hemaglutinina son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-C,de modo que la hemaglutinina y la proteína de fusión de la influenza son expresadas e incorporadas en el virus quimérico de influenza aviar.
4. Un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento NA empaquetado bicistrónico de virus de influenza, que comprende:
 - (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína neuraminidasa de influenza aviar, y

113

(b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio de neuraminidasa son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-N,

de modo que la neuraminidasa y la proteína de fusión de la influenza son expresadas e incorporadas en el virus quimérico de influenza aviar.

5. Un virus quimérico de influenza aviar, que comprende a segmento NA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en la cual el marco de lectura abierto NA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno HN de NDV, de modo que la proteína de fusión neuraminidasa es expresada e incorporada en el virus quimérico de influenza aviar.
6. El virus quimérico de influenza aviar de la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5 el cual comprende un segmento empaquetado del gen NS1 que codifica una proteína NS1 modificada que reduce la actividad antagonista de interferón celular del virus.
7. El virus quimérico de influenza aviar de la reivindicación 1, 4 o 5 el cual comprende un segmento HA que tiene un marco de lectura abierto modificado para remover el sitio de escisión polibásica de la hemaglutinina.
8. El virus quimérico de influenza aviar de la reivindicación 3, en la cual el primer marco de lectura abierto es modificado para remover el sitio de escisión polibásica de la hemaglutinina.
9. Una molécula de ADN recombinante que codifica el segmento NA de la reivindicación 1, 4 o 5.
10. Una molécula de ADN recombinante que codifica el segmento HA de la reivindicación 2 o 3.
11. Un método para producir una formulación inmunogénica; el método que comprende:
 - (a) propagar el virus quimérico de influenza aviar de la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5 en un huevo embrionado; y
 - (b) recolectar el virus progenie,

en donde el virus se cultiva en cantidades suficientes y bajo condiciones adecuadas para quedar libre de contaminación, de modo que el virus progenie es apto para usar

114

en una formulación inmunogénica.

12. Un método para producir una formulación inmunogénica; el método que comprende:
 - (a) propagar el virus quimérico de influenza aviar de la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5 en una línea celular que es susceptible a una infección por virus de influenza aviar; y
 - (b) recolectar el virus progenie,en donde el virus se cultiva en cantidades suficientes y bajo condiciones adecuadas para quedar libre de contaminación, de modo que el virus progenie es apto para usar en una formulación inmunogénica.
13. Un virus quimérico atenuado de influenza, que comprende un segmento NA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en la cual el marco de lectura abierto NA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno neuraminidasa de un agente infeccioso diferente de la influenza que está anclado por el extremo-N, de modo que la proteína de fusión neuraminidasa es expresada e incorporada en el virus quimérico atenuado de influenza aviar.
14. Un virus quimérico atenuado de influenza, que comprende un segmento HA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión hemaglutinina, en la cual el marco de lectura abierto HA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio HA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno enlazante /fusogénico del receptor de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-C, de modo que la proteína de fusión hemaglutinina es expresada e incorporada en el virus quimérico atenuado de influenza.
15. Un virus quimérico atenuado de influenza aviar, que comprende un segmento HA empaquetado bicistrónico de virus de influenza, que comprende:
 - (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína hemaglutinina de influenza aviar, y
 - (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión hemaglutinina, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio de la hemaglutinina son reemplazados por nucleótidos que codifican una proteína que contiene al menos un epítipo de un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, o de un antígeno asociado con una enfermedad

que está anclado por el extremo-C,

de modo que la hemagglutinina y la proteína de fusión de la influenza son expresadas e incorporadas en el virus quimérico atenuado de influenza.

16. Un virus quimérico atenuado de influenza, que comprende un segmento NA empaquetado bicistrónico de virus de influenza, que comprende:

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

(b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio de la neuraminidasa son reemplazados por nucleótidos que codifican una proteína que contiene al menos un epítipo de un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, o de un antígeno asociado con una enfermedad que está anclado por el extremo-N,

de modo que la neuraminidasa y la proteína de fusión de la influenza son expresadas e incorporadas en el virus quimérico atenuado de influenza.

17. El virus quimérico atenuado de influenza de la reivindicación 13, 14, 15 o 16 el cual comprende un segmento empaquetado del gen NS1 que codifica una proteína NS1 modificada que reduce la actividad antagonista de interferón celular del virus.

18. El virus quimérico atenuado de influenza de la reivindicación 13 o 16 el cual comprende un segmento HA que tiene un marco de lectura abierto modificado para remover el sitio de escisión polibásica de la hemagglutinina.

19. El virus quimérico atenuado de influenza de la reivindicación 15, en la cual el primer marco de lectura abierto es modificado para remover el sitio de escisión polibásica de la hemagglutinina.

20. Una molécula de ADN recombinante que codifica el segmento NA de la reivindicación 13 o 16.

21. Una molécula de ADN recombinante que codifica el segmento HA de la reivindicación 14 o 15.

22. Un método para producir una formulación inmunogénica; el método que comprende:

(a) propagar el virus quimérico atenuado de influenza de la reivindicación 13, 14, 15 o 16 en un huevo embrionado; y

(b) recolectar el virus progenie,

en donde el virus se cultiva en cantidades suficientes y bajo condiciones adecuadas para quedar libre de contaminación, de modo que el virus progenie es apto para usar en una formulación inmunogénica.

23. Un método para producir una formulación inmunogénica; el método que comprende:

(a) propagar el virus quimérico atenuado de influenza de la reivindicación 13, 14, 15 o 16 en una línea celular que es susceptible de una infección por virus atenuado de influenza; y

(b) recolectar el virus progenie,

en donde el virus se cultiva en cantidades suficientes y bajo condiciones adecuadas para quedar libre de contaminación, de modo que el virus progenie es apto para usar en una formulación inmunogénica.

24. Un NDV quimérico que comprende un genoma empaquetado, que comprende una secuencia nucleótida que codifica una proteína de fusión F que tiene los dominios de transmembrana y citoplásmico de una proteína F y al menos un epítipo de un ectodominio de un agente protector de un agente infeccioso diferente de NDV o de un antígeno asociado con una enfermedad, que está anclado por el extremo C, de modo que la proteína de fusión de la proteína F es expresada e incorporada en el NDV quimérico.

25. El NDV quimérico de la reivindicación 24 en el cual el genoma comprende una secuencia nucleótida que codifica una proteína F, de modo que la proteína F es expresada e incorporada en el NDV quimérico.

26. El NDV quimérico de la reivindicación 24 en la cual la secuencia nucleótida que codifica la proteína de fusión F reemplaza la secuencia nucleótida que codifica la proteína NDV F y la proteína de fusión F suministra la función de la proteína F.

27. Un NDV quimérico que comprende un genoma empaquetado, que comprende una secuencia nucleótida que codifica una proteína de fusión HN que tiene los dominios de transmembrana y citoplásmico de una proteína HN y al menos un epítipo de un ectodominio de un agente protector de un agente infeccioso, salvo NDV, o de un antígeno asociado con una enfermedad, que está anclado por el extremo N, de modo que la proteína de fusión de la proteína HN es expresada e incorporada en el NDV quimérico.

- 117
28. El NDV quimérico de la reivindicación 27 en el cual el genoma comprende una secuencia nucleótida que codifica una proteína HN, de modo que la proteína HN es expresada e incorporada en el NDV quimérico.
29. El NDV quimérico de la reivindicación 27, en la cual la secuencia nucleótida que codifica la proteína de fusión HN reemplaza la secuencia nucleótida que codifica la proteína NDV HN y la proteína de fusión F suministra la función de la proteína HN.
30. Un método para producir una formulación inmunogénica; el método que comprende:
- (a) propagar el NDV quimérico de cualquiera de las reclamaciones 24 a 29 en un huevo embrionado; y
 - (b) recolectar el virus progenie,
31. Un método para producir una formulación inmunogénica, el método que comprende:
- (a) propagar el NDV quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29 en una línea celular que es susceptible a una infección NDV; y
 - (b) recolectar el virus progenie,
- en donde el virus se cultiva en cantidades suficientes y bajo condiciones adecuadas para quedar libre de contaminación, de modo que el virus progenie es apto para formulación en una formulación inmunogénica.
32. Un método para inducir una respuesta inmune ante dos agentes infecciosos en un ave; el método que comprende administrar el virus quimérico de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 13, 14, 15, 16, 24, 25, 26, 27, 28, o 29.
33. Un método para inducir una respuesta inmune ante dos agentes infecciosos en un ser humano; el que método comprende administrar el virus quimérico de la reivindicación 13, 14, 16, 24, 25, 26, 27, 28, o 29.

1/8

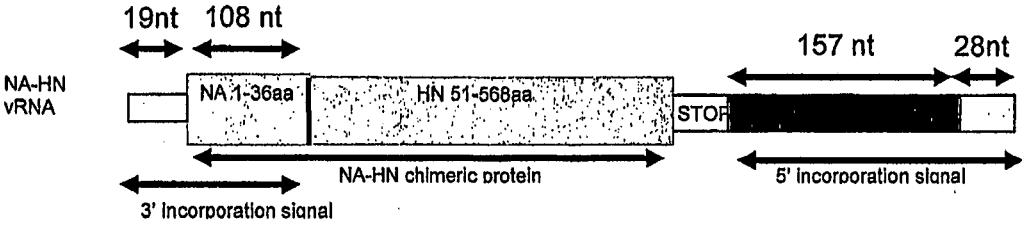


FIG. 1

119

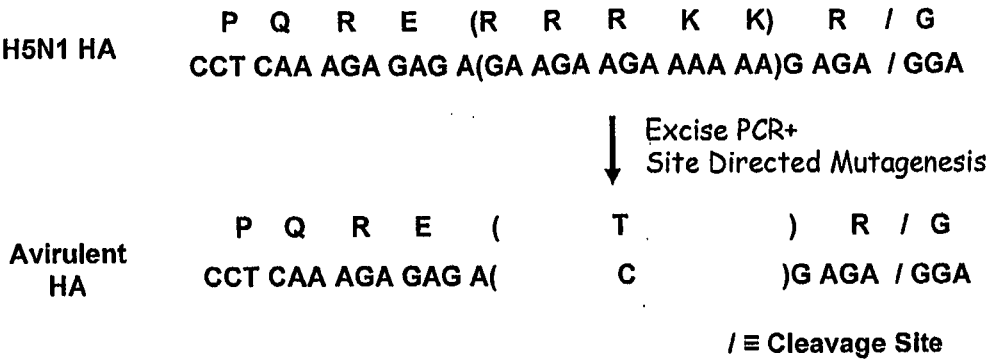


FIG. 2

021

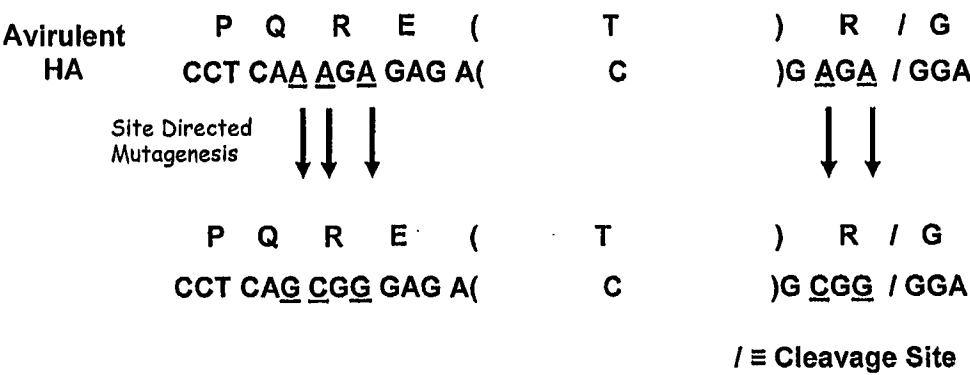


FIG. 3

121

FIG. 4A

FIG. 4B

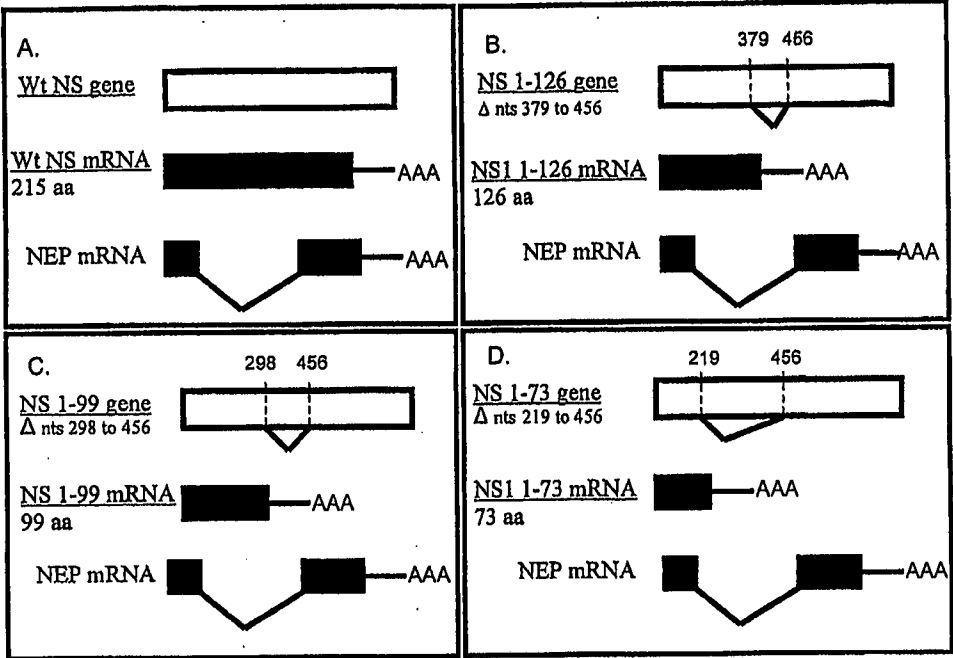


FIG. 4C

FIG. 4D

122

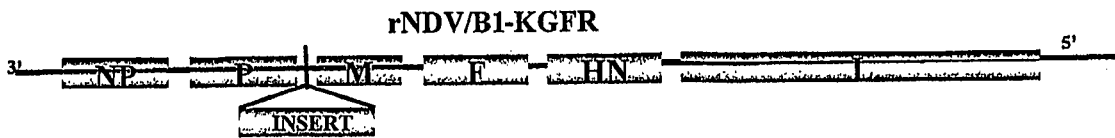


FIG. 5

129



FIG. 6

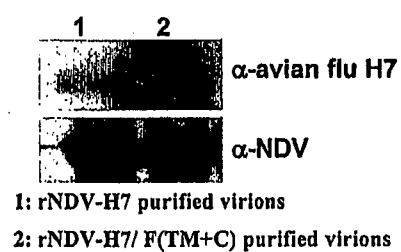


FIG. 7

125

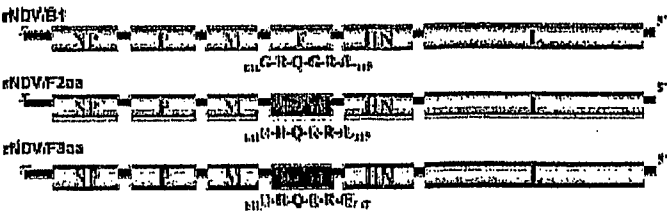


FIG. 8A

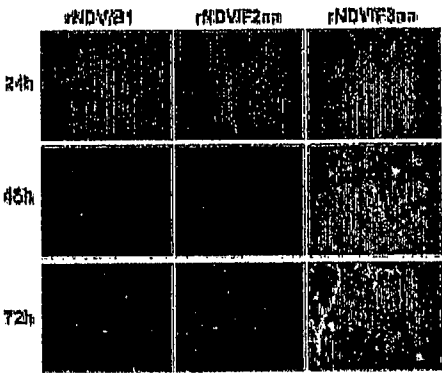


FIG. 8B

126

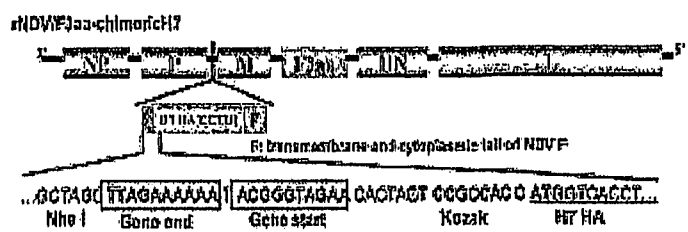


FIG. 9A

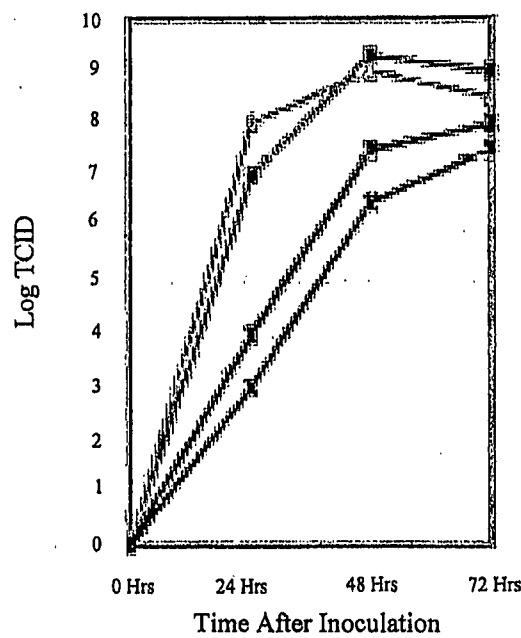


FIG. 9B

127

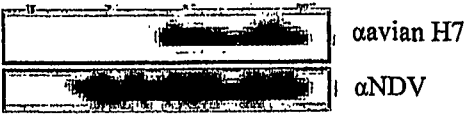


FIG. 9C



FIG. 9D

~4940120.TXT

SEQUENCE LISTING

<110> Mt. Sinai School of Medicine of New York University

<120> CHIMERIC VIRUSES PRESENTING NON-NATIVE
SURFACE PROTEINS AND USES THEREOF

<130> 6923-130-228

<150> 60/741,833

<151> 2005-12-02

<150> 60/802,864

<151> 2006-05-22

<160> 36

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 823

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<220>

<223> Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))
nonstructural protein 2 (NS) gene

<400> 1

```

atggattcca acactgtgtc aagctttcag gtagactgct ttctttggca tgtccgcaaa 60
cgatttgcag accaagaact gggatgatgc ccattccttg accggcttcg ccgagatcag 120
aagtccctaa gaggaagagg caacactctt ggtctggaca tcgaaacagc tactcgcgca 180
ggaaagcaga tagtggagcg gattctggag ggggagtctg ataaggcact taaaatgccg 240
gcttcacgct acctaactga catgactctc gaagaaatgt caagggactg gttcatgctc 300
atgccccagc agaaagtggc aggttccctt tgcataaaaa tggaccaggc aataatggat 360
aaaaccatca tattgaaagc aaacttcagt gtgatttttg accggttggg aaccctaata 420
ctacttagag ctttcacaga agaaggagca atcgtgggag aaatctcacc attaccttct 480
cttcaggagc atactggtga ggaatgtcaa aatgcaattg gcgtcctcat cggaggactt 540
gaatggaatg ataacacagt tgcagtcact gaaactatac agagattcgc ttggagaaac 600
agtgatgagg atgggagact tccactccct ccaaatacaga aacggtaaat ggcgagaaca 660
attgagtcag aagtttgaag aaataagggt gctgattgaa gaagtaagac atagattgaa 720
aattacagaa aacagcttcg aacagataac gtttatgcaa gccttacaac tactgcttga 780
agtggagcaa gagataagag ccttctcgtt tcagcttatt taa 823

```

<210> 2

<211> 982

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<220>

<223> Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))
membrane ion channel 2 and matrix protein 1 (M)
gene

<400> 2

```

atgagtcttc taaccgaggc cgaaacgtac gttctctcta tcatcccgtc agggccccctc 60
aaagccgaga tcgcacagaa acttgaagat gtctttgtag gaaagaacac cgatctcgag 120
gctctcatgg agtggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggattttg 180
ggattttgat tcacgctcac cgtgccaggt gagcaggagc tgcagcgtag acgctttgtc 240
cagaatgccc taaatggaaa tggagatcca aataatatgg atagggcagt taagctatat 300

```

129

~4940120.TXT

```

aagaagctga aaagagaaat aacattccat ggggctaagg aggtcgact cagctactca 360
accggtgcac ttgccagttg catgggtctc atatacaaca ggatgggaac ggtgactacg 420
gaagtggctt ttggcctagt gtgtgccact tgtgagcaga ttgcagattc acagcatcgg 480
tctcacagac agatggcaac tatcaccaac ccactaatca gacatgagaa cagaatggtg 540
ctggccagca ctacagctaa ggctatggag cagatggcgg gatcaagtga gcaggcagcg 600
gaagccatgg agatcgctaa tcaggctagg cagatgggtg aggcaatgag gacaattggg 660
actcatccta actctagtgc tggcttgaga gataatcttc ttgaaaattt gcaggcctac 720
cagaaacgaa tgggagtgca gatgcagcga ttcaagtgat cctattgttg ttgccgcaaa 780
tatcattggg atcttgcact tgatattgtg gattcttcat cgtcttttct tcaaatgcat 840
ttatcgctgc cttaaatacg gtttgaaaag agggcctgct acggcagggg tacctgagtc 900
tatgagggaa gagtaccggc aggaacagca gagtgtgtg gatgttgacg atggtcattt 960
tgtcaacata gaattggagt aa

```

<210> 3

<211> 1485

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<220>

<223> Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))
nucleocapsid protein(NP) gene

<400> 3

```

atggcgtctc aaggcaccaa acgatcttat gaacagatgg aaactggtgg ggaacgccag 60
aatgctactg agatcagggc atctgttgga agaattggta gtggcattgg gaggttctac 120
atacagatgt gcacagaact caaactcagt gactatgaag ggaggctgat ccagaacagc 180
ataacaatag agagaatggt actctctgca ttgatgaaa gaaggaaacag atacctggaa 240
gaacacccca gtgcgggaaa ggacccgaag aagactggag gtccaattta tcggaggaga 300
gacgggaaat gggtgagaga gctaattctg tacgacaaaag aggagatcag gaggatttgg 360
cgtcaagcga acaatggaga ggacgcaact gctgggtctta cccacctgat gatatggcat 420
tccaatctaa atgatgccac atatcagaga acgagagctc tcgtgcgtac tggaatggac 480
ccaaggatgt gctctctgat gcaagggtca actctcccga ggagatctgg agctgccggg 540
gcagcagtaa agggggtagg gacaatgggt atggagctga ttcggatgat aaaacgaggg 600
atcaacgacc ggaatttctg gagaggcgaa aatggaagaa gaacaaggat tgcatatgag 660
agaatgtgca acatcctcaa agggaaattc caaacagcag cacaagagc aatgatggat 720
caagtgcgag agagcagaaa tcctgggaat gctgaaattg aagatctcat ttttctggca 780
cggctctgcac tcattcctgag aggatcagtg gcccataagt cctgcttgcc tgcttgtgtg 840
tacggacttg cagtggccag tggatatgac tttagagag aggggtactc tctggttgga 900
atagatcctt tccgcctgct tcaaacagc caggctctta gtctcattag accaaatgag 960
aatccagcac ataagagtca attagtgtgg atggcatgcc actctgcagc atttgaggac 1020
cttagagtct caagtttcat cagagggaca agagtgggtc caagaggaca gctatccacc 1080
agaggggttc aaattgtctt aaatgagaac atggaggcaa tggactccaa cactcttgaa 1140
ctgagaagca gatattgggc tataagaacc agaagcggag gaaacaccaa ccagcagagg 1200
gcatctgcag gacagatcag cgttcagccc actttctcgg tccagagaaa ccttcccttc 1260
gaaagagcga ccattatggc agcatttaca ggaaatactg agggcagaac gtctgacatg 1320
aggactgaaa tcataagaat gatggaaaag gccagaccag aagatgtgtc attccagggg 1380
cggggagtct tcgagctctc ggacgaaaag gcaacgaacc cgatcgtgcc ttcctttgac 1440
atgaataatg aaggatctta tttcttcgga gacaatgcag aggag

```

<210> 4

<211> 1707

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<220>

<223> Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))
hemagglutinin HA gene

<400> 4

```

atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaacia ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaagaacggt 120

```

~4940120.TXT

```

actgttacac atgccaaga catactggaa aagaaacaca acgggaagct ctgcatcta 180
gatggagtga agcctctaata tttgagagat tgtagcgtag ctggatggct cctcggaac 240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggctctt acatagtggg gaaggccaat 300
ccagtcaatg acctctgtta cccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccagt 420
catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc agggaaagtc ctcttttttc 480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac 540
aataatacca accaagaaga tcttttggtg ctgtggggga ttcaccatcc taatgatgcy 600
gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata tttccgttgg gacatcaaca 660
ctaaaccaga gattggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaacyg gcaaagtggg 720
aggatggagt tcttctggac aattttaaag ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt 840
atgaaaagtg aattggaaata tggttaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcy 900
ataaactcta gcatgccatt ccacaatata caccctctca ccattgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcy actgggctca gaaatagccc tcaaagagag 1020
agaagaagaa aaaagagagg attatttggg gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac 1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcy 1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa caacttagaa 1260
aggagaatag agaattttaa caagaagatg gaagacyggg tcctagatgt ctggacttat 1320
aatgctgaac ttctggttct catggaaaat cagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
gtcaagaacc tttaagacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt 1440
aacggttggt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaat 1500
ggaaacgtatg actaccgcga gtattcagaa gaagcgagac taaaaagaga ggaataaagt 1560
ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caatttattc tacagtggcy 1620
agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatgga 1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

```

<210> 5

<211> 1350

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<220>

<223> Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))
neuramindase (NA) gene

<400> 5

```

atgaatccaa atcagaagat aataaccatc ggatcaatct gtatggtaac tggaaatagtt 60
agcttaatgt tacaaattgg gaacatgatc tcaatatggg tcagtcattc aattcacaca 120
gggaatcaac accaatcagc aataactaatt ttcttactga gaaagctgtg 180
gcttcagtaa aattagcggg caattcatct ctttgcccca ttaacggatg ggctgtatc 240
agtaaggaca acagtataag gatcgggtcc aagggggatg tgtttggtat aagagagccg 300
ttcatctcat gctccactt ggaatgcaga actttctttt tgactcaggg agccttgctg 360
aatgacaagc actccaatgg gactgtcaaa cagagaagcc ctacagaac attaatgagt 420
tgtcctgtgg gtgaggctcc ctccccatat aactcaaggt ttgagtctgt tgcttggtca 480
gcaagtgcct gccatgatgg caccagttgg ttgacgattg gaatttctgg cccagacaat 540
ggggctgtgg ctgtattgaa atacaatggc ataataacag acactatcaa gatttgagg 600
aacaacatac tgagaactca agagctgtaa tgtgcatgtg taaatggctc ttgctttact 660
gtaatgactg acggaccaag taatgggtcag gcatcacata agatcttcaa aatggaaaaa 720
gggaaagtgg ttaaatcagt cgaattggat gctcctaatt atactatga ggaatgctcc 780
tgttatccta atgccggaga aatcacatgt gtgtgcaggg ataattggca tggctcaaat 840
cggccatggg tatctttcaa tcaaaatttg gagtatcaaa taggatatat atgcagtggg 900
gttttcggag acaatccacg ccccaatgat ggaacaggta gttgtggtcc ggtgtcctct 960
aacggggcat atggggtaaa aggggttttca tttaaatagc gcaatgggtg ctggatcggg 1020
agaacaaaaa gcactaattc caggagcggc tttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg 1080
actgaaacyg acagtgcctt ttcagtgaac caagatatcg tagcaataac tgattgggtca 1140
ggatataagc ggagttttgt ccagcatcca gaactgacag gactagattg cataagacct 1200
tgtttctggg ttgagttgat cagagggcgg cccaaagaga gcacaatttg gactagtggg 1260
agcagcatat ctttttgggt tgtaaatagt gacactgtgg gttggtcttg gccagacggg 1320
gctgagttgc cattcaccat tgacaagtag 1350

```

~4940120.TXT

<210> 6
<211> 2151
<212> DNA
<213> Influenza A virus

<220>
<223> Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))
polymerase protein PA gene

<400> 6
atggaagact ttgtgcgaca atgcttcaat ccaatgattg tcgagcttgc ggaaaaggca 60
atgaaagaat atgggggaaga tccgaaaatc gaaacgaaca agtttgctgc aatatgcaca 120
cacttgagg tctgtttcat gtattcggat tttcacttta ttgatgaacg gagtgaatca 180
ataattgtag aatctggaga tccgaatgca ttattgaaac accgatttga aataattgaa 240
ggaagagacc gaacgatggc ctggactgtg gtgaatagta tctgcaacac cacaggagtt 300
gagaaacctt aattttctcc agatttgat gactacaaag agaaccgatt catcgaaatt 360
ggagtgcac ggagggaagt tcatacatat tatctggaga aagccaacaa gataaaatcc 420
gaggagacac atattcacat attctcattc acaggggagg aaatggccac caaagcggac 480
tacacccttg atgaagagag cagggcaaga attaaaacca ggctgttcac cataaggcag 540
gaaatggcca gtaggggtct atgggattcc tttcgtcaat ccgagagagg cgaagagaca 600
attgaagaaa aatttgaaat cactggaacc atgcgagac ttgcagacca aagtctccca 660
ccgaacttct ccagccttga aaactttaga gcctatgtgg atggattcga accgaacggc 720
tgatttgagg gcaagcttct tcaaattgtc aaagaagtga atgctagaat tgagccattt 780
ttgaagacaa cgccacgcct tctcagacta cctgatgggc ctcttgctc tcagcggctc 840
aagttcttgc tgatggatgc ccttaaatta agcatcgaag acccgagtca tgagggggag 900
gggataccac tatacgtatg aatcaaattc atgaagacat ttttcggctg gaaagagccc 960
aacatcgatg aaccacatga aaaagggtata aaccccaatt acctcctggc ttggaagcaa 1020
gtgctggcag aactccaaga tattgaaaat gaggagaaa tcccaaaaac aaagaacatg 1080
aaaaaaacaa cgagtttgaa gtgggcaactc ggtgagaaca tggcaccaga gaaagtagac 1140
tttgaggact gcaaagatgt tagcgatcta agacagtatg acagtgatga accagagtct 1200
agatcactag caagctggat tcagagtga ttcaacaagg catgtgaatt gacagattcg 1260
atttgattg aactcgatga aataggagaa gacgtagctc caattgagca cattgcaagt 1320
atgagaagga actattttac agcggaagta tcccattgca gggccactga atacataatg 1380
aagggagtgt acataaacac agcctgttg aatgcatcct gtgcagccat ggatgacttt 1440
caactgattc caatgataag caaatgcaga accaaagaag gaagacggaa aactaatctg 1500
tatggattca ttataaaaagg gagatcccac ttgaggaatg ataccgatgt ggtaaatttt 1560
gtgagtattg aattctctct tactgatccg aggttgagc cacacaagtg ggaaaagtac 1620
tgtgtcctcg agataggaga catgtcctc cggactgcag taggccaagt ttcgaggccc 1680
atgttcctgt atgtaagaac caatggaacc tccaagatca aaatgaaatg gggcatggaa 1740
atgaggcgat gccttcttca atcccttcaa caaattgaaa gcatgattga agccgagctc 1800
tctgtcaaag agaagggcat gaccaaagaa ttctttgaaa acaaatcaga aacatggccg 1860
attggagagt cccccaaggg agtgaggaa ggctccatcg gaaaggtgtg cagaaccttg 1920
ctggcgaaat ctgtgttcaa cagtttatat gcatctccac aactcgagg gttttcagct 1980
gaatcaagaa aattgcttct cattgctcag gcacttaggg acaacctgga acctgggacc 2040
ttcgatcttg gagggctata tgaagcaatt gaggagtgcc tgattaacga tccctgggtt 2100
ttgcttaatg cgtcttggtt caactcctc ctcgcacatg cactgaaata g 2151

<210> 7
<211> 2274
<212> DNA
<213> Influenza A virus

<220>
<223> Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))
polymerase protein PB1 gene

<400> 7
atggatgtca atccgacttt acttttcttg aaagtaccag tgcaaaatgc tataagtacc 60
accttccttt atactggaga cctccatcac agccatggaa cagggacagg ataccacatg 120
gacacagtca acagaacaca ccaatattca gaaaagggga agtgacaac aaacacagag 180
actggagcac cccaactcaa cccgattgat ggaccactac ctgaggataa tgagcccagt 240

132

~4940120.TXT

```

gggtacgcac aaacagattg tgtattggaa gcaatggctt tccttgaaga atcccaccca 300
gggatctttg aaaactcgtg tcttgaaacg atggaaattg ttcaacaaac aagagtggat 360
aaactgaccc aaggtcgcca gacctatgac tggacattga atagaaacca accggctgca 420
actgcttttg ccaacactat agaaatcttc agatcgaacg gtctaacagc caatgaatcg 480
ggacggctaa tagatttctt caaggatgtg atggagtcaa tggataagga agaaatggag 540
ataacaacac atttccagag aaagagaagg gtgagggaca acatgaccaa gaaaatggtc 600
acacaaagaa caatagggaa gaaaaaacia aggctgaaca aaaagagcta cctgataaga 660
gcaactgacac tgaacaacaat gacaaaagat gcagaaagag gcaaattgaa gaggcgagcg 720
attgcaacac cgggaatgca aatcagagga ttcgtgtact ttgttgaac actagcgagg 780
agttatctgtg agaaacttga ccaatctgga ctcccagtcg gagggaatga gaagaaggct 840
aaattggcaa acgtcgtgag gaagatgatg actaactcac aagatactga actctccttt 900
acaattactg gagacaatac caaatggaat gagaatcaga atcctaggat gtttctggca 960
ctgataacgt acatcacaa gaaacagcca gaattggttc ggaatgtctt aagcatagct 1020
cctataatgt tctcaaacaa aatggcgaga ctaggaaaag gatacatgtt cgaaagtaag 1080
agcatgaagt tacgaacaca aataccagca gaaatgcttg caaacattga tcttaaatac 1140
ttcaatgaat taacgaaaaa gaaaattgag aaaataaggc ctctattaat agatggtaca 1200
gcctcattga gccctggaat gatgatgggc atgttcaaca tgctgagtac agtcctagga 1260
gtttcaatcc gtttcaattg acagaaaagg tacaccaaaa ccacatattg gtgggacgga 1320
ctccaatcct ctgatgattt cgctctcatc gtaaatgcac cgaatcatga gggaatacaa 1380
gcaggagtggt atagggttta taggacttgt aaactagtgt gaatcaatat gagcaagaag 1440
aagtcttaca taaatcggac agggacattt gaattcacga gctttttcta ccgctatgga 1500
tttgtagcca atttcagtat ggagctgccc agttttggag tgcctggaat taatgaatcg 1560
gccgacatga gcattggtgt tacagtgata aaaaacaata tgataaacia cgaccttggg 1620
ccagcaacag ctcagatggc tcttcagtta ttcacaaagg actacagata cacataccga 1680
tgccacagag gggatacaga aatccaaaca aggagatcat tcgagctgaa gaagctgtgg 1740
gagcaaaccc gttcaaaagg gtttcagatg gtttcagatg gaggaccaa tctatacaat 1800
atccgaaacc tccatattcc tgaagtctgc ttaaaatggg aattgatgga tgaagattac 1860
cagggcagac tgtgtaatcc tctgaatcca ttcgtcagcc ataaggaaat tgaatctgtc 1920
aaaatgtctg tagtaatgcc agctcatggc ccggccaaga gtatggaata tgatgccgtt 1980
gcaactacac attcatggat tcttaaaagg aaccgttcca ttctcaatac gagtcaagg 2040
ggaattcttg aggatgaaca gatgtaccag aagtgtgca atctattcga gaaattcttc 2100
cccagcagtt catatcggag gccagttgga atttccagca tgggtggagg catggtgtct 2160
agggcccga ttgacgcacg aatcgatttc gagtctggaa ggattaagaa agaagagttt 2220
gccgagatca tgaagatctg ttccaccatt gaagaactca gacggcaaaa atag 2274

```

<210> 8

<211> 2280

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<220>

<223> Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))
polymerase basic subunit 2 (PB2) gene

<400> 8

```

atggagagaa taaaagaatt acgagatcta atgtcacagt cccgcactcg cgagatacta 60
acaaaaacca ctgtggacca tatggccata atcaagaaat acacatcagg aagacaagag 120
aagaaccctg ctctcagaat gaaatggatg atggcaatga aatatccaat cacagcggac 180
aagagaataa tagagatgat tcctgaaaagg aatgaacaag ggcagacgct ctggagcaag 240
acaaatgatg ctggatcgga caggggtgatg gtgtctcccc tagctgtaac ttggtggaat 300
aggaatgggc cggcgacaag tgcagttcat tatccaaagg tttaaaaaac atactttgag 360
aaggttgaaa gattaaaaca tggaaaccttc ggtcccgttc atttccgaaa ccaggttaaa 420
atacgcggcc gagttgatat aaatcctggc catgcagatc tcagtgtctaa agaagcacia 480
gatgtcatca tggaggtcgt tttcccaaat gaagtgggag ctagaatatt gacatcagag 540
tcgcaattga caataacgaa agagaagaaa gaagagctcc aagattgtaa gattgctccc 600
ttaatggttg catacatgtt ggaaagggaa ctggtccgca aaaccagatt cctaccggtg 660
gcaggcggaa caagtatgtg gtacattgag gtattgcatt tgactcaagg gacctgtctg 720
gaacagatgt acactccagg cggagaagtg agaaatgacg atgttgacca gagtttgatc 780
attgcttgcca gaaacattgt taggagagca acagatcag cggatccact ggcacactg 840
ctggagatgt gtcacagcac acaaattggt gggataagga tgggtggacat ccttaggcaa 900
aatccaactg aggaacaagc tgtggtatata tgcaaaagcag caatgggtct taggatcagt 960
tcttccttta gctttggagg cttcactttc aaaagaacia gtggatcatc cgtcaagaag 1020
gaagaggaag tgcttacagg caacctccaa acattgaaaa taagagtaca tgaggggtat 1080

```

133

~4940120.TXT

```

gaggaattca caatgggttg gcgaggggca acagctatcc tgaggaaagc aactagaagg 1140
ctgattcagt tgatagtaag tggagagac caacaatcaa tcgctgaggc aatcattgta 1200
gcaatgggtg tctcacagga ggattgcatg ataaaggcag tccgaggcga tctgaatttc 1260
gtaaacagag caaaccaaa attaaacccc atgcatcaac tcctgagaca ttttcaaaag 1320
gacgcaaaag tgctatttca gaattgggga attgaacca ttgataatgt catggggatg 1380
atcggaatat tacctgacat gactcccagc acagaaatgt cactgagagg agtaagagtt 1440
agtaaaatgg gagtggatga atattccagc actgagagag tagttgtaag tattgaccgt 1500
ttcttaaggg ttcgagatca gcgggggaac gtactcttat ctcccgaaga ggtcagcgaa 1560
acccagggaa cagagaaatt gacaataaca tattcatcat caatgatgtg ggaaatcaac 1620
ggtcccgagt cagtgtctgt taacacctat cagtggatca tcagaaactg ggagactgtg 1680
aagattcaat ggtctcaaga cccacgatg ctgtacaata agatggagtt tgaaccgttc 1740
caatccttgg tacccaaagc tgccagaggt caatacagtg gatttgtgag aacattattc 1800
acccagggaa gtcactgtc gggaacattt gactagtctc agataataaa gctgctacca 1860
tttgacagag cccaccgaa gcagagcaga atgcagtttt cttctctaac tgtgaatgtg 1920
agaggctcag gaatgagaat actcgttaag ggcaattccc ctgtgttcaa ctacaataag 1980
gcaaccaaaa ggcttaccgt ccttggaag gacgcaggtg cattaacaga ggatccggat 2040
gaagggacag ccggagtggg gtctgcagta agtaggggat tcttaatttt aggcaaggag 2100
gacaaaaggt atggaccagc attgagcatc aatgaactga gcaatcttgc gaagggggag 2160
aaagctaatt tgctgatagg gcaaggagac gtggtgttgg taatgaaacg aaaacgggac 2220
tctagcatat ttactgacag ccagacagcg accaaaagaa ttcggatggc catcaattag 2280

```

<210> 9

<211> 1409

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<220>

<223> Influenza A virus (A/WSN/1933(H1N1)) neuraminidase gene

<400> 9

```

agcgaagca ggagtttaaa tgaatccaaa ccagaaaata ataaccattg ggtcaatctg 60
tatggtagtc ggaataatta gcctaataat gcaaatagga aatataatct caatatggat 120
tagccattca attcaaaccg gaaatcaaaa ccatactgga atatgcaacc aaggcagcat 180
tacctataaa gttgttgctg ggcaggactc aacttcagtg atattaaccg gcaattcatc 240
tctttgtccc atccgtgggt gggctataca cagcaaagac aatggcataa gaattgggtc 300
caaaggagac gttttgtgca taagagagcc ttttatttca tgttctcact tggaatgcag 360
gacctttttt ctgactcaag gcgccttact gaatgacaag cattcaaggg ggacctttaa 420
ggacagaagc ccttataggg ccttaatgag ctgccctgtc ggtgaagctc cgtccccgta 480
caattcaagg tttgaatcgg ttgcttggtc agcaagtgca tgtcatgatg gaatgggctg 540
gctaacaatc ggaatttctg gtccagatga tggagcagtg gctgtattaa aatacaacgg 600
cataataact gaaacataaa aaagtgtgag gaagaatata ttgagaacac aagagtctga 660
atgtacctgt gtaaattggtt catgttttac cataatgacc gatggcccaa gtgatgggct 720
ggcctcgtag aaaattttca agatcgagaa ggggaagggt actaaatcaa tagagttgaa 780
tgcacctaat tctcactacg aggaatgttc ctgttaccct gataccggca aagtgtatgt 840
tgtgtgcaga gacaattggc acggttcgaa ccgaccatgg gtgtccttcg accaaaacct 900
agattataaa ataggataca tctgcagtgg ggttttcggg gacaaccgcg gtcccaaaga 960
tggaacaggc agctgtggcc cagtgtctgc tgatggagca aacggagtaa agggattttc 1020
atataagtat ggcaatgggt tttggatagg aaggactaaa agtgacagtt ccagacatgg 1080
gtttgagatg atttggggtc ctaattgatg gacagagact gatagtaggt tctctatgag 1140
acaagatgtt gtggcaatga ctgatcggtc aggggtacagc ggaagtttcg ttcaacatcc 1200
tgagctaaca gggctagact gtatgaggcc ttgcttctgg gttgaattaa tcagggggct 1260
acctgaggag gacgcaatct ggactagtgg gagcatcatt tctttttgtg gtgtgaatgg 1320
tgatactgta gattgtgtctt ggccagacgg tgctgagttg ccgttcacca ttgacaagta 1380
gtttgttcaa aaaactcctt gtttctact

```

<210> 10

<211> 15186

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<220>

<223> Newcastle disease virus B1 genome

~4940120.TXT

<400> 10

accaaacaga	gaatcgggtga	gttacgataa	aaggcgaagg	agcaattgaa	gtcgcacggg	60
tagaagggtgt	gaatctcgag	tgcgagcccc	aagcacaaaac	tcgaggaagc	cttctgccaa	120
catgtcttcc	gtattcgacg	agtacgaaca	gtctctcgcg	gctcagactc	gccccaatgg	180
agctcatgga	gggggggaga	aagggagtag	cttaaaagta	gacgtccccg	tattcactct	240
taacagtgat	gacccagaag	ataggtggag	ctttgtggta	ttctgcctcc	ggattgctgt	300
tagcgaagat	gccaacaaac	cactcaggca	agggtgctctc	atatctcttt	tatgctccca	360
ctcacaggta	atgaggaacc	atgttgccct	tgagggaag	cagaatgaag	ccacattggc	420
cgtgcttgag	attgatggct	ttgccaacgg	cacgccccag	ttcaacaata	ggagtggagt	480
gtctgaagag	agagcacaga	gatttgcgat	gatagcagga	tctctccctc	gggcatgcag	540
caacggcacc	ccgttcgtca	cagccggggc	tgaagatgat	gcaccagaag	acatcaccga	600
taccctggag	aggatctctc	ctatccaggc	tcaagtatgg	gtcacagtag	caaaagccat	660
gactgcgtat	gagactgcag	atgagtcgga	aacaaggcga	atcaataagt	atatgcagca	720
aggcagggtc	caaaagaaat	acatcctcta	ccccgtatgc	aggagcacia	tccaactcac	780
gatcagacag	tctcttgtag	tccgcactct	tttggttagc	gagctcaaga	gaggccgcaa	840
cacggcagggt	ggtagcctcta	cttattataa	ctctagtagg	gacgtagact	catatatcag	900
gaataccggg	cttactgcat	tcttcttgac	actcaagtag	ggaatcaaca	ccaagacatc	960
agcccttgca	cttagtagcc	tctcaggcga	catccagaag	atgaagcagc	tcatgctgtt	1020
gtatcggatg	aaaggagata	atgcgcccga	catgacatta	cttgggtgata	gtgaccagat	1080
gagctttgag	cctgcccagt	atgcacaact	ttactctttt	gccatgggta	tggcatcagt	1140
cctagataaa	ggtagtgaga	aataccaatt	tgccaaggac	tttatgagca	catcattctg	1200
gagacttgga	gtagagtacg	ctcagggtca	gggaagtagc	attaacgagg	atatggctgc	1260
cgagctaaag	ctaaccctcg	cagcaaggag	gggcctggca	gctgctgccc	aacgagtctc	1320
cgaggtgacc	gcagcagtag	acatgcttac	tcaacaagtc	ggagtcctca	ctgggcttag	1380
cgagggggga	tcccaagccc	tacaaggcgg	atcgaataga	tcgcaagggc	aaccagaagc	1440
cggggatggg	gagacccaat	tcttggtatc	gatgagagcg	gtagcaaaata	gcatgaggga	1500
ggcgccaaac	tctgcacagg	gcactcccca	atcggggcct	cccccaactc	ctgggcatc	1560
ccaagataac	gacacagact	gggggtattg	attgacaaaa	ccagcctgc	ttctacaaga	1620
acatcccaat	gctctcacc	gtagtcgacc	cctcgatttg	cggtctata	tgaccacacc	1680
ctcaaacaaa	catccccctc	tttctccct	ccccctgctg	tacaactccg	cacgcccctg	1740
gcaacagagg	cacaatgcgg	ctcactaaca	atcaaaacag	agccgaggga	attagaaaaa	1800
agtacgggtg	gaagagggtg	attcagagat	cagggcaagt	ctcccgagtc	tctgctctct	1860
cctctacctg	atagaccagg	acaacatgg	ccacccttac	agatgcagag	atcgacgagc	1920
tatttgagac	aagtggaaact	gtcattgaca	acataattac	agcccagggt	aaaccagcag	1980
agactgttgg	aaggagtgcga	atcccacaa	gcaagaccaa	ggtgctgagc	gcagcatggg	2040
agaagataac	gagcaccag	ccaccggcca	cccgatcga	cccgatcga	caggacagat	2100
ctgacaaaaca	accatccaca	cccagacaaa	cgaccccgca	tgacagccc	ccggccacat	2160
ccgctgacca	gccccccacc	caggccacag	acgaagccgt	cgacacacag	ctcaggaccg	2220
gagcaagcaa	ctctctgctg	ttgatgcttg	acaagctcag	caataaatcg	tccaatgcta	2280
aaaaggggccc	atggctgctg	cccaagagg	ggaatcacca	acgtccgact	caacagcagg	2340
ggagtcaacc	cagtcgagg	aacagtcagg	aaagaccgca	gaaccaagtc	aaggccgccc	2400
ctggaaacca	gggcacagac	gtgaacacag	catatcatgg	acaatgggag	gagtcacaac	2460
tatcagctgg	tgcaaccctc	catggtctcc	gatcaaagca	gagccaaaac	aatacccctg	2520
tttctgcgga	tcaattccac	ccactgttag	actttgtgca	agcgatgatg	tctattatgg	2580
aggggatttc	ccaaaggatg	agtaagggtg	cctatcaggt	agatcttggt	tttaaacaga	2640
catcttccat	ccctatgatg	gggtccgaaa	tccaacagct	gaaaacattt	gttgacgtca	2700
tggaagccaa	cttggggaatg	atgaagattt	tggatcccgg	ttgtgccaac	atttcatctt	2760
tgagtgatct	acgggcagtt	gcccgatctc	acccgggttt	agtttcaggc	cctggagacc	2820
catctcccta	tgtgatacaa	ggaggcgaaa	tgccacttaa	taaactttcg	caaccagtg	2880
cacatccatc	tgaattgatt	aaaccgcga	ctgcatgcgg	gcctgatata	ggagtggaga	2940
gggacactgt	ccgtgcattg	atcatgtcac	gcccgaatga	cccgagttct	tcagccaagc	3000
tcctaagcaa	gttagatgca	gcccgggtcga	tcaggaaatc	caggaaaatc	aagcgcttg	3060
ctctaattgg	ctaattacta	ctgccacacg	tagcgggtcc	ctgtccactc	ggcatcacac	3120
ggaatctgca	ccgagttccc	ccccgcagac	ccaaggtcca	actctccaag	cggcaatcct	3180
ctctcgcttc	ctcagcccca	ctgaatgatc	gcgcaaccgc	aattaatcta	gctacattaa	3240
ggattaagaa	aaaatacggg	tagaattgga	gtgcccgaat	tgtgccaaga	tggactcatc	3300
taggacaatt	gggctgtact	ttgattctgc	ccattcttct	agcaacctgt	tagcatttcc	3360
gatcgctcta	caagacacag	gagatgggaa	gaagcaaatc	gccccgcaat	ataggatcca	3420
gcgccttgac	ttgtggactg	atagtaagga	agactcagta	ttcatcacca	cctatggatt	3480
catctttcaa	gttggggaatg	aagaagccac	tgctggcatt	atcgatgata	aacccaagcg	3540
cgagtttact	tccgctgcga	tgctctgcct	agggaagcgt	ccaaataaccg	gagaccttat	3600
tgagctggca	agggcctgtc	tcactatgat	ggtcacatgc	aagaagagtg	caactaatac	3660

~4940120.TXT

tgagagaatg	gttttctcag	tagtgcaggc	accccaagt	ctgcaaagct	gtagggttgt	3720
ggcaaa caaa	tactcatcag	tgaatgcagt	caagcacgtg	aaagcgccag	agaagatccc	3780
cgggagtgga	accctagaat	acaaggtgaa	ctttgtctcc	ttgactgtgg	taccgaagaa	3840
ggatgtctac	aagatccag	ctgcagtatt	gaagatttct	ggctcgagtc	tgtacaatct	3900
tgcgctcaat	gtcactatta	atgtggagg	agacccgagg	agtcctttgg	ttaaatctct	3960
gtctaaagtct	gacagcggat	actatgctaa	cctcttcttg	catattggac	ttatgaccac	4020
cgtagatagg	aaggggaaga	aagtgcatt	tgacaagctg	gaaaagaaaa	taaggagcct	4080
tgatctatct	gtcgggctca	gtgatgtgct	cgggccttcc	gtgttggtaa	aagcaagagg	4140
tgacaggact	aagcttttgg	caccttttct	ctctagcagt	gggacagcct	gctatcccac	4200
agcaaatgct	tctcctcagg	tggccaagat	actctggagt	caaaccgcgt	gcctgcggag	4260
cgtaaaatc	attatccaag	caggtaccca	acgcgctgtc	gcagtgaccg	ctgaccacga	4320
ggttacctct	actaagctgg	agaaggggca	cacccttgcc	aaatacaatc	cttttaagaa	4380
ataagctcgc	tctctagatg	tgcgctccgc	cactcaccc	agatcatcat	gacacaaaa	4440
actaatctgt	cttgattatt	tacagttagt	ttacctgtcc	atcaagttag	aaaaaacacg	4500
ggtagaagac	tctggatccc	ggttggcgcc	ctccagggtc	aggatgggct	ccagaccttt	4560
taccaagaac	ccagcaccta	tgatgctgac	tatccgggtc	gcgctgggtat	tgagttgcat	4620
ctgtccggca	aactccattg	atggcaggcc	ttttgcagct	gcaggaattg	tggttacagg	4680
agacaaagca	gtcaacatat	acacctcatc	ccagacagga	tcaatcatag	ttaagctcct	4740
cccgaatctg	ccaagcata	aggaggcatg	tgcgaagcc	cccttggtatg	catacaacag	4800
gacattgacc	actttgctca	cccccttgg	tgactctatc	cgtaggatac	aagagctctgt	4860
gactacatct	ggagggggga	gacaggggcg	cccttataggc	gccattattg	gcggtgtggc	4920
tcttgggggt	gcaactcccg	cacaaataac	agcgggccga	gctctgatac	aagccaaaca	4980
aaatgctgcc	aacatcctcc	gacttaaaga	gagcattgcc	gcaaccaatg	aggctgtgca	5040
tgaggctcact	gacggattat	cccaactagc	agtggcagtt	gggaagatgc	agcagtttgt	5100
taatgaccaa	tttaataaaa	cagctcagga	attagactgc	ataaaaaattg	cacagcaagt	5160
tggtgtgag	gtcaactctgt	acctaaccca	attgactaca	gtattcggac	cacaaatcac	5220
ttcacctgcc	ttaaacaagc	tgactattca	ggcactttac	aatctagctg	gtgggaatat	5280
ggattactta	ttgactaagt	taggtatagg	gaacaatcaa	ctcagctcat	taatcggtag	5340
cggcttaate	accgtaacc	ctattctata	cgactcacag	actcaactct	tggttatata	5400
ggttaactcta	ccttcagctg	ggaacctaaa	taatatgcgt	gccacctact	tggaacctt	5460
atccgtaagc	acaaccaggg	gatttgctc	ggcacttgct	ccaaaagtgg	tgacacaggt	5520
cgttctctgtg	atagaagaac	ttgacacctc	atactgtata	gaaactgact	tagattttata	5580
ttgtacaaga	atagtaacgt	tccctatgtc	ccctgggtatt	tactcctgct	tgagcggcaa	5640
tacatcgaggc	tgatcgctat	caaagaccga	aggcgcaact	actacaccat	atatgactat	5700
caaaggctca	gtcatcgcta	actgcaagat	gacaacatgt	agatgtgtaa	acccccggg	5760
tatcatatcg	caaaactatg	gagaagccgt	gtctctaata	gataaacaat	catgcaatgt	5820
tttatcctta	ggcgggataa	ctttaaggct	cagtggggaa	ttcgatgtaa	cttatcagaa	5880
gataatctca	atcaagtaat	ctcaagtaat	aataacaggc	aatcttgata	tctcaactga	5940
gcttgggaat	gtcaacaact	cgatcagtaa	tgctttgaat	aagttagagg	aaagcaacag	6000
aaaactagac	aaagtcaatg	tcaaactgac	cagcacatct	gctctcatta	cctatatcgt	6060
tttgactatc	atatctcttg	tttttggtat	acttagcctg	attctagcat	gctacctaat	6120
gtacaagcaa	aaggcgcaac	aaaagacctt	attatggctt	gggaataata	ccctagatca	6180
gatgagagcc	actacaaaaa	tgtgaacaca	gatgaggaa	gaaggtttcc	ctaatagtaa	6240
tttgtgtgaa	agttctggta	gtctgtcagt	tcggagagtt	aagaaaaaac	taccggttgt	6300
agatgaccaa	aggacgatat	acgggtagaa	cggtaagaga	ggccgcccc	caattgcgag	6360
ccagacttca	caacctccgt	tctaccgctt	caccgacaac	agtcctcaat	catggaccgc	6420
gccgttagcc	aagttgcgtt	agagaatgat	gaaagagagg	caaaaaatac	atggcgcttg	6480
atattccgga	ttgcaatctt	attcttaaca	gtagtgcact	tggttatatc	tgtagcctcc	6540
cttttatata	gcatgggggc	tagcacacct	agcgatcttg	taggcatacc	gactaggatt	6600
tccagggcag	aagaaaagat	tacatctaca	cttggttcca	atcaagatgt	agtagatagg	6660
atatataagc	aagtggccct	tgagtctcca	ttggcattgt	taaatactga	gaccacaatt	6720
atgaacgcaa	taacatctct	ctcttatcag	attaatggag	ctgcaaacaa	cagcgggttg	6780
ggggcaccta	ttcatgaccc	agattatata	ggggggatag	gcaaagaact	cattgtatag	6840
gatgctagtg	atgtcacatc	attctatccc	tctgcatttc	aagaacatct	gaattttatc	6900
ccggcgcccta	ctacaggatc	aggttgcact	cgaataccct	catttgacat	gagtgctacc	6960
cattactgct	acaccataa	tgtaatattg	tctggatgca	gagatcactc	acactcatat	7020
cagtattttag	cacttggtgt	gtcctcgaca	tctgcaacag	ggagggtatt	cttttctact	7080
ctgcgtttcca	tcaacctgga	cgacacccaa	aatcggaagt	cttgacgtgt	gagtgcaact	7140
cccctgggtt	gtgatatgct	gtgctcgaaa	gccacggaga	cagagggaaga	agattataac	7200
tcagctgtcc	ctacgcggat	ggtacatggg	aggttagggt	tcgacggcca	atatcacgaa	7260
aaggacctag	atgtcacaac	attattcggg	gactgggttg	ccaactaccc	aggagtaggg	7320
ggtggatctt	tatttgacag	ccgcgtatgg	tctcagctct	acggagggtt	aaaacccaat	7380
tcaccagctg	acactgtaca	ggaagggaaa	tatgtgat	acaagcgata	caatgacaca	7440

136

~4940120.TXT

tgccagatg	agcaagacta	ccagattcga	atggccaagt	cttcgtataa	gcctggacgg	7500
tttgggtgga	aacgcataca	gcaggctatc	ttatctatca	aagtgtcaac	atccttaggc	7560
gaagacccgg	tactgactgt	accgccaac	acagtcacac	tcatgggggc	cgaaggcaga	7620
attctcacag	tagggacatc	ccatttcttg	tatcagcgag	ggtcatcata	cttctctccc	7680
gcgttattat	atcctatgac	agtcagcaac	aaaacagcca	ctcttcatag	tccttatata	7740
ttcaatgcct	tcactcggcc	aggtagtatc	ccttgccagg	cttcagcaag	atgccccaac	7800
tcgtgtgtta	ctggagtcta	tacagatcca	tatcccctaa	tcttctatag	aaaccacacc	7860
ttgcgagggg	tattcgggac	aatgcttgat	ggtgaacaag	caagacttaa	ccctgcgtct	7920
gcagtatctc	atagcacatc	ccgcagtcgc	ataactcgag	tgagttcaag	cagcatcaaa	7980
gcagcataca	caacatcaac	ttgttttaaa	gtggtcaaga	ccaataagac	ctattgtctc	8040
agcattgctg	aaatatctaa	tactctcttc	ggagaattca	gaatcgctcc	gttactagtt	8100
gagatctcta	aagatgacgg	ggttagagaa	gccaggctcg	gctagttgag	tcaactatga	8160
aagattgtgga	atagcagcat	tgtatcacct	atcttctcgc	acatcaagaa	tcaaaccgaa	8220
tgccggcgcg	tgctcggaat	ccatgtcgcc	agttgaccac	aatcagccag	tgctcatgcy	8280
atcagattaa	gccttgtcaa	tagtctcttg	attaagaaaa	aatgtaagt	gcaatgagat	8340
acaaggcaaa	acagctcatg	gtaaataata	cgggtaggac	atggcgagct	ccggtcctga	8400
aagggcagag	atagcagcat	tcctaccaga	gtcacacctg	tcctaccat	tggtcaagca	8460
caaactactc	tattattgga	aattaactgg	gtaccgctt	cctgatgaat	gtgacttcca	8520
ccacctcatt	ctcagccgac	aatggaaaaa	aatacttgaa	tcggcctctc	ctgatactga	8580
gagaatgata	aaactcggaa	gggcagtaga	ccaaactctt	aaccacaatt	ccagaataac	8640
cggagtactc	caccacaggt	gttagaaga	actggcta	attgaggtcc	ctgattcaac	8700
caacaaat	cggaagattg	agaagaagat	ccaaattcac	aacacgagat	atggagaact	8760
gttcacaagg	ctgtgtacgc	atatagagaa	gaaactgctg	gggtcatctt	ggtctaacaa	8820
tgtcccccg	tcagaggagt	tcagcagcat	tcgtacggat	ccggcattct	ggtttcactc	8880
aaaatgggcc	acagccaagt	ttgcattggc	ccatataaaa	cagatccaga	ggcatctgat	8940
tgtggcagct	aggagaaggt	ctgcggccaa	caaattgggt	atgctaacc	ataaggtagg	9000
ccaagtcttt	gtcactcctg	aacttgttgt	tgtgacgcat	acgaatgaga	acaagttcac	9060
atgtcttacc	caggaacttg	tattgatgta	tgcagatatg	atggagggca	gagatatggt	9120
caacataata	tcaaccacgg	cgggtgcatt	cagaagctta	tcagagaaaa	ttgatgacat	9180
tttgcggtta	atagcagctc	tggaacaa	cttgggta	caagtctacg	atgttgatc	9240
actaatggag	ggatttgcat	acggagctgt	ccagctactc	gagccgtcag	gtacatttgc	9300
gggagatttc	ttcgcattca	acctgcagga	gcttaaagac	attctaattg	gcctcctccc	9360
caatgatata	gcagaatccg	tgactcatgc	aatcgctact	gtattctctg	gtttagaaca	9420
gaatcaagca	gcttgaccca	agagtatgct	agcgtctgtg	ggtcacccac	tgcttgatgc	9480
ccgtattgca	gcaaaggcag	tcaggagcca	aatgtgcgca	ccgaaaatgg	tagactttga	9540
tatgatcctt	caggtactgt	ctttcttcaa	gggaacaatc	atcaacggat	acagaaagaa	9600
gaatgcaggt	gtgtggccgc	gagtcaaagt	ggatacaata	tatgggaagg	tcattgggca	9660
actacatgca	gattcagcag	agatttcaca	ctgatcatg	ttgagagagt	ataagagt	9720
atctgcactt	gaatttgagc	catgtataga	atacgaccct	gtcactaacc	tgagcatggt	9780
cctaaaagac	aaggcaatcg	cacaccccaa	cgataattgg	cttgccctcg	ttaggcgga	9840
ccttctctcc	gaagaccaga	agaaacatgt	aagggaagcg	acttcgacta	accgcctctt	9900
gatagatgtt	ttagagtcaa	atgattttga	tcctataaaa	gagatggaat	atctgacgac	9960
ccttgagtac	cttagagatg	acaatgtggc	agtatcatac	tcgctcaaag	agaaggaagt	10020
gaaagttaat	ggacggatct	tcgctaagct	gacaaagaag	ttaaggaact	gtcaggtgat	10080
ggcggaagg	atcctagccg	atcagattgc	acctttcttt	cagggaaatg	gagtcattca	10140
ggatagcata	tccttgacca	agagtatgct	agcgatgagt	caactgtctt	ttaacagcaa	10200
taagaaacgt	atcactgact	gtaaagaaag	agtatcttca	aaccgcaatc	atgatccgaa	10260
aagcaagaac	cgtcggagag	ttgcaacctt	cataacaact	gacctgcaaa	agtactgtct	10320
taattggaga	tatcagacga	tcaaattggt	cgctcatgcc	atcaatcagt	tgatgggcct	10380
acctcatttc	ttcgagtggg	ttcacctaag	actgatggac	actacgatgt	tcgtaggaga	10440
ccctttcaat	cctccaagtg	acctactga	ctgtgacctc	tcaagagtcc	ctaattgata	10500
catatatatt	gtcagtgcga	gagggggtat	cgaaggatta	tgccagaagc	tatggacaat	10560
gatctcaatt	gctgcaatcc	aacttgctgc	agctagatcg	cattgtcgtg	ttgcctgtat	10620
ggtagacggg	gataatcaag	taatagcagt	aacgagagag	gtaagatcag	atgactctcc	10680
ggagatgggt	ttgacacagt	tgcatcaagc	cagtataaat	ttcttcaagg	aattaatcca	10740
tgtcaatcat	ttgattggcc	ataatttgaa	ggatcgtgaa	accatcaggt	cagacacatt	10800
cttcatatac	agcaaacgaa	tcttcaaaga	tggagcaatc	ctcagtcagg	tcctcaaaaa	10860
ttcatctaaa	ttagtgttag	tgtaggtgaa	tctcagttaa	aacaccgtaa	tgctctgtgc	10920
caacattgcc	tctactgtag	cacggctatg	cgagaacggg	cttcccaaag	acttctgtta	10980
ctatttaaac	tatataatga	gttgtgtgca	gacatacttt	gactctgagt	tctccatcac	11040
caacaattcg	caccccgatc	ttaatcagtc	gtggattgag	gacatctctt	ttgtgcactc	11100
atatgttctg	actctgccc	aattaggggg	actgagtaac	cttcaatact	caaggctcta	11160
cactagaaat	atcggtgacc	cggggactac	tgcttttgca	gagatcaagc	gactagaagc	11220

137

~4940120.TXT

```

agtgggacta ctgagtccta acattatgac taatatctta actaggccgc ctgggaatgg 11280
agattggggc agtctgtgca acgacccata ctctttcaat tttgagactg ttgcaagccc 11340
aaatatgttt ctttaagaaac atacgcaaag agtcctatgt gaaacttggt caaatccctt 11400
attgtctgga gtgcacacag aggataatga ggcagaagag aaggcattgg ctgaattctt 11460
gcttaatcaa gaggtgattc atccccgctg tgcgcatgcc atcatggagg caagctctgt 11520
aggtaggaga aagcaaattc aagggtctgt tgacacaaca aacactgtaa ttaagattgc 11580
gcttactagg aggccattag gcatcaagag gctgatgcgg atagtcaatt attctagcat 11640
gcatgcaatg ctgttttagag acgatgtttt ttcctctagt agatccaacc accccttagt 11700
ctcttctaata atgtgttctc tgacactggc agactatgca cggaaatagaa gctggtcacc 11760
tttgacggga ggcaggaaaa tactgggtgt atctaatacct gatacgatag aactcgtaga 11820
gggtgagatt cttagtgtaa gcgagggtgt tacaagatgt gacagcggag atgaacaatt 11880
tacttggttc catcttccaa gcaatataga attgaccgat gacaccagca agaatcctcc 11940
gatagagcta ggtcaaagac ggtcaaagag agagctgcct cacttgcgaa cacttgcgaa 12000
aatagctcat atgtcgccac atgtgaaggc tgccctaagg gcatcatccg tgttgatctg 12060
ggcttatggg gataatgaag taaattggac tgctgtcttc acgattgcaa aatctcggtg 12120
taatgtaaaac ttagagtatc ttcggttact gtccccctta cccacggctg ggaatcttca 12180
acatagacta gatgatggtg taacttcagat cctgcatctc tctacaggtg tctacaggtg 12240
tcaccitaca ttcacatata caatgattct caaaggctgt tcatgaaga aggagtcaaa 12300
gaggggaatg tggttttacca acagagtcac gctcttgggt ttatctctaa tcgaatcgat 12360
ctttccaatg acaacaacca gaacatatga tgagatcaca ctgcacctac atagtaaatt 12420
tagttgtctg atcagggaag cactgtttgc gagctacttg ggtggcacc 12480
ggaagtgagg acagtgacct caaataagtt tatgtatgat cctagccctg tatcgagggg 12540
agactttgct agacttgact tagctatctt caagagttat gagcttaatc tggagtcata 12600
tcccacgata gagctaatac acattctttc aatatccagc ggggaagttga ttggccagtc 12660
tgtgttttct tatgatgaag atacctccat aaagaatgat gccataatag tgtatgacaa 12720
taccggaat tggtatgagg aatgtcagaa ttcagatgtg gtccgcctat ttgaatatgc 12780
agcacttgaa gtgtcctcc accgttctta ccaactctat tacctgagag taagaggcct 12840
agacaatatt gtcttatata tgggtgattt atacaagaat atgccaggaa ttctactttc 12900
caacatgca gctacaatat ctcatcctgt cattcattca aggttacatg cagtgggcct 12960
ggtcaaccat gacgggacac atcacaggat agttacaggat tttatcgaaa tgtctgcaaa 13020
actgttagta tcttgacccc gacgtgtgat ctccggctta tattcaggaa ataagtatga 13080
tctgtgttcc ccatctgtct tagatgataa cctgaatgag aagatgcttc agctgatata 13140
ccggttatgc tgtctgtaca cgggtactct tctacaaca agagaaatcc cgaataaag 13200
aggcttaact gcagaagaga atgttactag tctactagag tatttactgt cggatgctgt 13260
gaaaccatta cttagccccg atcaagttag ctctatcatg tctcctaaca taattacatt 13320
cccagctaata ctgtactaca tgtctcggaa gagcctcaat ttgatcaggg aaagggagga 13380
cagggatact atcctggcgt tgttgttccc ccaagagcca ttattagagt tcccttctgt 13440
gcaagataatt ggtgctcgag tgaaagatcc gacctcggag caactcggg catttttggc 13500
agagttagat ttgagtgtc cagcaaggta tgacgcattc acacttagtc agattcatcc 13560
tgaactcaca tctccaaatc cggaggaaga ctacttagta cgatacttgt tcagagggat 13620
agggactgca tcttctctt ggtataaggc atcccatctc ctttctgtac ccgaggtgag 13680
atgtcaagaa ccttataact ccttataact agcggagcca tcatgagtct 13740
tcttgaactg catgtaccac atgaaactat acgctctttt caaatgagat 13800
gaaccccccg caacgacatt tccggccgac cccaactcag tttttgaatt cgggtgttta 13860
taggaatcta caggcggagg taacatgcaa ggatggattt gtccaagagt tccgtccatt 13920
atggagagaa aatacagagg aaagtacatt aaagcagtgg ggtatattac 13980
atctgcagta ccctacagat ctgtatcatt gctgcattgt gacattgaaa ttcctccagg 14040
gtccaatcaa agcttactag atcaactagc tatcaattta tctctgattg ccatgcattc 14100
tgtaaggtag ggcggggtag taatcatcaa agtgttgtat gcaatgggat actactttca 14160
tctactcatg aacttgtttg ctccgtgttc caaaaagga tatattctct ctaatggtta 14220
tgcatgtcga ggggatattg agtgttacct ggtatttgtc atgggttacc tgggcggggc 14280
tacatttgta catgaggtgg tgaggatggc aaaaactctg gtgcagcggc acggtacgct 14340
cttgtctaaa tcagatgaga tcacactgac caggttattc acctcacagc ggcagcgtgt 14400
gacagacatc ctatccagtc ctttaccagg attaataaag tacttgagga agaataattga 14460
cactgcgctg attgaagccg ggggacagcc cgtccgtcca ttttgtgcgg aaagtttggg 14520
gagcacgcta gcgaacataa ctacagataa ccagattatc gctagtcaca ttgacacagt 14580
catccggctc gtgatataata tggaaagctga ggtgatctc gctgacacag tatttctatt 14640
taccctttac atctctctca ctgacgggaa aaagaggaca tcacttaaac agtgcacgag 14700
acagatccta gaggttaca tactaggtct tagagtcgaa aatctcaata aaataggcga 14760
tataatcagc ctagtgtcta aaggcatgat ctccatggag gacctatcc cactaaggac 14820
atacttgaag catagtacct gccctaaata tttgaaggct gtcctaggtg ttacaaact 14880
caaaagaaatg tttacagaca cttctgtact cgtgtcaac aaaattcta 14940
catgaaaact ataggcaatg cagtcaaagg atattacagt aactgtgact cctaacgaaa 15000

```

~4940120.TXT

```

atcacatatt aataggctcc ttttttggcc aattgtattc ttgttgattt aattatatta 15060
tgtagaaaaa aagttgaact ctgactcctt aggactcgaa ttcgaactca aataaatgtc 15120
tttaaaaaag gttgcgaca attattcttg agtgtagtct cgtcattcac caaatctttg 15180
tttggt                                           15186

```

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a consensus sequence based on avirulent avian
 strains of influenza A H5 in the region
 immediately before the HA cleavage site

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

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> altered consensus sequence based on avirulent
 avian strains of influenza A H5 in the region
 immediately before the HA cleavage site

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

<210> 13
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> consensus sequence based on avirulent avian
 strains of influenza A H5 in the region
 immediately before the HA cleavage site

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

33

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> consensus sequence based on avirulent avian
 strains of influenza A H5 in the region
 immediately before the HA cleavage site

~4940120.TXT

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

<210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> altered consensus sequence based on avirulent
 avian strains of influenza A H5 in the region
 immediately before the HA cleavage site

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

21

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

<220>
 <223> consensus sequence based on avirulent avian
 strains of influenza A H5 in the region
 immediately before the HA cleavage site

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

<210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> further altered DNA consensus sequence based on
 avirulent avian strains of influenza A H5 in the
 region immediately before the HA cleavage site

<400> 17
 cctcagcggg agacgcggg a

21

<210> 18
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> "gene end" sequence engineered to the genes
 which were inserted into the NDV as an
 extratranscriptional units

<400> 18

~4940120.TXT

ttagaaaaaa

10

<210> 19

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> "gene start" sequence engineered to the genes
which were inserted into the NDV as an
extratranscriptional units

<400> 19

acgggtagaa

10

<210> 20

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer used to produce ectodomain (ECTO)
of the H5 HA gene

<400> 20

cggctagctt agaaaaaata cggtagaagt gaaactagtc cgccaccatg gaaagaatag 60
tgattgcctt tgca 74

<210> 21

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer used to produce ectodomain (ECTO)
of the H5 HA gene

<400> 21

cggttaacct gataagcccc cattgattct aat

33

<210> 22

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer used to amplify TM and CT of the NDV F gene

<400> 22

cggttaacct cattacctat atcgttttga ct

32

<210> 23

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer used to amplify TM and CT of the NDV F gene

<400> 23

cggagctcaa gctagcttat cacatttttg tagtggctct catctg

46

<210> 24

~4940120.TXT

<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer F2aa-1(+) used to generate rNDV/F2aa

<400> 24
ggatcccggg tggcgccctc cagg 24

<210> 25
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer F2aa-1(-) used to generate rNDV/F2aa

<400> 25
aaggcgctc tgtctccgcc ctccagatgt agtcacag 38

<210> 26
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer F2aa-2(+) used to generate rNDV/F2aa

<400> 26
ggcggagaca gaggcgcctt ataggcgcca ttattgg 37

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer F2aa-2(-) used to generate rNDV/F2aa

<400> 27
ccatattccc accagctaga ttgt 24

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer F3aa-1(+) used to generate rNDV/F3aa

<400> 28
ggatcccggg tggcgccctc cagg 24

<210> 29
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

~4940120.TXT

<223> reverse primer F3aa-1(-) used to generate rNDV/F3aa

<400> 29
aaagcgcctc tgtctccgcc ctccagatgt agtcacag 38

<210> 30
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer F3aa-2(+) used to generate rNDV/F3aa

<400> 30
ggcggagaca gaggcgcttt ataggcgcca ttattgg 37

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer F3aa-2(-) used to generate rNDV/F3aa

<400> 31
ccatattccc accagctaga ttgt 24

<210> 32
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HpaNDV F(TM+CYTO)P primer used to generate
chimeric H7HA gene

<400> 32
cggttaacct cattacctat atcgttttga ct 32

<210> 33
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SacNDVF(TM+CYTO)M primer used to generate
chimeric H7HA gene

<400> 33
cggagctcaa gctagcttat cacatttttg tagtggctct catctg 46

<210> 34
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SpeH7(ECTO)P primer used to generate
chimeric H7HA gene

<400> 34
cgactagtcc gccaccatga aactcaa at tctggcattc at 42

143

~4940120.TXT

<210> 35

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HpaH7(ECTO)M primer used to generate
chimeric H7HA gene

<400> 35

cggttaacgt ctttgtatcc actactcaat ttcac

35

<210> 36

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partical H7HA with GE/GS and Kozak sequence

<400> 36

gctagcttag aaaaaatacg ggtagaacac tagtccgccca ccatgggtcag ct

52

144



**EXTRACTO PARA LA PUBLICACION
SOLICITUD DE PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

.(21) No. SOLICITUD		.(51) INT.CL: A61K 39/00	
.(22) FECHA DE PRESENTACION		.(71) SOLICITANTE: THE MOUNT SINAI MEDICAL CENTER OF NEW YORK UNIVERSITY	
.(30) PRIORIDAD		.(72) INVENTOR(ES): Peter PALESE-Adolfo GARCIA-SASTRE	
.(31) No. DE SOLICITUD		60/741,833- 60/802,864	
.(32) FECHA DE PRESENTACION		Sean Powell Dipan Patel	
		Diciembre 2,2005 Mayo 22,2006	
.(33) PAIS E.U.A.		.(74) APODERADO: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSON	

.(54) TITULO: SUPERFICIE NO NATIVAS Y USO DE LOS MISMOS

.(57) RESUMEN

1. Un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento NA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en el cual el marco de lectura abierto NA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno neuraminidasa de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-N, de modo que la proteína de fusión neurominidasa es expresada e incorporada en el virus quimérico de influenza aviar.
2. Un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento HA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión hemaglutinina, en la cual el marco de lectura abierto HA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio HA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno enlazante/fusogénico del receptor de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-C, de modo que la proteína de fusión hemaglutinina es expresada e incorporada en el virus quimérico de influenza aviar.
3. Un virus quimérico de influenza, que comprende un segmento HA empaquetado bicistrónico de virus de influenza, que comprende:
 - (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína hamaglutinina de influenza aviar y,
 - (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión de hemaglutinina, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio de la hemaglutinina son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-C,de modo que la hemaglutinina y la proteína de fusión de la influenza son expresadas e incorporadas en el virus quimérico de influenza aviar.
4. Un virus quimérico de influenza aviar, que comprende un segmento NA empaquetado bicistrónico de virus de influenza aviar.
 - (a) un primer marco de lectura abierto que codifica una proteína neuraminidasa de influenza aviar y,

- (b) un segundo marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en la cual los nucleótidos que codifican el ectodominio de neuraminidasa son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno protector de un agente infeccioso, salvo influenza, que está anclado por el extremo-N,

de modo que la neuraminidasa y la proteína de fusión de la influenza son expresadas e incorporadas en el virus quimérico de influenza aviar.

5. Un virus quimérico de influenza aviar, que comprende a segmento NA empaquetado de virus de influenza que codifica una proteína de fusión neuraminidasa, en la cual el marco de lectura abierto NA es modificado de modo que los nucleótidos que codifican el ectodominio NA son reemplazados por nucleótidos que codifican un ectodominio de un antígeno HN de NDV, de modo que la proteína de fusión neuraminidasa es expresada e incorporada en el virus quimérico de influenza aviar.

12. Un método para producir una formula inmunogénica; el método que comprende:

- (a) propagar el virus quimérico de influenza aviar de la reivindicación 1,2,3,4 o 5 en una línea celular que es susceptible a una infección por virus de influenza aviar; y
(b) recolectar el virus progenie,

en donde el virus se cultiva en cantidades suficientes y bajo condiciones adecuadas para quedar libre de contaminación, de modo que el virus progenie es apto para usar en una formulación inmunogénica.

Castillo Grau & Asociados

ABOGADOS
APARTADO AEREO 251473 .
BOGOTA, COLOMBIA

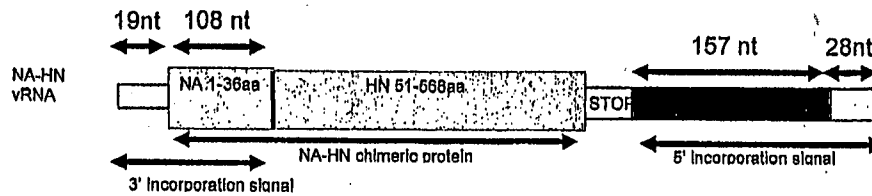


FIG. 1

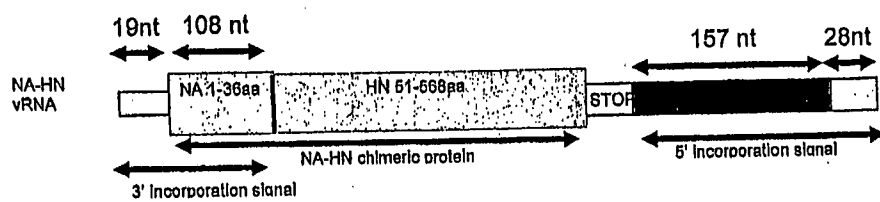


FIG. 1

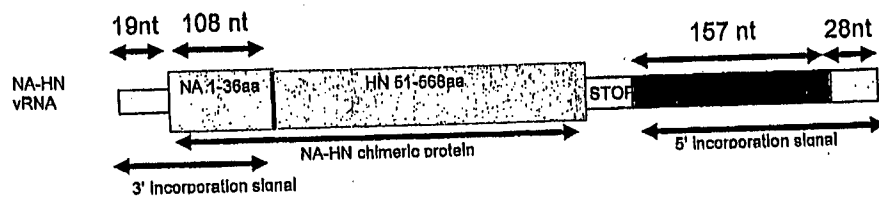


FIG. 1

47

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-067535-00000-0000

Fecha: 2008-07-02 15:09:31
Tra. 11 PATENTE I/II
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 146



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente.
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Descripción de la invención
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

SRT
Firma Responsable

Fecha JUN 2 08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia