

VIRUS DEL HERPES AVIAR RECOMBINANTES QUE CONTIENEN MÚLTIPLES GENES EXTRAÑOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a virus de herpes recombinantes en los que se han insertado al menos dos secuencias de nucleótidos recombinantes, y los usos de estos. La invención es particularmente adecuada para producir virus o composiciones multivalentes, tales como vacunas, que pueden inducir una inmunidad protectora contra patógenos o enfermedades aviares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La carne y los huevos de aves de corral son fuentes importantes de alimento, cuyo consumo aumenta continuamente debido al crecimiento de la población humana y su gran relación calidad-precio. Para garantizar la salud de las aves de corral, así como la salubridad y la seguridad alimentaria, la tecnología de vacunas avícolas se ha convertido en una preocupación mundial.

Los vectores virales que expresan proteínas patógenas se utilizan comúnmente como vacunas de aves de corral contra patógenos diana. Las vacunas que incluyen tales vectores virales inducen la expresión de proteínas patógenas extrañas dentro de los huéspedes infectados, lo que puede conducir a una inmunidad protectora.

Se han investigado muchas clases diferentes de virus como vectores candidatos para la vacunación de aves, tales como adenovirus, AAV, virus de la viruela aviar, virus del herpes y similares.

Se han determinado tres tipos de virus del herpes, MDV1, MDV2 y MDV3 (también conocido como virus del herpes del pavo (HVT)). Existe una gran similitud entre dichos virus (ver Kingham *et al.*, *Journal of General Virology* (2001) 82, 1123-1135) y todos se han utilizado para preparar virus recombinantes en los que se ha integrado un gen extraño derivado de un patógeno, para usar como vacuna en aves, particularmente aves de corral, como pollos.

Aunque tales preparaciones de vacunas proporcionan resultados eficaces para vacunar especies aviares contra muchas enfermedades, puede producirse competencia e inmunosupresión entre patógenos cuando se inyectan aves con dos o más virus del herpes recombinantes, cada uno de los cuales codifica un antígeno diferente.

Para superar dicha interferencia y también para facilitar la vacunación contra múltiples enfermedades, se han realizado varios intentos de producir virus del herpes multivalentes que codifiquen varios antígenos.

Los primeros estudios insertaron varios genes en un único sitio de clonación en el genoma del virus del herpes (véase, por ejemplo, el documento EP1026246). Sin embargo, tales constructos no proporcionaron el nivel requerido de inmunidad protectora o resultaron ser inestables, donde todos o parte de los genes extraños se eliminaron durante los pases repetidos en las células de cultivo.

El documento WO2013/144355 informa de virus del herpes estables que codifican múltiples antígenos extraños obtenidos con el uso de combinaciones de sitios de clonación ubicados en regiones no codificantes del genoma viral.

Los documentos WO2013/057236, WO2013/082327 y WO2013/082317 informan de otro enfoque en el diseño de HVT multivalente, mediante la clonación de al menos un gen dentro de la secuencia codificante de US2 de los virus del herpes. Según estas solicitudes, US2 no sería esencial para la replicación del virus, aunque dicha propiedad no está verificada.

Considerando el número de patógenos y especies, existe una necesidad en la técnica de virus herpes multivalentes recombinantes adicionales que puedan expresar de manera estable múltiples genes *in vivo* y sean adecuados para la vacunación de aves, particularmente aves de corral.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona virus de herpes aviar recombinantes que contienen múltiples secuencias de nucleótidos recombinantes en al menos dos ubicaciones separadas del genoma viral.

Más específicamente, la invención proporciona virus del herpes recombinantes de pavo (HVT) que comprenden al menos una primera y una segunda secuencia de nucleótidos recombinante, cada secuencia de nucleótidos recombinante codifica un polipéptido, en donde la primera secuencia de nucleótidos recombinante se inserta en la región intergénica del genoma viral ubicado entre HVT053 (UL45) y HVT054 (UL46), y en donde la segunda secuencia de nucleótidos recombinante se inserta en una región intergénica del genoma viral ubicada entre HVT064 (LORF3) y HVT070, particularmente entre HVT064 (LORF3) y HVT065 (UL55), entre HVT065 (UL55) y HVT066 (LORF4), entre HVT066 (LORF4) y HVT067 (LORF5), entre HVT067 (LORF5) y HVT069 (LORF6), o entre HVT069 (LORF6) y HVT070, incluso más en particular

entre HVT065 (UL55) y HVT066 (LORF4).

Cada nucleótido recombinante puede codificar el mismo polipéptido o uno diferente, particularmente un antígeno, una citoquina, un adyuvante, una hormona y similares. En una forma de realización particular, cada nucleótido recombinante codifica un antígeno, que puede ser el mismo o diferente (o porciones idénticas o distintas de un mismo antígeno) y puede ser de un mismo patógeno o de distintos patógenos. El (los) antígeno(s) pueden seleccionarse o derivarse, por ejemplo, de proteínas de superficie, proteínas secretadas o proteínas estructurales de dicho(s) patógeno(s) o fragmentos inmunogénicos de estos.

La invención también se refiere a un ácido nucleico que comprende el genoma de un HVT recombinante como se definió con anterioridad, y a un vector (tal como un plásmido) que contiene dicho ácido nucleico.

La invención se refiere además a una célula que contiene un HVT recombinante o un ácido nucleico o vector como se definió con anterioridad.

Otro objeto de la invención es una composición que comprende un HVT recombinante como se definió con anterioridad y un excipiente o diluyente adecuado.

Otro objeto de la invención es una composición que comprende un ácido nucleico o una célula como se definió con anterioridad y un excipiente o diluyente adecuado.

Otro objeto de la invención reside en una vacuna que comprende una cantidad inmunizante eficaz de un HVT recombinante, ácido nucleico y/o célula, como se definió con anterioridad.

Un objeto adicional de la invención reside en un HVT recombinante, ácido nucleico o célula como se definió con anterioridad, para uso para inmunizar un ave, tal como aves de corral, contra un patógeno.

Un objeto adicional de la invención reside en un HVT recombinante, ácido nucleico o célula como se definió con anterioridad, para uso para proteger un ave, tal como aves de corral, contra una enfermedad causada por un patógeno.

Un objeto adicional de la invención reside en una vacuna como se define con anterioridad, para uso para vacunar a un ave, tal como aves de corral, contra uno o más patógenos.

Un objeto adicional de la invención reside en un método para vacunar a un ave que comprende administrar al ave una composición o vacuna o virus como se definió con anterioridad.

Un objeto adicional de la invención reside en un método para inducir una

respuesta inmunitaria a un antígeno en un ave que comprende administrar al ave una composición o vacuna o virus como se definió con anterioridad.

La invención también proporciona un kit de vacunación para inmunizar a un ave que comprende los siguientes componentes:

- a. una cantidad eficaz de una composición o vacuna como se definió con anterioridad, y
- b. medios para administrar dicha composición o vacuna a dicha ave.

La invención puede usarse en cualquier ave, para la vacunación contra cualquier patógeno aviar. Es especialmente adecuado para vacunar aves de corral, como pollos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra el diagrama esquemático del genoma de HVT (**1A**). La ubicación del Unique Long (UL) 45 (HVT053) y UL 46 (HVT054) y la ubicación del Unique Long HVT064-070 están marcadas. Se pueden insertar secuencias de nucleótidos recombinantes en sitios Sfil generados por PCR entre HVT053 (UL45) y HVT054 (UL46), y entre HVT064 y 065, y/o HVT065 y 066, y/o HVT066 y 067, y/o HVT 067 y 069 y/o HVT 069 y 070. También se representan constructos de HVT que integran diferentes agrupaciones de secuencias de nucleótidos y promotores, según formas de realización particulares de la invención (**1B**).

La Figura 2A muestra la tinción por inmunofluorescencia de CEF infectados con HVT recombinantes dobles según formas de realización de la invención (FW241 y FW242) que coexpresan NDV-F e ILTV-gB (células infectadas con rHVT/ND/ILT). La expresión de proteína F se detectó mediante Mab anti-F (77-2) y Alexa Flour 488. La expresión de proteína gB se detectó mediante suero de conejo anti-gBN4 y Alexa Flour 546. Los resultados muestran que ambas células infectadas con FW241 o FW242 expresan tanto la proteína NDV-F insertada y la proteína ILTV-gB insertada. Se observaron mediante microscopio de fluorescencia con un aumento de 40 veces.

La Figura 2B muestra la tinción por inmunofluorescencia de CEF infectados con HVT recombinantes dobles según formas de realización de la invención (FW259) que coexpresan IBDV VP2 e ILTV-gB (células infectadas con rHVT/IBD/ILT). La expresión de proteína VP2 fue detectada por Mab anti-VP2 (R63) y Alexa Flour 488. La expresión de proteína gB fue detectada por suero de conejo anti-gBN4 y Alexa Flour 546. Los resultados muestran que las células infectadas con FW259 expresan tanto la proteína IBDV-VP2 insertada como la proteína ILTV-gB insertada. Se

observaron mediante microscopio de fluorescencia con un aumento de 100 veces.

Las Figuras 3A y 3B son análisis de transferencia Western que muestran la expresión de la proteína F y/o la proteína gB en CEF infectados con rHVT de la invención. Como se muestra en la Figura 3 A, se observó una banda de proteína de 60 kilodaltons (kDa) solo en el carril con células infectadas con rHVT/ND/ILT, que era el tamaño esperado de la proteína F (➡). No había banda en el carril de rHVT/45-46BacVP2 (FW181). Como se muestra en la Figura 3B, la proteína gB se observó a 54 kilodaltons (kd) en los carriles de cada rHVT/ND/ILT (⇔). Por el contrario, no había banda en el carril de rHVT/45-46 PecF (FW168). Los rHVT dobles de la invención expresaron tanto NDV-F como ILTV-gB.

Las Figuras 4A y 4B muestran los resultados de un análisis de PCR para la comprobación de la estabilidad de HVT FW242 recombinante en pases sucesivos, lo que indica que después de 20 pases, el gen F y el gen gB se expresaron de forma estable en el rHVT FW242 de la invención.

Las Figuras 4C y 4D muestran los resultados de un análisis de PCR para la verificación de la estructura del genoma de FW243 purificado y la verificación de la estabilidad de FW243 en pases sucesivos. Indicaron que FW243, HVT/ND/ILT recombinante doble de la invención tenía la estructura genómica esperada y, después de 20 pases, el gen F y el gen gB se expresaron de forma estable en el rHVT FW243 de la invención.

Las Figuras 5A y 5B muestran los resultados de un análisis de transferencia Western para la comprobación de la estabilidad de HVT FW244 recombinante en pases sucesivos, lo que indica que después de 20 pases la proteína F y la proteína gB se expresaron de forma estable en CEF infectado con el rHVT FW244 de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente a virus de herpes aviar recombinantes que contienen múltiples secuencias de nucleótidos recombinantes, su fabricación, composiciones que las comprenden y sus usos.

Definiciones

La presente divulgación se entenderá mejor al hacer referencia a las siguientes definiciones:

El término “*recombinante*”, en relación con un virus del herpes, se refiere a un virus del herpes cuyo genoma ha sido modificado mediante la inserción de al menos

una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, ADN, como un gen) que no se encuentra naturalmente en el genoma del virus del herpes, o que se encuentra naturalmente en dicho genoma, pero en una forma diferente o en una posición diferente. Se entenderá que el virus del herpes recombinante se puede fabricar mediante una variedad de métodos tales como tecnología de ADN recombinante como se describe en este y, una vez elaborado, se puede reproducir sin uso adicional de tecnología de ADN recombinante. Por tanto, la estructura del “virus del herpes recombinante” se describe en términos de inserción de ADN.

En la presente descripción, las expresiones “ácido nucleico”, “*secuencia nucleica*” y “*secuencia nucleotídica*” se usan indistintamente y se refieren a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia determinada, que puede ser desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos. La secuencia de nucleótidos se puede preparar en primer lugar, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes, enzimáticas y/o químicas, y posteriormente se puede replicar en una célula huésped o en un sistema *in vitro*. Una secuencia de nucleótidos comprende preferentemente un marco de lectura abierto que codifica una molécula (por ejemplo, un péptido o una proteína). La secuencia de nucleótidos puede contener secuencias adicionales tales como un promotor, un terminador de la transcripción, un péptido señal, un IRES, etc. Preferentemente, un marco de lectura abierto en un ácido nucleico recombinante no contiene un intrón.

Una “*secuencia de nucleótidos recombinante*” designa una secuencia que no se encuentra naturalmente en el genoma de un virus del herpes, o que se encuentra naturalmente en dicho genoma, pero en una forma diferente o en una posición diferente. Las “*secuencias de nucleótidos recombinantes*” típicas son genes que codifican preferentemente moléculas que no son producidas naturalmente por un virus del herpes aviar, tales como moléculas de un virus diferente o de una célula. Un “gen” en el contexto de tal “*secuencia de nucleótidos recombinante*” designa cualquier molécula de ácido nucleico que contiene un marco de lectura abierto, tal como un ácido nucleico que consiste o consiste esencialmente en un marco de lectura abierto. El gen puede contener además elementos reguladores, como un promotor o un terminador, por ejemplo.

En la presente descripción, los términos “*polipéptido*”, “*péptido*” y “*proteína*” se usan indistintamente y se refieren a cualquier molécula que comprenda un polímero de al menos 2 aminoácidos consecutivos.

La expresión “*región intergénica*” es bien conocida en la técnica y se refiere a

cualquier región de un genoma viral que se encuentra entre dos ORF virales especificados. La región intergénica entre UL45 (HVT053) y UL46 (HVT054) designa así la región que comienza inmediatamente en 3' del codón de terminación de UL45 y termina inmediatamente en 5' del codón de terminación de UL46 (ya que ambos ORF están en orientación opuesta). La región intergénica entre HVT064 y HVT065 designa la región que comienza inmediatamente en 3' del codón de inicio de HVT064 y termina inmediatamente en 5' del codón de inicio de HVT065 (ya que ambos ORF están en orientación inversa). De manera similar, la región intergénica entre HVT065 y HVT066 designa la región que comienza inmediatamente en 3' del codón de terminación de HVT065 y termina inmediatamente en 5' del codón de terminación de HVT066 (ya que ambos ORF están en orientación opuesta). La región intergénica puede incluir regiones reguladoras tales como terminadores o promotores.

La expresión “*especie aviar*” pretende abarcar todo tipo de aves tales como aves de la clase Aves, es decir, animales vertebrados que son emplumados, alados, bípedos, endotérmicos y ponedores. En el contexto de la invención, las aves o especies aviares se refieren más particularmente a aves con intereses económicos y/o agronómicos, como aves de corral (como pollos y pavos), aves acuáticas (como patos y gansos) y aves ornamentales (como cisnes y psitácidos).

El término “*vacuna*” como se usa en este documento designa un agente que puede usarse para causar, estimular o amplificar una respuesta inmunitaria en un organismo.

El término “*multivalente*”, como se usa en este documento en relación con un virus del herpes recombinante, un vector o una vacuna de la invención se refiere a un virus del herpes recombinante o una vacuna que comprende al menos dos secuencias de nucleótidos recombinantes como se definió con anterioridad, donde dichas secuencias son iguales o diferentes, y de un mismo patógeno o un patógeno diferente.

HVT recombinante multivalente

La invención se refiere a HVT recombinante que contiene múltiples genes extraños en ubicaciones particulares. Más específicamente, la invención muestra que se puede obtener HVT recombinante multivalente estable y eficaz cuando:

- . al menos una secuencia de nucleótidos recombinante se clona en la región intergénica del genoma ubicada entre HVT053 y HVT054, y
- . al menos una secuencia de nucleótidos recombinante se clona en una región intergénica del genoma ubicada entre HVT064 y HVT070.

Como se muestra en los ejemplos, cuando se usa tal combinación de sitios, el HVT recombinante es estable durante al menos 10, preferentemente al menos 15, más preferentemente al menos 20 pases en células CEF. Además, al utilizar tal combinación de sitios, se obtiene una expresión fuerte y duradera de los genes *in vivo*, suficiente para conseguir una alta inmunidad protectora.

Existen muchos sitios potenciales de clonación en un virus del herpes recombinante. En particular, hay casi 397 ORF, 99 de los cuales se estima que codifican productos proteicos funcionales, en un genoma del virus del herpes (véase Afonso *et al.*, *J. Virology* 75 (2), 2001, 971). Además, algunos sitios de clonación adecuados para usar en el contexto de virus monovalentes han mostrado inestabilidad cuando se usan en el contexto de virus multivalentes, especialmente cuando se usan dos sitios de clonación diferentes en un mismo virus. La invención muestra que la combinación de la región intergénica entre HVT053 y HVT054 con una región intergénica entre HVT064 y HVT070, permite la estabilidad y el nivel adecuado de expresión de ambas secuencias de nucleótidos recombinantes clonadas *in vitro*. Por tanto, estos virus recombinantes particulares representan nuevos agentes eficaces para inducir una potente inmunidad protectora *in vivo*.

En una forma de realización particular, la invención se refiere a un HVT recombinante que contiene múltiples ácidos nucleicos recombinantes (por ejemplo, genes extraños) en el que:

- . al menos un ácido nucleico recombinante se clona en la región intergénica del genoma ubicada entre HVT053 y HVT054, y
- . al menos un ácido nucleico recombinante se clona en la región intergénica del genoma ubicada entre HVT064 y HVT065.

En una forma de realización particular adicional, la invención se refiere a un HVT recombinante que contiene múltiples ácidos nucleicos recombinantes (por ejemplo, genes extraños) en el que:

- . al menos un ácido nucleico recombinante se clona en la región intergénica del genoma ubicada entre HVT053 y HVT054, y
- . al menos un ácido nucleico recombinante se clona en la región intergénica del genoma ubicada entre HVT065 y HVT066.

En una forma de realización particular adicional, la invención se refiere a un HVT recombinante que contiene múltiples ácidos nucleicos recombinantes (por ejemplo, genes extraños) en el que:

- . al menos un ácido nucleico recombinante se clona en la región intergénica del

genoma ubicada entre HVT053 y HVT054, y

- . al menos un ácido nucleico recombinante se clona en la región intergénica del genoma ubicada entre HVT066 y HVT067.

En otra forma de realización particular, la invención se refiere a un HVT recombinante que contiene múltiples ácidos nucleicos recombinantes (por ejemplo, genes extraños) en el que:

- . al menos un ácido nucleico recombinante se clona en la región intergénica del genoma ubicada entre HVT053 y HVT054, y

- . al menos un ácido nucleico recombinante se clona en la región intergénica del genoma ubicada entre HVT067 y HVT069. Tal región intergénica puede solaparse en un grado limitado con el ORF de HVT068, que sin embargo se encuentra en la cadena complementaria. Por tanto, la clonación en dicha región intergénica puede alterar la secuencia codificante de HVT068.

En una forma de realización particular adicional, la invención se refiere a un HVT aviar recombinante que contiene múltiples ácidos nucleicos recombinantes (por ejemplo, genes extraños) en el que:

- . al menos un ácido nucleico recombinante se clona en la región intergénica del genoma ubicada entre HVT053 y HVT054, y

- . al menos un ácido nucleico recombinante se clona en la región intergénica del genoma ubicada entre HVT069 y HVT070.

El HVT recombinante de la invención se puede preparar a partir de cualquier HVT, preferentemente HVT no patógena. Un ejemplo de una cepa no patógena de HVT (MDV3) adecuada para su uso en la invención es la cepa FC126.

La secuencia genómica de la cepa FC126 está disponible en la técnica (Afonso *et al.*, *supra*; Kingham *et al.* *supra*). El experto en la técnica puede identificar fácilmente la ubicación de las regiones intergénicas citadas al utilizar las enseñanzas de la presente solicitud, el conocimiento común y la información de secuencia disponible en la bibliografía. Por ejemplo, Kingham *et al.* *supra*, informan la secuencia de nucleótidos de la cepa de referencia FC 126, así como la ubicación de la mayoría de los ORF dentro de dicho genoma.

Con referencia a un genoma completo FC126 (GenBank: AF291866.1), la región intergénica entre HVT053 y HVT054 corresponde preferentemente a los nucleótidos 95323-95443 del genoma de HVT, la región intergénica entre HVT064 y HVT065 corresponde a los nucleótidos 111304-111499 del genoma de HVT, la región intergénica entre HVT065 y HVT066 corresponde a los nucleótidos 112010-112207 del

genoma de HVT, la región intergénica entre HVT066 y HVT067 corresponde a los nucleótidos 112766-113107 del genoma de HVT, la región intergénica entre HVT067 y HVT069 corresponde a los nucleótidos 113906- 114078 del genoma de HVT, y la región intergénica entre HVT069 y HVT070 corresponde a los nucleótidos 116731-116831 del genoma de HVT.

En la presente solicitud, la referencia al genoma completo de la cepa FC126 es una referencia a dicha cepa como se describe en Genbank con el número de acceso AF291866.1 en la fecha de presentación de la presente solicitud.

Las secuencias de nucleótidos recombinantes insertadas en el genoma pueden tener cualquier orientación.

En una forma de realización preferida, un HVT recombinante de la invención comprende:

- . al menos una secuencia de nucleótidos recombinante clonada en la región intergénica del genoma entre HVT053 y HVT054, y

- . al menos una secuencia de nucleótidos recombinante clonada en la región intergénica del genoma entre HVT065 y HVT066.

En una forma de realización particular, el ácido nucleico insertado en la región intergénica entre HVT053 y HVT054 está en la misma orientación que HVT054.

En otra forma de realización particular, la secuencia de nucleótidos recombinante insertada en la región intergénica entre HVT065 y HVT066 está en la misma orientación que HVT066.

La secuencia de nucleótidos recombinante o la secuencia de ácido nucleico insertada puede contener (o estar unida operativamente a) secuencias reguladoras, tales como un promotor y/o un terminador. El promotor utilizado puede ser un promotor sintético o natural, endógeno o heterólogo. En principio, puede usarse cualquier promotor, siempre que pueda funcionar eficazmente en las células diana o en el huésped. A este respecto, el promotor puede ser un promotor eucariota, procariota, viral o sintético, capaz de dirigir la transcripción génica en células aviares en el contexto de un vector multivalente. Además, cada secuencia de nucleótidos recombinante puede contener un promotor, que puede ser igual o diferente entre sí.

Preferentemente, el promotor utilizado para cada secuencia de nucleótidos recombinante se selecciona de un promotor de beta-actina (Bac) de pollo, un promotor de Pec, un promotor de citomegalovirus murino (Mcmv) ie1, un promotor de citomegalovirus humano (Hcmv), un promotor del virus de simio 40 (SV40) y un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), o cualquier fragmento de estos que

conservar una actividad promotora.

Una secuencia de ácido nucleico de un promotor Bac de pollo se muestra en SEQ ID NO: 1, una secuencia de un promotor Pec se muestra en SEQ ID NO: 2 y una secuencia de un promotor ie1 de Mcmv se muestra en SEQ ID NO: 3. Cabe señalar que las variantes de tales secuencias que codifican promotores funcionales son conocidas y/o pueden ser diseñadas/probadas por el experto en la técnica, para su uso en la presente invención.

En una forma de realización preferida, la secuencia de nucleótidos recombinante insertada en la región intergénica ubicada entre HVT053 y HVT054 contiene un promotor Pec o un promotor Bac. Los resultados obtenidos por los inventores muestran que dichos promotores son eficientes cuando se colocan en dicho sitio de clonación, en el contexto de un vector multivalente de la invención.

En otra forma de realización preferida, el gen extraño insertado en la región intergénica ubicada entre HVT065 y HVT066 contiene un promotor Pec o ie1 de Mcmv. Los resultados obtenidos por los inventores muestran que tales promotores son particularmente eficientes cuando se colocan en dicho sitio de clonación, en el contexto de un vector multivalente de la invención.

El HVT recombinante particularmente preferido de la invención contiene (i) un ácido nucleico recombinante insertado en la región intergénica entre HVT065 y HVT066 bajo el control de un promotor Pec o ie1 de Mcmv y (ii) un ácido nucleico recombinante insertado en la región intergénica entre HVT053 y HVT054 bajo control de un promotor Pec.

Secuencia de nucleótidos recombinante

Las secuencias de nucleótidos recombinantes pueden codificar cualquier polipéptido de interés. Las secuencias de nucleótidos recombinantes pueden codificar polipéptidos tales como antígenos, citoquinas, hormonas o adyuvantes, por ejemplo.

En una forma de realización particular, una o cada una de dichas al menos 2 secuencias de nucleótidos recombinantes codifican un antígeno de un patógeno o un fragmento inmunogénico de este.

Pueden derivarse u obtenerse de cualquier organismo patógeno capaz de causar una infección en una especie aviar. Los ejemplos de patógenos que causan infección en aves incluyen virus, bacterias, hongos y protozoos.

Los antígenos pueden ser cualquier péptido o proteína inmunogénicos de un patógeno, tal como un péptido o proteína seleccionados o derivados de proteínas de

superficie, proteínas secretadas o proteínas estructurales de dicho patógeno, o fragmentos de estos.

Las secuencias de nucleótidos recombinantes preferidas para su uso en la presente invención codifican un antígeno del virus de la influenza aviar, paramixovirus aviar tipo 1 (también llamado virus de la enfermedad de Newcastle (NDV)), metapneumovirus aviar, virus de la enfermedad de Marek, virus de la enfermedad de Gumboro (también llamado virus de la bursitis infecciosa (IBDV)), virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILVT), virus de la bronquitis infecciosa (IBV), *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, microorganismos de *Mycoplasma* que infectan las especies aviares y/o coccidios.

Preferentemente, al menos una de las secuencias de nucleótidos recombinantes insertadas en el genoma viral codifica un antígeno seleccionado de una proteína F de NDV, una proteína VP2 de IBDV, una proteína gB de ILTV, una proteína 40K de *Mycoplasma gallisepticum* y una proteína de superficie hemaglutinina (HA) del virus de la influenza aviar, o fragmentos inmunogénicos de este. Preferentemente, ambas secuencias de nucleótidos recombinantes codifican dicho antígeno, que puede ser el mismo o no.

Los fragmentos inmunogénicos de un antígeno designan cualquier fragmento que pueda provocar una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno *in vivo*, preferentemente cualquier fragmento que contenga un epítipo. Los fragmentos inmunogénicos generalmente contienen de 5 a 50 residuos de aminoácidos consecutivos de un antígeno, tal como de 5 a 40, o de 10 a 40.

Pueden considerarse varias combinaciones de péptidos antigénicos.

En una forma de realización, el HVT recombinante de la invención contiene una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica una proteína F de NDV o un fragmento inmunogénico de esta y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína VP2 de IBDV o un fragmento inmunogénico de esta.

En otra forma de realización, el HVT recombinante de la invención contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína VP2 de IBDV o un fragmento inmunogénico de esta y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína gB de ILTV o un fragmento inmunogénico de esta.

En una forma de realización preferida, el HVT recombinante de la invención contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F de NDV o un fragmento inmunogénico de esta y una secuencia de nucleótidos que codifica una

proteína gB de ILTV o un fragmento inmunogénico de esta.

En otra variante, un HVT recombinante de la invención expresa dos o más antígenos de un mismo patógeno. Dichos antígenos pueden ser iguales o diferentes.

En una variante adicional, al menos una de las secuencias de nucleótidos recombinantes codifica una molécula activa tal como una citoquina o inmunomodulador, un adyuvante, una hormona, un agente antiparasitario, un agente antibacteriano y similares y el otro codifica, por ejemplo, un antígeno.

De acuerdo con una forma de realización adicional, se insertan tres o más secuencias de nucleótidos recombinantes en el genoma viral.

Método de construcción

El HVT recombinante de la invención se puede preparar con el uso de técnicas conocidas per se en la técnica, tales como tecnología recombinante, recombinación homóloga, inserción específica de sitio, mutagénesis y similares.

La clonación de genes y la construcción de plásmidos son bien conocidas por un experto en la técnica y pueden realizarse esencialmente mediante técnicas de biología molecular estándar (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, N.Y. 2012).

Los virus del herpes pueden propagarse en cualquier medio y célula huésped adecuado. El huésped y las condiciones para propagar los virus del herpes incluyen, por ejemplo, células derivadas de pollo tales como CEF (fibroblasto de embrión de pollo), células de riñón de pollo y similares. Dichas células pueden cultivarse en un medio de cultivo tal como MEM de Eagle, medio de cultivo Leibowitz-L-15/McCoy 5A (mezcla 1:1) a aproximadamente 37 °C durante 3 a 4 días.

El ADN genómico puede extraerse de células infectadas por virus de acuerdo con cualquier método convencional. En particular, después de que las proteínas se desnaturalizan en un amortiguador de lisis y se eliminan, el ADN se puede extraer con fenol y etanol.

Normalmente, los virus recombinantes se pueden preparar mediante recombinación homóloga entre un genoma viral y un constructo (por ejemplo, un plásmido) que comprende la secuencia de nucleótidos recombinante o el ácido nucleico por insertar, flanqueado por nucleótidos del sitio de inserción que permite la recombinación. Brevemente, una secuencia que contiene una región intergénica diana se clona primero en un plásmido u otro vector adecuado. Los ejemplos de plásmidos comprenden pBR322, pBR325, pBR327, pBR328, pUC18, pUC19, pUC7, pUC8 y

pUC9, los ejemplos de fagos comprenden el fago lambda y el fago M13, y el ejemplo de cósmidos comprende pHC79. La región clonada debe tener preferentemente una longitud suficiente para que, tras la inserción del gen extraño, las secuencias que flanquean el gen extraño tengan una longitud apropiada para permitir la recombinación homóloga *in vitro* con el genoma viral. Preferentemente, cada secuencia flanqueante tendrá al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud.

Para insertar una o más secuencias de nucleótidos recombinantes en la región intergénica, se puede llevar a cabo una mutación en un sitio específico de la región intergénica para crear un sitio de escisión para una enzima de restricción. Un método para llevar a cabo una mutación puede ser un método convencional, y se puede utilizar un método comúnmente utilizado por un experto en la técnica, tal como mutagénesis *in vitro* y PCR. Por tanto, en el método de PCR, se lleva a cabo una mutación como la delección, sustitución o adición de 1 a 2 nucleótidos en el cebador de PCR, y el cebador se usa luego para crear una mutación. Alternativamente, se pueden usar sitios de restricción existentes de forma natural. El gen extraño (y el promotor) se inserta luego en el sitio de inserción del genoma viral en el plásmido.

El plásmido resultante puede introducirse en una célula infectada por HV o en células transfectadas con el genoma de HV con el uso de cualquier técnica adecuada (por ejemplo, electroporación, fosfato cálcico, un método basado en lipofectina o similar). Cuando la cantidad de plásmido por introducir está en el intervalo de 0,1 a 1000 µg, la eficacia de generación de virus recombinantes por recombinación entre las regiones homólogas del genoma del HV y el plásmido se vuelve alta en las células. Esto da como resultado un evento de recombinación entre el plásmido y el genoma viral, que conduce a la inserción de la secuencia de nucleótidos recombinante en el virus.

El virus recombinante resultante puede seleccionarse genotípica o fenotípicamente con el uso de técnicas conocidas de selección, por ejemplo, mediante hibridación, detectando la actividad enzimática codificada por un gen cointegrado junto con las secuencias de ácido nucleico recombinante o detectando el péptido antigénico expresado por el virus herpes recombinante inmunológicamente.

El virus del herpes recombinante seleccionado se puede cultivar en gran escala en cultivo celular. Una vez creado, el virus puede propagarse en células adecuadas.

Forma de realización preferida

Los siguientes HVT recombinantes son formas de realización específicas

preferidas de la invención. Como se muestra en los ejemplos, permiten una fuerte respuesta inmunitaria *in vivo* contra los antígenos codificados por cada secuencia de nucleótidos recombinante.

Un HVT recombinante particularmente preferido de la invención comprende, (i) insertada en la región intergénica entre HVT065 y HVT066, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica una proteína F de NDV, o un fragmento inmunogénico de esta, preferentemente bajo el control de un promotor ie1 de Mcmv y, (ii) insertada en la región intergénica entre HVT053 y HVT054, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica una proteína gB de ILTV, o un fragmento inmunogénico de esta, preferentemente bajo el control de un promotor Pec (**FW243**).

Otro HVT recombinante particularmente preferido de la invención es un virus del herpes aviar recombinante que comprende, (i) insertada en la región intergénica entre HVT065 y HVT066, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica una proteína gB de ILTV o un fragmento inmunogénico de esta, preferentemente bajo el control de un promotor Pec y, (ii) insertada en la región intergénica entre HVT053 y HVT054, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica una proteína F de NDV, o un fragmento inmunogénico de esta, preferentemente bajo el control de un promotor Pec (**FW242**).

Otro HVT recombinante particularmente preferido de la invención es un virus del herpes aviar recombinante que comprende, (i) insertada en la región intergénica entre HVT065 y HVT066, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica una proteína gB de ILTV, o un fragmento inmunogénico de esta, preferentemente bajo control de un promotor ie1 de Mcmv y, (ii) insertada en la región intergénica entre HVT053 y HVT054, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica una proteína F de NDV, o un fragmento inmunogénico de esta, preferentemente bajo el control de un promotor Pec (**FW244**).

Otro HVT recombinante particularmente preferido de la invención comprende, (i) insertada en la región intergénica entre HVT065 y HVT066, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica una proteína F de NDV, o un fragmento inmunogénico de esta, preferentemente bajo el control de un promotor Pec y ii) insertada en la región intergénica entre HVT053 y HVT054, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica una proteína gB de ILTV, o un fragmento inmunogénico de esta, preferentemente bajo el control de un promotor Pec (**FW241**).

Otra HVT recombinante de la invención comprende, (i) insertada en la región intergénica entre HVT065 y HVT066, una secuencia de nucleótidos recombinante que

codifica una proteína VP2 de IBDV o un fragmento inmunogénico de esta, preferentemente bajo el control de un promotor ie1 de Mcmv o un promotor Pec y, (ii) insertada en la región intergénica entre HVT053 y HVT054, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica una proteína gB de ILTV o un fragmento inmunogénico de esta, preferentemente bajo el control de un promotor Pec.

Un HVT recombinante adicional de la invención comprende, (i) insertada en la región intergénica entre HVT065 y HVT066, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica una proteína gB de ILTV o un fragmento inmunogénico de esta, preferentemente bajo el control de un promotor ie1 de Mcmv o un promotor Pec y, (ii) insertada en la región intergénica entre HVT053 y HVT054, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica una proteína VP2 de IBDV o un fragmento inmunogénico de esta, preferentemente bajo el control de un promotor Pec (FW259).

El HVT recombinante de la presente invención se puede propagar en cultivos celulares. En formas de realización preferidas, CEF, huevos embrionados, células de riñón de pollo y similares se utilizan como células huésped para la propagación de HVT recombinante. El HVT recombinante multivalente de la presente invención puede cultivarse en un medio de cultivo tal como medio de cultivo MEM de Eagle, Leibowitz-L-15/McCoy 5A (mezcla 1:1) a aproximadamente 37 °C durante 3 a 4 días. Las células infectadas así obtenidas se suspenden en un medio de cultivo que contiene dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 % y se almacenan congeladas bajo nitrógeno líquido.

Ventajosamente, los HVT multivalentes recombinantes de la invención presentan un alto nivel de estabilidad a través de pases, lo que corresponde a una coexpresión de las secuencias de nucleótidos recombinantes en células de especies aviares, preferentemente células CEF, incluso después de 10 o más pases, preferentemente después de 15 pases, incluso más preferentemente después de 20 pases. En el contexto de la invención, un “pase” o “pase de células” significa un cultivo de células en condiciones adecuadas para permitir su crecimiento y mantenerlas vivas hasta que tengan una confluencia del 90 % al 100 %. La etapa del pase consiste en transferir un pequeño número de células del cultivo confluyente anterior a un nuevo medio de cultivo. Una alícuota del cultivo confluyente anterior, que contiene algunas células, puede diluirse en un gran volumen de medio fresco.

Los virus se pueden recolectar o purificar con el uso de técnicas convencionales. Pueden almacenarse en cualquier medio adecuado, congelarse y/o liofilizarse.

Ácidos nucleicos y células

Otro objeto de la invención se refiere a cualquier ácido nucleico contenido en un virus como se define con anterioridad. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, ADN o ARN, o variantes de estos.

La invención también se refiere a un vector (por ejemplo, plásmido, cósmido, cromosoma artificial, etc.) que contiene un ácido nucleico de la invención.

La invención también se refiere a una célula que contiene un HVT recombinante, un ácido nucleico o un vector de la invención. Las células son típicamente células eucariotas, como células aviares, o células procariotas (si el vector es adecuado para la replicación o mantenimiento en tal tipo de célula).

Composiciones de vacunas

La invención también se refiere a composiciones, tales como vacunas, que comprenden un HVT recombinante multivalente de la invención, un ácido nucleico de la invención o una célula de la invención.

Las vacunas de la invención comprenden típicamente una cantidad inmunológicamente eficaz de un HVT recombinante como se describió con anterioridad, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones y vacunas según la presente invención comprenden típicamente un disolvente o diluyente o excipiente adecuado, tal como, por ejemplo, un amortiguador acuoso o un amortiguador fosfato. Las composiciones también pueden comprender aditivos, tales como proteínas o péptidos derivados de animales (por ejemplo, hormonas, citoquinas, factores coestimuladores), ácidos nucleicos derivados de virus y otras fuentes (por ejemplo, ARN bicatenario, CpG) y similares que se administran con la vacuna en una cantidad suficiente para potenciar la respuesta inmunitaria. Además, cualquier número de combinaciones de las sustancias mencionadas con anterioridad puede proporcionar un efecto de inmunopotenciación y, por lo tanto, puede formar un inmunopotenciador de la presente invención.

Las vacunas de la presente invención pueden formularse además con uno o más aditivos adicionales para mantener la isotonicidad, el pH fisiológico y la estabilidad, por ejemplo, un amortiguador como solución salina fisiológica (0,85 %), solución salina amortiguada con fosfato (PBS), amortiguadores de citrato, Tris (hidroximetil aminometano (TRIS), solución salina amortiguada con Tris y similares, o un antibiótico, por ejemplo, neomicina o estreptomicina, etc.

La vía de administración puede ser cualquier vía, incluida la administración oral,

ocular (por ejemplo, mediante gotas para los ojos), oculonasal mediante aerosol, intranasal, cloacal en el pienso, en agua o mediante pulverización, *in ovo*, tópicamente o mediante inyección (por ejemplo, vacunación intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intraocular, intradérmica y/o intraperitoneal). El experto adaptará fácilmente la formulación de la composición de vacuna para cada tipo de vía de administración.

Cada dosis de vacuna puede contener una dosis adecuada suficiente para provocar una respuesta inmunitaria protectora en las especies de aves. La optimización de dicha dosis es bien conocida en la técnica. La cantidad de antígeno por dosis puede determinarse mediante métodos conocidos con el uso de reacciones antígeno/anticuerpo, por ejemplo mediante el método ELISA.

Las vacunas de la invención se pueden administrar en dosis únicas o en dosis repetidas, dependiendo del protocolo de vacunación.

Las vacunas de la presente invención son además ventajosas porque confieren a las especies de aves hasta un 80 % de protección contra los patógenos aviares diana después de 3 semanas de vacunación.

La presente invención se refiere además al uso de la vacuna descrita con anterioridad para inmunizar especies aviares, tales como aves de corral, contra un patógeno.

La presente invención se refiere además a un método para inmunizar especies de aves mediante la administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna según la invención. La vacuna se puede administrar ventajosamente por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, oral, *in ovo*, mediante administración mucosa o vía administración oculonasal.

La presente invención se refiere además a kits de vacunación para inmunizar especies aviares que comprende una cantidad eficaz de la vacuna multivalente como se describió con anterioridad y un medio para administrar dichos componentes a dicha especie. Por ejemplo, dicho kit comprende un dispositivo de inyección relleno con la vacuna multivalente según la invención e instrucciones para inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular o *in ovo*. Alternativamente, el kit comprende un dispositivo de pulverización/aerosol o gotas para los ojos relleno con la vacuna multivalente de acuerdo con la invención e instrucciones para la administración oculonasal, oral o mucosal.

A continuación, se divulgarán aspectos y ventajas adicionales de la presente solicitud en los siguientes ejemplos, que son ilustrativos de la invención.

EJEMPLOS

En la sección experimental, se han generado varios HVT recombinantes (monovalentes o multivalentes según la invención), designados de la siguiente manera (HVT/primer sitio de inserción-primer gen extraño/segundo sitio de inserción-segundo gen extraño):

Monovalente:

FW200: HVT/65-66 Pec F

FW219: HVT/65-66 Pec gB

FW168: HVT/45-46 Pec F

FW169: HVT/45-46 Bac VP2

FW181: HVT/45-46 Pec gB

Multivalente:

FW241: HVT/65-66 Pec F/45-46 Pec gB

FW242: HVT/65-66 Pec gB/45-46 Pec F

FW243: HVT/65-66 ie1 de Mcmv F/45-46 Pec gB

FW244: HVT/65-66 ie1 de Mcmv gB/45-46 Pec F

FW259: HVT/65-66 Pec gB/45-46 Bac VP2

Ejemplo 1: construcción de vectores de homología

La construcción del plásmido se realizó esencialmente mediante las técnicas estándar de biología molecular (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4ta Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2012). Los fragmentos de restricción de ADN se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se purificaron con Plasmid plus Midi Kit (QIAGEN, Cat # 12945).

Se preparó ADN de HVT a partir de células CEF infectadas con la cepa FC126 de HVT de acuerdo con el método de Lee *et al.* (J. Gen. Virol., 51: 245-253, 1980). HVT064-071 se amplificó mediante PCR con el uso del ADN de HVT obtenido como plantilla. Se utilizaron dos cebadores, uno fue la SEQ ID NO: 4 (5'-GGATGTCCAATTCGCACATG-3') y el otro fue la SEQ ID NO: 5 (5'-GCTACAGTTACGGGATTCATAGG-3'). Cada cebador se diseñó con la información de GenBank AF291866.1.

Construcción de pHVT64-65

Con el uso del HVT064-071 como plantilla, se realizó la PCR con dos pares de cebadores. Se preparó mediante PCR un fragmento de ADN que tenía un sitio SfiI

entre dos ORF, HVT064 (LORF3) y HVT065 (UL55), y se clonó en pUC18.

El primer par fue SEQ ID NO: 6 (5'-GGGGGAATTCACACTACTTTTAATTCTCTTTA-3') y SEQ ID NO: 7 (5'-GGGGGGCCAATAAGGCCGCTAGCGGCCGCTAACACCCCCGAATATTAGTC-3').

El segundo par fue SEQ ID NO: 8 (5'-GGGGCGGCCGCTAGCGGCCTTATTGGCCTCACGTGTAGCCCATTGTGTGCATATAAC-3') y SEQ ID NO: 9 (5'-GGGAAGCTTAGATCTGAAATAACGCAGTTG-3').

El primer fragmento resultante se digirió con EcoRI y NheI. El segundo fragmento resultante se digirió con NheI y HindIII. Estos fragmentos escindidos se integraron en pUC18 escindido con EcoRI y HindIII, dando como resultado el plásmido pHVT 64-65.

Construcción de pHVT65-66

Con el uso del HVT064-071 como plantilla, se realizó la PCR con dos pares de cebadores. Se preparó mediante PCR un fragmento de ADN que tenía un sitio SfiI entre dos ORF, HVT065 (UL55) y HVT066 (LORF4), y se clonó en pUC18.

El primer par fue SEQ ID NO: 10 (5'-GGGGAATTCGCCAGATATCCAAAGTACAGC-3') y SEQ ID NO: 11 (5'-GGGGGGCCAATAAGGCCGCTAGCGGCCGCCAATTATTTTATTTAATAACATAT-3').

El segundo par fue SEQ ID NO: 12 (5'-GGGGCGGCCGCTAGCGGCCTTATTGGCCACCAGTGAACAATTTGTTTAATGTTA-3') y SEQ ID NO: 13 (5'-GGGAAGCTTGGGTCTGTCCTAGCGATATAA-3').

El primer fragmento resultante se digirió con EcoRI y NheI. El segundo fragmento resultante se digirió con NheI y HindIII. Estos fragmentos escindidos se integraron en pUC18 escindido con EcoRI y HindIII, dando como resultado el plásmido pHVT 65-66.

Construcción de pHVT66-67

Con el uso del HVT064-071 como plantilla, se realizó la PCR con dos pares de cebadores. Se preparó mediante PCR un fragmento de ADN que tenía un sitio SfiI entre dos ORF, HVT066 (LORF4) y HVT067 (LORF5), y se clonó en pUC18.

El primer par fue SEQ ID NO: 14 (5'-GGGGGAATTCTCCAGATTGTTGGATATCTG-3') y SEQ ID NO: 15 (5'-GGGGGGCCAATAAGGCCGCTAGCGGCCGCTTATTGATTTATAAAAACATACATGC

AGTG-3').

El segundo par fue SEQ ID NO: 16 (5'-GGGGCGGCCGCTAGCGGCCTTATTGGCCAGTACATAATTTATTACGTATCATTTC CG-3') y SEQ ID NO: 17 (5'-GGGAAG CTTCTGCAAGACCTCATACGGAA-3').

El primer fragmento resultante se digirió con EcoRI y NheI. El segundo fragmento resultante se digirió con NheI y HindIII. Estos fragmentos escindidos se integraron en pUC18 escindido con EcoRI y HindIII, dando como resultado el plásmido pHVT 66-67.

Construcción de pHVT67-69

Con el uso del HVT064-071 como plantilla, se realizó la PCR con dos pares de cebadores. Se preparó mediante PCR un fragmento de ADN que tenía un sitio SfiI entre dos ORF, HVT067 (LORF5) y HVT069 (LORF6), y se clonó en pUC18.

El primer par fue SEQ ID NO: 18 (5'-GGGGGAATTCATTTCTTCATTGCAACGACG-3') y SEQ ID NO: 19 (5'-GGGGGCCAATAAGGCCGCTAGCGGCCGCATGATC GTGCTCATTACTGCATCG-3').

El segundo par fue SEQ ID NO: 20 (5'-GGGGCGGCCGCTAGCGGCCTTATTG GCCGGG CGGGGCGATGACGTTCTATTTGC-3') y SEQ ID NO: 21 (5'-GGGAAGCTTAA TACGCAGATTCTTTTCGG-3').

El primer fragmento resultante se digirió con EcoRI y NheI. El segundo fragmento resultante se digirió con NheI y HindIII. Estos fragmentos escindidos se integraron en pUC18 escindido con EcoRI y HindIII, dando como resultado el plásmido pHVT 67-69.

Construcción de pHVT69-70

Con el uso del HVT064-071 como plantilla, se realizó la PCR con dos pares de cebadores. Se preparó mediante PCR un fragmento de ADN que tenía un sitio SfiI entre dos ORF, HVT069 (LORF6) y HVT070, y se clonó en pUC18.

El primer par fue SEQ ID NO: 22 (5'-GGGGGAATTCTAAAGAATCGTACATGAGCG-3') y SEQ ID NO: 23 (5'-GGGGGCCAATAAGGCCGCTAGCGGCCGCCTGAT GTATAAGATTGCCGAAAAG-3').

El segundo par fue SEQ ID NO: 24 (5'-GGGGCGGCCGCTAGCGGCCTTATTGGCCCGGGTTGCGTGAATACTGGTCACAG-3') y SEQ ID NO: 25 (5'-GGGAAGCTTACGATCTGGCAAAGGGTCC -3').

El primer fragmento resultante se digirió con EcoRI y NheI. El segundo

fragmento resultante se digirió con NheI y HindIII. Estos fragmentos escindidos se integraron en pUC18 escindido con EcoRI y HindIII, dando como resultado el plásmido pHVT 69-70.

Construcción del vector de homología, pHVT65-66 Pec F

El pHVT65-66 escindido con SfiI se desfosforiló con el uso de fosfatasa alcalina *Shewanella* sp. Recombinante S1B1 (PAP) (Funakoshi # DE110). El fragmento se ligó con p45/46Pec F escindido con BglI (WO2003 001066), lo que dio como resultado el plásmido, pHVT65-66 Pec F. Se integró la señal de poliA corta sintetizada (SPA: SEQ ID NO: 26 CTGCAGGCGGCCGCTCTAGAGTCGACAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTG TGTGTTGTTTTTGTGTGGCCAATAAGGCC) en el pHVT65-66 PecF escindido con Sall y SfiI, dando como resultado el plásmido de homología, pHVT65-66 Pec F SPA

Construcción del vector de homología, pHVT65-66 Pec gB

El vector de homología, pHVT65-66 Pec F SPA se escindió con XbaI y NotI. El fragmento de 5210 pb se ligó con pHVT87-88 Pec ILgB del (documento WO2013 144355) (1506 pb) escindido con XbaI/NotI, dando como resultado el plásmido de homología, pHVT65-66 Pec gB SPA.

Promotor ie1 de Mcmv sintetizado químicamente

El promotor ie1 de Mcmv (SEQ ID NO: 3) se sintetizó a partir de la información de 4191-4731bp en Gene Bank L06816.1 informado por Koszinowski, U.H. El promotor ie1 de Mcmv sintetizado se diseñó de modo que se añadieran sitios BglI-PstI delante de él y se añadieran sitios XbaI-NotI al final.

Ejemplo 2: Purificación de HVT recombinante en CEF transfectado con cada vector de transferencia

Se preparó ADN viral del tipo salvaje de HVT, cepa FC126 (wt-HVT) como describen Morgan *et al.* (*Avian Diseases*, 34: 345-351, 1990). Los ADN virales de FW168 (rHVT/45-46PecF), FW169 (rHVT/45-46BacVP2) y FW181 (rHVT/45-46PecgBdel) (WO2005 093070) se prepararon con un método similar. El primer patrón doble de rHVT fue que las células CEF se transfectaron con el ADN de wt-HVT preparado y pHVT65-66 Pec F (por ejemplo, FW200). El segundo patrón fue que las células CEF se transfectaron con el ADN de FW168 preparado y pHVT65-66 Pec gB

(por ejemplo, FW242). El tercer patrón fue que las células CEF se transfectaron con el ADN de FW181 preparado y pHVT65-66 Pec F (por ejemplo, FW241). El cuarto patrón fue que las CEF se transfectaron con el ADN de FW169 preparado y pHVT65-66 Pec gB (por ejemplo, FW259). Estos virus recombinantes resultantes se purificaron en placa mediante tinción de placas con el anticuerpo anti-ILTV gB, el anticuerpo anti-NDV-F o el anticuerpo anti-IBDV-VP2.

Brevemente, se suspendieron 10^7 células CEF primarias en 100 μ l de MEF-1 (Lonza LNJVD-1004) y se cotransfectaron con 1 μ g del vector de homología, por ejemplo, pHVT65-66 PecF y pHVT65-66 ie1 de Mcmv gB, y 2 μ g de ADN de HVT, por ejemplo, FC126, FW181 y FW168 por electroporación. La electroporación se realizó en Nucleofector II. Las células transfectadas se diluyeron en 20 ml de L-15 de Leibovitz (GIBCO BRL, Cat # 41300-39), medio 5A de McCoy (GIBCO BRL, Cat # 21500-061) (1:1) y suero de ternera al 4 % (solución denominada Medio LM (+)), se esparció 100 μ l por pocillo de placa de 96 pocillos.

Incubar a 37 °C en CO₂ al 5 % hasta que las placas se hicieron visibles, las células se separaron de las placas mediante tripsinización, se diluyeron en células CEF secundarias recién preparadas, se transfirieron igualmente a dos placas de 96 pocillos y se incubaron durante 3 días para visualizar las placas. A continuación, se tiñó una de las dos placas con un anticuerpo mediante el cual se detectó el gen insertado alojado en cada vector de transferencia como el anticuerpo primario. El NDV-F se detectó mediante suero de conejo anti-Fc o Mab77-2. Se detectó ILTV-gB mediante suero de conejo anti-ILTV gBN4 o Mab # 1_B4_7. El IBDV-VP2 fue detectado por el anticuerpo monoclonal anti-VP2 R63 (ATCC N.º: HB-9490). Después de detectar el pocillo que contenía las placas recombinantes teñidas, se recuperaron las células del pocillo correspondiente de la otra placa, se diluyeron en células CEF secundarias frescas y se transfirieron igualmente a dos placas de 96 pocillos para completar la primera ronda de purificación. El procedimiento de purificación se repitió hasta que cada placa obtenida se tiñó positivamente con cada anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal. Después de eso, el candidato de doble rHVT se tiñó con otro anticuerpo. Finalmente, la expresión de las proteínas por todas las placas del candidato de rHVT se confirmó mediante tinción con IFA dual. Los CEF infectados por cada rHVT se fijaron con acetona-metanol frío (2:1), se lavaron con PBS, se hicieron reaccionar con una mezcla de anticuerpos (suero de conejo anti gBN4 diluido 1:1000 (o Mab #1_B4_1) y suero de conejo anti Fc (Mab77-2) o Mab R63 de ratón anti-VP2) a 37 °C en 60 minutos. Después de lavar 3 veces con PBS, las células se hicieron

reaccionar con una mezcla de anticuerpos fluorescentes (Alexa Fluor488 anti-conejo diluido 1:1000 y Alexa Fluor546 anti-ratón proporcionado por Invitrogen) a 37 °C en 60 minutos. Después de lavar 3 veces con PBS, se observaron mediante microscopio de fluorescencia con un aumento de 40 o 100 veces.

La expresión de proteína gB se detectó mediante suero de conejo anti-gBN4 y Alexa Flour 546. La expresión de proteína F se detectó mediante Mab 77-2 anti-F y Alexa Flour 488. La expresión de proteína VP2 se detectó mediante Mab anti-VP2 (R63) y Alexa Flour 546 Cuando todas las placas expresaron tanto F como gB (tanto gB como VP2), se concluyó que la purificación se completó. Las figuras 2A y B muestran algunos ejemplos de IFA dual.

El HVT recombinante purificado se denominó rHVT/ND/ILT o rHVT/ILT/IBDV.

La tabla 1 a continuación muestra la expresión de gB y proteína F obtenidas de los diferentes rHVT/ND/ILT.

Las cepas FW168 (HVT/45-46 PecF) y FW200 (HVT/65-66 PecF) corresponden a un virus del herpes recombinante monovalente utilizado como control para la expresión de la proteína F, y FW181 (HVT/45-46 Pec gBdel) y FW219 (HVT/65-66 Pec gBdel) corresponden a un virus del herpes recombinante monovalente utilizado como control para la expresión de la proteína gB, y FW169 (HVT/45-46 Bac VP2) corresponde a un virus del herpes recombinante monovalente utilizado como control para la expresión de VP2.

Los resultados muestran que los constructos bivalentes de la invención expresan ambos antígenos.

Tabla 1. Expresión del gen gB de NDV-F e ILTV insertado por rHVT/ND/ILT (Detección de fluorescencia)

Virus	Anticuerpo primario		
	Mab anti-F	antisuero de conejo anti-gB	PBS
FW241	+	+	-
FW242	+	+	-
FW243	+	+	-
FW244	+	+	-
FW200	+	-	-
FW219	-	+	-
FW168	+	-	-
FW181	-	+	-
FC126	-	-	-
Ninguno	-	-	-

+: detectado, -: no detectado

Ejemplo 3: Coexpresión de dos proteínas en CEF infectadas con HVT recombinantes dobles

Se infectaron 2 ml que contenían 2×10^5 células CEF con HVT recombinantes y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 3 días.

Después, el cultivo se centrifugó a 300 g durante 3 minutos y las células precipitadas se resuspendieron en 100 ul. Se añadió amortiguador Laemmli (100 ul) a la suspensión celular. Después, la mezcla resultante se hirvió durante 5 min y 5 ul de ellos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10 %. Las proteínas sometidas a electroforesis se transfirieron de SDS-GEL a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore), que se bloqueó en leche en polvo desnatada al 1 % p/v en PBS a temperatura ambiente durante una hora.

Después, para la detección de F (Figura 3A), la membrana tratada se hizo reaccionar con el antisuero de conejo anti-Fc a una dilución de 500 veces a temperatura ambiente durante una hora, se lavó tres veces con PBS y se incubó durante una hora con el antisuero de cabra anti-conejo biotinilado.

Después, para la detección de gB (Figura 3B), la membrana tratada se hizo reaccionar con el suero de conejo anti-gBN4 a una dilución de 500 veces a temperatura ambiente durante una hora, se lavó tres veces con PBS y se incubó durante una hora con el antisuero de cabra anticonejo biotinilado.

Luego de lavar tres veces con PBS, la membrana se incubó durante una hora con un complejo de avidina-fosfatasa alcalina, se lavó tres veces con PBS y una vez con TBS (solución salina amortiguada con Tris) y se hizo reaccionar con BCIP-NBT (un sustrato de fosfatasa alcalina). Como se muestra en la Figura 3A, se observó una banda de proteína de 60 kilodaltons (kDa) solo en el carril con células infectadas con rHVT/ND/ILT, que era el tamaño esperado de la proteína F (). No había banda en el carril de rHVT/45-46 Pec gB (FW181).

La Figura 3B muestra que se observó proteína gB a 54 kilodaltons (kd) en los carriles de cada rHVT/ND/ILT (⇒). Por el contrario, no había banda en el carril de rHVT/45-46 PecF (FW168). La proteína de 54 kd es gB truncada (469aa; WO2005/093070) que se inserta en rHVT/ND/ILT o rHVT/ILT/IBD.

Los HVT recombinantes dobles de acuerdo con la invención expresaron tanto NDV-F como ILTV-gB.

Ejemplo 4: Verificación de la estructura genómica

Análisis de PCR

El rHVT/ND/ILT purificado se propagó en células CEF de una placa de 6 pocillos para obtener las placas confluentes. Las células se recuperaron de las placas mediante raspado, se transfirieron a tubos Falcon y se sometieron a centrifugación a 300 xg durante 5 min. Se suspendió una décima parte de las células recolectadas (de un pocillo) en 0,1 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, SDS al 0,1 %) y se lisaron mediante agitación con vórtex durante 1 min. Los lisados se incubaron a 60 °C durante 10 min con 2 µl de proteasa K (10 mg/ml). La mezcla obtenida se trató dos veces con fenol-cloroformo. La fase acuosa (el ADN viral) se utilizó como plantilla.

Se diseñaron conjuntos de cebadores para cada sitio de inserción.

Para análisis alrededor de HVT65/66

65R (SEQ ID NO: 27): 5'-CCACTGCCACTGTGATGATAAG-3'

66F (SEQ ID NO: 28): 5'-GCCTACTATGCACATTGTTACTCCT-3'

Para análisis alrededor de UL45/46

45-46F-K (SEQ ID NO: 29): 5'-GGGGAAGTCTTCCGGTTAAGGGAC-3'

45-46R (SEQ ID NO: 30): 5'-GGTGCAATTCGTAAGACCGATGGG-3'

La PCR se realizó con el uso de ADN polimerasa Tks Gflex (TAKARA BIO Inc. # R060) de acuerdo con el manual del fabricante.

El resultado de la PCR en la Figura 4C muestra que se amplificó un fragmento de 2550 pb con el conjunto de cebadores 66F/65R en el ADN de FW243 purificado (p + 1). El fragmento amplificado en el plásmido de transferencia pHVT65-66 ie1 NDV-F tenía el mismo tamaño. Además, el fragmento de 2281 pb se amplificó con otro conjunto de cebadores 45-46-K/45-46R en el ADN de FW243 purificado (p + 1) (Figura 4D). Se detectó la misma banda en p45-46 Pec gBdel. El fragmento inferior (546 pb) se amplificó en pNZ45-46 Sfi-T.

La Figura 4C-D (p + 1) indica que los recombinantes dobles obtenidos HVT/ND/ILT tienen la estructura genómica esperada. Los virus recombinantes se confirmaron puros porque no se amplificó ninguna banda correspondiente a las cepas parentales.

Ejemplo 5: Estabilidad de los HVT recombinantes en el pase

Análisis de PCR

Cada rHVT/ND/ILT se pasó veinte veces en células CEF y se sometió a análisis de PCR como se describe en el Experimento 4. Los resultados fueron los mismos que los obtenidos en el Experimento 4, lo que indica que el virus recombinante

era estable incluso después de 20 pases.

El resultado de la PCR en la Figura 4A mostró que un fragmento de 2118 pb se amplificó con el conjunto de cebadores 66F/65R en el ADN de FW242 (p +5, +10, +15, +20) y el plásmido de transferencia pHVT65-66 Pec gBdel. Por el contrario, el fragmento inferior (252 pb) se amplificó en un clon que no se purificó.

La Figura 4B muestra que se amplificó un fragmento de 3083 pb con otro conjunto de cebadores 45-46-K/45-46R en FW242 (p +5, +10, +15, +20) y p45-46 Pec F 2^{do}. La banda inferior (547 pb) se amplificó en pNZ45-46 Sfi-T (US 7569365).

La Figura 4C muestra que se amplificó un fragmento de 2550 pb en el pase de FW243 (p +5, +10, +15, +20). La Figura 4D muestra que se amplificó un fragmento de 2281 pb en el pase de FW243 (p +5, +10, +15, +20).

El análisis de PCR con 65R/66F y 45-46-K/45-46R mostró que el gen F o el gen gB se mantenían de forma estable en el sitio de inserción HVT65/66 o UL45/46 respectivamente en FW242 y FW243.

Análisis de transferencia Western

Se pasaron en serie HVT recombinantes dobles (hasta 20 veces) en fibroblastos de embrión de pollo (CEF). Luego, los lisados celulares se aplicaron al análisis de transferencia Western. En un primer panel (Figura 5A), la transferencia se hizo reaccionar con un suero de conejo anti-Fc (1:500). En un segundo panel (Figura 5B), la transferencia se hizo reaccionar con un suero de conejo anti-gBN4 (1:500).

Simulacro: CEF no infectado

M: Estándares de proteínas Precision Plus Bio Rad # 161-0374

Después de 20 pases, la proteína NDV-F (➡) e ILTV-gB (⇒) se expresaron de forma estable en CEF infectado con HVT recombinante doble.

Ejemplo 6: Inducción de anticuerpos anti-NDV en pollos inoculados con HVT recombinantes dobles

Se inoculó subcutáneamente HVT recombinante doble en el lomo de diez pollos SPF de un día de edad (LineM, NISSEIKEN) con el uso de una jeringa de calibre 20. Las dosis de inoculación se muestran en la Tabla 2. Se recogió el suero de las aves vacunadas y se midieron los títulos de anticuerpos anti-NDV mediante un kit de ELISA comercial (IDVET, kit ID Screen Newcastle Disease Indirect para diagnosticar la enfermedad de Newcastle). A los pollos del grupo de control negativo (no inmunizados) no se les administró ninguna vacuna.

La Tabla 2 muestra el título anti-NDV por valor S/P, y los resultados muestran claramente que el HVT recombinante doble de acuerdo con la invención indujo anticuerpos anti-NDV tan pronto como tres semanas después de la inoculación y aumentaron los anticuerpos anti-NDV posteriormente.

Tabla 2 Inducción de anticuerpo anti-NDV en pollos SPF inoculados con recombinantes dobles.

Grupo	Dosis (pfu/cabeza)	Valor S/P promedio	
		3 semanas de edad	4 semanas de edad
No inmunizado	0	0,00	0,00
FW241	1350	0,16	0,46
FW242	540	0,39	0,51
FW243	1300	0,01	0,08
FW244	750	0,36	0,84

Ejemplo 7: Eficacia de rHVT/ND/ILT en pollos SPF contra ILTV

La eficacia de rHVT/ND/ILT (FW241, FW242, FW243, FW244) como vacuna ILT se evaluó mediante una exposición a la cepa ILTV USDA.

Se inoculó subcutáneamente HVT recombinante doble en el lomo de pollos SPF de un día de edad. Cuatro semanas después de la inoculación, los pollos vacunados se expusieron por vía intratraqueal (IT) a $10^3\text{EID}_{50}/\text{ave}$ de la cepa ILTV USDA. Los pollos expuestos se observaron diariamente para verificar la mortalidad y detectar cualquier síntoma de laringotraqueítis infecciosa, como depresión, dificultad para respirar, estertores, expectoración con sangre, estornudos, jadeos, sacudidas de la cabeza, cuello estirado o plumas erizadas. Los resultados en el día 10 después de la exposición se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Experimentos de exposición de pollos SPF vacunados con rHVT/ND/ILT a cepa virulenta de ILTV US

Vacuna	Dosis (pfu/cabeza)	Inmunizado	Estimulado	Muerto	Síntoma	Protección (%)
FW241	1350	10	9	0	3	67
FW242	540	10	10	1	2	70
FW243	1300	10	10	0	1	90
FW244	750	10	10	0	2	80
NICC	0	0	10	3	5	20
NINC	0	0	0	0	0	100

Como se muestra en la Tabla 3, todo el HVT recombinante doble de acuerdo con la invención indujo una inmunidad protectora en pollos contra la exposición a ILTV

virulento.

Ejemplo 8: Eficacia de rHVT/ND/ILT en pollos SPF contra NDV

Se evaluó la eficacia de rHVT/ND/ILT (FW241, FW242, FW243, FW244) como vacuna ND.

Se inocularon 2.000 UFP/200 µl/ave de rHVT/ND/ILT por vía subcutánea en el lomo de quince pollos SPF de un día de edad (LineM, Japan Biological Laboratories) con el uso de una jeringa de calibre 20. A partir de las tres semanas posteriores a la vacunación, se recogió el suero de las aves vacunadas y se midió el título de anticuerpos anti-NDV mediante un kit de ELISA comercial (IDVET, kit ID Screen Newcastle Disease Indirect para diagnosticar la enfermedad de Newcastle).

A los pollos del grupo de control negativo no se les administró ninguna vacuna (NI: no inmunizados).

A los 49 días de edad (48 días después de la vacunación), los pollos de los cinco grupos se expusieron a 10^3EID_{50} de NDV-TexasGB, una cepa usada frecuentemente como cepa de exposición en estudios de eficacia, por inyección intramuscular en la región femoral. Los pollos expuestos se observaron diariamente para comprobar la mortalidad y detectar cualquier síntoma de la enfermedad de Newcastle, como depresión, jadeo, síntomas neurológicos y moribundos. Los resultados en el día 10 después de la exposición se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Experimentos de exposición de pollos SPF vacunados con rHVT/ND/ILT a NDV virulento

Vacuna	Inmunizado	Estimulado	Muerto	Síntoma	% de protección	Título HI (ELISA) al nacimiento	Título ELISA en la estimulación
FW241	15	15	0	0	100	0	0,69
FW242	15	15	0	0	100		0,77
FW243	15	15	0	3	80		0,16
FW244	15	15	0	0	100		1,26
NICC	0	15	14	1	0		0,05
NINC	0	(10)	0	0	100		N/A

Como se muestra en la Tabla 4, todo el HVT recombinante doble de acuerdo con la invención indujo una inmunidad protectora en pollos frente a la exposición a NDV.