

GALLID ALPHAHERPESVIRUS 3 (MDV-2), UN VECTOR VIRAL CONTRA DIFERENTES PATÓGENOS AVIARES: UNA NUEVA ESTRATEGIA DE VACUNACIÓN EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención describe la obtención de nuevas vacunas vectorizadas con la inserción y expresión de diferentes genes y/o antígeno protectivos contra diferentes patógenos virales. La presente invención describe el procedimiento de la obtención de nuevas vacunas recombinantes y/o vectorizadas en base al vector *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3) o Marek disease serotipo 2 (MDV-2), así como el procedimiento de la selección de clonas recombinantes con gran estabilidad, expresión e inmunogenicidad.

Entre los genes de interés en la invención son; el gen de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) genotipo XII, o al menos otro gen hemaglutinina neuraminidasa (HN) del genotipo XII, I, II, y/o VII, o las glicoproteínas D e I (gD-I) de laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTIV) o al menos un gen de los siguientes genes gB, gE, y gC., la proteína VP2 de la enfermedad infecciosa de Gumboro (IBDV) o al menos un gen de los siguientes genes VP3, VP4 y VP_x de IBDV, el gen de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de H5N1, H5N9, H_xN_x de influenza aviar (AIV), bronquitis infecciosa aviar (IBV) al menos un gen Spike (S), S1, y S2.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

El virus de la enfermedad de Marek (MDV, por sus siglas en inglés: Marek disease virus) o *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), es el agente etiológico de la enfermedad de Marek, es un alphaherpesvirus que afecta a las especies aviares (*Gallus gallus domesticus*) donde se establece como una infección crónica. La enfermedad de Marek (MD), es caracterizada en base a su inmunosupresión, desórdenes neurológicos, trastornos neoplásicos de células CD4⁺, localizadas en alrededor del nervio periférico y órganos viscerales del huésped (1).

El MDV, es un virus ubicuo en la industria avícola comercial en todo el mundo que se controla principalmente mediante el uso de vacunas. Las pérdidas significativas antes de la utilización de las vacunas impidieron la posibilidad de criar pollos de engorde en

confinamiento. Actualmente, todas las gallinas de América del norte y del sur, tanto ponedoras como de engorde, están vacunadas contra la enfermedad de MD, como condición obligatoria (1).

- 5 En los últimos 40 años, las vacunas vivas de diferentes cepas son utilizadas en diferentes combinaciones para el control de la MD (2–4). De las cuales estas incluyen; la vacuna atenuada naturalmente Marek serotipo 1 (MDV-1) cepa Rispens (CVI-988), Marek serotipo 2 (MDV-2) *Gallid alphaherpesvirus* 3 (GaHV-3) entre ellas las cepas: SB-1, 301B/1, y HPRS-24, y el herpesvirus de pavo (HVT) *Meleagrid herpesvirus* 1 (MeAHV-1) cepa Fc126. De las
10 cuales la más comúnmente utilizada es la cepa SB-1 y MeHV-1 cepa Fc126, debido a que en combinación presentan un aparente efecto aditivo en la protección de pollos contra cepas virulentas de MDV (5).

- El *Gallid alphaherpesvirus* 3 (GaHV-3) pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia
15 *Alphaherpesvirinae*, género *Mardivirus*. Según el comité internacional de taxonomía de virus (ICTV; por sus siglas inglés: International Committee on Taxonomy of Viruses) determina que el género *Mardivirus* está clasificado en tres especies: *Gallid alphaherpesvirus* 2, *Gallid alphaherpesvirus* 3 (cepas no oncogénicas: SB-1, 301B/1, y HPRS-24), y *Meleagrid herpesvirus* 1, y formalmente conocidos como: MDV serotipo 1
20 (MDV-1), MDV serotipo 2 (MDV-2), y MDV serotipo 3 (MDV-3), respectivamente.

- Adicionalmente, las ventajas de estas vacunas son exitosas debido a su larga protección por tiempo prolongado contra la MD, estas cepas vacunales de herpesvirus han sido reconocidas como vectores virales recombinantes incluyendo protección contra un número
25 de patógenos virales aviares, tales como: enfermedad de Gumboro (IBD), influenza aviar (AI), laringotraqueitis infecciosa aviar (ILT), la enfermedad de Newcastle (ND), etc. (6–9).

- A pesar que el vector vacunal HVT proporciona una extremada y efectiva protección, es decir que estas vacunas utilizadas de manera individual han demostrado ser
30 extremadamente eficaces, sin embargo, cuando se utiliza más de una vacuna de vector HVT, ocurre lo contrario, es decir se obtienen resultados problemáticos para obtener la respuesta inmune deseada contra cada vacuna utilizada de manera combinada.

Son claras las recomendaciones de no utilizar el vector HVT con los vectores recombinantes, debido al resultado de una posible interferencia, generando una pobre eficacia contra insertos foráneos. Es por ello, que con estas restricciones en el vector HVT por su uso como vacuna multivalente, hay la necesidad de desarrollar otras plataformas de vacunas vectorizadas, que complementarían bastante esta interferencia con la protección, contra múltiples componentes de la vacuna.

Los alphaherpesvirus, tienen un genoma de ADN de doble cadena de aproximadamente 178 kilo pares de bases (kpb), de los cuales contiene varias regiones no esenciales para su replicación, tales como 10 genes en la región única corta (Unique short) US y 23 genes en la región única larga (Unique long) UL, permitiendo así integrar o reemplazar por otros genes de otros patógenos. Específicamente, los genes US7, UL40 y regiones intergénicas UL45-46 del genoma HVT, y los genes US2 y UL41 genes del genoma de MDV, tienden a ser utilizados como sitios de inserción. Recientemente, un estudio comparativo de los genes no esenciales ha demostrado ser la US2, al ser más efectivo a la expresión de genes heterólogas de expresión que el sitio de inserción US10 (6).

Los promotores comúnmente usados para obtener vectores virales basados en alphaherpesvirus son los de citomegalovirus, virus simio 40, y b-actina chicken, como también algunos promotores propios de MDV (unidireccionales o bidireccionales), de los cuales han sido exitosos.

La tecnología para la obtención de los recombinantes MDV y HVT involucran plásmidos, bácmidos, y fósidos.

Si bien estas técnicas permiten la inserción de genes protectivos frente a otros patógenos aviares, estas estrategias presentan limitaciones y tienden a consumir mucho tiempo para la obtención de vacunas (10).

Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas en inglés: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/Cas es un nuevo sistema de edición génica que deriva del mismo sistema inmunológico de las bacterias, el cual les permite recordar y destruir fagos como una herramienta de defensa contra invasiones virales (11).

CRISPR asociada a Cas 9 (CRISPR/Cas9) del sistema tipo II, consiste de un ARN guía que es guiado por la endonucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, y el cual consiste en: un simple ARN guía (gRNA por sus siglas en inglés) y trans-activación crRNA (tracrRNA, por sus siglas en inglés), ha sido recientemente desarrollado para la edición de células eucariotas, introduciendo de una manera precisa y eficiente un doble corte en la doble hebra del ADN (DNA, por sus siglas en inglés: double-stranded deoxyribonucleic acid). Estas dobles cadenas rotas (DSBs, por sus siglas en inglés: double-stranded breaks) son posteriormente reparadas por la unión de terminaciones no homólogas (NHEJ, por sus siglas en inglés: nonhomologous end joining) la cual repara el ADN causando la presencia de indels en la región (ejemplo: inserciones o deleciones) o por reparación homología directa (HDR, por sus siglas en inglés: Homology directed repair) el cual repara el ADN en presencia de un donador homólogo al ADN. El CRISPR/Cas9 es un sistema que ha demostrado ser, una poderosa herramienta genética que está actualmente adaptado a la edición de virus cuyos genomas contengan ADN tales como el virus de Epstein-Bar, virus de la pseudorrabia y el herpesvirus simple tipo I. La tecnología de CRISPR/Cas9 ha sido recientemente aplicada en herpes virus aviar (12).

Desde el punto de vista de documentos de patente, se conoce el documento WO2022/136623 que se refiere a constructos HVT recombinantes (rHVT), útiles como vector vacuna multivalente para aves. El rHVT comprende 4 genes heterólogos de patógenos avícolas: el gen VP2 de IBDV, el gen F de NDV y los genes gD y gI de ILTV. Los genes VP2 y F se insertan en la región del genoma Us del rHVT. Los genes gD-gI se insertan en la región del genoma UL, ya sea entre UL44 y UL45, o entre UL45 y UL46 del genoma del rHVT. Los rHVT demostraron ser genéticamente estables in vitro e in vivo, y expresaron todos los genes insertados lo suficientemente bien como para inducir inmunidad protectora en aves vacunadas contra IBDV, NDV e ILTV. Se realiza la integración de los casetes de expresión que se puede realizar mediante el uso de CRISPR/Cas9.

Por su parte, el documento ES2719409 enseña una composición o vacuna para su uso en un procedimiento para inducir una respuesta inmunogénica o protectora en un animal contra uno o más patógenos aviares, comprendiendo dicha composición o vacuna un vector de la cepa SB-1 de herpesvirus gallináceo 3 (MDV-2) recombinante, comprendiendo dicho vector uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican y expresan al menos un antígeno de

un patógeno aviar, en la que el polinucleótido heterólogo codifica la proteína del virus de la enfermedad de Newcastle NDV-F. El polinucleótido heterólogo es un polinucleótido NDV-F VIId que es optimizado por codones, el promotor es un promotor SV40 y una señal de poliadenilación, en el que el polinucleótido heterólogo que codifica NDV-F se inserta en la región entre ORF UL55 y ORF LORF5 en la región única larga (UL) del vector de la cepa SB-1 del Gallid herpesvirus 3 (MDV-2); o el polinucleótido heterólogo es un polinucleótido NDV-F VIId optimizado por codones, el promotor es un promotor SV40 y la señal de poliadenilación es endógena originada en el gen de la glucoproteína C (gC), adicionalmente, en el que el polinucleótido heterólogo que codifica NDV-F se inserta en la región que codifica la glucoproteína C (UL44) del vector de la cepa SB-1 del Gallid herpesvirus 3 (MDV-2). Los genes que codifican el antígeno o polipéptido descrito en la invención pueden ser los que codifican la proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F), la neuraminidasa de hemaglutinina del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-HN), entre otros.

También se conoce el documento EP3391903 que hace referencia a un vector recombinante del *Gallid herpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2) que comprende uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican y expresan al menos un antígeno de un patógeno aviar, insertado en las regiones intergénicas UL3/UL4 y/o UL21 /UL22 del vector Gallid herpesvirus 3. Preferiblemente, el vector del Gallid herpesvirus 3 recombinante es un vector de la cepa SB-1 del Gallid herpesvirus 3 recombinante. Preferiblemente, el al menos un antígeno protege contra el virus de la enfermedad infecciosa de la bursitis (IBDV), el virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la gripe aviar (AIV) o el virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV). El al menos un antígeno puede seleccionarse del grupo que consiste en (a) VP2, VP3, VP4 y VPX del virus de la enfermedad infecciosa de la bursitis (IBDV); (b) glicoproteína B, glicoproteína I, glicoproteína D, glicoproteína E y glicoproteína C de ILTV; (c) proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F) y hemaglutinina neuraminidasa viral (NDV-NH) de NDV (d) hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de influenza aviar. El vector de Gallid herpesvirus 3 contiene un casete de expresión que comprende además un promotor tal como citomegalovirus (CMV) y promotor SV40.

Por su parte, el documento US2020/0323978 describe constructos de virus de la enfermedad de Marek no patogénicas multivalentes recombinantes que codifican y

expresan antígenos foráneos de tres o más virus aviares y métodos de uso de vacunas de virus avícolas multivalentes. Se proporcionan vectores del virus de la enfermedad de Marek no patógenos recombinantes (rMDVnp) (incluidos los vectores HVT) que codifican y expresan antígenos de tres o más patógenos foráneos de virus de pollo. El vector rMDVnp
5 codifica uno o más antígenos del virus de la laringotraqueítis (ILTV), uno o más antígenos del virus de la enfermedad infecciosa de la bursitis (IBDV) y uno o más antígenos del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

También se conoce el documento WO2018/193110 que se encuentra dirigida a un vector
10 recombinante del *Gallid herpesvirus 3* que codifica antígenos patógenos aviares heterólogos que comprende uno o más polinucleótidos heterólogos insertados en los sitios intergénicos UL3/UL4 y/o UL21/UL22. Se proporcionan métodos adicionales para tratar una especie aviar para la protección contra una o más enfermedades causadas por patógenos aviares y un método para producir el vector del *Gallid herpesvirus 3* recombinante que
15 codifica antígenos patógenos aviares heterólogos. El vector viral recombinante puede tener un polinucleótido que codifica un producto génico o una proteína viral del virus de la influenza aviar (AIV), tal como una proteína o un producto génico HA o NA del AIV y proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F) y hemaglutinina neuraminidasa viral (NDV-NH) de NDV.

En este sentido, es claro que existe la necesidad aún no satisfecha de la obtención de un *Gallid alphaherpesvirus 3* como vector recombinante modificado para la inserción del gen F y HN de NDV, gD-I, gB de ILTV, VP2 de IBDV, HA y NA de IAV, y Spike (S), S1, S2 de IBV bajo el control de un promotor y un terminador, que demuestre una temprana respuesta
20 inmunológica por serología y protección completa en gallinas SPF y en pollos de engorde (broilers) contra NDV, ILTV, IBDV, AIV, IBV y una reducción completa de diseminación viral en hisopados cloacales y traqueales.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **figura 1** muestra la estrategia utilizada para la generación del virus rSB1-F por la tecnología CRISPR/Cas9-NHEJ. **(A)** La confirmación correcta de inserción del gen F de NDV genotipo XII en el genoma del rSB1-GFP-F y rSB1-F fue demostrada utilizando
30 cebadores específicos. **(B)** El genoma del virus parental o SB1wt, es mostrado con una

única región larga (UL), única región corta (US), y una región interna repetida larga (TRL/IRL) y cortas (TRS/IRS). Estrategia utilizada para la generación de rSB1-F por CRISPR/Cas9-NHEJ. Esta figura fue creada con BioRender.com (La figura no presenta escala). (C) Comparación de la morfología de la placa de lisis de SB1wt, rSB1-GFP-F, y rSB1-F en campo claro y en fluorescencia.

La **figura 2** muestra la expresión de la proteína F de NDV en el rSB1-F en el pasaje 20. La expresión de la proteína F fue evaluado en células CEF infectadas con rSB1-F mediante Western blot, donde detectamos una banda de ~52kDa que corresponde a la subunidad (F1), una banda de ~59kDa que corresponde al precursor inactivo (F0) y finalmente una banda de ~120kDa que corresponde al dímero F1 (dF1) de la proteína de F. Como control de corrida se detectó la beta-actina (β -actina) y como control negativo del experimento se utilizó células CEF infectadas con SB1wt, el cual no se detectó ninguna banda.

La **figura 3** muestra la evaluación *In vitro* de la estabilidad del gen F en el genoma de *Gallid alphaherpesvirus 3* (Cepa SB1) rSB1-F. Las células CEF fueron infectadas con el virus rSB1-F durante 25 pasajes. (A) La expresión de la proteína F fue evaluado en células CEF infectadas con rSB1-F mediante Western blot cada 5 pasajes (pasaje 5 al 20), donde detectamos una banda de ~52kDa que corresponde a la subunidad (F1), una banda de ~59kDa que corresponde al precursor inactivo (F0) y finalmente una banda de ~120kDa que corresponde al dímero F1 (dF1) de la proteína de F. Como control negativo utilizamos células CEF infectadas con SB1wt, el cual no se detectó ninguna banda. (B) El ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), demostró la expresión de la proteína F (fluorescencia roja) en células infectadas con el virus recombinante rSB1-F, en el pasaje 20 en CEFs. Además, se detectó la expresión de las proteínas de MDV-2 (fluorescencia azul), y así mismo se detectó la expresión de ambas proteínas (fluorescencia azul/roja), como control negativo se utilizaron células CEF infectadas con el SB1wt. (C) Cada 5 pasajes la presencia del gen F en el genoma del rSB1-F fue evaluado mediante PCR convencional, el SB1wt.

La **figura 4** muestra la caracterización biológica del virus rSB1-F. (A) La cinética de replicación de rSB1-F y SB1wt en células CEF, infectadas con la MOI de 0.001, recolectadas cada 24 horas (24 a 120 horas post-infección), los títulos fueron expresados en unidades formadoras de placa (UFP/ml). (B) Cinética de expresión de la proteína F de NDV en células CEFs infectadas con rSB1-F. Células fueron infectadas con la MOI de 0.001

de rSB1-F y SB1wt, cada 24 horas los lisados celulares fueron recolectados y analizados por Western blot, detectando una banda de ~52kDa (F1), una banda de ~59kDa (F0) y finalmente una banda de ~120kDa (dF1) de la proteína F, como control de corrida se detectó la beta-actina (β -actina) y como control negativo del experimento se utilizó células CEF infectadas con SB1wt, en el cual no se detectó ninguna banda. **(C)** Proceso de infección y formación de placas de lisis de rSB1-F y SB1wt en células CEF. Células fueron infectadas con la MOI de 0.001, cada 24 horas post-infección, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, finalmente las imágenes fueron capturadas utilizando un microscopio invertido con contraste de fases.

10

La **figura 5** muestra los resultados de la evaluación de la respuesta inmune humoral mediante un ensayo de ELISA Kit de ID Screen Newcastle Disease Indirect (ID. Vet) – NDVS del experimento N°1 en aves SPF. **(A)** Los anticuerpos fueron monitoreados en las muestras de sueros a los 34, 46, 55 días post-inmunización, utilizando un kit de ELISA específico para la proteína F de NDV. La media de los títulos y la desviación estándar son representados con una barra horizontal y bigotes. Las muestras positivas fueron consideradas por encima del límite de corte (Cut off: 993 de título). **(B)** Porcentaje de supervivencia del experimento N°1 (Grupos: N°1 y N°2), fueron evaluados hasta 14 días post-desafío.

20

La **figura 6** muestra los resultados de la evaluación de la respuesta inmune humoral mediante un ensayo de ELISA Kit de ID Screen Newcastle Disease Indirect (ID. Vet) – NDVS del experimento N°2 en pollos de engorde broilers. **(A)** Los anticuerpos fueron monitoreados en las muestras de sueros a los 20, 34, 41 días post-inmunización, utilizando un kit de ELISA específico para la proteína F de NDV. La media de los títulos y la desviación estándar son representados con una barra horizontal y bigotes. Las muestras positivas fueron consideradas por encima del límite de corte (Cut off: 993 de título). **(B)** Porcentaje de supervivencia del experimento N°2 (Grupos: N°1 y N°2), fueron evaluados hasta 14 días post-desafío.

30

La **figura 7**, muestra la estrategia utilizada para la generación del virus rSB1-ILTV (gD-I) por la tecnología CRISPR/Cas9-NHEJ. **(A)** El genoma del virus parental o SB1wt, es mostrado con una única región larga (UL), única región corta (US), y una región interna repetida larga (TRL/IRL) y cortas (TRS/IRS). Estrategia utilizada para la generación de

rSB1-ILTV (gD-I) por CRISPR/Cas9-NHEJ. Esta figura fue creada con BioRender.com (La figura no presenta escala). **(B)** La confirmación de la correcta inserción del casete de expresión de los genes D-I de ILTV en el genoma del rSB1-GFP-ILTV y rSB1-ILTV fue demostrada utilizando cebadores específicos mediante PCR convencional.

5

La **figura 8**, muestra la evaluación y selección de clonas recombinantes por PCR convencional de rSB1-GFP-ILTV (gD-I) obtenidas a partir de la etapa de transfección. Las clonas recombinantes: C6, C7, C8, C13, C15, C16, y C20 fueron evaluadas mediante PCR con cebadores específicos que amplifican el casete de expresión completo, el producto

10 amplió una banda esperada de 6855 pb.

La **figura 9**, muestra la evaluación *In vitro* de la estabilidad del casete de expresión que contiene los genes que codifican las glicoproteínas D e I de ILTV en el genoma de *Gallid alphaherpesvirus 3*. Las células CEF fueron infectadas con el virus rSB1-ILTV (gD-I). **(A)**

15 La expresión de las glicoproteínas D e I fueron evaluadas en células CEF infectadas con rSB1-ILTV (gD-I) mediante Western blot cada 5 pasajes (pasaje 5 al 25), donde detectamos, una banda de ~48.5kDa que corresponde a la glicoproteína D (gD) y una banda de ~39.5kDa que corresponde a la glicoproteína I (gI). Como control de corrida se detectó la beta-actina (β -actina) ~42kDa y como control negativo del experimento se utilizó células

20 CEF infectadas con SB1wt, el cual no se detectó ninguna banda. **(B)** Cada 5 pasajes (pasaje 5 al 20) la presencia del casete insertado que contiene los genes que codifican las glicoproteínas D e I de ILTV en el genoma del rSB1-ILTV (gD-I), fue evaluado mediante PCR convencional utilizando cebadores específicos, el SB1wt fue utilizado como control. .

25 **(C)** El ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), demostró la expresión de las glicoproteínas D e I (fluorescencia verde) en células infectadas con el virus recombinante rSB1-ILTV (gD-I), en los pasajes 10, 15, 20, 25 en CEFs. Panel inferior (emisión de fluorescencia) y panel superior (campo claro). Como control negativo se utilizaron células CEF infectadas con el SB1wt. Las imágenes digitales fueron capturadas a 200x de amplificación y procesadas con la cámara de AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Germany).

30

La **figura 10**, muestra los resultados de la evaluación de la respuesta inmune humoral mediante un ensayo de ELISA específico a la glicoproteína I (gI) IDScreen ILT gI Indirect (ID. Vet, Cat. No. ILTGIS) y el porcentaje de supervivencia del experimento N°1 en pollos de engorde broilers **(A)** Los anticuerpos fueron monitoreados en las muestras de sueros a

los 21, 34, 42, y 49 días post-inmunización, utilizando un kit de ELISA específico para la glicoproteína I de ILTV. La media de los títulos y la desviación estándar son representados con una barra horizontal y bigotes. Las muestras positivas fueron consideradas por encima del límite de corte (Cut off: ≥ 611 de título). **(B)** Score de los signos clínicos. Los grupos de

5 aves fueron desafiadas con una cepa de ILTV a los 42 días post-vacunación. Posteriormente los signos clínicos fueron monitoreados hasta el día 10 post-desafío. Los scores de los signos clínicos fueron designados como: 0 = *sin signos clínicos*; 1 = *conjuntivitis, dificultad para respirar, o ronquera leve*; 2 = *conjuntivitis, dificultad para respirar, o ronquera moderada*; 3 = *conjuntivitis, dificultad para respirar, o ronquera grave*.

10 **(C)** Diseminación viral del virus de desafío. Se recolectaron hisopados traqueales a los días 3, 5, y 7 post-desafío de los grupos de las aves ($n = 7$). La carga viral del virus de desafío fue determinada mediante la técnica de PCR en tiempo real cuantitativo, con la detección del gen de la glicoproteína B (gB) de ILTV.

15 La **figura 11**, muestra la estrategia utilizada para la generación del virus rSB1-VP2 por la tecnología CRISPR/Cas9-NHEJ, utilizando dos sgRNAs de la región génica US2 (SB1 sg1/US2 y SB1 sg2/US2). El genoma del virus parental o SB1wt, es mostrado con una única región larga (UL), única región corta (US), y una región interna repetida larga (TRL/IRL) y cortas (TRS/IRS). Estrategia utilizada para la generación de rSB1-VP2 por CRISPR/Cas9-

20 NHEJ. Esta figura fue creada con BioRender.com (La figura no presenta escala).

La **figura 12**, muestra la evaluación y selección de clones recombinantes por PCR convencional de rSB1-GFP-VP2 obtenidas a partir de la transfección. Clonas recombinantes: C10, C11, C15, C16, C17, y C18 (correspondiente SB1 sg1/US2), clonas

25 C2, C3, C5, C8, y C12 (correspondiente SB1 sg2/US2), fueron evaluadas mediante PCR con cebadores específicos MDV2-US2-5F + MDV2-US2-5R que amplifican la región flanqueante del casete reportero, el producto amplificó una banda esperada de 6027 pb.

La **figura 13**, muestra la evaluación y selección de clones recombinantes por PCR

30 convencional de rSB1-GFP-VP2 obtenidas. Clonas recombinantes: C10, C11, C15, C16, C17, y C18 (correspondiente SB1 sg1/US2 (50)), clonas C2, C3, C5, C8, y C12 (correspondiente SB1 sg2/US2 (51)), fueron evaluadas mediante PCR con cebadores específicos MDV2-US2-6F + MDV2-US2-VP2-6R que amplifican la región de unión entre el

casete de expresión y el genoma del vector, los productos amplificados mostraron un tamaño de banda de 918 y 768 pb respectivamente.

La **figura 14**, muestra la evaluación y selección de clonas recombinantes por PCR convencional de rSB1-GFP-VP2 obtenidas. Clonas recombinantes: C10, C11, C15, C16, C17, y C18 (correspondiente SB1 sg1/US2 (50)), clonas C2, C3, C5, C8, y C12 (correspondiente SB1 sg2/US2 (51)), fueron evaluadas mediante PCR con cebadores específicos MDV2-EGFP-US2-7F + MDV2-US3-7R que amplifican la región de unión entre el casete de expresión y el genoma del vector, los productos amplificados mostraron una banda con un tamaño de 514 y 664pb respectivamente.

La **figura 15**, muestra la evaluación *In vitro* de la estabilidad del casete de expresión que contiene el gen que codifica la proteína VP2 en el genoma de *Gallid alphaherpesvirus 3*. Las células CEF fueron infectadas con el virus rSB1-GFP-VP2. El ensayo de IFI, demostró la expresión del gen VP2 (fluorescencia roja) en células infectadas con el virus recombinante rSB1-GFP-VP2. Como control negativo se utilizaron células CEF infectadas con el SB1wt. Las imágenes digitales fueron capturadas a 200x de amplificación y procesadas con la cámara de AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Germany).

La **figura 16**, muestra la expresión de la proteína VP2 de IBDV en células CEFs infectadas con rSB1-GFP-VP2 (IBDV). Células fueron infectadas con la MOI de 0.0001 de rSB1-GFP-VP2 y SB1wt, a las 48 horas los lisados celulares fueron recolectados y analizados por Western blotting, detectando una banda de ~48kDa (VP2), como control negativo del experimento se utilizó células CEF infectadas con SB1wt, el cual no se detectó ninguna banda.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca dentro de la industria farmacéutica veterinaria y se relaciona con métodos de biología molecular recombinante para el desarrollo de productos inmunogénicos para el uso en animales, tales como aves. En particular, la presente invención se refiere al campo de la medicina veterinaria preventiva.

En una modalidad, la invención abarca un virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3, MDV-2), que expresa el gen de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) genotipo XII que comprende la secuencia de identificación SEQ. ID. NO. 4.

5

En una modalidad adicional, la invención abarca un virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3, MDV-2) que expresa el gen de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) genotipo XII en donde la inserción del gen de fusión (F) es insertado en la región intergénica no codificante entre UL45/46 del genoma de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3, MDV-2) cepas no oncogénicas: SB-1 (SEQ. ID. NO. 1), 301B/1, y HPRS-24.

En una modalidad adicional, la invención abarca un virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3, MDV-2), que expresa el gen de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) genotipo XII en donde el sitio de clivaje o de corte ha sido modificado de polibásico (¹¹²RRQKRF¹¹⁷) a dibásico (¹¹²GRQGRL¹¹⁷).

En una modalidad adicional, la invención abarca un virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3, MDV-2), que expresa el gen de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) genotipo XII de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la secuencia sintética del casete F es almacenada en el plásmido pUC57-F.

En una modalidad adicional, la invención abarca una composición inmunogénica que comprende el virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2), que expresa el gen F de NDV genotipo XII identificado con la SEQ ID NO. 5 y excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una modalidad adicional, la invención abarca una composición inmunogénica que comprende el virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2), que expresa las glicoproteínas D e I de ILTV cepa VFAR-043 identificado con la SEQ ID NO.22 y excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una modalidad adicional, la invención abarca una composición inmunogénica que comprende el virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2), que

expresa el gen VP2 de IBDV cepa Faragher 52/70, identificado con la SEQ ID NO. 36 y excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una modalidad adicional, la invención abarca un virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2) que expresa el gen de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) genotipo XII en donde la secuencia sintética del casete F (genotipo XII) es almacenada en el plásmido pUC57-F, la secuencia del casete F y HN de NDV puede variar o ser obtenidas de otras cepas; Clon 30, LaSota, y B1, pudiendo ser estas pertenecientes al genotipo I, II, y VII.

En otra modalidad adicional, la invención abarca un procedimiento para generar un virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2), que expresa genes antigénicos contra diferentes enfermedades aviares NDV, ILTV, IBDV, IBV y AIV, en donde el procedimiento comprende:

- a) Diseño y construcción de los gRNAs y del plásmido donador;
- b) Generación de recombinantes;
- c) Recuperación de los virus recombinantes;
- e) Selección y caracterización de los virus recombinantes que contienen el casete GFP + el casete de interés (antígeno protector), por PCR convencional amplificando el casete completo insertado y las zonas de unión entre el genoma del virus recombinante obtenido y del propio genoma del virus modificado;
- f) Remover el casete de expresión del gen reportero fluorescente "GFP" por el sistema de Cre-Lox y selección de clonas recombinantes utilizando PCR convencional;
- g) Detección de expresión de proteínas de interés en células infectadas con los virus recombinantes mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI);
- h) Determinación de expresión de genes por Western blot (WB);
- i) Evaluación de estabilidad genética del casete insertado en el genoma del virus por PCR convencional y/o Western blot (WB); y
- j) Medir las propiedades de crecimiento *in vitro*.

En otra modalidad adicional, la invención abarca un kit que comprende una vacuna o composición inmunogénica y un medio que puede ser una bolsa que contiene un medio nutritivo llamado DMEM como diluyente estéril y que puede estar refrigerado a 4°C.

- 5 En otra modalidad adicional, la invención abarca una vacuna que comprende el virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2) en donde la concentración de virus que se requiere para lograr la respuesta antigénica es de 3000 unidades formadoras de placa por ave (UFP/ave).
- 10 En otra modalidad adicional, la invención abarca un vector viral que comprende un virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2) de acuerdo con la invención, útil en el control contra el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), contra el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa o Gumboro (IBDV), contra el virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV), contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV) y contra el
- 15 virus de influenza aviar (IAV).

- En otra modalidad adicional, la invención abarca una vacuna que comprende el virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2) de acuerdo con la invención, en donde el *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2) se selecciona entre las cepas no
- 20 oncogénicas: SB-1, 301B/1, y HPRS-24.

Ejemplo 1: Construcción, inmunogenicidad, y eficacia protectora de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3) que expresa eficientemente el gen de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) genotipo XII en aves SPF y pollos de engorde (Broilers).

25

I. Metodología

Animales

- Gallinas libres de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés: specific pathogen-free) White leghorn de 1 día de edad (Charles River Avian Vaccine Services, Norwich, USA)
- 30 (Experimento N°1) y pollos de engorde o broilers de 1 día de edad (Experimento N°2).

Células y virus

Para la generación y mantenimiento del virus recombinante rSB1-F, se utilizaron células de fibroblasto de embrión de pollo (CEF, por sus siglas en inglés: Chick embryo fibroblasts) extraídas de 9-10 días de edad de huevos embrionados libres de patógenos (SPF) (Charles River Avian Vaccine Services, Norwich, USA). Las células CEFs fueron mantenidas en
5 Dulbecco's Modified Eagle medium/F12 (DMEM, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (FBS, por sus siglas en inglés: Fetal bovine serum) (SFB, Thermo Fisher Scientific) y antibiótico-antimicótico 1× (Thermo Fisher Scientific), a 37°C, bajo 5% CO₂ de atmósfera.

10 El virus *Gallid alphaherpesvirus* 3 (GaHV3) o MDV-2 (serotipo 2 de MDV) cepa SB1 (GenBank N° de acceso: HQ840738.1) (**SEQ ID NO.1**) fue utilizado para la generación del virus recombinante rSB1-F en células CEFs por la tecnología CRISPR/Cas9 y por la vía de reparación de NHEJ.

15 La cepa de desafío del NDV conocida como NDV/peacock/Perú/2011 (PP2011) (GenBank no. acceso KR732614) perteneciente a la clase II genotipo XII con un índice de patogenicidad intracerebral (ICPI, por sus siglas en inglés: intracerebral pathogenicity index) de 1.80 con características de un patotipo velogénico, fue previamente aislado y caracterizado en Perú.

20

Diseño y construcción

El virus recombinante rSB1-F, fue obtenido por la tecnología CRISPR/Cas9-NHEJ utilizando los plásmidos y sgRNAs: pGEM-sgA-GFP-F, px459v2.0-sgRNA-sgA, y
25 px459v2.0-sgRNA1-SB1/UL45-46, px459v2.0-sgRNA2-SB1/UL45-46, px459v2.0-sgRNA3-SB1/UL45-46, px459v2.0-sgRNA4-SB1/UL45-46.

Diseño y construcción de los sgRNAs y del plásmido donador

30 Selección y diseño de sgRNAs

La secuencia objetivo en esta invención fue la región intergénica de los genes UL45 y UL46 del genoma *Gallid alphaherpesvirus* 3, el cual fue submitido para el diseño del gRNA

(<http://crispr.mit.edu/>), seleccionándose así 4 secuencias con el más alto puntaje (score). Las secuencias se muestran en la tabla 1.

El plásmido px459v2.0 (catálogo no. 62988; Addgene, USA) fue digerido con BbsI-HF (Neb New England BioLabs, Inc) y luego purificado usando el Gel Extraction Kit QIAquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los sgRNAs se presentaron como oligos-ADN primers (cebadores) correspondientes para el sgRNA de la secuencia objetivo fueron sintetizados y clonados en el vector de clonamiento px459v2.0 previamente digerido para la construcción del px459v2.0-sgRNA. La secuencia de sg-A fue tomada de una previa publicación y clonada en el plásmido px459v2.0 de la misma manera. La correcta inserción de los sgRNA fue confirmada por digestión con la enzima BbsI-HF (Datos no mostrados).

Secuencia de la región intergénica no codificante entre UL45/46 del genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (cepa SB1) (**SEQ ID NO.2**)

Tamaño: 119pb

```
>acgcgagagaccgagcattagagtagcacttatttctatcgagagaaacaccgcgcgcgtcaaaaaaacacagg
cggggtacgataaatttacgcggccgcgctatgtttact
```

Tabla 1. Secuencias de sgRNAs diseñados en base a la secuencia de 119 pb de la región intergénica UL45/46 del genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (cepa SB1) (GenBank N° de acceso: HQ840738.1)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ840738.1>.

#	sgRNA	5'-----3'	
1	gRNA1_UL45/46/SB1_T	CACCGGCGCGTTCAAAAAAACAC	gT(+)
	gRNA1_UL45/46/SB1_B	AAACGTGTTTTTTTTGAACGCGCC	gB (-)
2	gRNA2_UL45/46/SB1_T	CACCGGTTCAAAAAAACACAGGC	gT(+)
	gRNA2_UL45/46/SB1_B	AAACGCCTGTGTTTTTTTTGAACC	gB (-)
3	gRNA3_UL45/46/SB1_T	CACCGGGGTACGATAAATTTACG	gT(+)
	gRNA3_UL45/46/SB1_B	AACCGTAAATTTATCGTACCCCC	gB (-)
4	gRNA4_UL45/46/SB1_T	CACCGTGTTTTTTTTGAACGCGCG	gT(+)
	gRNA4_UL45/46/SB1_B	AAACCGCGCGTTCAAAAAAACAC	gB (-)

B= Cadena de ADN inferior, T= Cadena de ADN superior

Procedimiento de clonamiento de los sgRNAs

Hibridación de sgRNAs

- 5 El sgRNA fue sintetizado como oligo:
5'CACCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAAA 5'

10 *El sgRNA fue resuspendido en agua libre de nucleasas y diluido 1/10 a fin de tener una concentración final de trabajo de 10 μ M.

Reacción de hibridación 1 x:

15	<table><tr><th>Reacción de hibridación</th><th>Volumen</th></tr><tr><td>Solución tampón de hibridación1 x</td><td>2 μl</td></tr><tr><td>sgRNA cadena de ADN superior (10 μM)</td><td>2 μl</td></tr><tr><td>sgRNA cadena de ADN inferior (10 μM)</td><td>2 μl</td></tr><tr><td>H₂O</td><td>14 μl</td></tr><tr><td>TOTAL</td><td>20 μl</td></tr></table>	Reacción de hibridación	Volumen	Solución tampón de hibridación1 x	2 μ l	sgRNA cadena de ADN superior (10 μ M)	2 μ l	sgRNA cadena de ADN inferior (10 μ M)	2 μ l	H ₂ O	14 μ l	TOTAL	20 μ l
Reacción de hibridación	Volumen												
Solución tampón de hibridación1 x	2 μ l												
sgRNA cadena de ADN superior (10 μ M)	2 μ l												
sgRNA cadena de ADN inferior (10 μ M)	2 μ l												
H ₂ O	14 μ l												
TOTAL	20 μ l												

20 *Solución tampón de hibridación: 10mM Tris, pH 7,5-8; 50mM NaCl, 1mM EDTA.

Las muestras fueron colocadas en el termociclador bajo las siguientes condiciones:
90°C por 3 min y 37°C durante 1 hora.

25 Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría empleando Eppendorf BioPhotometer plus, se obtuvo un valor promedio de 200 ng/ μ l. Se realizó una dilución de 1/10, para contar con un stock de trabajo de 20 ng/ μ l.

30 Digestión o Linealización del vector plásmido pX459-v2.0 (catálogo No. 62988; Addgene, USA)

Reacción de digestión 1X:

Reacción de digestión	Reacción 1 x	Volumen
Solución tampón CutSmart 10 x	1 x	2 μ l
Enzima Bbs I-HF (20 000 U)	20 unidades	1 μ l
Plásmido (500 ng/ml)	2 μ g	4 μ l
H ₂ O		12 μ l
TOTAL		20 μ l

Las muestras fueron colocadas en el termociclador a 37°C durante 6 horas.

Se realizó un ensayo de electroforesis a fin de poder purificar la banda de interés, que contiene el ADN lineal. Se cortó el gel y se extrajo el ADN empleando el kit de extracción QIAquick® Gel Extraction Kit 250. El ADN linealizado fue cuantificado y almacenado a 4°C.

5 Ligación de sgRNAs con el vector pX459-v2.0

Se siguió el protocolo descrito por NEB (Quick ligation protocol - M2200).

Reacción de ligación 1x:

Reacción de ligación	Reacción 1 x	Volumen (20 µl)
Solución tampón de Ligasa 2 x	1 x	10 µl
sgRNA (20ng/µl)	3 x (75 ng)	
Plásmido	1 x (25 ng)	
Ligasa	1 x	1 µl
H ₂ O		Hasta 20 µl
TOTAL		20 µl

10

Los productos de ligación (sgRNA + vector px459-v2.0) que dieron origen a los nuevos plásmidos fueron identificados:

Nombre de gRNAs clonados en px459-v2.0
px459v2.0-sgRNA1-SB1/UL45-46
px459v2.0-sgRNA2-SB1/UL45-46
px459v2.0-sgRNA3-SB1/UL45-46
px459v2.0-sgRNA4-SB1/UL45-46

15

Se seleccionó el px459v2.0-sgRNA1-SB1/UL45-46, para los siguientes pasos de clonamiento.

20

Transformación en bacterias *E. coli* competentes DH5α con el producto de ligación para la obtención del plásmido recombinante px459v2.0-sgRNA1-SB1/UL45-46.

25

El producto de ligación (sgRNA + vector px459-v2.0) fue añadido sobre las células competentes de *E. coli* DH5α, seguido de un choque térmico de 4° a 42°C.

Las bacterias transformadas, fueron crecidas en caldo Luria Bertani (LB) suplementado con el antibiótico ampicilina (100µg/ml), fueron transferidas por siembra a placas de agar LB

suplementado con ampicilina (100µg/ml) para su posterior selección de clonas (plásmidos recombinantes).

Extracción y purificación del plásmido recombinante px459v2.0-sgRNA1-SB1/UL45-46

5

Se seleccionaron clonas (plásmidos recombinantes), fueron crecidas en caldos de LB suplementados con ampicilina (100µg/ml), el pellet bacteriano fue concentrado, y el plásmido fue extraído empleando el Kit de extracción QIAprep® Spin Miniprep Kit (250), según las indicaciones de manufactura, empleando el equipo QIAcube y se comprobó la correcta inserción de los sgRNA en el plásmido pX459-v2.0, a través del producto de digestión con la enzima de digestión BbsI-HF en la corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente, el sgRNA específico de UL45-46 de SB1 que recibió por nombre px459v2.0-sgRNA1-SB1/UL45-46.

10

15 Diseño y construcción del plásmido donador

Para la construcción del plásmido donador se realizaron dos procesos de clonamiento consecutivos: el marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés: Open Reading Frame) de la proteína fusión (F) del genotipo XII cepa PP2011 (NDV/peacock/Perú/2011) (Número de acceso al GenBank: KR732314) (**SEQ ID NO.3**), el cual se encuentra flanqueado en ambos extremos por el sitio de restricción SfiI (corriente arriba y corriente abajo). Esta secuencia fue sintetizada y clonada subsecuentemente en el plásmido pUC57 por GenScript, el plásmido resultante se denominó pUC57-F.

20

25 El plásmido pGEM-sgA-GFP, previamente construido. Este plásmido fue digerido y linealizado por la enzima SfiI. El plásmido pGEM-sgA-GFP (este plásmido contiene: sgA + promotor citomegalovirus murino + sitios de corte Sfi + una secuencia de señal Poli A de SV40 + un casete de expresión de GFP para la expresión del gen reportero de fluorescencia, este último flanqueado por secuencias LoxP + sgA).

30

El plásmido pUC57-F, fue digerido por la enzima SfiI para liberar el casete F, seguidamente este casete fue clonado en el plásmido pGEM-sgA-GFP (linealizado), el plásmido resultante se denominó pGEM-sgA-GFP-mCMV-F-Poli A (8886pb).

La correcta inserción y orientación del casete de expresión F, fue verificado por PCR utilizando cebadores específicos y por secuenciamiento (datos no mostrados).

Tabla 2. Lista de cebadores y de sgRNAs utilizados en este estudio de invención

Cebadores y sgRNAs de SB1 (MDV-2)	Dirección	Secuencias (5'→ 3')	SEQ No.
1F	Forward primer	CGTTGTAAAACGACGGCCAG	SEQ ID NO.6
1R	Reverse primer	TGGCTTGGGAACAATACCCT	SEQ ID NO.7
2F	Forward primer	ATTGAGTCACCACCCCTATGC	SEQ ID NO.8
2R	Reverse primer	CCCAACTTCTCGGGGACTGT	SEQ ID NO.9
MDV2-UL45-UL46 F2	Forward primer	GCAACGCTACCGAGCTAGAA	SEQ ID NO.10
MDV2-UL45-UL46 R2	Reverse primer	AACCCTCCCTGCCACTTTTT	SEQ ID NO.11
SB1_FXII_UL46F	Forward primer	AGTCATCGTGACAGGCAACC	SEQ ID NO.12
SB1_FXII_UL46R	Reverse primer	CTACGACGGGATTGGCGATT	SEQ ID NO.13
gRNA1_UL45/46/SB1_T	Cadena superior	CACCGGCGCGTTCAAAAAAACAC	SEQ ID NO.14
gRNA1_UL45/46/SB1_B	Cadena inferior	AAACGTGTTTTTTTGAACGCGCC	SEQ ID NO.15

5

Generación del recombinante rSB1-GFP-F

Se sembraron 0.5×10^6 células CEF por pocillo en una placa de 6 pocillos de cultivo celular en medio de mantenimiento (DMEM 1x +5% de SFB) a 37 °C, bajo 5% CO₂ de atmósfera.

10 Luego de 24 horas, el sobrenadante fue retirado y la monocapa fue lavada por 3 veces consecutivas con DPBS1x para eliminar restos de debris celular. Las células fueron infectadas con SB1wt con una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés: multiplicity of infection) de 0.001 por 8 horas a 37 °C y 5% de CO₂ en medio de DMEM 1x + 5% SFB.

15 Al día siguiente, 1 µg del plásmido pGEM-sgA-GFP-mCMV-F-Poli A que contiene el casete mCMV-F-polyA, 0.5 µg de sgRNA-sgA, y 0.5 µg sgRNA SB1 UL45-46, fueron co-transfectados por 24 horas utilizando Lipofectamine® Reagent (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

A las 24 horas post-transfección, el sobrenadante que contiene el complejo de ADN: Lipofectamine fue removido y reemplazado por un medio de fresco de mantenimiento, para evitar alguna toxicidad en la monocapa celular.

- 5 A los tres días post transfección, las células infectadas/transfectadas fueron transferidas y distribuidas en 2 placas de 6 pocillos de cultivo celular de células CEF previamente sembradas.

- 10 Luego de 4 días post-transfección/infección, placas de lisis con emisión de fluorescencia GFP fueron visibles, correspondiente al virus recombinante. Seguidamente las clonas seleccionadas fueron purificadas con tres rondas de purificación de placas. Para ello, células únicas que expresaban la proteína F/GFP, fueron seleccionadas y distribuidas en placas de cultivo celular de 96 pocillos por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) en BD FACSMelody™ Cell Sorter (BD Biosciences).
- 15 Finalmente, el nuevo virus recombinante fue nombrado como rSB1-GFP-F (**SEQ ID NO.4**). Posteriormente, la presencia y expresión del casete F fue verificado por PCR convencional, IFI, y Western blot.

Selección de clonas recombinantes rSB1-GFP-F

- 20 Clonas recombinantes de rSB1-GFP-F, fueron evaluadas por PCR convencional para confirmar la correcta inserción del casete F/GFP en el genoma del SB1 post-transfección y purificación. Doce clonas (C1 al C12) fueron seleccionadas e infectadas en células CEF previamente sembradas, luego fueron tripsinizadas al alcanzar un porcentaje de infección
- 25 de 70%. El ADN viral fue extraído y analizado por PCR convencional utilizando los siguientes cebadores específicos: MDV2-UL45-UL46 F2/ MDV2-UL45-UL46 R2 (Datos no mostrados).

Remoción del casete reportero GFP por el sistema de Cre-Lox

- 30 El casete de expresión de GFP (flanqueado por secuencias de LoxP) de rSB1-GFP-F, fue removido por el sistema de Cre-Lox. Se preparó una monocapa de células CEF en una placa de 6 pocillos de cultivo celular, seguidamente la monocapa fue infectada con el virus rSB1-GFP-F con una MOI de 0.01 por 24 horas. Seguidamente, la monocapa/infectada fue

co-transfectada con 2 µg de Cre-recombinasa utilizando Lipofectamine® Reagent (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5 Luego de 12 horas post-transfección el medio de cultivo fue cambiado para evitar algún efecto citotóxico. La verificación de la remoción completa del casete de expresión del gen reportero GFP, fue confirmado con la aparición de nuevas placas de lisis no fluorescentes. Finalmente, el nuevo virus recombinante obtenido fue denominado rSB1-F (**SEQ ID NO.5**).

Selección de clonas recombinantes rSB1-F post-remoción del casete reportero GFP

10

La verificación de la completa remoción del casete reportero GFP en las clonas rSB1-GFP-F, fue verificada por PCR convencional utilizando cebadores específicos: MDV2-UL45-UL46 F2/ MDV2-UL45-UL46 R2. Asimismo, estos mismos cebadores permitieron evaluar la integridad del casete F en el SB1.

15

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) detección de expresión proteína F

Células CEF fueron crecidas en placa de 12 pocillos de cultivo celular, luego fueron infectadas con una MOI de 0.001 con el SB1wt y rSB1-F. Después de 48 horas post-infección (hpi), las células fueron lavadas tres veces con DPBS 1x y luego fueron fijadas con 4% paraformaldehído por 30 min a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario en una solución de 5% albumina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés: bovine serum albumin) en DPBS por 1 hora a temperatura ambiente. Un anticuerpo de pollo anti MDV (Charles River Avian Vaccine Services, Norwich, USA) fue utilizado como control positivo para la detección de la infección de SB1, y el anticuerpo primario de conejo contra NDV F (GenScript, Piscataway, NJ, USA) fue utilizado para la detección de la expresión de la proteína F. Después de los tres lavados con DPBS 1x, las células fueron incubadas con un anticuerpo cabra anti-IgY de pollo Alexa Fluor® 405 (Abcam, Cambridge, MA, USA) (fluorescencia azul) y anticuerpo IgG de cabra anti-conejo IgG H&L Alexa Fluor® 594 (Abcam, Cambridge, MA, USA) (fluorescencia roja), respectivamente en DPBS 1x con 5% BSA por 45 min a temperatura ambiente. Los resultados fueron observados utilizando un microscopio de fluorescencia ObserverA1 (Carl Zeiss, Germany). Las imágenes digitales fueron tomadas a 50x de amplificación y procesadas con la cámara de AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Germany).

Western blot

- Para evaluar la expresión de la proteína F de NDV. Células CEF fueron infectadas con el virus recombinante con una MOI de 0.01. A las 72 hpi, las células CEF fueron lisadas y analizadas por Western blot. El análisis de Western blot fue realizado utilizando un anticuerpo específico primario contra NDV F (GenScript) diluido 10/5000 en leche al 1% en PBS-T 0.1% durante 15 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. Posteriormente, se realizaron tres lavados con T-TBS al 0.1% (Cada lavado de 10 min y en agitación constante). Al finalizar los lavados, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-Rabbit IgG HRP monoclonal (Catálogo No. A01827, GenScript, Piscataway, NJ, USA) diluido 1/5000 en leche al 1% en PBS-T 0.1% por 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante.
- Las visualizaciones de la expresión de las proteínas fueron detectadas utilizando un fotodocumentador y una cámara de AZURE CCD (Azure Biosystems, Inc., Dublin, USA).

Estabilidad genética *in vitro* del rSB1-F

- La estabilidad genética fue evaluada en CEFs hasta el pasaje 20. El ADN viral fue extraído de células CEF infectadas, cada 5 pasajes se verificó la presencia del casete e inserto F, el cual fue confirmado por PCR convencional, usando cebadores específicos MDV2-UL45-UL46 F2/ MDV2-UL45-UL46 R2. La expresión de la proteína F fue evaluada cada 5 pasajes por ensayo de Western blot, descrito previamente en sección de Western blot.

Diseño experimental N°1:

Inmunización de aves SPF con la vacuna rSB1-F

- Veinte pollos SPF de 1 día de edad fueron divididos de forma aleatoria en dos grupos: Grupo N°1= rSB1-F ($n=10$) que fue inmunizado con 3000 unidades formadoras de placa (UFP) de la vacuna rSB1-F por ave por vía subcutánea y el grupo N°2= control no inmunizado ($n=10$). A los 34, 46, y 55 días post-inmunización, se recolectaron muestras de sueros para evaluar la respuesta inmune humoral mediante la detección de anticuerpos

específicos contra la proteína Fusión de NDV, utilizando un ELISA Kit de ID Screen Newcastle Disease Indirect (ID. Vet) – NDVS.

- Para evaluar la eficacia protectora de rSB1-F, las aves inmunizadas y no inmunizadas, fueron parcialmente trasladadas hacia las instalaciones de bioseguridad de nivel 3 (BSL-3) de FARVET S.A.C. Las aves fueron desafiadas a los 59 días post-inmunización con 10^4 TCID₅₀ de NDV genotipo XII cepa PP2011 con 0,1 ml (0,05 ml por la cavidad ocular y 0,05 ml por la cavidad nasal). Se realizaron observaciones por un periodo de 14 días post-desafío (d.p.d) para evaluar los signos clínicos; los cuales fueron anotados y reportados diariamente.
- Para determinar la diseminación viral se recolectaron muestras de hisopados orales y cloacales (3, 5, y 7 d.p.d) de aves inmunizadas y no inmunizadas, respectivamente. Seguidamente de la recolección, los hisopos fueron embebidos inmediatamente en 1ml de PBS 1x suplementado con antibiótico-antimicótico (concentración final de 10x) por un tiempo de reposo de 30 minutos (min) a 4°C. Luego cada hisopo fue retirado y el sobrenadante fue clarificado para eliminar desechos celulares y/o restos de alimento/heces por centrifugación a 3000 rpm por 15 min a 4°C. Las muestras fueron cuantificadas por ensayo en placa.

Diseño experimental N°2:

20

Inmunización de pollos de engorde (broilers) con la vacuna rSB1-F

- Veinte pollos broilers de 1 día de edad fueron divididos de forma aleatoria en dos grupos: Grupo N°1= rSB1-F ($n=10$) que fue inmunizado con 3000 UFP de rSB1-F por ave por vía subcutánea y el grupo N°2= control no inmunizado ($n=10$). A los 20, 34, y 41 días post-inmunización, se recolectaron muestras de sueros para evaluar la respuesta inmune humoral mediante la detección de anticuerpos específicos contra la proteína F de NDV, utilizando un ELISA Kit de ID Screen Newcastle Disease Indirect (ID. Vet) – NDVS.
- Para evaluar la eficacia protectora de rSB1-F, las aves inmunizadas y no inmunizadas, fueron parcialmente trasladadas hacia las instalaciones de BSL-3 de FARVET S.A.C. Las aves fueron desafiadas a los 44 días post-inmunización con 10^4 TCID₅₀ de NDV genotipo XII cepa PP2011 con 0,1 ml (0,05 ml por la cavidad ocular y 0.05 ml por la cavidad nasal).

Se realizaron observaciones por un periodo de 14 d.p.d para evaluar los signos clínicos; los cuales fueron anotados y reportados diariamente.

Para determinar la diseminación viral se recolectaron muestras de hisopados orales y cloacales (3, 5, y 7 d.p.d) de aves inmunizadas y no inmunizadas, respectivamente. Seguidamente de la recolección, los hisopos fueron embebidos inmediatamente en 1ml de PBS 1x suplementado con antibiótico-antimicótico (concentración final de 10x) por un tiempo de reposo de 30 min a 4°C. Luego cada hisopo fue retirado y el sobrenadante fue clarificado para eliminar desechos celulares y/o restos de alimento/heces por centrifugación a 3000 rpm por 15 min a 4°C. Las muestras fueron cuantificadas por ensayo en placa.

Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico fue realizado utilizando el GraphPad Prism version 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). El análisis de two-way Anova test fue usado para comparar los datos entre diferentes grupos. Las diferencias fueron consideradas con el p value $<0,0001$. Los títulos de Elisa fueron analizados utilizando el test de múltiples comparaciones de Turkey al 95%.

20 I. Resultados:

Construcción y recuperación del virus recombinante rSB1-F

Los sgRNAs (sgRNA-sgA and sgRNA-UL45-46) fueron diseñados, sintetizados, y clonados en el plásmido px459v.20, el cual contiene el gen de la Cas9 de *S. pyogenes*. Los plásmidos resultantes fueron denominados px459v2.0-sgRNA-sgA y px459v2.0-sgRNA-UL45-46.

El plásmido donador pGEM-sgA-GFP-F, contiene el casete de expresión del GFP reportero el cual se encuentra flanqueado por dos secuencias de LoxP para su separación del casete F de expresión. Los dos casetes fueron flanqueados por sitios de sg-A para introducir un deseado corte o clivaje, para la liberación del casete e integración en la región intergénica UL45-46 del genoma SB1wt. La endonucleasa Cas9 promueve la inserción del casete GFP y NDV en la región intergénica UL45-46 del genoma del SB1wt, ver figura 1.

Para la generación del virus rSB1-GFP-F, las células CEF fueron co-transfectadas con los plásmidos pGEM-sgA-GFP-F, px459v2.0-sgRNA-sgA, y px459v2.0-sgRNA-UL45-46. A las 24 horas post-transfección, las células fueron infectadas con el virus SB1wt con una MOI de 0.01. Las placas que expresan GFP fueron visibles a los 3 días post-transfección/infección, demostrando con éxito la inserción del casete. El virus recombinante fue aislado en tres rondas de purificación por aislamiento de placas de lisis y por Cell Sorter.

Posteriormente, la remoción del casete reportero GFP, fue realizado con el tratamiento de Cre-recombinasa (pcDNA3.1-Cre) a través de sistema Cre-LoxP, las células infectadas con el virus rHVT-GFP-F fueron co-transfectadas con la Cre-recombinasa, las apariciones de placas de lisis sin emisión de fluorescencia fueron visibles a los 4 días post-transfección/infección. La completa remoción fue confirmada por PCR convencional utilizando cebadores específicos MDV2-UL45-UL46 F2 y MDV2-UL45-UL46 R2 (Figura 4C). Finalmente, el nuevo virus recombinante fue denominado rSB1-F.

Selección de clonas post-remoción casete reportero GFP

Luego de la remoción del casete reportero GFP, se seleccionaron cinco clonas recombinantes rSB1-F, de las cuales se verificó la completa remoción del casete reportero GFP por PCR convencional utilizando cebadores específicos: MDV2-UL45-UL46 F2/MDV2-UL45-UL46 R2. Las clonas del C1 al C5 presentaron el tamaño esperado de 4112pb, demostrando la completa remoción del casete reportero e integridad del casete F de NDV, en la región intergénica UL45-46 del genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (SB1). Se seleccionó la clona C1 para las siguientes evaluaciones como caracterización del virus recombinante.

Estabilidad del gen F en el genoma del virus recombinante rSB1-F

Las células CEFs fueron infectadas con el virus rSB1-F durante 20 pasajes para determinar la estabilidad genética del virus mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Western blotting. El ADN viral fue analizado cada 5 pasajes por PCR convencional donde detectamos la presencia del gen F con una banda de ~ 4112 pb (Figura 3C). Del mismo modo, cada 5 pasajes (pasaje 5 al 20) confirmamos la expresión de la proteína F mediante Western blotting (Figura 3A) donde detectamos tres

bandas: una banda de ~52kDa que corresponde a subunidad (F1), una banda de ~59kDa que corresponde al precursor inactivo (F0), y finalmente una banda de ~120kDa que corresponde al dímero F1 (dF1) de la proteína F. El IFI demostró la expresión de la proteína F en células infectadas con el virus recombinante en el pasaje 20 en CEFs (Figura 3B).

- 5 Estos resultados demostraron que la presencia y la expresión del gen de la proteína F de NDV, no afectó la replicación del virus recombinante, confirmando la estabilidad del gen F en el genoma viral del recombinante.

Respuesta humoral

10

Se detectó una respuesta inmunológica específica contra NDV en el grupo N°1 rSB1-F (Experimento N°1) a los 46 días post-inmunización (585.33 ± 175.22), siendo el 100% positivas a los 55 días post-inmunización (10/10) (8342.9 ± 1506.28). Por otro lado, en el grupo N°2 control no inmunizado (Experimento N°1) no se detectó alguna respuesta

15 inmunológica a los 46 (21.40 ± 6.32) y 55 días post-inmunización (116.200 ± 30.44) siendo el Cut-off del kit 993, siendo este último monitoreo significativo con el grupo control no inmunizado $p < 0.0001$ ****, ver figura 5A.

20

Para determinar si la vacuna rSB1-F, era capaz de superar los anticuerpos maternos como el vector recombinante HVT, se realizó un segundo experimento en pollos de engorde (experimento N°2), pollos inmunizados al primer día de edad, fueron monitoreados a los 21 días post-inmunización detectando altos títulos de anticuerpos (1959.00 ± 1366.98) siendo el Cut-off del kit 993, los cuales se interpretaron como títulos de anticuerpos maternos debido a que sólo 9 pollos de 10 (9/10) fueron positivos. Luego a los 34 días post-

25 inmunización 2/10 fueron positivos (1190.22 ± 1909.31) siendo el Cut-off del kit 993. Y finalmente a los 41 días post inmunización 8/10 fueron positivos (4521.55 ± 6401.52) siendo el Cut-off del kit 993, ver figura 6A.

Eficacia ante el desafío de NDV genotipo XII

30

La eficacia protectora en los experimentos N° 1 y 2, fue demostrado por la ausencia de signos clínicos y mortalidad durante los 14 días post-desafío (d.p.d). Aves de un día de edad, fueron inmunizadas con una sola dosis completa de la vacuna rSB1-F (en 0.2ml de diluyente/dosis), por vía subcutánea en la parte posterior de cuello, luego fueron desafiadas

a los 59 y 44 días post-inmunización respectivamente, con NDV genotipo XII, por vía óculo-nasal.

Todos los pollos inmunizados (Experimento N°1 y 2) mostraron una completa protección, resultando 100% viabilidad y protección (10/10). Por el contrario, los pollos control no inmunizados (Experimento N°1 y 2) presentaron los típicos signos clínicos de la enfermedad, entre 3 y 4 d.p.d acumulando una mortalidad total de 100% (10/10) a los 5 d.p.d (Tabla 5) ver figura 5B y 6B.

La diseminación viral del virus de desafío NDV genotipo XII en aves (Experimento N°1 y 2), fue cuantificada a partir de muestras recolectadas de hisopados traqueales y cloacales por ensayo en placa (3, 5, y, 7 d.p.d). Se mostró un significativo efecto de reducción en los títulos de diseminación viral en muestras de tracto respiratorio (muestras de hisopados traqueales) de aves vacunadas, comparado con el grupo control no vacunado después del desafío. Por otro lado, sorprendentemente la diseminación viral en el tracto intestinal fue completamente reducida es decir la replicación viral de NDV genotipo XII fue neutralizada en aves SPF y en pollos de engorde broilers. Por lo contrario, se observó que en los grupos controles no inmunizados de ambos experimentos N° 1 y 2, presentaron una alta diseminación viral significativa en comparación con los grupos inmunizados, ver tabla 3 y 4.

Tabla 3. Frecuencia de diseminación viral traqueal y cloacal del virus de desafío NDV genotipo XII, en aves SPF inmunizadas con rSB1-F experimento N°1

Grupos	59 días post-inmunización					
	3 d.p.d ^(a)		5 d.p.d		7 d.p.d	
	Traqueal	Cloacal	Traqueal	Cloacal	Traqueal	Cloacal
Grupo N°1= rSB1-F	2/7	0/7	1/7	0/7	0/7	0/7
Grupo N°2 = Control no inmunizado	7/7	6/7	4/4	4/4	NS ^(b)	NS

Tabla 4. Frecuencia de diseminación viral traqueal y cloacal del virus de desafío NDV en aves inmunizadas (pollos de engorde broilers) con rSB1-F experimento N°2

Grupos	44 días post-inmunización					
	3 d.p.d ^(a)		5 d.p.d		7 d.p.d	
	Traqueal	Cloacal	Traqueal	Cloacal	Traqueal	Cloacal
Grupo N°1= rSB1-F	1/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
Grupo N°2 = Control no inmunizado	7/7	7/7	4/4	4/4	NS ^(b)	NS

(a) d.p.d = días post-desafío

(b) NS = No sobrevivientes

5

Tabla 5. Porcentaje de viabilidad y mortalidad post-desafío de aves desafiadas con NDV genotipo XII a los 59 y 44 días post-inmunización con rSB1-F(XII) en el experimento N°1 pollos SPF y N°2 (pollos de engorde broilers).

Experi- mentos	Grupos			Días post-desafío (d.p.d)						
				1	2	3	4	5	6	7
Experimento N°1: Desafío a los 59 días pos-inmunización	Grupo N°1= rSB1-F (n=10)	Experimento N°1: Desafío a los 59 días pos-inmunización	Aves muerta s	0	0	0	0	0	0	0
			% de viabilid ad	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
			% de mortali dad	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Grupo N°2= Control no inmuniz ado (n=10)		Aves muerta s	0	0	5	5	NS	NS	NS
			% de viabilid ad	100 %	100 %	50 %	0%	0%	0%	0%
			% de mortali dad	0%	0%	50 %	100 %	NS	NS	NS
Experimento N°2: Desafío a los 44 días post- inmunización	Grupo N°1= rSB1-F (n=10)	Experimento N°2: Desafío a los 42 días post- inmunización	Aves muerta s	0	0	0	0	0	0	0
			% de viabilid ad	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	Grupo N°2=		% de mortali dad	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

	Control no inmuniz ado (n=10)		Aves muerta s	0	0	3	5	2	NS	NS
			% de viabilid ad	100 %	100 %	70 %	20 %	0%	NS	NS
			% de mortali dad	0%	0%	30 %	80 %	100 %	NS	NS

NS: No sobreviviente.

Listado de Secuencias:

5

SEQ ID NO.1 Secuencia de nucleótidos del genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3) cepa SB-1, con número de acceso por GenBank: HQ840738.1

Longitud: 165, 994 pares de bases (pb).

- 10 SEQ ID NO.2 Secuencia de nucleótidos de la región intergénica no codificante entre UL45/46 del genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3) cepa SB-1, con número de acceso por GenBank: HQ840738.1

Longitud: 119 pb.

- 15 SEQ ID NO.3 Secuencia de nucleótidos del gen F de NDV genotipos cepa NDV/peacock/Peru/2011 XII, con número de acceso por GenBank: KR732614; CDS: 4550-6211pb.

Longitud: 1662 pb.

- 20 SEQ ID NO.4 Secuencia de nucleótidos del genoma completo del virus rSB1-GFP-F

Longitud: 171, 856 pb.

SEQ ID NO.5 Secuencia de nucleótidos del genoma completo del virus rSB1-F

Longitud: 169, 390 pb.

25

SEQ ID NO.6 Secuencia de nucleótidos del cebador o forward primer 1F en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pb.

SEQ ID NO.7 Secuencia de nucleótidos del cebador o reverse primer 1R en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pb.

SEQ ID NO.8 Secuencia de nucleótidos del cebador o forward primer 2F en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pb.

5

SEQ ID NO.9 Secuencia de nucleótidos del cebador o reverse primer 2R en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pb.

SEQ ID NO.10 Secuencia de nucleótidos del cebador o forward primer MDV2-UL45-UL46

10 F2 en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pb.

SEQ ID NO.11 Secuencia de nucleótidos del cebador o reverse primer MDV2-UL45-UL46

R2 en sentido 5' a 3'

15 Longitud: 20 pb.

SEQ ID NO.12 Secuencia de nucleótidos del cebador o forward primer SB1_FXII_UL46F en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pb.

20

SEQ ID NO.13 Secuencia de nucleótidos del cebador o reverse primer SB1_FXII_UL46R en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pb.

25 SEQ ID NO.14 Secuencia de nucleótidos del oligo cadena superior gRNA1_UL45/46/SB1_T

Longitud: 24 pb.

SEQ ID NO.15 Secuencia de nucleótidos del oligo cadena inferior gRNA1_UL45/46/SB1_B

Longitud: 24 pb.

30

Ejemplo 2:

Construcción, inmunogenicidad y eficacia protectora de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3) que expresa eficientemente las glicoproteínas D – I (gD-I) del virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTIV) en pollos de engorde (Broilers)

II. Metodología

Animales

- 5 Pollos de engorde o broilers de 1 día de edad (Experimento N°1). Fueron utilizados para evaluar la inmunogenicidad y eficacia de la vacuna rSB1-ILTV (gD-I) contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV).

Células y virus

10

Para la generación y mantenimiento del virus recombinante rSB1-ILTV (gD-I), se utilizaron células CEF extraídas de 9-10 días de edad de huevos embrionados SPF (Charles River Avian Vaccine Services, Norwich, USA). Las células CEFs fueron mantenidas en DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 5% de SFB inactivado, Thermo
15 Fisher Scientific) y 1x de antibiótico-antimicótico (Thermo Fisher Scientific), a 37 °C, bajo 5% CO₂ de atmósfera.

20

El virus GaHV3 o MDV-2 cepa SB1 (GenBank N° de acceso: HQ840738.1) (**SEQ ID NO.1**) fue utilizado para la generación del virus recombinante rSB1-ILTV (gD-I), en células CEFs por la tecnología CRISPR/Cas9 y por la vía de reparación de NHEJ.

La cepa de desafío de ILT utilizada para evaluar la eficacia de la vacuna rSB1-ILTV (gD-I), fue la cepa VFAR-043 aislada y reportada en países de Sur América (10.1637/11939-073018-Reg.1).

Diseño y construcción

25

El virus recombinante rSB1-ILTV (gD-I), fue obtenido por la tecnología CRISPR/Cas9-NHEJ utilizando los plásmidos y sgRNAs: pGEM-sgA-GFP-mCMV-ILTV (gD-I)-Poli A, px459v2.0-sgRNA-sgA, y px459v2.0-sgRNA1-SB1/UL45-46, px459v2.0-sgRNA2-SB1/UL45-46, px459v2.0-sgRNA3-SB1/UL45-46, y px459v2.0-sgRNA4-SB1/UL45-46.

30

Diseño y construcción de los sgRNAs y del plásmido donador

Selección y diseño de sgRNAs

La secuencia objetivo en esta invención fue la región intergénica de los genes UL45 y UL46 del genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (cepa SB1), el cual fue submitido para el diseño del gRNA (<http://crispr.mit.edu/>), seleccionándose así 4 secuencias con el más alto puntaje (score). Las secuencias se muestran en la tabla 1.

El plásmido px459v2.0 (catálogo no. 62988; Addgene, USA) fue digerido con BbsI-HF (Neb New England BioLabs, Inc) y luego purificado usando el Gel Extraction Kit QIAquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los sgRNAs se presentaron como oligos-ADN primers (cebadores) correspondientes para el sgRNA de la secuencia objetivo, los cuales fueron sintetizados y clonados en el vector de clonamiento px459v2.0 previamente digerido para la construcción del px459v2.0-sgRNA. La secuencia de sg-A fue tomada de una previa publicación y clonada en el plásmido px459v2.0 de la misma manera. La correcta inserción de los sgRNA fue confirmada por digestión con la enzima BbsI-HF (Datos no mostrados).

Secuencia de la región intergénica no codificante entre UL45/46 del genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (cepa SB1) **(SEQ ID NO.2)**

Tamaño: 119pb

>acgcgagagaccgagcattagagtagcacttatttctatcgagagaaacaccgcgcggtcaaaaaaacacagg
cggggtacgataaatttacgcgccgcgctatgtttact

Tabla 6. Secuencias de sgRNAs diseñados en base a la secuencia de 119 pb de la región intergénica UL45/46 del genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (cepa SB1) (GenBank N° de acceso: HQ840738.1)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ840738.1>.

#	sgRNA	5'-----3'	
1	gRNA1_UL45/46/SB1_T	CACCGGCGCGTTCAAAAAAACAC	gT(+)
	gRNA1_UL45/46/SB1_B	AAACGTGTTTTTTTTGAACGCGCC	gB (-)
2	gRNA2_UL45/46/SB1_T	CACCGGTTCAAAAAAACACAGGC	gT(+)
	gRNA2_UL45/46/SB1_B	AAACGCCTGTGTTTTTTTTGAACC	gB (-)

3	gRNA3_UL45/46/SB1_T	CACCGGGGGTACGATAAATTTACG	gT(+)
	gRNA3_UL45/46/SB1_B	AACCGTAAATTTATCGTACCCCC	gB (-)
4	gRNA4_UL45/46/SB1_T	CACCGTGTTTTTTTTGAACGCGCG	gT(+)
	gRNA4_UL45/46/SB1_B	AAACGCGCGGTTCAAAAAAACAC	gB (-)

B= Cadena de ADN inferior, T= Cadena de ADN superior

Procedimiento de clonamiento de los sgRNAs

Hibridación de sgRNAs

5 El sgRNA fue sintetizado como oligo:
5'CACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAA 5'

10 *El sgRNA fue resuspendido en agua libre de nucleasas y diluido 1/10 a fin de tener una concentración final de trabajo de 10 μ M.

Reacción de hibridación 1 x:

15	Reacción de hibridación	Volumen
	Solución tampón de hibridación1 x	2 μ l
	sgRNA cadena de ADN superior (10 μ M)	2 μ l
	sgRNA cadena de ADN inferior (10 μ M)	2 μ l
	H ₂ O	14 μ l
	TOTAL	20 μ l

20 *Solución tampón de hibridación: 10mM Tris, pH 7,5-8; 50mM NaCl, 1mM EDTA.

Las muestras fueron colocadas en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

25 90°C por 3 min y 37°C durante 1 hora.

Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría empleando Eppendorf BioPhotometer plus, se obtuvo un valor promedio de 200 ng/ μ l. Se realizó una dilución de 1/10, para contar con un stock de trabajo de 20 ng/ μ l.

30

Digestión o Linealización del vector plásmido pX459-v2.0 (catálogo No. 62988; Addgene, USA)

Reacción de digestión 1X:

Reacción de digestión	Reacción 1 x	Volumen
-----------------------	--------------	---------

Solución tampón CutSmart 10 x	1 x	2 µl
Enzima BbS I-HF (20 000 U)	20 unidades	1 µl
Plásmido (500 ng/ml)	2 µg	4 µl
H ₂ O		12 µl
TOTAL		20 µl

Las muestras fueron colocadas en el termociclador a 37°C durante 6 horas.

Se realizó un ensayo de electroforesis a fin de poder purificar la banda de interés, que contiene el ADN lineal. Se cortó el gel y se extrajo el ADN empleando el kit de extracción

- 5 QIAquick® Gel Extraction Kit 250. El ADN linealizado fue cuantificado y almacenado a 4°C.

Ligación de sgRNAs con el vector pX459-v2.0

Se siguió el protocolo descrito por NEB (Quick ligation protocol - M2200).

- 10 Reacción de ligación 1x:

Reacción de ligación	Reacción 1 x	Volumen (20 µl)
Solución tampón de Ligasa 2 x	1 x	10 µl
sgRNA (20ng/µl)	3 x (75 ng)	
Plásmido	1 x (25 ng)	
Ligasa	1 x	1 µl
H ₂ O		Hasta 20 µl
TOTAL		20 µl

Los productos de ligación (sgRNA + vector px459-v2.0) que dieron origen a los nuevos plásmidos fueron identificados:

- 15

Nombre de gRNAs clonados en px459-v2.0
px459v2.0-sgRNA1-SB1/UL45-46
px459v2.0-sgRNA2-SB1/UL45-46
px459v2.0-sgRNA3-SB1/UL45-46
px459v2.0-sgRNA4-SB1/UL45-46

Se seleccionó el px459v2.0-sgRNA1-SB1/UL45-46, para los siguientes pasos de clonamiento.

- 20

Transformación en bacterias *E. coli* competentes DH5α con el producto de ligación para la obtención del plásmido recombinante px459v2.0-sgRNA1-SB1/UL45-46.

El producto de ligación (sgRNA + vector px459-v2.0) fue añadido sobre las células competentes de *E. coli* DH5α, seguido de un choque térmico de 4° a 42°C.

Las bacterias transformadas, fueron crecidas en caldo LB suplementado con el antibiótico ampicilina (100µg/ml), fueron transferidas por siembra a placas de agar LB suplementado con ampicilina (100µg/ml) para su posterior selección de clonas (plásmidos recombinantes).

Extracción y purificación del plásmido recombinante px459v2.0-sgRNA1-SB1/UL45-46

Se seleccionaron plásmidos recombinantes, fueron crecidas en caldos de LB suplementados con ampicilina (100µg/ml), el pellet bacteriano fue concentrado, y el plásmido fue extraído empleando el Kit de extracción QIAprep® Spin Miniprep Kit (250), según las indicaciones de manufactura, empleando el equipo QIAcube y se comprobó la correcta inserción de los sgRNA en el plásmido pX459-v2.0, a través del producto de digestión con la enzima de digestión BbsI-HF en la corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente, el sgRNA específico de UL45-46 de SB1 que recibió por nombre px459v2.0-sgRNA1-SB1/UL45-46.

Diseño y construcción del plásmido donador

Para la construcción del plásmido donador se realizaron dos procesos de clonamiento consecutivos: el marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés: Open Reading Frame) de los genes D e I de ILTV (Número de acceso al GenBank: MG: MG775218.1) *Gallid alphaherpesvirus 1* strain VFAR-043, complete genome - Nucleotide - NCBI (nih.gov) (**SEQ ID NO.20**), el cual se encuentra flanqueado en ambos extremos por el sitio de restricción SfiI (corriente arriba y corriente abajo). Esta secuencia fue sintetizada y clonada subsecuentemente en el plásmido pUC57 por GenScript, el plásmido resultante se denominó pUC57- ILTV (gD-I).

El plásmido pGEM-sgA-GFP, previamente construido. Este plásmido fue digerido y linealizado por la enzima SfiI. El plásmido pGEM-sgA-GFP (este plásmido contiene: sgA + promotor citomegalovirus murino + sitios de corte Sfi + una secuencia de señal Poli A de SV40 + un casete de expresión de GFP para la expresión del gen reportero de fluorescencia, este último flanqueado por secuencias LoxP + sgA).

El plásmido pUC57- ILTV (gD-I), fue digerido por la enzima Sfil para liberar el casete gD-I, seguidamente este casete fue clonado en el plásmido pGEM-sgA-GFP (linealizado), el plásmido resultante se denominó pGEM-sgA-GFP-mCMV-ILTV (gD-I)-Poli A (9144pb).

La correcta inserción y orientación del casete de expresión ILTV (gD-I), fue verificado por

5 PCR utilizando cebadores específicos y por secuenciamiento (datos no mostrados).

Tabla 7. Lista de cebadores y de sgRNAs utilizados en este estudio de invención

Cebadores y sgRNAs de SB1 (MDV-2)	Dirección	Secuencias (5' -> 3')	SEQ No.
MDV2-UL45-UL46 F2	Forward primer	GCAACGCTACCGAGCTAGAA	SEQ ID NO.10
MDV2-UL45-UL46 R2	Reverse primer	AACCCTCCCTGCCACTTTTT	SEQ ID NO.11
gRNA1_UL45/46/SB1_ T	Cadena superior	CACCGGCGCGTTCAAAAAAA CAC	SEQ ID NO.14
gRNA1_UL45/46/SB1_ B	Cadena inferior	AAACGTGTTTTTTTTGAACGC GCC	SEQ ID NO.15
SB1_UL45-F	Forward primer	TATGCGGTTGTACGATCGGG	SEQ ID NO. 16
SB1_ILTV_UL45-R	Reverse primer	AGAAACGTTCCGGAAGGGAC	SEQ ID NO. 17
SB1_EGFP_UL46-F	Forward primer	CCACTCCCACTGTCCTTTCC	SEQ ID NO. 18
SB1_ILTV_UL46-R	Reverse primer	GTTGTGCTTCTACGACGGGA	SEQ ID NO. 19

10

Generación del recombinante rSB1-GFP-ILTV (gD-I)

Se sembraron 0.5×10^6 células CEF por pocillo en una placa de 6 pocillos de cultivo celular suplementado con medio de mantenimiento (DMEM 1x +5% de SFB) a 37 °C, bajo 5% CO₂ de atmósfera. Luego de 24 horas, el sobrenadante fue retirado y la monocapa fue lavada por 3 veces consecutivas con DPBS1x para eliminar restos celulares. Las células fueron infectadas con SB1wt con una MOI de 0.001 por 8 horas a 37 °C y 5% de CO₂ en medio de DMEM 1x + 5% SFB.

15

20

Al día siguiente, 1 µg del plásmido pGEM-sgA-GFP-mCMV-ILTV (gD-I)-Poli A que contiene el casete mCMV-ILTV (gD-I)-Poli A, 0.5 µg de sgRNA-sgA, y 0.5 µg sgRNA SB1 UL45-46,

fueron co-transfectados por 24 horas utilizando Lipofectamine® Reagent (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5 A las 24 horas post-transfección, el sobrenadante que contiene el complejo de ADN: Lipofectamine fue removido y reemplazado por un medio de mantenimiento nuevo, para evitar alguna toxicidad en la monocapa celular.

10 A los tres días post transfección, las células infectadas/transfectadas fueron transferidas y distribuidas en 2 placas de 6 pocillos de cultivo celular de células CEF previamente sembradas.

Luego de 4 días post-transfección/infección, placas de lisis con emisión de fluorescencia GFP fueron visibles, correspondiente al virus recombinante. Seguidamente las clonas seleccionadas fueron purificadas con tres rondas de purificación de placas. Para ello, células únicas que expresaban el casete de expresión de ILTV (gD-I)-GFP, fueron seleccionadas y distribuidas en placas de cultivo celular de 96 pocillos por FACS en BD FACSMelody™ Cell Sorter (BD Biosciences). Finalmente, el nuevo virus recombinante fue nombrado como rSB1-GFP-ILTV (gD-I) (**SEQ ID NO.21**). Posteriormente, la presencia y expresión del casete ILTV (gD-I) fue verificado por PCR convencional, IFI, y Western blot.

20

Selección de clonas recombinantes rSB1-GFP-ILTV (gD-I)

Clonas recombinantes de rSB1-GFP-ILTV (gD-I), fueron evaluadas por PCR convencional para confirmar la correcta inserción del casete ILTV (gD-I) /GFP en el genoma del SB1 post-transfección y purificación. Siete clonas fueron seleccionadas e infectadas en células CEF previamente sembradas, luego fueron tripsinizadas al alcanzar un porcentaje de infección de 70%. El ADN viral fue extraído y analizado por PCR convencional utilizando los siguientes cebadores específicos: MDV2-UL45-UL46 F2/ MDV2-UL45-UL46 R2 (Datos no mostrados).

30

Remoción del casete reportero GFP por el sistema de Cre-Lox

El casete de expresión de GFP (flanqueado por secuencias de LoxP) de rSB1-GFP-ILTV (gD-I), fue removido por el sistema de Cre-Lox. Se preparó una monocapa de células CEF

en una placa de 6 pocillos de cultivo celular, seguidamente la monocapa fue infectada con el virus rSB1-GFP-ILTV (gD-I) con una MOI de 0.01 por 24 horas. Seguidamente, la monocapa/infectada fue co-transfectada con 2 µg de Cre-recombinasa utilizando Lipofectamine® Reagent (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Luego de 12 horas post-transfección el medio de cultivo fue cambiado para evitar algún efecto citotóxico. La verificación de la remoción completa del casete de expresión del gen reportero GFP, fue confirmado con la aparición de nuevas placas de lisis no fluorescentes. Finalmente, el nuevo virus recombinante obtenido fue denominado rSB1-ILTV (gD-I) (**SEQ ID NO.22**).

Selección de clonas recombinantes rSB1-ILTV (gD-I) post-remoción del casete reportero GFP

La verificación de la completa remoción del casete reportero GFP en las clonas rSB1-GFP-ILTV (gD-I), fue verificada por PCR convencional utilizando cebadores específicos: MDV2-UL45-UL46 F2/ MDV2-UL45-UL46 R2. Asimismo, estos mismos cebadores permitieron evaluar la integridad del casete de expresión ILTV (gD-I) en el SB1.

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Células CEF fueron crecidas en placa de 6 pocillos de cultivo celular, fueron infectadas con una MOI de 0.001 con el SB1wt y rSB1-ILTV (gD-I) en los pasajes 10, 15, 20, y 25. Después de 48 horas post-infección (hpi), las células fueron lavadas tres veces con DPBS 1× y luego fueron fijadas con 4% paraformaldehído por 30 min a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario en una solución de 5% albumina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés: bovine serum albumin) en DPBS por 1 hora a temperatura ambiente. Un anticuerpo primario: anti-suero Infectious laryngotracheitis (No. de catálogo, N0118) (Avian Vaccine Services, LLC dba AVS Bio, Norwich, USA) para la detección de la expresión de las glicoproteínas gD-I. Después de los tres lavados con DPBS 1x, las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario goat anti-chicken IgY H&L Alexa Fluor® 488 en una dilución de 1:1000 (No. de catálogo ab150169, Abcam, Cambridge, MA, USA) (fluorescencia verde), respectivamente en DPBS 1× con 5% BSA

por 1 hora a temperatura ambiente. Los resultados fueron observados utilizando un microscopio de fluorescencia ObserverA1 (Carl Zeiss, Germany). Las imágenes digitales fueron tomadas a 200× de amplificación y procesadas con la cámara de AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Germany).

5

Western blot para detección de las glicoproteínas D-I (gD-I) de ILTV

Para evaluar la expresión de las glicoproteínas gD-I de ILTV. Células CEF fueron infectadas con el virus recombinante con una MOI de 0.01. A las 72 hpi, las células CEF fueron lisadas y analizadas por Western blot. El análisis de Western blot fue realizado utilizando un anticuerpo primario: anti-suero Infectious laryngotracheitis (No. de catálogo, N0118, Avian Vaccine Services, LLC dba AVS Bio, Norwich, USA) diluido 20/5000 en leche al 1% en PBS-T 0.1% durante 15 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. Posteriormente, se realizaron tres lavados con T-TBS al 0.1% (Cada lavado de 10 min y en agitación constante). Al finalizar los lavados, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario Goat Anti-Chicken IgY (H&L) [HRP] (Catálogo No. A00165, GenScript, Piscataway, NJ, USA) diluido 1/5000 en leche al 1% en PBS-T 0.1% por 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante.

Las visualizaciones de la expresión de las proteínas fueron detectadas utilizando un fotodocumentador y una cámara de AZURE CCD (Azure Biosystems, Inc., Dublin, USA).

Estabilidad genética *in vitro* del rSB1-ILTV (gD-I).

La estabilidad genética fue evaluada en CEFs hasta el pasaje 20. El ADN viral fue extraído de células CEF infectadas, cada 5 pasajes se verificó la presencia del casete e inserto ILTV (gD-I), el cual fue confirmado por PCR convencional, usando cebadores específicos MDV2-UL45-UL46 F2/ MDV2-UL45-UL46 R2. La expresión de las glicoproteínas gD-I fue evaluada cada 5 pasajes por ensayo de Western blot, descrito previamente en sección de Western blot.

Diseño experimental N°1: Inmunización de pollos de engorde (broilers) con la vacuna rSB1-ILTV (gD-I)

Para la experimentación de inmunización se evaluaron tres clonas de virus recombinantes obtenidos rSB1-ILTV (gD-I) clonas: 15.1, 16.3, 15.7, como control se utilizó una vacuna comercial de rHVT-ILTV, rHVT-ILTV aislado, y un grupo control no inmunizado.

5 Setenta y dos pollos broilers de 1 día de edad fueron divididos de forma aleatoria en seis grupos: Grupo N°1= rSB1-ILTV (gD-I) clona 15.1 ($n=12$), grupo N°2 = rSB1-ILTV (gD-I) clona 16.3 ($n=12$), grupo N°3 = rSB1-ILTV (gD-I) clona 15.7 ($n=12$) , grupo N°4 = HVT-ILTV (comercial) ($n=12$) , grupo N°5 =rHVT-ILTV aislado ($n=12$) y grupo N°6 = control no inmunizado control no inmunizado ($n=12$). Los pollos fueron inmunizados con una dosis de
10 3000 UFP/ave, a los 20, 34, y 41 días post-inmunización, se recolectaron muestras de sueros para evaluar la respuesta inmune humoral mediante la detección de anticuerpos específicos contra la glicoproteína I (gI) de ILTV, utilizando IDScreen ILT I Indirect (ID.Vet Cat. No ILTGIS).

15 Para evaluar la eficacia contra el desafío de ILTV, las aves inmunizadas y no inmunizadas, fueron parcialmente trasladadas hacia las instalaciones de BSL-3 de FARVET S.A.C. Las aves fueron desafiadas a los 42 días post-inmunización por vía ocular (50 μ l en cada ojo) e intratraqueal (50 μ l) y los signos clínicos fueron monitoreados por 10 días. los cuales fueron anotados y reportados diariamente. Los scores de los signos clínicos fueron designados
20 como 0: *sin signos clínicos*; 1: *conjuntivitis, dificultad para respirar, o ronquera leve*; 2 = *conjuntivitis, dificultad para respirar, o ronquera moderada*; 3 = *conjuntivitis, dificultad para respirar, o ronquera grave*.

Para determinar la diseminación viral se recolectaron muestras de hisopados orales y
25 cloacales (3, 5, y 7 d.p.d) de aves inmunizadas y no inmunizadas, respectivamente. Seguidamente de la recolección, los hisopos fueron embebidos inmediatamente en 1ml de PBS 1x suplementado con antibiótico-antimicótico (concentración final de 10x) por un tiempo de reposo de 30 min a 4°C. Luego cada hisopo fue retirado y el sobrenadante fue clarificado para eliminar desechos celulares y/o restos de alimento/heces por centrifugación
30 a 3000 rpm por 15 min a 4°C. Las muestras fueron cuantificadas por la técnica de PCR en tiempo real cuantitativo.

Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico fue realizado utilizando el GraphPad Prism version 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). El análisis de two-way Anova test fue usado para comparar los datos entre diferentes grupos. Las diferencias fueron consideradas con un p value $<0,0001$. Los títulos de Elisa fueron analizados utilizando el test de múltiples comparaciones de Turkey al 95%.

Resultados:

Construcción y recuperación del virus recombinante

Los sgRNAs (sgRNA-sgA and sgRNA-UL45-46) fueron diseñados, sintetizados, y clonados en el plásmido px459v.20, el cual contiene el gen de la Cas9 de *S. pyogenes*. Los plásmidos resultantes fueron denominados px459v2.0-sgRNA-sgA y px459v2.0-sgRNA-UL45-46.

El plásmido donador pGEM-sgA-GFP-mCMV-ILTV (gD-I)-Poli A, contiene el casete de expresión del GFP reportero el cual se encuentra flanqueado por dos secuencias de LoxP para su separación del casete ILTV (gD-I) de expresión. Los dos casetes fueron flanqueados por sitios de sg-A para introducir un deseado corte o clivaje, para la liberación del casete e integración en la región intergénica UL45-46 del genoma SB1wt. La endonucleasa Cas9 promueve la inserción del casete GFP y ILTV en la región intergénica UL45-46 del genoma del SB1wt, ver figura 7.

Para la generación del virus rSB1-GFP-ILTV (gD-I), las células CEF fueron co-transfectadas con los plásmidos pGEM-sgA-GFP-mCMV-ILTV (gD-I) Poli A, px459v2.0-sgRNA-sgA, y px459v2.0-sgRNA-UL45-46. A las 24 horas post-transfección, las células fueron infectadas con el virus SB1wt con una MOI de 0.01. Las placas que expresan GFP fueron visibles a los 4 días post-transfección/infección, demostrando con éxito la inserción del casete. El virus recombinante fue aislado en tres rondas de purificación por aislamiento de placas de lisis y por Cell Sorter.

Posteriormente, la remoción del casete reportero GFP, fue realizado con el tratamiento de Cre-recombinasa (pcDNA3.1-Cre) a través de sistema Cre-LoxP, las células infectadas con el virus rSB1T-GFP-ILTV (gD-I) fueron transfectadas con la Cre-recombinasa, las apariciones de placas de lisis sin emisión de fluorescencia fueron visibles a los 4 días post-transfección/infección. La completa remoción fue confirmada por PCR convencional

utilizando cebadores específicos MDV2-UL45-UL46 F2 y MDV2-UL45-UL46 R2 (Figura 9B). Finalmente, el nuevo recombinante SB1 fue denominado rSB1-ILTV (gD-I).

Selección de clonas post-remoción casete reportero GFP

5

Las clonas C8, C15 y C16 del virus rSB1-GFP-ILTV (gD-I) presentaron el tamaño esperado de 6855 pb (Figura 8) antes de la remoción del casete reportero GFP, por ello fueron seleccionadas para la remoción del casete reportero GFP.

- 10 Luego de la remoción del casete reportero GFP, se seleccionaron siete clonas recombinantes rSB1-ILTV (gD-I), de las cuales se verificó la completa remoción del casete reportero GFP por PCR convencional utilizando cebadores específicos: MDV2-UL45-UL46 F2/MDV2-UL45-UL46 R2. Demostrando la completa remoción del casete reportero e integridad del casete ILTV (gD-I) en la región intergénica UL45-46 del genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (SB1).
- 15

Estabilidad de los genes D e I en el genoma del virus recombinante rSB1-ILTV (gD-I)

- Las células CEFs fueron infectadas con el virus rSB1- ILTV (gD-I) para determinar la estabilidad genética del virus mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Western blotting. El ADN viral fue analizado cada 5 pasajes (pasajes 5° al 20°) por PCR convencional donde detectamos la presencia del casete insertado en el genoma del virus recombinante con una banda de ~ 4389 pb (Figura 9B). Del mismo modo, cada 5 pasajes (pasaje 5° al 25°) confirmamos la expresión de las glicoproteínas D e I por mediante Western blotting (Figura 9A) donde detectamos dos bandas: una banda de ~48.5kDa que corresponde a la glicoproteína D (gD) y una banda de ~39.5kDa que corresponde a la glicoproteína I (gI). Como control de corrida se detectó la beta-actina (β -actina) ~42kDa y como control negativo del experimento se utilizó células CEF infectadas con SB1wt, el cual no se detectó la expresión de las proteínas de interés.
- 20
- 25
- 30 El IFI demostró la expresión de ambas glicoproteínas gD-I en células infectadas con el virus recombinante en los pasajes 10° al 25° en CEFs (Figura 9C). Estos resultados demostraron que la presencia y la expresión del gen de las glicoproteínas gD-I de ILTV, no afectó la replicación del virus recombinante, confirmando la estabilidad de las glicoproteínas D e I en el genoma viral del virus recombinante.

Respuesta inmune humoral

Se evaluó la inmunogenicidad a través de la respuesta inmune humoral provocada por las vacunas, los sueros de los pollos fueron recolectados y evaluados a través de un ELISA indirecto específico para la detección de la glicoproteína I (gI) IDScreen ILT gI Indirect (ID. Vet, Cat. No. ILTGIS) al primer día de edad pre-inmune, 21, 34, 42, y 49 días post-inmunización.

- Se detectaron títulos relativamente altos al primer día de edad, los cuales corresponden a los anticuerpos maternos (Datos no mostrados).

A los 21 dpv, un ave del grupo 1 clona 15.1 demostró un alto título de anticuerpos, no habiendo significancia. Por lo contrario, a los 34 dpv, los resultados del ELISA mostraron títulos mayores estadísticamente significativos en el grupo 1 (clona 15.1) y grupo 2 (clona 16.3) en comparación con el grupo no vacunado. A los 42 dpv, los títulos fueron mayores estadísticamente significativos en los grupos 1 y 2 vacunados en comparación al grupo no vacunado por análisis de two way ANOVA (Figura 10A). Los resultados fueron interpretados como positivos a títulos ≥ 611 .

Eficacia ante el desafío de ILTV

La eficacia de la vacuna rSB1-ILTV (gD-I), fue evaluada tomando en cuenta el score de signos clínicos, y la diseminación viral.

Los grupos de aves del experimento fueron desafiadas con una cepa del virus de laringotraqueitis infecciosa a los 42 días post-vacunación por vía ocular (50 μ L en cada ojo) e intratraqueal (50 μ L) y los signos clínicos fueron monitoreados por 10 días. Posteriormente, los promedios del score de los signos clínicos fueron más altos en los grupos de aves no inmunizadas y el grupo de aves inmunizadas con la vacuna rHVT-ILTV (comercial) lo cual indicó la gravedad de los síntomas en estos grupos. Además, cabe resaltar que un ave murió con síntomas graves de la enfermedad en el grupo no inmunizado. Por otro lado, los grupos de aves inmunizadas con las vacunas rSB1-ILTV (gD-I) clon 15.1, rSB1-ILTV (gD-I)

clon 16.3, rSB1-ILTV (gD-I) clon 15.7, y rHVT-ILTV aislado mostraron un menor score de signos clínicos con diferencia significativa (Figura 10B).

5 Los grupos de aves del experimento N°1, fueron desafiadas con una cepa del virus de laringotraqueitis infecciosa a los 42 días post-vacunación por vía ocular (50 µl en cada ojo) e intratraqueal (50 µl). Luego, para evaluar la diseminación viral del virus de desafío, se recolectaron hisopados traqueales en los días 3, 5 y 7 post-desafío para ser evaluados mediante la técnica de PCR en tiempo real cuantitativo. Posteriormente, los promedios de las copias/µL fueron más altos en los grupos de aves no inmunizadas y el grupo de aves
10 inmunizadas con la vacuna rHVT-ILTV (comercial) lo cual podría indicar una mayor diseminación viral en estos grupos. Por otro lado, los grupos de aves inmunizadas con las vacunas rSB1-ILTV (gD-I) clon 15.1, rSB1-ILTV (gD-I) clon 16.3, rSB1-ILTV (gD-I) clon 15.7 y rHVT-ILTV (gD-I) aislado mostraron un promedio menor de las copias/µl (Figura 10C).

15 **Listado de Secuencias:**

SEQ ID NO.16 Secuencia de nucleótidos del cebador o forward primer SB1_UL45-F en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pb.

20

SEQ ID NO.17 Secuencia de nucleótidos del cebador o reverse primer SB1_ILTV_UL45-R en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pb.

25 SEQ ID NO.18 Secuencia de nucleótidos del cebador o forward primer SB1_EGFP_UL46-F en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pb.

SEQ ID NO.19 Secuencia de nucleótidos del cebador o reverse primer SB1_ILTV_UL46-R
30 en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pb.

SEQ ID NO.20 Secuencia de nucleótidos de las glicoproteínas D e I de ILTV cepa VFAR-043, con número de acceso por GenBank: MG775218.1

Longitud: 3570 pb.

SEQ ID NO.21 Secuencia de nucleótidos del virus rSB1-GFP-ILTV (gD-I) de la cepa VFAR-043

5 Longitud: 172,133 pb.

SEQ ID NO.22 Secuencia de nucleótidos del virus rSB1-ILTV (gD-I) de la cepa VFAR-043
Longitud: 169,667 pb.

10 **Ejemplo 3:**

Construcción, inmunogenicidad y eficacia protectora de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3) que expresa eficientemente la glicoproteína VP2 de la enfermedad de Gumboro (IBDV) en pollos de engorde (Broilers).

15 III. Metodología

Animales

20 Pollos de engorde o broilers de 1 día de edad (Experimento N°1). Fueron utilizados para evaluar la inmunogenicidad y eficacia de la vacuna rSB1-VP2 contra el virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV).

Células y virus

25 Para la generación y mantenimiento del virus recombinante rSB1-VP2, se utilizaron células CEF extraídas de 9-10 días de edad de huevos embrionados SPF (Charles River Avian Vaccine Services, Norwich, USA). Las células CEFs fueron mantenidas en DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 5% de SFB inactivado, Thermo Fisher Scientific) y 1x de antibiótico-antimicótico (Thermo Fisher Scientific), a 37 °C, bajo 5% CO₂
30 de atmósfera.

El virus GaHV3 o MDV-2 cepa SB1 (GenBank N° de acceso: HQ840738.1) (**SEQ ID NO.1**) fue utilizado para la generación del virus recombinante rSB1-VP2, en células CEFs por la tecnología CRISPR/Cas9 y por la vía de reparación de NHEJ.

La cepa de desafío de IBDV utilizada para evaluar la eficacia de la vacuna rSB1-VP2, fue la cepa F52/70 vía ocular con un título de 10^4 DIE₅₀ (30µl/dosis).

5 Diseño y construcción

El virus recombinante rSB1-VP2, fue obtenido por la tecnología CRISPR/Cas9-NHEJ utilizando los plásmidos y sgRNAs: pGEM-sgA-GFP-VP2, px459v2.0-sgRNA-sgA, px459v2.0-sgRNA1-SB1/US2, y px459v2.0-sgRNA2-SB1/US2.

10

Diseño y construcción de los sgRNAs y del plásmido donador

Selección y diseño de sgRNAs

15 La secuencia objetivo en esta invención fue la región del gen US2 del genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (MDV-2), el cual fue submitido para el diseño del gRNA (<http://crispr.mit.edu/>), seleccionándose así 3 secuencias con el más alto puntaje (score). Las secuencias se muestran en la tabla 1.

20 El plásmido px459v2.0 (catálogo no. 62988; Addgene, USA) fue digerido con BbsI-HF (Neb New England BioLabs, Inc) y luego purificado usando el Gel Extraction Kit QIAquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

25 Los sgRNAs se presentaron como oligos-ADN primers (cebadores) correspondientes para el sgRNA de la secuencia objetivo fueron sintetizados y clonados en el vector de clonamiento px459v2.0 previamente digerido para la construcción del px459v2.0-sgRNA. La secuencia de sg-A fue tomada de una previa publicación y clonada en el plásmido px459v2.0 de la misma manera. La correcta inserción de los sgRNA fue confirmada por digestión con la enzima BbsI-HF (Datos no mostrados).

30

Secuencia de la región génica de US2 en el genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (cepa SB1)
(SEQ ID NO.33)

Tamaño: 816pb

>tcattcggaagttataactgccgccttcgcacatttcttttgcctgtttgtattgccataacagataggaattgaaacctgatcct
 cctgtttttgcagcatggccagcaacagaatactttgtcggatcgactacttgcgcgagatggttccgttcttgaggtttcggcg
 ggtcgggtggagaacctattattttatacacacacgtcataccgttgcgcgaaaatgttcttcttctgccgtctcgaacgtcgg
 5 tttccacgtagacgttaggagcgttggaatggtatcaggaagagcccacggcatgccggaccaagtaccgctactttgacc
 gcgagcagtctcttcggaatgggatgtattccagagcagcgcggcagagatcagcggccccactatccacagactgtatg
 aagtgtttctgaaacatcggactccaacatcaaataccagacataacatcttgccattcggaagcacatccgccgacatcttc
 aaatagcctaactataaacgagtctctagtctctgctaaccagtacctcgaatgccagtcccatccggtgggttcgtctgata
 atcgggtctctgacgccgaggaagaactaaaaggggtctggaaaagcggaacagatctgcagaccgaacgactacagaca
 10 cgcccatcatcatgtatctgttccatgcattgctttatgagaaaaatccataaggccgaggcggcatctctagatctccggg
 gagtctctcgactcatctaggagagtgcgacagttatcatagacacgcccatt

Tabla 1. Secuencias de sgRNAs diseñados en base a la secuencia de 816 pb de la región
 génica US2 del genoma *Gallid alphaherpesvirus* 3 (cepa SB1) (GenBank N° de acceso:
 15 HQ840738.1)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HG974565.1>

#	sgRNA	5'-----3'	
1	gRNA1_US2/SB1_T	CACCGAGAAAAATCCATAAGGCCG	gT(+)
	gRNA1_US2/SB1_B	AAACCGGCCTTATGGATTTTCTC	gB (-)
2	gRNA2_US2/SB1_T	CACCGGAATGCCAGTCCCATCCGG	gT(+)
	gRNA2_US2/SB1_B	AAACCCGGATGGGACTGGCATTCC	gB (-)

Procedimiento de clonamiento de los sgRNAs

Hibridación de sgRNAs

25 El sgRNA fue sintetizado como oligo:
 5'CACCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAA 5'

30 *El sgRNA fue resuspendido en agua libre de nucleasas y diluido 1/10 a fin de tener una
 concentración final de trabajo de 10 µM.

Reacción de hibridación 1 x:

Reacción de hibridación	Volumen
Solución tampón de hibridación 1 x	2 µl

sgRNA cadena de ADN superior (10 µM)	2 µl
sgRNA cadena de ADN inferior (10 µM)	2 µl
H ₂ O	14 µl
TOTAL	20 µl

5

*Solución

tampón de hibridación: 10mM Tris, pH 7,5-8; 50mM NaCl, 1mM EDTA.

Las muestras fueron colocadas en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

10 90°C por 3 min y 37°C durante 1 hora.

Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría empleando Eppendorf BioPhotometer plus, se obtuvo un valor promedio de 200 ng/µl. Se realizó una dilución de 1/10, para contar con un stock de trabajo de 20 ng/µl.

15

Digestión o Linealización del vector plásmido pX459-v2.0 (catálogo No. 62988; Addgene, USA)

Reacción de digestión 1X:

Reacción de digestión	Reacción 1 x	Volumen
Solución tampón CutSmart 10 x	1 x	2 µl
Enzima BbS I-HF (20 000 U)	20 unidades	1 µl
Plásmido (500 ng/ml)	2 µg	4 µl
H ₂ O		12 µl
TOTAL		20 µl

20 Las muestras fueron colocadas en el termociclador a 37°C durante 6 horas.

Se realizó un ensayo de electroforesis a fin de poder purificar la banda de interés, que contiene el ADN lineal. Se cortó el gel y se extrajo el ADN empleando el kit de extracción QIAquick® Gel Extraction Kit 250. El ADN linealizado fue cuantificado y almacenado a 4°C.

25

Ligación de sgRNAs con el vector pX459-v2.0

Se siguió el protocolo descrito por NEB (Quick ligation protocol - M2200).

Reacción de ligación 1x:

30

Reacción de ligación	Reacción 1 x	Volumen (20 µl)
Solución tampón de Ligasa 2 x	1 x	10 µl
sgRNA (20ng/µl)	3 x (75 ng)	

Plásmido	1 x (25 ng)	
Ligasa	1 x	1 µl
H ₂ O		Hasta 20 µl
TOTAL		20 µl

Los productos de ligación (sgRNA + vector px459-v2.0) que dieron origen a los nuevos plásmidos fueron identificados:

5

Nombre de gRNAs clonados en px459-v2.0
px459v2.0-sgRNA1-SB1/US2
px459v2.0-sgRNA2-SB1/US2

Los dos px459v2.0-sgRNA1-SB1/US2 y px459v2.0-sgRNA2-SB1/US2, fueron seleccionados para los siguientes pasos de clonamiento.

- 10 Transformación en bacterias *E. coli* competentes DH5α con el producto de ligación para la obtención del plásmido recombinante px459v2.0-sgRNA1-SB1/US2 y px459v2.0-sgRNA2-SB1/US2

- 15 El producto de ligación (sgRNA + vector px459-v2.0) fue añadido sobre las células competentes de *E. coli* DH5α, seguido de un choque térmico de 4° a 42°C.

Las bacterias transformadas, fueron crecidas en caldo LB suplementado con el antibiótico ampicilina (100µg/ml), fueron transferidas por siembra a placas de agar LB suplementado con ampicilina (100µg/ml) para su posterior selección de clonas (plásmidos recombinantes).

- 20 Extracción y purificación del plásmido recombinante px459v2.0-sgRNA1-SB1/US2 y px459v2.0-sgRNA2-SB1/US2

- 25 Se seleccionaron plásmidos recombinantes, fueron crecidas en caldos de LB suplementados con ampicilina (100µg/ml), el pellet bacteriano fue concentrado, y el plásmido fue extraído empleando el Kit de extracción QIAprep® Spin Miniprep Kit (250), según las indicaciones de manufactura, empleando el equipo QIAcube y se comprobó la correcta inserción de los sgRNA en el plásmido pX459-v2.0, a través del producto de digestión con la enzima de digestión BbsI-HF en la corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente, el sgRNA específico de US2 de SB1 que recibió por nombres:
- 30 px459v2.0-sgRNA1-SB1/US2 y px459v2.0-sgRNA2-SB1/US2.

Diseño y construcción del plásmido donador

Para la construcción del plásmido donador se realizaron dos procesos de clonamiento consecutivos: el marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés: Open Reading Frame) del gen VP2 de IBDV (Número de acceso al GenBank: HG974565.1) (**SEQ ID NO. 34**), el cual se encuentra flanqueado en ambos extremos por el sitio de restricción SfiI (corriente arriba y corriente abajo). Esta secuencia fue sintetizada y clonada subsecuentemente en el plásmido pUC57 por GenScript, el plásmido resultante se denominó pUC57-VP2.

El plásmido pGEM-sgA-GFP, previamente construido. Este plásmido fue digerido y linealizado por la enzima SfiI. El plásmido pGEM-sgA-GFP (este plásmido contiene: sgA + promotor citomegalovirus murino + sitios de corte Sfi + una secuencia de señal Poli A de SV40 + un casete de expresión de GFP para la expresión del gen reportero de fluorescencia, este último flanqueado por secuencias LoxP + sgA).

El plásmido pUC57-VP2, fue digerido por la enzima SfiI para liberar el casete VP2, seguidamente este casete fue clonado en el plásmido pGEM-sgA-GFP (linealizado), el plásmido resultante se denominó pGEM-sgA-GFP-mCMV-VP2-Poli A (8586pb).

La correcta inserción y orientación del casete de expresión IBDV (VP2), fue verificado por PCR utilizando cebadores específicos y por secuenciamiento (datos no mostrados).

Tabla 8. Lista de cebadores y de sgRNAs utilizados en este estudio de invención

Cebadores y sgRNAs de <i>Gallid alphaherpesvirus</i> (GaHV-3)	Dirección	Secuencias (5' -> 3')	SEQ No.
MDV2-US2-5F	Forward primer	GGTATCAGGAAGAGCCCACG	SEQ ID NO.23
MDV2-US2-5R	Reverse primer	GATCTAGAGATGCCGCCTCG	SEQ ID NO.24
MDV2-US2-6F	Forward primer	TGTCGGATCGACTACTTGCG	SEQ ID NO.25
MDV2-US2-VP2-6R	Reverse inferior	CCCTGAAGATTGCAGGAGCA	SEQ ID NO.26
MDV2-EGFP-US2-7F	Forward primer	CCACTCCCCTGTCCTTTCC	SEQ ID NO.27
MDV2-US3-7R	Reverse primer	TGTCTTCGACGTCGTCTGG	SEQ ID NO.28
gRNA1_US2/SB1_T	Cadena superior	CACCGAGAAAAATCCATAAGGCCG	SEQ ID NO.29
gRNA1_US2/SB1_B	Cadena inferior	AAACCGGCCTTATGGATTTTCTC	SEQ ID NO.30
gRNA2_US2/SB1_T	Cadena superior	CACCGGAATGCCAGTCCCATCCGG	SEQ ID NO.31
gRNA2_US2/SB1_B	Cadena inferior	AAACCCGGATGGGACTGGCATTCC	SEQ ID NO.32

Generación del recombinante rSB1-GFP-VP2

Se sembraron 0.5×10^6 células CEF por pocillo en una placa de 6 pocillos de cultivo celular en medio de mantenimiento (DMEM 1x +5% de SFB) a 37 °C, bajo 5% CO₂ de atmósfera. Luego de 24 horas, el sobrenadante fue retirado y la monocapa fue lavada por 3 veces consecutivas con DPBS1x para eliminar restos celulares. Las células fueron infectadas con SB1wt con una MOI de 0.01 por 8 horas a 37 °C y 5% de CO₂ en medio de DMEM 1x + 5% SFB.

Al día siguiente, 1 µg del plásmido pGEM-sgA-GFP-mCMV-VP2-Poli A que contiene el casete mCMV-VP2-Poli A, 0.5 µg de sgRNA-sgA, y 0.5 µg sgRNA SB1 US2, fueron co-transfectados por 24 horas utilizando Lipofectamine® Reagent (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

A las 24 horas post-transfección, el sobrenadante que contiene el complejo de ADN: Lipofectamine fue removido y reemplazado por un medio de fresco de mantenimiento, para evitar alguna toxicidad en la monocapa celular.

A los tres días post transfección, las células infectadas/transfectadas fueron transferidas y distribuidas en 4 placas de 6 pocillos de cultivo celular de células CEF previamente sembradas.

- 5 Luego de 4 días post-transfección/infección, placas de lisis con emisión de fluorescencia GFP fueron visibles, correspondiente al virus recombinante. Seguidamente las clonas seleccionadas fueron purificadas con tres rondas de purificación de placas (sub-clonas). Para ello, células únicas que expresaban el casete de expresión de VP2 - GFP, fueron seleccionadas y distribuidas en placas de cultivo celular de 96 pocillos por FACS en BD
- 10 FACSMelody™ Cell Sorter (BD Biosciences). Finalmente, el nuevo virus recombinante fue nombrado como rSB1-GFP-VP2 (**SEQ ID NO. 35**). Posteriormente, la presencia y expresión del casete VP2 (IBDV) fue verificado por PCR convencional e IFI.

Selección de clonas recombinantes rSB1-GFP-VP2

- 15 Clonas recombinantes de rSB1-GFP-VP2, fueron evaluadas por PCR convencional para confirmar la correcta inserción del casete VP2/GFP en el genoma del SB1 post-transfección y purificación. Cinco clonas fueron seleccionadas e infectadas en células CEF previamente sembradas, luego fueron tripsinizadas al alcanzar un porcentaje de infección de 70%. El
- 20 ADN viral fue extraído y analizado por PCR convencional utilizando los siguientes cebadores específicos, ver tabla 3.

Remoción del casete reportero GFP por el sistema de Cre-Lox

- 25 El casete de expresión de GFP (flanqueado por secuencias de LoxP) de rSB1-GFP-VP2, fue removido por el sistema de Cre-Lox. Se preparó una monocapa de células CEF en una placa de 6 pocillos de cultivo celular, seguidamente la monocapa fue infectada con el virus rSB1-GFP-VP2 con una MOI de 0.01 por 24 horas. Seguidamente, la monocapa/infectada fue co-transfectada con 2 µg de Cre-recombinasa utilizando Lipofectamine® Reagent
- 30 (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Luego de 12 horas post-transfección el medio de cultivo fue cambiado para evitar algún efecto citotóxico. La verificación de la remoción completa del casete de expresión del gen reportero GFP, fue confirmado con la aparición de nuevas placas de lisis no fluorescentes.

Finalmente, el nuevo virus recombinante obtenido fue denominado rSB1-VP2 (**SEQ ID NO. 36**).

Selección de clonas recombinantes rSB1-VP2 post-remoción del casete reportero GFP

- 5 La verificación de la completa remoción del casete reportero GFP en las clonas rSB1-GFP-VP2, fue verificada por PCR convencional utilizando cebadores específicos ver tabla 3. Asimismo, estos mismos cebadores permitieron evaluar la integridad del casete de expresión VP2 de IBDV en el SB1.

10 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

- Células CEF fueron crecidas en placa de 6 pocillos de cultivo celular, fueron infectadas con una MOI de 0.001 con el SB1wt y rSB1-VP2. Después de 48 horas post-infección (hpi), las células fueron lavadas tres veces con DPBS 1× y luego fueron fijadas con 4% paraformaldehído por 30 min a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario en una solución de 5% albumina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés: bovine serum albumin) en DPBS por 1 hora a temperatura ambiente. Un anticuerpo primario: anti-suero de Infectious Bursal Disease Virus (No. de catálogo, #G0114) (Avian Vaccine Services, LLC dba AVS Bio, Norwich, USA) para la detección de la expresión de VP2. Después de los tres lavados con DPBS 1x, las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario goat anti-chicken IgY H&L Alexa Fluor® 594 en una dilución de 1:200 (No. de catálogo ab150172, Abcam, Cambridge, MA, USA) (fluorescencia roja), respectivamente en DPBS 1× con 5% BSA por 1 hora a temperatura ambiente. Los resultados fueron observados utilizando un microscopio de fluorescencia ObserverA1 (Carl Zeiss, Germany). Las imágenes digitales fueron tomadas a 200× de amplificación y procesadas con la cámara de AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Germany).

Western blotting para detección de la proteína VP2 en el rSB1-VP2

- 30 Para evaluar la expresión de la proteína VP2. Células CEF fueron infectadas con el virus recombinante con una MOI de 0.01. A las 72 hpi, las células CEF fueron lisadas y analizadas por Western blotting. El análisis de Western blot fue realizado utilizando un anticuerpo primario Anti-IBDV, VP2 Mouse (No. de catálogo, MBS312798, MyBioSource) diluido 2/5000 en leche al 1% en PBS-T 0.1% durante 15 horas a temperatura ambiente y

en agitación constante. Posteriormente, se realizaron tres lavados con T-TBS al 0.1% (Cada lavado de 10 min y en agitación constante). Al finalizar los lavados, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario Anti-Mouse IgG [HRP] (Catálogo No. A00160, GenScript, Piscataway, NJ, USA) diluido 2/5000 en leche al 1% en PBS-T 0.1% por 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante.

Las visualizaciones de la expresión de las proteínas fueron detectadas utilizando un fotodocumentador y una cámara de AZURE CCD (Azure Biosystems, Inc., Dublin, USA).

10 Diseño experimental N°1: Inmunización de pollos de engorde (broilers) con la vacuna rSB1-VP2

Para la experimentación de inmunización se evaluaron tres sub-clonas de virus recombinantes obtenidos rSB1-VP2 clonas: 3.2, 3.7 y 18.7, como control se utilizó un grupo control no inmunizado.

Edad	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
1 día	rSB1-VP2 C3.2 <i>n</i> =12	rSB1-VP2 C3.7 <i>n</i> =12	rSB1-VP2 C18.7 <i>n</i> =12	Control no inmunizado <i>n</i> =12

Los pollos fueron inmunizados con una dosis de 3000 UFP/ave, a los 20, 34, y 42 días post-inmunización, se recolectaron muestras de sueros para evaluar la respuesta inmune humoral mediante la detección de anticuerpos contra la proteína VP2 de IBDV, utilizando un ELISA indirecto IDScreen® IBD VP2 Indirect (ID. Vet Cat. No IBDVP2).

Cronograma de evaluación en el estudio:

Grupo	A	B	C	D
Nº de aves (<i>n</i>)	12	12	12	12
Días	Tratamiento			Control
1	Inmunización por vía subcutánea con 3000 UFP/Pollo			No aplica
20	Evaluación serológica por ELISA indirecto IDScreen® IBD VP2 Indirect			
34	Evaluación serológica por ELISA indirecto IDScreen® IBD VP2 Indirect			

41	Evaluación serológica por ELISA indirecto IDScreen® IBD VP2 Indirect
42	Desafío: 30µl (10⁴ DIE₅₀) de una cepa clásica F52/70 vía ocular
45	Evaluación de lesiones macroscópicas y microscópicas post desafío
48	Evaluación de lesiones macroscópicas y microscópicas post desafío
52	Evaluación de lesiones macroscópicas y microscópicas post desafío

A los 35 días de edad todas las aves fueron desafiadas con la cepa F52/70 vía ocular con un título de 10⁴ DIE₅₀ (30µl/dosis).

- 5 Posterior al desafío las aves fueron examinadas clínicamente durante 10 días registrándose la mortalidad, depresión, diarrea, y cualquier otro signo clínico. A las aves muertas se les realizó las necropsias para determinar y confirmar la causa de muerte.

Evaluación de las lesiones macroscópicas y microscópicas

10

Para la evaluación de lesiones macro y microscópicas, fueron sacrificadas 3 aves por grupo a los 45, 48, y 52 días de edad; en todos los casos se registraron y fotografiaron las lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas.

15 Índice Bursal:

Se determinó el índice bursal es decir el peso de la Bursa de Fabricio con respecto al peso corporal, el cual es empleado para determinar la presencia o no de atrofia de la Bursa de Fabricio.

20 La fórmula es:

$$\frac{\text{Peso de la bursa (grs)} \times 1000}{\text{Peso corporal (grs)}}$$

25 El índice bursal obtenido fue clasificado de la siguiente manera:

1.5 - 3.5 = Bursa Normal

0.5 – 1.5 = Atrofia Bursal

≤ a 0.5 = Severa Atrofia Bursal

Análisis estadístico

Resultados:

Construcción y recuperación del virus recombinante

- 5 Los sgRNAs (sgRNA-sgA and sgRNA-US2) fueron diseñados, sintetizados, y clonados en el plásmido px459v.20, el cual contiene el gen de la Cas9 de *S. pyogenes*. Los plásmidos resultantes fueron denominados px459v2.0-sgRNA-sgA y px459v2.0-sgRNA-US2.

- El plásmido donador pGEM-sgA-GFP-mMCV-VP2-Poli A, contiene el casete de expresión del GFP reportero el cual se encuentra flanqueado por dos secuencias de LoxP para su separación del casete VP2 de expresión. Los dos casetes fueron flanqueados por sitios de sg-A para introducir un deseado corte o clivaje, para la liberación del casete e integración en la región intergénica US2 del genoma SB1wt. La endonucleasa Cas9 promueve la inserción del casete GFP y gen VP2 en la región génica del genoma del SB1wt, ver figura 11.
- 10
- 15

- Para la generación del virus rSB1-GFP-VP2, las células CEF fueron co-transfectadas con los plásmidos pGEM-sgA-GFP-mMCV-VP2-Poli A, px459v2.0-sgRNA-sgA, px459v2.0-sgRNA1-US2, y px459v2.0-sgRNA2-US2. A las 24 horas post-transfección, las células fueron infectadas con el virus SB1wt con una MOI de 0.01. Las placas que expresan GFP fueron visibles a los 4 días post-transfección/infección, demostrando con éxito la inserción del casete. El virus recombinante fue aislado en tres rondas de purificación por aislamiento de placas de lisis y por Cell Sorter.
- 20

- Posteriormente, la remoción del casete reportero GFP, fue realizado con el tratamiento de Cre-recombinasa (pcDNA3.1-Cre) a través de sistema Cre-LoxP, las células infectadas con el virus rSB1-GFP-VP2 fueron transfectadas con la Cre-recombinasa, las apariciones de placas de lisis sin emisión de fluorescencia fueron visibles a los 4 días post-transfección/infección. La completa remoción fue confirmada aplicando diversos PCR convencionales utilizando cebadores específicos que amplificaron la región completa y extremos de unión del inserto al genoma del virus (Figura 12, 13, y 14). Finalmente, el nuevo recombinante SB1 fue denominado rSB1-VP2.
- 25
- 30

Selección de clones post-remoción casete reportero GFP

Antes de la remoción del casete reportero, las clonas C3, C8, C11, C16 y C18 del virus rSB1-GFP-VP2 fueron seleccionadas para la remoción debido a que presentaron el tamaño de banda de ADN de 6855 pb mediante PCR convencional, lo cual indicó tanto la presencia del casete reportero GFP y del casete VP2.

Luego de la remoción del casete reportero GFP, se seleccionaron cinco clonas recombinantes rSB1-VP2, de las cuales se verificó la completa remoción del casete reportero GFP, utilizando una PCR convencional, ver tabla 3, demostrando la completa remoción del casete reportero e integridad del casete VP2 en la región génica US2 del genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (SB1).

Detección de expresión de VP2 en el rSB1-VP2

Se confirmó la expresión de la proteína VP2 con una banda de 45 KDa mediante Western blotting. Como control negativo del experimento se utilizó células CEF infectadas con SB1wt y células sin infectar, el cual no se detectó ninguna banda (Figura 16). El IFI demostró la expresión de la proteína VP2 en células CEFs infectadas con el virus recombinante (Figura 15). Estos resultados demostraron que la presencia y la expresión del gen VP2 de IBDV, no afectó la replicación del virus recombinante.

Respuesta inmune humoral y protección

A partir de la tercera semana post-inmunización, los niveles de anticuerpos en aves inmunizadas fueron medidos y detectados. Después del desafío con IBDV todos los grupos de aves a excepción del grupo control no inmunizado presentaron 100% de protección contra IBDV. Por lo tanto, estos estudios demuestran que este nuevo recombinante *Gallid alphaherpesvirus 3* vector vacunal induce similares niveles de anticuerpos como otras vacunas convencionales comerciales. El promedio del score clínico y el porcentaje de supervivencia de las aves durante la evaluación del desafío de IBDV, nos indicó la eficacia de vacuna recombinante en aves inmunizadas. Los resultados muestran que el GaHV-3 puede ser utilizado como un vector vacunal contra la enfermedad de IBDV que expresa la proteína VP2 en pollos de un día de edad, resultando 100% de protección contra el desafío con dosis letal de IBDV.

Porcentaje de mortalidad post-desafío de ambos grupos

Grupo		Días post desafío					
		1	2	3	4	5	6
A	Aves muertas	0	0	0	0	0	0
	% mortalidad	0	0	0	0	0	0
B	Aves muertas	0	0	0	0	0	0
	% mortalidad	0	0	0	0	0	0
C	Aves muertas	0	0	0	0	0	0
	% mortalidad	0	0	0	0	0	0
D	Aves muertas	0	0	2	3	3	4
	% mortalidad	0	0	16.6%	41.6%	66.6%	100%

Listado de Secuencias:

5

SEQ ID NO.23 Secuencia de nucleótidos del cebador o forward primer MDV2-US2-5F en sentido 5' a 3'

Longitud: 21 pares de bases.

10

SEQ ID NO.24 Secuencia de nucleótidos del cebador o reverse primer MDV2-US2-5R en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pares de bases.

15

SEQ ID NO.25 Secuencia de nucleótidos del cebador o forward primer MDV2-US2-6F en sentido 5' a 3'

Longitud: 20 pares de bases.

- SEQ ID NO.26 Secuencia de nucleótidos del cebador o reverse primer MDV2-VP2-6R en sentido 5' a 3'
Longitud: 20 pares de bases.
- 5
- SEQ ID NO. 27 Secuencia de nucleótidos del cebador o reverse primer MDV2-EGFP-US2-7F en sentido 5' a 3'
Longitud: 20 pares de bases.
- 10
- SEQ ID NO. 28 Secuencia de nucleótidos del cebador o reverse primer MDV2-US3-7R en sentido 5' a 3'
Longitud: 20 pares de bases.
- 15
- SEQ ID NO.29 Secuencia de nucleótidos del oligo cadena superior gRNA1_US2/SB1_T
Longitud: 24 pb.
- 20
- SEQ ID NO.30 Secuencia de nucleótidos del oligo cadena inferior gRNA1_US2/SB1_B
Longitud: 24 pb.
- 25
- SEQ ID NO.31 Secuencia de nucleótidos del oligo cadena superior gRNA2_US2/SB1_T
Longitud: 24 pb.
- 30
- SEQ ID NO.32 Secuencia de nucleótidos del oligo cadena inferior gRNA2_US2/SB1_B
Longitud: 24 pb.
- 35
- SEQ ID NO.33 Secuencia génica de US2 de *Gallid alphaherpesvirus 3* con número de acceso por GenBank N° de acceso: HQ840738.1
Longitud: 816 pb.
- SEQ ID NO.34 Secuencia de nucleótidos de las glicoproteínas VP2 de IBDV cepa Faragher 52/70, con número de acceso por GenBank: Y14958.1
Longitud: 1362 pb.
- SEQ ID NO.35 Secuencia de nucleótidos del virus rSB1-GFP-VP2 (IBDV)
Longitud: 171,562 pb.

SEQ ID NO.36 Secuencia de nucleótidos del virus rSB1-VP2 (IBDV)

Longitud: 169, 094 pb.

Bibliografía:

- 5 1. Jarosinski KW, Tischer BK, Trapp S, Osterrieder N. 2006. Marek's disease virus: Lytic replication, oncogenesis and control. *Expert Review of Vaccines* 5:761–772.
2. Petherbridge L, Xu H, Zhao Y, Smith LP, Simpson J, Baigent S, Nair V. 2009. Cloning of Gallid herpesvirus 3 (Marek's disease virus serotype-2) genome as infectious bacterial artificial chromosomes for analysis of viral gene functions.
- 10 Journal of Virological Methods 158:11–17.
3. Kim T, Spatz SJ, Dunn JR. 2020. Vaccinal efficacy of molecularly cloned Gallid alphaherpesvirus 3 strain 301B/1 against very virulent Marek's disease virus challenge. *Journal of General Virology* 101:542–552.
4. Iqbal M. 2012. Progress toward the development of polyvalent vaccination
- 15 strategies against multiple viral infections in Chickens using herpesvirus of turkeys as vector. *Bioengineered* 3:222–226.
5. Romanutti C, Keller L, Zanetti FA. 2020. Current status of virus-vectored vaccines against pathogens that affect poultry. *Vaccine* 38:6990–7001.
6. Sadigh Y, Powers C, Spiro S, Pedrera M, Broadbent A, Nair V. 2018. Gallid
- 20 herpesvirus 3 SB-1 strain as a recombinant viral vector for poultry vaccination. *npj Vaccines* 3:1–7.
7. Calderón K, Rojas-Neyra A, Carbajal-Lévano B, Luján-Valenzuela L, Ticona J, Isasi-Rivas G, Montalvan A, Criollo-Orozco M, Huaccachi-Gonzáles E, Tataje-Lavanda L, Alvarez KLF, Fernández-Sánchez M, Fernández-Díaz M, Tang N, Yao
- 25 Y, Nair V. 2022. A Recombinant Turkey Herpesvirus Expressing the F Protein of Newcastle Disease Virus Genotype XII Generated by NHEJ-CRISPR/Cas9 and Cre-LoxP Systems Confers Protection against Genotype XII Challenge in Chickens. *Viruses* 2022, Vol 14, Page 793 14:793.
8. Baron MD, Iqbal M, Nair V. 2018. Recent advances in viral vectors in veterinary
- 30 vaccinology. *Current Opinion in Virology* 29:1–7.
9. Hein R, Koopman R, García M, Armour N, Dunn JR, Barbosa T, Martinez A. 2021. Review of Poultry Recombinant Vector Vaccines. *Avian Diseases* 65:438–452.
10. Salsman J, Dellaire G. 2017. Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochemistry and Cell Biology* <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0137>.
- 35 11. Suenaga T, Kohyama M, Hirayasu K, Arase H. 2014. Engineering large viral DNA

genomes using the CRISPR-Cas9 system. Microbiology and Immunology
<https://doi.org/10.1111/1348-0421.12180>.

12. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature Protocols 8:2281–2308.
- 5 13. Chumbe A, Izquierdo-Lara R, Tataje-Lavanda L, Figueroa A, Segovia K, Gonzalez R, Cribillero G, Montalvan A, Fernández-Díaz M, Icochea E. 2015. Characterization and Sequencing of a Genotype XII Newcastle Disease Virus Isolated from a Peacock (*Pavo cristatus*) in Peru. Genome Announcements 3:e00792-15.