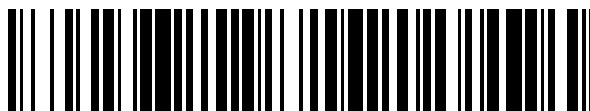


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 142**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/38** (2006.01)

**C12N 15/869** (2006.01)

**A61K 39/255** (2006.01)

**A61K 39/265** (2006.01)

**C12N 7/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05720839 .9**

96 Fecha de presentación: **09.03.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1731612**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54 Título: **VIRUS HERPES RECOMBINANTE Y USOS DEL MISMO.**

30 Prioridad:  
**29.03.2004 JP 2004095500**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.11.2011**

73 Titular/es:  
**CEVA Santé Animale SA**  
**10, avenue de la Ballastière**  
**33501 Libourne Cedex , FR**

72 Inventor/es:  
**Okuda, Takashi;**  
**Saitoh, Shuji y**  
**Saeki, Sakiko**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 369 142 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Virus herpes recombinante y uso del mismo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un virus herpes recombinante que tiene un ADN que codifica el gen gB del virus de la laringotraqueitis infecciosa (al que se alude aquí en lo que sigue como ILTV), y a usos del mismo. Más específicamente, se refiere a un virus herpes recombinante con una secuencia parcial del gen gB de ILTV que puede estar presente de forma estable en el recombinante, y una vacuna contra el virus de la laringotraqueitis infecciosa.

Técnica de antecedentes

15 La laringotraqueitis infecciosa es provocada por la infección de ILTV. ILTV infesta a aves tales como pollos, faisanes, pavos reales y pavos. Rasgos característicos del brote en pollos incluye la aparición de síntomas respiratorios, la elevación de la temperatura corporal y anorexia y similares, tos grave, expectoración y esputos. Cuando se infestan a gallinas ponedoras, la tasa de puesta de huevos comienza a disminuir aproximadamente cuatro días después del brote de la enfermedad, y transcurre aproximadamente un mes antes de que se vuelva a una puesta normal. Además de ello, se han reseñado aumentos en la tasa de mortalidad debido a la infección mixta de ILTV y otros agentes patógenos, y la laringotraqueitis infecciosa infringe enormes pérdidas económicas en la industria de las aves de corral.

25 Para la prevención de la laringotraqueitis infecciosa, se han utilizado convencionalmente vacunas vivas secas o vacunas vivas congeladas procedentes de cepas de vacunas atenuadas. Sin embargo, el efecto de inmunización varía con el entorno de cría, la densidad de cría, el método de inoculación y similares. Además de ello, existen también riesgos de que la vacunación pueda provocar ligeros síntomas en el tracto respiratorio y métodos o cantidades de inoculación deficientes pueden conducir al brote de la enfermedad. En algunas zonas, existen informes de enfermedades provocadas por la patogenicidad invertida de cepas de vacunas y, así, se está buscando el desarrollo de vacunas seguras y eficaces.

30 Con el fin de superar los problemas, se han desarrollado recientemente, mediante la tecnología recombinante, vacunas que comprenden, en calidad de ingrediente activo, un vector de virus recombinante. Con respecto a ILTV, se ha investigado el uso del virus de la viruela aviar (al que se alude aquí en lo que sigue como FPV) en calidad de vector de virus, y está comercialmente disponible en los EE.UU. (BIOMUNE, nombre registrado VECTORMUNE FP-LT (+AE)).

35 ILTV es un virus causante de la laringotraqueitis infecciosa. ILTV es uno de los virus herpes y el genoma del virus consiste en un ADN de doble cadena que comprende aproximadamente 160.000 pares de bases. Se conocen el gen de timidina quinasa (Griffin et al., J. Gen. Virol. 71:841, 1990), el gen gp60 (Kongsuwan et al., Virus Genes 7: 297-303, 1993), el gen p40 de la cápsida (Griffin et al., Nucleic Acids Res. 18:366, 1990), el gen de glicoproteína B (gB) (Poulsen et al., Virus Genes 5: 335 – 347, 1991; Griffin et al., J. Gen. Virol. 72: 393-398, 1991; patente de EE.UU. nº 5.443.831), el gen de glicoproteína C (gC) (Kingsley et al., Virology 203: 336-343, 1994), el gen RR2 (Griffin et al., J. of General. Virol. 70: 3085-3089, 1989), el gen UL32 (publicación de patente internacional WO 98/07866) y similares.

45 El marco de lectura abierto del gen gB de ILTV tiene una longitud total de 2613 pb (873 aminoácidos), y está reseñado en la patente de EE.UU. nº 5.443.831, etc. que un FPV recombinante que tiene el gen de longitud completa integrado en él exhibe un efecto en forma de vacuna.

50 Los virus de la viruela tales como FPV se desarrollan rápidamente en el hospedante y, después de expresar la proteína del antígeno, son expelidos por completo del sistema inmune del hospedante. Sin embargo, dado que la inmunidad se memoriza y se refuerza después de expeler el virus, el virus de la viruela es adecuado para uso como hospedante para la vacuna. Por otra parte, los virus herpes tales como el virus herpes de los pavos (al que se alude aquí en lo que sigue como HVT) no se desarrollan rápidamente en el hospedante, y la infección latente dura mucho tiempo. Durante esta latencia, los virus herpes continúan estimulando el sistema inmune del hospedante. Se está investigando el uso de HVT recombinante en calidad de un vector del virus utilizando una característica de este tipo.

55 A pesar de que la publicación nacional japonesa PCT nº 4-501658 (documento EP 434721) describía que se ha construido un HVT recombinante que comprende HVT en el que se ha insertado un gen de antígeno de ILTV, de hecho el HVT recombinante no ha sido construido.

60

Además, en la publicación de patente japonesa no examinada nº 2001-000188 se ha construido un HVT recombinante en el que se han insertado dos genes, es decir, un gen gB de longitud completa de ILTV y un gen UL32. Se ha confirmado que este HVT recombinante expresa in vitro una proteína que corresponde al gen insertado utilizando un método de ensayo inmunofluorescente, pero no se ha confirmado un efecto en calidad de una vacuna.

5

#### Descripción de la invención

Bajo las circunstancias de la tecnología convencional, los autores de la presente invención han intentado purificar, mediante subcultivo, un virus herpes recombinante, en el que en el genoma del virus herpes se ha insertado una molécula de ADN en la que se ligó un promotor situado más arriba del gen gB de longitud completa de ILTV. Sin embargo, la purificación era imposible debido a la delección del gen gB de ILTV. Cuando se produce la delección del gen gB, el virus herpes recombinante no actúa como una vacuna anti-ILTV. Además de ello, ILTV y HVT son ambos virus herpes, y HVT per se tiene al gen gB como un gen esencial.

Así, dado que genes gB pueden competir uno con otro en el momento de formar partículas de virus, los autores de la presente invención pensaron que sería importante evitar una compleción y conservar la antigenicidad suprimiendo la porción de anclaje a la membrana y el dominio citoplásmico del producto de gen gB de ILTV con el fin de cambiar la proteína gB de ILTV de una proteína de la membrana a una proteína secretora.

Basados en esta idea, tras un estudio intenso y amplio con el fin de obtener virus herpes recombinantes que fuesen estables durante el subcultivo, los autores de la presente invención han encontrado que se puede obtener un efecto de vacuna acortando el gen gB hasta una longitud predeterminada, además de suprimiendo la porción de anclaje a la membrana y el dominio citoplásmico, y se puede obtener un mayor efecto de vacuna ligando el gen gB acortado a una secuencia aditiva específica y, por lo tanto, han completado la presente invención.

Así, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un virus herpes recombinante, excluido el virus de la laringotraqueitis infecciosa, que tiene un ADN que codifica un polipéptido que comprende 429 aminoácidos en el extremo amino terminal de una proteína codificada por el gen gB del virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV) o un polipéptido en el que un aminoácido ha sido suprimido, añadido o sustituido en dicho polipéptido. Además de ello, se proporciona una vacuna contra el virus de la laringotraqueitis infecciosa que comprende, en calidad de ingrediente activo, a dicho virus herpes recombinante.

#### Breve explicación de los dibujos

La Fig. 1 es un dibujo que compara FW050 con el vector de homología original.

La Fig. 2 es un diagrama esquemático del vector de homología.

Mejor modo para llevar a cabo la invención.

La presente invención se explicará ahora con detalle en lo que sigue.

#### ADN

El ADN para uso en la presente invención es uno (al que se alude aquí en lo que sigue como el gen gB parcial) que codifica un péptido parcial que comprende 429 aminoácidos en el extremo amino terminal de una proteína (a la que se alude aquí en lo que sigue como la proteína gB) codificada por el gen gB de ILTV. La secuencia de aminoácidos de este péptido parcial puede incluir la delección, adición o sustitución de uno o una pluralidad de aminoácidos.

Como un ejemplo específico de ADN para uso en la presente invención se puede mencionar un ADN que codifica una secuencia de 429 aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 2, y como un ejemplo específico se puede mencionar un ADN de una secuencia de nucleótidos recogida en SEQ ID NO: 3.

Como ILTV que puede ser un origen del gen gB se puede mencionar, por ejemplo, la cepa NS-175 (la cepa número VA0204 del Catálogo de Cultivos para la Higiene Animal, the Japanese Association of Veterinary Biologics), la cepa CE (Kouda, Azabu Veterinary College Research Report, 31, 133-202, 1976), la cepa SA-2 (Johnson et al., Arch. Virol., 119, 181-198, 1991), la cepa de aislamiento de campo 632 muy tóxica (Keeler et al., Avian Diseases, 35, 920-929, 1991), y la cepa de enfrentamiento USDA (Poulsen et al., J. General. Virol., 78, 2945-2951, 1997).

El gen gB no está específicamente limitado, y se puede utilizar cualquier gen que codifique la proteína gB derivada

de ILTV, y se puede mencionar, por ejemplo, el gen gB (Nº de ACC. a GeneBank X56093) derivado de la cepa de aislado de campo 632 muy tóxica, y el gen gB (Nº de ACC. a GeneBank M64927) derivado de la cepa SA2.

5 El efecto de la vacuna se puede potenciar ligando un ADN (al que se alude aquí en lo que sigue como el ADN aditivo) que codifica la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID Nº: 4 en marco con el extremo 3' del gen gB antes mencionado. Se puede suprimir, añadir o sustituir uno o una pluralidad de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID Nº: 4.

10 La unión del ADN aditivo en un marco con el gen gB parcial es tanto importante como preferida con el fin de potenciar el efecto de la vacuna.

15 La secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID Nº: 4 no tiene ni una secuencia que tenga alguna función ni tiene una secuencia que se estime tenga alguna función. Entre la secuencia de ácidos nucleicos de 120 pb (que no contiene el codón de terminación) (SEQ ID Nº: 5) que codifica la secuencia de aminoácidos recogida en la SEQ ID Nº: 4, 87 pb se derivan de la señal de poliadenilación de SV40, 16 pb de UL45 de HVT, 13 pb de la secuencia Sfil introducida artificialmente y 4 pb de la secuencia flanqueante.

20 El método de ligar el gen gB parcial y el ADN aditivo en un marco no está específicamente limitado, y se puede utilizar un método general descrito en un libro de texto (Sambrook, J., Russel D. W., ed., Molecular Cloning, tercera Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, etc.) sobre tecnología recombinante de genes. Como método general, se puede mencionar un método de ligamiento de sitios escisión de enzimas de restricción. Cuando no están disponibles sitios de reconocimiento de la enzima de restricción, dichos sitios se pueden introducir mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mutación in vitro o similar.

#### 25 Virus herpes recombinante

30 El virus herpes recombinante de la presente invención debe emplear un virus herpes distinto de ILTV en calidad del virus parental. El virus herpes parental puede ser cualquier virus herpes que infeste mamíferos o aves. Sin embargo, dado que el gen integrado no puede existir de forma estable en ILTV, ILTV no puede utilizarse como el virus parental. Cuando se ha de obtener una vacuna para aves, se prefiere seleccionar el virus en la enfermedad de Marek como virus herpes parental. Existen tres tipos virus de la enfermedad de Marek: tipos 1, 2 y 3, y cualquier tipo se puede seleccionar de acuerdo con la presente invención. Un virus de la enfermedad de Marek puede obtenerse de forma natural, o está disponible de ATCC, etc., con o sin coste, y se prefieren los no patógenos. En calidad de virus de este tipo se pueden mencionar, por ejemplo, la cepa CV1988 (Rispens) como virus tipo 1 de la enfermedad de Marek, la cepa SB-1 como virus tipo 2 de la enfermedad de Marek y FC126 (ATCC VR-584B), PB-THV1, H-2, YT-7 y HPRS-26 como virus tipo 3 de la enfermedad de Marek.

40 El método para construir un virus herpes recombinante no está específicamente limitado, y se puede utilizar un plásmido recombinante que tenga un ADN aditivo ligado según se desee al gen gB parcial antes mencionado, que puede insertarse en un virus herpes parental mediante recombinación homóloga. En este momento, el gen gB parcial está situado en una posición que se encuentra bajo el control de un promotor extraño o endógeno.

45 En calidad de plásmido para uso como plásmido recombinante (al que se alude aquí en lo que sigue como vector de homología), se puede utilizar cualquiera comúnmente utilizado, e incluye, por ejemplo, pBR322, pBR325, pBR327, pBR328, pUC8, pUC18 y pUC19.

La construcción de un vector de homología se puede realizar de acuerdo con método estándar utilizando sitios de enzimas de restricción poseídos por el vector.

50 El vector de homología es un plásmido en el que, habitualmente, el promotor y la señal poliA se añaden al gen gB parcial antes mencionado, que luego se inserta en una región no esencial para el desarrollo del virus herpes recombinante.

55 El método de construir el vector de homología de la presente invención se explicará a continuación en lo que sigue.

60 Cuando el ADN se ha de integrar en un virus herpes recombinante, éste se integra generalmente de modo que la molécula de ADN de la presente invención esté situada bajo el control de un gen regulador (promotor) con el fin de obtener una expresión elevada. El promotor puede ser cualquiera comúnmente utilizado que opere en una célula eucariótica, y puede derivarse de una célula eucariótica o de un virus. Ejemplos específicos del promotor incluyen el promotor de timidina quinasa del virus herpes (Ross et al., J. Gen. Virol. 74: 371-477, 1993), el promotor de la

5 proteína gB del virus herpes de pavo (HVT) y el virus tipo 1 de la enfermedad de Marek (MDV) (Ross et al., J. Gen. Virol. 74: 371-377, 1993), el promotor IE del citomegalovirus humano (HCMV) (Stinski et al., J. Virol. 55: 431-441, 1985), el promotor SV40 (Gunning et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 84: 4831-4835, 1987), el promotor de acción  $\beta$  humano (Gunning et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 4831-4835, 1987), el promotor de la actina  $\beta$  de pollo (Kost et al., Nucleic Acids Res. 11: 8287-8301, 1983), el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) (Greuel et al., Virology 177: 33-43, 1990), el promotor Pec (publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) nº 2001-000188) y similares.

10 Al añadir un potenciador que sea un factor activante de la transcripción, además del promotor, se puede esperar una expresión eficaz adicional (Stinski et al., J. Virol. 55 : 431-441, 1985). En calidad de potenciador se puede ilustrar parte del promotor derivado del citomegalovirus y, en general, no está limitada la relación posicional al gen insertado. En calidad de promotor de este tipo, se pueden ilustrar el promotor Pec descrito en la publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) nº 2001-000188.

15 Además de ello, al añadir una señal de poliadenilación más abajo del ADN aditivo, se puede esperar una expresión específicamente elevada.

20 En calidad de la señal de poliadenilación se puede ilustrar una señal poliA tal como SV40 (Gunning et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 84: 4831-4835, 1987) y la señal poliA de UL46h, UL47h y UL49h del virus tipo 1 de la enfermedad de Marek (MDV) (Yanagida et al., J. Gen. Virol. 74: 1837-1845, 1993).

25 En calidad de regiones de gen no esenciales para el desarrollo del virus herpes en el caso del virus tipo 1, tipo 2 y tipo 3 (el tipo 3 es el virus herpes de pavo) de la enfermedad de Marek (MDV) se puede ilustrar la región TK (Ross et al., the 16th International Herpes Workshop, 1991), la región US10 (Sakaguchi et al., Vaccine 12: 953-957, 1994), la región US2 (Sondermeijer, P. J. et al., Vaccine 11:349-358, 1993), la región entre UL44 y 45 y entre UL45 y 46 descritas en la publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) nº 11 – 192093 y similares.

30 El vector de homología se puede construir insertando un gen extraño tal como el gen gB parcial o el ADN aditivo, un ADN a modo de ejemplo de la presente invención. La longitud de la región no esencial en la que se insertan genes extraños tales como ADN de la presente invención no está específicamente limitada, pero son suficientes 10 pb o más hacia delante o hacia atrás del sitio de inserción del gen extraño, preferiblemente 100 pb o más y, más preferiblemente, 500 pb o más de bases derivadas de la región no esencial.

35 Mediante la recombinación homóloga del vector de homología antes mencionado y del virus herpes parental se puede obtener un virus herpes recombinante.

Como un método concreto para construir un virus herpes recombinante se puede ilustrar el siguiente método.

40 El vector de homología se introduce en una célula infestada con virus herpes mediante electroporación, el método de fosfato de calcio, un método que utiliza lipofectina, un método que utiliza una pistola de genes y similares. Por ejemplo, cuando el virus parental es un virus herpes de aves, la célula a infectar por parte del virus herpes es preferiblemente una célula derivada de aves tales como fibroblastos de embriones de pollo (CEF), un huevo de pollo en desarrollo, una célula de riñón de pollo, etc. La célula infestada se puede cultivar por un método de cultivo comúnmente utilizado. Como método de introducir el vector de homología en la célula infestada se adopta preferiblemente la electroporación o un método que utiliza lipofectina con el fin de obtener una elevada eficacia de introducción. Cuando la cantidad del vector de homología (plásmido, etc.) a introducir se encuentra en el intervalo de 0,1 – 1000  $\mu$ g, aumentan las incidencias de formar un virus herpes recombinante a partir de las regiones homólogas del ADN genómico del virus herpes y el vector de homología. Como método de selección de únicamente un virus herpes recombinante de este tipo al que se ha introducido un vector de homología, se puede utilizar el método del ensayo de placa negra (BPA). En el método BPA se lleva a cabo una reacción inmunológica utilizando un anticuerpo contra el gen extraño y se visualizan placas que expresan el antígeno extraño, es decir, se utiliza un anticuerpo contra el gen extraño y luego se utiliza un anticuerpo secundario marcado con enzimas y, finalmente, se utiliza un sustrato correspondiente a la enzima para la visualización. Mediante este método se selecciona un virus herpes recombinante que expresa el gen extraño. Además de ello, tiene la ventaja de que, cuando se construye un virus herpes recombinante de este tipo, la detección de la integración se puede llevar a cabo fácilmente utilizando un gen marcador tal como  $\beta$ -galactosidasa en calidad del gen extraño. Cuando se utiliza el  $ge\beta$  -galactosidasa, se puede aislar fácilmente un recombinante vigilando la expresión utilizando Bluo-Gal (Invitrogen) etc. De otro modo, se puede utilizar un método tal como la hibridación en placa para aislar el virus herpes recombinante deseado. Al repetir estos procesos, se puede purificar el virus herpes recombinante.

Vacuna para el virus de la laringotraqueitis infecciosa.

La vacuna de la presente invención para el virus de la laringotraqueitis infecciosa es una vacuna para aves que comprende, en calidad de ingrediente activo, el virus herpes recombinante anterior de la presente invención.

El método de preparar la vacuna no está específicamente limitado, y se puede preparar, por ejemplo, por el siguiente método.

Las células infestadas con el virus herpes recombinante de la presente invención se infestan a las células (a las que se alude aquí en lo que sigue como la célula hospedante) en las que se puede desarrollar el virus, y después de que se desarrollen los virus, las células se raspan mediante un raspador o tripsina, seguido de centrifugación para separar las células infestadas y el sobrenadante. Por ejemplo, cuando el virus parental es un virus herpes de aves, se prefiere en calidad de célula hospedante una célula derivada de aves y se pueden utilizar adecuadamente fibroblastos de embrión de pollo (CEF), células de riñón de pollo, etc. Las células infestadas obtenidas se suspenden en un medio de cultivo que contiene dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y se almacenan congeladas en nitrógeno líquido. Cuando se utilizan en calidad de la vacuna, se utiliza una cantidad adecuada de tampón fosfato o solución salina fisiológica para disolver el producto liofilizado antes del uso.

Estabilizadores u otros ingredientes para almacenar las células infestadas anteriores bajo nitrógeno líquido son cualesquiera ingredientes que permiten una supervivencia estable de las células infestadas por el virus y que no son farmacológicamente dañinas para el receptor.

El método de administrar a aves la vacuna que comprende como un ingrediente principal el virus herpes recombinante así preparado no está específicamente limitado. Por ejemplo, se puede mencionar el mismo método que actualmente se utiliza para vacunas de virus herpes tales como un método de inyectar por vía subcutánea a un ave individual y un método de inocular mediante punción un huevo en desarrollo.

La cantidad inoculada y el tiempo de inoculación pueden ser iguales que los utilizados para las actuales vacunas. Por ejemplo, al inocular una dosis de  $10^2 - 10^5$  UFP o de  $10^2 - 10^4$  TCDI<sub>50</sub> por vía subcutánea en el dorso de un ave el día de la incubación utilizando una aguja de 20G o mayor, se puede esperar el efecto como vacuna. O la misma dosis que la anterior puede inocularse mediante punción de un huevo en desarrollo el día 18 - 19 después del desarrollo. Además del método de administrar a aves utilizando una aguja como el método de inoculación, se puede utilizar un instrumento de inoculación in ovo tal como Inovoject (Embrex).

El virus herpes recombinante obtenido como antes, actúa no sólo como una vacuna contra ILTV, sino asimismo como una vacuna contra el virus herpes parental.

## Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de un plásmido recombinante (vector de homología) que tiene el gen gB de ILTV de longitud completa

Un fragmento de pGHMCSpolyASfi de 125 pb, escindido por BglIII, descrito en la publicación de patente de EE.UU. nº 2003- 0059799 se insertó en el fragmento Sfil de pNZ45/46Sfi descrito en la publicación de patente internacional WO 99/18215 (documento EP 1026246) para construir P45/46HMCSpolyASfi. Con pUC18Xlac descrito en la publicación de patente internacional WO 98/18215 (documento EP 1026246) como molde, la PCR se llevó a cabo utilizando un cebador M13 (-21) recogido en SEQ ID N°: 6 y un cebador lac3'KpnR recogido en SEQ ID N°: 7 para obtener un fragmento de 3205 pb.

La PCR utilizó la Pfu polimerasa (Stratagene Corp.) y el aparato DNA Thermal Cyclor 480 de Perkin Elmer Inc. y se llevó a cabo durante 30 ciclos bajo una condición estándar (desnaturalización a 95°C durante 1 min, reanillamiento a 60°C o 55°C durante 2 minutos, y extensión a 72°C durante 3 minutos). Esta condición se utilizó en todos los Ejemplos, a menos que se especifique de otro modo.

Un fragmento de 3149 pb, obtenido al digerir el fragmento de 3205 pb amplificado por PCR con BamHI y KpnI, se ligó a un fragmento de 5573 pb, obtenido al digerir P45 / 46HMCSpolyASfi con BamHI y KpnI para construir pNZ45 /46HlacpolyASfi.

Por otra parte, con pBK-CMV (Stratagene Corp.) como molde, la PCR se llevó a cabo utilizando un cebador M13 (-21) recogido en SEQ ID N°: 6 y un cebador pCMV-1 recogido en SEQ ID N°: 8 para obtener un fragmento de 953 pb.

Un fragmento de 599 pb, obtenido al digerir este fragmento de 953 pb con PstI y NheI, un fragmento de 382 pb, obtenido al digerir pNZ45 /46lacpolyASfi con PstI y SphI, y un fragmento de 8332 pb, obtenido al digerir pNZ45 /46HlacpolyASfi con SphI y XbaI, se sometieron a ligamiento en tres fragmentos para construir pNZ45 /46HCMVlac.

5 Con el fin de suprimir el sitio de escisión de BglII en el gen gB de ILTV sin modificar los aminoácidos codificantes, se obtuvieron dos fragmentos con pGTPs/ILgB descritos en la publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) n° 10 – 807866 (documento EP 953642) en calidad de molde, un fragmento de 1132 pb, obtenido mediante amplificación por PCR utilizando un cebador ILgB-5 recogido en SEQ ID N°: 9 y un cebador ILgB-BglR recogido en la SEQ ID N°: 10, y un fragmento de 1564 pb, obtenido mediante amplificación por PCR utilizando un cebador ILgB-Bgl recogido en SEQ ID N°: 11 y un cebador ILgB-3+Kpn recogido en SEQ ID N°: 12. Con los dos fragmentos en calidad de molde, la PCR se llevó a cabo utilizando un cebador ILgB-5 recogido en SEQ ID N°: 9 y un cebador ILgB-3+Kpn recogido en SEQ ID N°:12 para obtener un fragmento de 2648 pb. Un fragmento de 2639 pb, obtenido al digerir este fragmento de 2648 pb con BamHI y KpnI y un fragmento de 3280 pb, obtenido al digerir pGIPEc descrito en la publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) n° 2001-000188 con BamHI y KpnI se ligaron para construir pGIPEcILgB.

Un fragmento de 2638 pb, obtenido al digerir este pGIPEcILgB con BamHI y KpnI y un fragmento de 4479 pb, obtenido al digerir pGIBacpA descrito en el documento EP 1298139 con BamHI y KpnI se ligaron para construir pGIBAcgBpA.

20 Al insertar un fragmento de 4464 pb, obtenido al digerir este pGIBAcgBpA con BglI en el sitio Sfil del pNZ45 /46HCMVlac anterior, se construyó un vector de homología p45 /46HCMVlacBacgB2nd con CMV-IE en calidad de promotor.

25 Luego, con el fin de suprimir el sitio de escisión de BglI en el promotor de CMV, un cebador pCMV-1 recogido en SEQ ID N°: 8 y un cebador pPec1R recogido en SEQ ID N°: 13 se amplificaron mediante PCR con pGIPEc descrito en la publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) n° 2001-000188 en calidad de molde para obtener un fragmento de 293 pb. Con pBK-CMV (Stratagene Corp.) en calidad de molde, un cebador pCMV-o1 recogido en SEQ ID N°: 14 y un cebador pCMV-R1 recogido en SEQ ID N°: 15 se utilizaron en la amplificación por PCR para obtener un fragmento de 341 pb. Con estos dos fragmentos en calidad de molde, un cebador pCMV-1 recogido en SEQ ID N°: 8 y un cebador pCMV-R1 recogido en SEQ ID N°: 15 se utilizaron en la amplificación por PCR para obtener un fragmento de 604 pb. Un fragmento de 589 pb, obtenido al digerir este fragmento de 604 pb con PstI y XbaI, y un fragmento de 2765 pb, obtenido al digerir pGIPEc descrito en la publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) n° 2001-000188 con PstI y XbaI se ligaron para construir pGICMV (-).

35 Un fragmento de 2137 pb, obtenido al digerir este pGICMV (-) con BamHI y XhoI y un fragmento de 4054 pb, obtenido al digerir el pGIBAcgBpA anterior con BamHI y XhoI se ligaron para construir pCMV-ILgB. Al insertar un fragmento de 3338 pb, obtenido al digerir este pCMV-ILgB con BglI en el sitio Sfil de pNZ45 /46RSVlac-T, se construyó un vector de homología p45/46CMVILgBlac, que tenía CMV-IE en calidad de promotor.

40 Un fragmento de 2103 pb, obtenido al digerir pGIPEc descrito en la publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) 2001-000188 con BamHI y XhoI y un fragmento de 4054 pb, obtenido al digerir el pGIBAcgBpA anterior con BamHI y XhoI se ligaron para construir pGIPEcILgB2.

45 Al insertar un fragmento de 3504 pb, obtenido al digerir este pGIPEcILgB2 con BglI en el sitio Sfil de pNZ45 /46RSVlac-T descrito en la publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) n° 11-192093 (documento EP 1026246) se construyó un vector de homología p45 /46PecILgBlac que tenía el promotor Pec en calidad de promotor.

50 De manera similar, al insertar un fragmento de 3504 pb, obtenido al digerir este pGIPEcILgB2 anterior con BglI en el sitio Sfil de pNZ45/46Sfi descrito en la publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) n° 11-192093 (documento EP 1026246) se construyó un vector de homología p45/46PecILgB que tenía el promotor Pec en calidad de promotor.

55 Ejemplo 2. Construcción y purificación de un HVT recombinante con un gen gB de ILTV de longitud completa

Utilizando los cuatro vectores de homología (p45/46HCMVlacBacgB2nd, p45/46CMVILgBlac, p45/46PecILgBlac, p45/46PecILgB) construidos en el Ejemplo 1, se construyó y purificó un HVT recombinante.

60 Específicamente, se llevó a cabo el siguiente proceso.

Primeramente, el ADN de HVT se recogió de acuerdo con el método de Morgan et al. (Avian Dis., Vol. 34, 345-351, 1990). Así, aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFP de HVT, la cepa FC126 (ATTCC VR-584B) o la cepa FC126 (la cepa original proporcionada por el Dr. Witter) se infectó hasta aproximadamente  $3 \times 10^7$  CEF y, después de cultivar durante 2-3 días, se añadieron a ello 4 ml del tampón de lisis (SDS al 0,5%, Tris 10 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, 200  $\mu\text{g/ml}$  de proteinasa K), y se incubó a 37°C durante 4 horas, seguido de extracción con fenol y precipitación en etanol para recoger ADN de HVT.

Los vectores de homología se escindieron con enzimas de restricción en regiones que no contenían sitios homólogos ni genes extraños y linearizados.

Aproximadamente  $3 \times 10^6$  CEF recogidos con tripsina se suspendieron en solución salina G (NaCl 0,14 M, KCl 0,2 mM, hidrogeno-fosfato disódico 1,1 mM, fosfato potásico monobásico 1,5 mM, cloruro de magnesio hexahidrato 0,5 mM, glucosa al 0,011%), 10-30  $\mu\text{g}$  del ADN de HVT anterior y 10-30  $\mu\text{g}$  de un vector de homología linearizado para la recombinación electroporaron cada uno utilizando el pulsador de genes (fabricado por Bio-Rad Inc.) bajo la condición de  $0,5 \text{ KVcm}^{-1}$  y 0,4 ms. La suspensión de células se extendió en una placa de cultivo con un diámetro de 6 cm y, después de añadir un medio de cultivo, se cultivó durante 5-7 días. Después del cultivo, el virus que contenía el HVT recombinante se recogió del líquido de cultivo. Después, se llevó a cabo la dilución limitante para purificar HVT recombinante.

El método específico de purificación era como sigue:

Para el vector de homología p45/46PecLgB que no contenía gen lacZ, aproximadamente  $2 \times 10^8$  CEF junto con la disolución de virus diluida en serie se extendieron en placas de 96 pocillos. Después de cultivar durante 3-5 días, aparecieron halos y se preparó una réplica. Una de las placas se sometió a rastreo de acuerdo con el ensayo de placa negra (BPA) como sigue:

Antisuero (antisuero anti-ILTV-gB), obtenido al inmunizar un conejo con la proteína de ILTV-gB expresada en Escherichia coli, diluido aproximadamente 500 veces en un tampón fosfato de Dulbecco (fabricado por Dainippon Seiyaku Co., Ltd.; al que se alude aquí en lo que sigue como PBS (-)) que no contenía magnesio se hizo reaccionar para formar halos a 22-25°C durante 2 horas. Después de lavar con leche en polvo sin grasa al 3% en PBS (-) tres veces, se hizo reaccionar para formar halos a 22-25°C durante 2 horas con anticuerpo anti-conejo biotinilado (oveja, Biosource Inc.). El anticuerpo después de la reacción se lavó en PBS (-) y luego se hizo reaccionar para formar un complejo de avidina-biotina-fosfatasa alcalina (Vector laboratories). Después de aclarar el complejo de avidina-biotina-fosfatasa alcalina que no había reaccionado con PBS (-), se dejó que el color cambiara de azul oscuro a negro utilizando BCIP/NBT (fabricado por Roche), un sustrato para fosfatasa alcalina.

En el método BPA, el virus suspendido, correspondiente a los halos positivos así generados, se infecta de nuevo con CEF, y este proceso se repite durante 3-4 veces hasta que todas las placas se vuelven positivas con BPA y, habitualmente, se completa la purificación y construcción de HVT recombinante.

Sin embargo, para el HVT recombinante que tiene p45/46PecLgB integrado, no se pudo obtener HVT recombinante que se purificó hasta el 100%.

La construcción de HVT recombinante utilizando los vectores de homología p45/46HCMVlacBacgB2nd, p45/46CMVILgBlac y p45/46PecLgBlac que contenía lacZ se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente proceso.

Así, aproximadamente  $2 \times 10^6$  CEF junto con las disoluciones de virus diluidas en serie se extendieron en multiplacas de 96 pocillos. Después de cultivar durante 3-5 días, aparecieron halos, y se preparó una réplica. A una de las placas se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de cada uno de 100  $\mu\text{g/ml}$  de Bluo -gal (fabricado por Gibco), un sustrato cromogénico para  $\beta$ -galactosidasa, y se incubó a 37°C durante 4 horas. Dado que los halos que expresaban lacZ se volvían azules, las células se recogieron de estos pocillos en otra placa correspondiente a pocillos que contenían halos de color azul para hacerles una disolución de virus. Esta disolución de virus se extendió junto con aproximadamente  $2 \times 10^6$  CEF en una multiplaca de 96 pocillos de fondo plano para el cultivo. Una etapa de subcultivo a partir de una multiplaca de 96 pocillos de fondo plano para el cultivo a una multiplaca de 96 pocillos de fondo plano para el cultivo se consideró que era una etapa de rastreo. El rastreo se repitió hasta que todos los pocillos tenían halos azules, y la purificación se llevó a cabo hasta que todos los halos se volvieron azules (de manera usual, aproximadamente 5-10 veces de rastreo) cuando se añadió Bluo-gal.

Como resultado, solamente un clon de HVT recombinante se purificó con éxito a partir del vector de homología



p45/46PecILgBlac, y éste se denominó FW050.

Cuando se utilizó p45/46HCMVlacBacgB2nd o p45/46CMVILgBlac, no se obtuvo HVT recombinante 100% purificado.

Ejemplo 3. La estructura y el efecto de vacuna de FW050 de HVT recombinante

FW050, un HVT recombinante obtenido en el Ejemplo 2, se secuenció directamente. El resultado reveló que FW050 tiene una delección de 1542 pb que contenía la señal poliA y, en su lugar habían sido emparejadas tres bases (GCG) de origen desconocido (SEQ ID N°: 22). Como resultado, se predijo que expresara una proteína quimera que consistía en 469 aminoácidos que comprende 429 aminoácidos en el extremo amino terminal del ORF (marco de lectura abierto) del gen gB de ILTV original y 40 aminoácidos que eran ahora codificados por la porción de la señal poliA hasta que aparece el codón de terminación (véase la Fig. 1 y la SEQ ID N°: 1).

Este FW050 se sometió a un experimento con animales para examinar el efecto de vacuna y se obtuvo el resultado mostrado en la Tabla 1.

El experimento con animales se llevó a cabo de acuerdo con las provisiones (9CFR) en el Servicio de Inspección de Salud Animal y Vegetal (APHIS) por parte del Departamento de Agricultura de los EE.UU.

El enfrentamiento de un ILTV muy tóxico se llevó a cabo utilizando un método descrito en 9CFR Cap. 1 113.328. Así, un HVT recombinante se inoculó a más de 10 pollos SPF por grupo (línea M: Nippon Institute for Biological Science) (en el Experimento 1 solo, el número de pollos inoculados para FW050 era 9 debido a la muerte accidental de un animal después de la inoculación). El grupo control negativo (control) no recibió inoculación alguna.

Cuando los pollos SPF de ensayo incubaban, HVT recombinante se inoculó por vía subcutánea en el dorso de los pollos a razón de  $1 \times 10^4$  UFP utilizando una aguja de 26G. A animales de 4 semanas de edad se inoculó para enfrentamiento un ILTV muy virulento (la cepa NS-175,  $1 \times 10^{3.0}$  EID<sub>50</sub>/0,1 ml) a la muesca infraorbital. Durante diez días después de la inoculación, los síntomas clínicos se observaron diariamente y se determinó la presencia o ausencia de la prevención de la infección.

El resultado se muestra en la Tabla 1.

Como se puede observar por la Tabla 1, se reconoció para FW050 un efecto protector contra la cepa de ILTV muy virulenta.

Tabla 1

	HVT recombinante	Vector de homología	Tasa de protección % (n° de pollos protegidos/total de n° de pollos)	
			Experimento 1	Experimento 2
Control			0 (0/10)	0 (0/16)
Enfrentamiento	FW050	P45/46PecILgBlac	78 (7/9)	31 (4/13)

Ejemplo 4. Construcción de un recombinante con un fragmento en el que el gen gB de ILTV estaba truncado

Un vector de homología que tenía un producto de gen gB mutante, en el que parte del ORF del gen gB de ILTV estaba suprimida, se construyó como sigue:

(1) Un vector de homología que contiene ADN que codifica gB-a de 623 aminoácidos a partir del terminal amino que es el ORF del gen gB de ILTV y que no es probable que contenga una región formadora de dímeros: p45/46PecILgBa y p45/46PecILgBalac.

Utilizando pGIPecILgB2 construido en el Ejemplo 1 como molde, se amplificó un fragmento de 1205 pb mediante la PCR estándar antes mencionada utilizando un cebador P-BglTI recogido en SEQ ID N°: 16 y un cebador A-R recogido en SEQ ID N°: 17. Un fragmento de 1198 pb, obtenido al digerir esto con BglII y KpnI y un fragmento de 7057 pb, obtenido al digerir p45/46PecILgB construido en el Ejemplo 1 con BglII y KpnI, se ligaron para construir un vector de homología p45/46PecILgBa.

Un fragmento de 6373 pb, obtenido al digerir p45/46PecILgBa con BglII y XhoI y un fragmento de 5923 pb, obtenido

al digerir p45/46PecIlgBlac construido en el Ejemplo 1 con BgIII y XhoI se ligaron para construir un vector de homología p45/46PecIlgBalac.

(2) Un vector de homología que contiene ADN que codifica gB-b de 691 aminoácidos en el que el terminal carboxi ha sido suprimido hasta inmediatamente antes del dominio de transmembrana: p45/46PecIlgBb y p45/46PecIlgBblac.

Utilizando pGIPecIlgB2 construido en el Ejemplo 1 como molde, un fragmento de 1409 pb se amplificó por la PCR estándar antes mencionada utilizando un cebador P-BgIII recogido en SEQ ID N°: 16 y un cebador B-R recogido en SEQ ID N°: 18. Un fragmento de 1402 pb, obtenido al digerir esto con BgIII y KpnI y un fragmento de 7057 pb, obtenido al digerir p45/46PecIlgB construido en el Ejemplo 1 con BgIII y KpnI se ligaron para construir un vector de homología p45/46PecIlgBb.

Un fragmento de 6577 pb, obtenido al digerir p45/46PecIlgBb con BgIII y XhoI y un fragmento de 5923 pb, obtenido al digerir p45/46PecIlgBlac construido en el Ejemplo 1 con BgIII y XhoI se ligaron para construir un vector de homología p45/46PecIlgBblac.

(3) Un vector de homología que contiene ADN que codifica gB-c de 803 aminoácidos en el que el dominio de transmembrana solo ha sido suprimido: p45/46PecIlgBc y p45/46PecIlgBclac.

Utilizando pGIPecIlgB2 construido en el Ejemplo 1 como molde, un fragmento de 1409 pb se amplificó por la PCR estándar antes mencionada utilizando un cebador P-BgIII recogido en SEQ ID N°: 16 y un cebador C-R recogido en SEQ ID N°: 19. De manera similar, utilizando pGIPecIlgB2 como molde, un fragmento de 357 pb se amplificó mediante la PCR estándar utilizando un cebador C-F recogido en SEQ ID N°: 20 y un cebador CDE-R recogido en SEQ ID N°: 21. Utilizando dos fragmentos del fragmento de 1409 pb y el fragmento de 357 pb como molde un fragmento de 1745 pb se amplificó mediante la PCR estándar utilizando un cebador P-BgIII recogido en SEQ ID N°: 16 y un cebador CDE-R recogido en SEQ ID N°: 21. Un fragmento de 1738 pb, obtenido al digerir esto con BgIII y KpnI y un fragmento de 7057 pb, obtenido al digerir p45/46PecIlgB construido en el Ejemplo 1 con BgIII y KpnI se ligaron para construir un vector de homología p45/46PecIlgBc.

Un fragmento de 6913 pb, obtenido al digerir p45/46PecIlgBc con BgIII y XhoI y un fragmento de 5923 pb, obtenido al digerir p45/46PecIlgBlac construido en el Ejemplo 1 con BgIII y XhoI se ligaron para construir un vector de homología p45/46PecIlgBclac.

Los diagramas esquemáticos de estos vectores de homología se muestran en la Fig. 2.

Utilizando estos seis vectores de homología, así contruidos, se intentó la purificación de HVT recombinante de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 2, pero no se podían obtener recombinantes con la misma estructura que los vectores de homología.

Así, a pesar de que se construyeron una pluralidad de vectores de homología que estaban truncados desde el terminal carboxi de la proteína gB subsiguiente al promotor para purificar y construir HVT recombinante, no se obtenían recombinantes que tuvieran la misma longitud del gen gB de ILTV que los vectores de homología. Este resultado demostró que cuando el gen gB integrado junto con el promotor había de ser expresado en HVT recombinante, no se podían purificar aquellos que tuvieran un ORF largo. También, incluso si se pudiera purificar HVT recombinante, se pensó que el ORF del gen gB en el HVT recombinante obtenido se convierte en reducido debido a la presión de selección. Así, se predijo que cuando el gen gB está integrado junto con el promotor, la longitud del gen gB del ORF de ILTV que puede estar presente en forma de un HVT recombinante estable es aproximadamente del tamaño de los que codifican 623 aminoácidos o menos.

Ejemplo 5. Se invirtió la modificación a partir del clon suprimido de FW050 y el efecto vacuna del HVT recombinante

A partir del HVT recombinante FW050, para el que se confirmó el efecto de vacuna en el Ejemplo 3 y que se espera que exprese una proteína de fusión de los 429 aminoácidos a partir del extremo amino terminal de la proteína gB de ILTV y los 40 aminoácidos derivados de poliA, se construyó un vector de homología p45/46CMVILgBf con el fin de expresar una proteína en la que se han suprimido 40 aminoácidos derivados de poliA de la proteína a expresar.

Específicamente, un fragmento de 303 pb, obtenido al digerir pGIBacpA descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada (Kokai) n° 2004-000111 con EcoRI y KpnI y un fragmento de 5854 pb, obtenido al digerir pGIPecIlgB2 construido en el Ejemplo 1 con EcoRI y KpnI se ligaron para construir pGIPecIlgB3. Un fragmento de 2245 pb,

obtenido al digerir este pGI $\text{PecI}$ LgB3 con BgIII y SfiI y un fragmento de 6759 pb, obtenido al digerir p45/46 $\text{PecI}$ LgB con BgIII y SfiI se ligaron para construir p45/46 $\text{PecI}$ LgB2.

5 Entonces, utilizando p45/46 $\text{PecI}$ LgB2 como molde, P-BgIII recogido en SEQ ID N°: 16 y F-R recogido en SEQ ID N°: 23 se sometieron a PCR para obtener un fragmento de 623 pb. Un fragmento de 616 pb, obtenido al digerir esto con BgIII y KpnI, y un fragmento de 7057 pb, obtenido al digerir p45/46 $\text{PecI}$ LgB2 con BgIII y KpnI, se ligaron para construir p45/46 $\text{PecI}$ LgBf.

10 Un fragmento de 7102 pb, obtenido por digestión completa de este p45/46 $\text{PecI}$ LgBf con XbaI, seguido de digestión parcial con PstI, y un fragmento de 589 pb, obtenido al digerir pGICMV (-) construido en el Ejemplo 1, con PstI y XbaI se ligaron para completar la construcción de un vector de homología p45/46CMVILgBf.

15 Utilizando este vector de homología p45/46CMVILgBf, se construyó y purificó FW063, un HVT recombinante. Se confirmó que la porción de gen insertada del HVT recombinante, FW063, era la misma que la secuencia base del vector de homología y no había sido mutada.

Además de ello, al clonar inversamente FW050, se construyó un vector de homología p45/46 $\text{PecI}$ LgBdellac en el siguiente proceso.

20 El molde utilizado en la PCR para esta clonación es un ADN viral recogido de un pollo que se inoculó con FW050, y el cebador consistía en dos cebadores de P-BgIII recogidos en SEQ ID N°: 16 y 45/46F(K) recogido en SEQ ID N°: 24, y el vector de homología p45/46 $\text{PecI}$ LgBdellac se construyó ligando un fragmento de 707 pb, obtenido al digerir con BgIII y SfiI, un fragmento de 944 pb, obtenido mediante la amplificación con los dos cebadores y un fragmento de 10809 pb, obtenido al digerir p45/46 $\text{PecI}$ LgBdellac con BgIII y SfiI. Utilizando este vector de homología p45/46 $\text{PecI}$ LgBdellac, el HVT recombinante FW069 se purificó y construyó con éxito.

25 De la misma manera que antes, sin cambiar la porción poliA en absoluto, un vector de homología p45/46 $\text{PecI}$ LgBdellac+STP, en el que la terminación se insertó en un sitio en el que terminaba el ORF de 429 aminoácidos en el extremo amino terminal de la proteína gB en el siguiente proceso.

30 Primero, utilizando como molde un fragmento de 637 pb, amplificado al utilizar un cebador P-BgIII recogido en SEQ ID N°: 16 y un cebador gBdelSTP-R recogido en SEQ ID N°: 25 y fragmento de 673 pb, amplificado utilizando un cebador gBdelSTP-F recogido en SEQ ID N°: 26 y un cebador 45/46F(B) recogido en SEQ ID N°: 27, la PCR se llevó a cabo con el cebador P-BgIII y el cebador 45/46F(B) para obtener un fragmento de 1263 pb. Después, un fragmento de 707 pb, obtenido al digerir esto con BgIII y SfiI y un fragmento de 10809 pb, obtenido al digerir p45/46 $\text{PecI}$ LgBlac con BgIII y SfiI se ligaron para construir un vector de homología p45/46 $\text{PecI}$ LgBdellac+STP.

35 Utilizando este vector de homología p45/46 $\text{PecI}$ LgBdellac+STP, se purificó y construyó con éxito un HVT recombinante, FW070.

40 Así, FW063, FW069 y FW070, en los que el ORF del gen gB es de 429 aminoácidos como en FW050 descrito en el Ejemplo 3, se podían fácilmente purificar. Esto demostró que, cuando el ADN derivado del gen gB que codifica los 429 aminoácidos en el extremo amino terminal de la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID N°: 2 se ha de expresar en un HVT recombinante que lo tenía integrado junto con el promotor, se puede llevar a cabo la purificación.

45 Utilizando el HVT recombinante, así purificado, FW063, FW069 y FW070 purificados en el Ejemplo 3, se llevó a cabo un test de enfrentamiento como en el Ejemplo 3 para investigar el efecto vacuna. El resultado se muestra en la Tabla 2.

50

Tabla 2

	HVT recombinante	Vector de homología	Tasa de protección % (n° de pollos protegidos/total de n° de pollos)
Control			0 (0/7)
Enfrentamiento	FW050	p45/46PecLgBlac	54 (7/13)
Enfrentamiento	FW063	p45/46CMVILgBf	33 (5/15)
Enfrentamiento	FW069	p45/46PecLgBdellac	56 (9/16)

5 A partir del resultado, se puede observar que el efecto vacuna también se puede reconocer para FW063 que no tiene secuencia aditiva, y FW069 y FW050 que tienen la secuencia aditiva exhiben un mejor efecto vacuna.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 5 <110> Zeon Corp.
- <120> Virus herpes recombinante y uso del mismo
- <130> P852
- 10 <160> 27
- <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- 15 <211> 469
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 20 <223> virus de la laringotraqueitis infecciosa y ORF artificial
- <400> 1

```

Met Ala Ser Leu Lys Met Leu Ile Cys Val Cys Val Ala Ile Leu Ile
1           5           10           15
Pro Ser Thr Leu Ser Gln Asp Ser His Gly Ile Ala Gly Ile Ile Asp
           20           25           30
Pro Arg Asp Thr Ala Ser Met Asp Val Gly Lys Ile Ser Phe Ser Glu
           35           40           45
Ala Ile Gly Ser Gly Ala Pro Lys Glu Pro Gln Ile Arg Asn Arg Ile
50           55           60
Phe Ala Cys Ser Ser Pro Thr Gly Ala Ser Val Ala Arg Leu Ala Gln
65           70           75           80
Pro Arg His Cys His Arg His Ala Asp Ser Thr Asn Met Thr Glu Gly
           85           90           95
Ile Ala Val Val Phe Lys Gln Asn Ile Ala Pro Tyr Val Phe Asn Val
           100          105          110
Thr Leu Tyr Tyr Lys His Ile Thr Thr Val Thr Thr Trp Ala Leu Phe
           115          120          125
Ser Arg Pro Gln Ile Thr Asn Glu Tyr Val Thr Arg Val Pro Ile Asp
           130          135          140
Tyr His Glu Ile Val Arg Ile Asp Arg Ser Gly Glu Cys Ser Ser Lys
145          150          155          160
Ala Thr Tyr His Lys Asn Phe Met Phe Phe Glu Ala Tyr Asp Asn Asp
           165          170          175
Glu Arg Glu Lys Lys Leu Pro Leu Val Pro Ser Leu Leu Arg Ser Thr

```



<213> virus de la laringotraqueitis infecciosa

<400> 2

```

Met Ala Ser Leu Lys Met Leu Ile Cys Val Cys Val Ala Ile Leu Ile
1           5           10           15
Pro Ser Thr Leu Ser Gln Asp Ser His Gly Ile Ala Gly Ile Ile Asp
           20           25           30
Pro Arg Asp Thr Ala Ser Met Asp Val Gly Lys Ile Ser Phe Ser Glu
           35           40           45
Ala Ile Gly Ser Gly Ala Pro Lys Glu Pro Gln Ile Arg Asn Arg Ile
           50           55           60
Phe Ala Cys Ser Ser Pro Thr Gly Ala Ser Val Ala Arg Leu Ala Gln
65           70           75           80
Pro Arg His Cys His Arg His Ala Asp Ser Thr Asn Met Thr Glu Gly
           85           90           95
Ile Ala Val Val Phe Lys Gln Asn Ile Ala Pro Tyr Val Phe Asn Val
           100          105          110
Thr Leu Tyr Tyr Lys His Ile Thr Thr Val Thr Thr Trp Ala Leu Phe
           115          120          125
Ser Arg Pro Gln Ile Thr Asn Glu Tyr Val Thr Arg Val Pro Ile Asp
           130          135          140
Tyr His Glu Ile Val Arg Ile Asp Arg Ser Gly Glu Cys Ser Ser Lys
145          150          155          160
Ala Thr Tyr His Lys Asn Phe Met Phe Phe Glu Ala Tyr Asp Asn Asp
           165          170          175
Glu Arg Glu Lys Lys Leu Pro Leu Val Pro Ser Leu Leu Arg Ser Thr
           180          185          190
Val Ser Lys Ala Phe His Thr Thr Asn Phe Thr Lys Arg His Gln Thr
           195          200          205
Leu Gly Tyr Arg Thr Ser Thr Ser Val Asp Cys Val Val Glu Tyr Leu
           210          215          220
Gln Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Tyr Phe Gly Met Ala Thr Gly
225          230          235          240

```

Asp Thr Val Glu Ile Ser Pro Phe Tyr Thr Lys Asn Thr Thr Gly Pro  
 245 250 255  
 Arg Arg His Ser Val Tyr Arg Asp Tyr Arg Phe Leu Glu Ile Ala Asn  
 260 265 270  
 Tyr Gln Val Arg Asp Leu Glu Thr Gly Gln Ile Arg Pro Pro Lys Lys  
 275 280 285  
 Arg Asn Phe Leu Thr Asp Glu Gln Phe Thr Ile Gly Trp Asp Ala Met  
 290 295 300  
 Glu Glu Lys Glu Ser Val Cys Thr Leu Ser Lys Trp Ile Glu Val Pro  
 305 310 315 320  
 Glu Ala Val Arg Val Ser Tyr Lys Asn Ser Tyr His Phe Ser Leu Lys  
 325 330 335  
 Asp Met Thr Met Thr Phe Ser Ser Gly Lys Gln Pro Phe Asn Ile Ser  
 340 345 350  
 Arg Leu His Leu Ala Glu Cys Val Pro Thr Ile Ala Ser Glu Ala Ile  
 355 360 365  
 Asp Gly Ile Phe Ala Arg Lys Tyr Ser Ser Thr His Val Arg Ser Gly  
 370 375 380  
 Asp Ile Glu Tyr Tyr Leu Gly Ser Gly Gly Phe Leu Ile Ala Phe Gln  
 385 390 395 400  
 Lys Leu Met Ser His Gly Leu Ala Glu Met Tyr Leu Glu Glu Ala Gln  
 405 410 415  
 Arg Gln Asn His Leu Pro Arg Gly Arg Glu Arg Arg Gln  
 420 425

<210> 3  
 <211> 1287  
 <212> DNA  
 <213> virus de la laringotraqueitis infecciosa

5

<400> 3  
 atggctagct tgaaaatgct gatctgctg tgcgtggcaa tctgatccc atctacccta 60  
 tctcaagatt cacacggaat tgccggaata atagaccctc gtgatacagc cagcatggat 120  
 gttggaaaaa tctctttctc cgaagccatt gggctcggggg caccgaaaga accccagatt 180  
 agaaaacagaa tttttgctg ctcatctcca actggcgcca gtgttgcgag gcttgcccag 240  
 ccacgacatt gtcaccgaca tgccgattcg actaacatga ctgaaggaat tgccgtagtc 300  
 ttcaagcaaa acattgcccc gtacgtcttt aatgtgactc tatactataa acatataacc 360  
 acagttacta cgtgggcatt attctcaaga ccccaataa caaatgagta cgtgaccagg 420



```

gttccaatag actatcatga aattgtcagg attgatcgat cgggagaatg ctcatccaaa 480
gcaacgtatc ataaaaattt catgtttttt gaagcittacg acaatgatga acgagaaaaa 540
aaattgcccc tggttccatc actgttaaga tcaactgtct ccaaggcggt tcatacaact 600
aactttacta agcgacatca aaccctggga taccgaacgt ctacatcggt cgactgtggt 660
gtggaatatc tacaggctag atctgtatac ccgtatgatt actttggaat ggcgacaggt 720
gatacagtag aaatttctcc cttttatacc aaaaacacga cggaccaag gcgtcacagt 780
gtctacagag actatagatt tctcgaaatc gcaaattatc aagtcaggga ttggaaacc 840
ggacaaataa gaccccctaa aaaaagaaac tttctaacag atgaacaatt cactataggc 900
tgggatgcaa tggagaaaaa ggaatctgta tgtactctca gtaaattgat tgaagtcccg 960
gaagcagttc gtgtttcgta caaaaacagt taccactttt cacttaaaga tatgactatg 1020
acgttctcgt ccggaaaaca accttttaac atcagcagge ttcatttggc tgaatgcgtt 1080
cctaccatag cttcggagge catagatggc atctttgcca gaaagtatag ttcgactcat 1140
gtccgttctg gggacatcga atactatctc ggtagtggcg gatttctgat cgcatttcag 1200
aaactcatga gccatggctt ggctgaaatg tacctagaag aggcacaaaag acaaaatcat 1260
ctcccagagag ggagagagcg tcgccaa 1287

```

5 <210> 4  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> señal de pA de SV40

```

<400> 4
  Gly Asp Leu Tyr Lys Cys Gly Met Ala Asp Tyr Asp His Glu Gln Thr
  1           5           10           15
  Val Arg Thr Glu Gly Pro Glu Met Ser Leu Gly Thr Val Asn Arg Pro
           20           25           30
  Ile Arg Pro Ile Tyr Ser Ser His
           35           40

```

15 <210> 5  
 <211> 120  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> señal de pA de SV40

```

<400> 5
  ggcgacctct acaaatgtgg tatggctgat tatgatcatg aacagactgt gaggactgag 60
25  gggcctgaaa tgagccttgg gactgtgaat cggccaataa ggcctatta ctcatcgcat 120

```

<210> 6  
 <211> 18

<212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Sintético  
 <400> 6  
 tgtaaacga cggccagt 18  
 <210> 7  
 <211> 29  
 10 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
 15 <400> 7  
 ttcggtaccg gttattatta tttttgac 29  
 <210> 8  
 <211> 30  
 20 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
 25 <400> 8  
 gggctgcaga gttattaata gtaatcaatt 30  
 <210> 9  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 30  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
 35 <400> 9  
 gcactcggat ccattgacat ggctagc 27  
 40 <210> 10  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Sintético  
  
 <400> 10  
 50 agatgccatc tatggcctcc gaagctatgg 30  
 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Sintético  
  
 <400> 11  
 60 tggctgaatg cgttcctacc atagcttcgg 30

5 <210> 12  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
  
 10 <400> 12  
 cgggtacctt attcgtcttc gctttcttc 29  
  
 <210> 13  
 <211> 30  
 15 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
 20  
 <400> 13  
 gccaggcgcg ccattaccg tcattgacgt 30  
  
 <210> 14  
 <211> 30  
 25 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
 30  
 <400> 14  
 acgtcaatga cggtaaattg cgcgcctggc 30  
  
 <210> 15  
 <211> 30  
 35 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
 40  
 <400> 15  
 45 cgtctagagg atctgacggt tcactaaacc 30  
  
 <210> 16  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Sintético  
  
 <400> 16  
 55 ggctagatct gtatacccgt atgattact 30  
  
 <210> 17  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 60 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sintético

5 <400> 17  
 cggtagccta ttgtctaaca aatgtatagt 30

<210> 18  
 <211> 30  
 10 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sintético

15 <400> 18  
 cggtagccta atctccacgt attacagtgt 30

<210> 19  
 <211> 30  
 20 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sintético

25 <400> 19  
 ttacatatt atctccacgt attacagtgt 30

<210> 20  
 <211> 30  
 30 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 20  
 40 acgtggagat aaatatgtaa tgaacctgaa 30

<210> 21  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Sintético

<400> 21  
 50 cggtagccta ttcgtctcg ctttctctg 30

<210> 22  
 <211> 1410  
 <212> DNA  
 55 <213> virus herpes recombinante de pavo

<400> 22

ES 2 369 142 T3

atggctagct tgaaaatgct gatctgctg tgctgtggcaa tectgatccc atctacccta 60  
 tctcaagatt cacacggaat tgccggaata atagaccctc gtgatacagc cagcatggat 120  
 gttggaaaaa tcicitttctc cgaagccatt gggctcggggg caccgaaaga accccagatt 180  
 agaaacagaa tttttgctg ctcactctcca actggcgcca gtgttgcgag gcttgcccag 240  
 ccacgacatt gtcaccgaca tgccgattcg actaacatga ctgaaggaat tgccgtagtc 300  
 ttcaagcaaa acattgcccc gtacgtcttt aatgtgactc tatactataa acatataacc 360  
 acagttacta cgtgggcatt attctcaaga ccccaataa caaatgagta cgtgaccagg 420  
 gttccaatag actatcatga aatgtcagg attgatgat cgggagaatg ctcatccaaa 480  
 gcaacgtatc ataaaaattt catgtttttt gaagcttacg acaatgatga acgagaaaaa 540  
 aaattgcccc tggttccatc actgttaaga tcaactgtct ccaaggcgtt tcatacaact 600  
  
 aactttacta agcgacatca aaccctggga taccgaacgt ctacatcggg cgactgtggt 660  
 gtggaatatac tacaggctag atctgtatac ccgatgatt actttggaat ggcgacagg 720  
 gatacagtag aaatttctcc cttttatacc aaaaacacga ccggaccaag gcgtcacagt 780  
 gtctacagag actatagatt tctcgaaatc gcaaatatc aagtcaggga tttggaacc 840  
 ggacaaataa gacccccata aaaaagaaac tttctaacag atgaacaatt cactataggc 900  
 tgggatgcaa tggaaagaaaa ggaatctgta tgtactctca gtaaatggat tgaagtccc 960  
 gaagcagttc gtgtttcgta caaaaacagt taccactttt cacttaaaga tatgactatg 1020  
 acgttctcgt ccggaaaaca accttttaac atcagcaggc ttcatttggc tgaatgcgtt 1080  
 cctaccatag cttcggaggc catagatggc atctttgcca gaaagtatag ttcgactcat 1140  
 gtccgttctg gggacatcga atactatctc ggtagtggcg gatttctgat cgcatttcag 1200  
 aaactcatga gccatggctt ggctgaaatg tacctagaag aggacaaaag acaaaatcat 1260  
 ctcccagag ggagagagcg tcgccaaggc gacctctaca aatgtggat ggctgattat 1320  
 gatcatgaac agactgtgag gactgagggg cctgaaatga gccttgggac tgtgaatcgg 1380  
 ccaataaggc ctatttactc atcgcattag 1410

5 <210> 23  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Sintético

<400> 23  
 cggtaccta ttggcgacgc tctctccctc 30

15 <210> 24  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Sintético

25 <400> 24  
 gggaagtct tccggtaag ggac 24

# ES 2 369 142 T3

5 <210> 25  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Sintético

10 <400> 25  
cataccacat ttgtagaggt cctattggcg 30

<210> 26  
<211> 30  
15 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Sintético

20 <400> 26  
cgagaggag agagcgtcgc caataggacc 30

<210> 27  
<211> 24  
25 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
30 <223> Sintético

<400> 27  
tagcggcacg gaaacagata gaga 24

35

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un virus herpes recombinante, excluyendo el virus de la laringotraqueitis infecciosa, que tiene un ADN que codifica un polipéptido parcial que consiste en 429 aminoácidos en el extremo amino terminal de la proteína gB codificada por el gen gB de un virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV), en el que puede estar suprimido, añadido o sustituido un aminoácido del polipéptido parcial.
- 10 2.- El virus herpes recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, excluyendo el virus de la laringotraqueitis infecciosa, en el que puede estar suprimido, añadido o sustituido un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID N°: 4, está enlazada en un marco con el extremo 3' del ADN que codifica un polipéptido parcial que consiste en 429 aminoácidos en el extremo amino terminal de la proteína gB codificada por el gen gB de un virus de la laringotraqueitis infecciosa, en el que puede estar suprimido, añadido o sustituido un aminoácido del polipéptido parcial.
- 15 3.- El virus herpes recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en donde el virus herpes es un virus herpes que infesta aves.
- 20 4.- El virus herpes recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, en el que un virus herpes es un virus tipo 1, 2 ó 3 de la enfermedad de Marek.
- 5.- Una vacuna contra el virus de la laringotraqueitis infecciosa, que comprende en calidad de ingrediente activo un virus herpes recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 6.- La vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, para tratar virus herpes en un ave.
- 7.- La vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el virus herpes es el virus de la laringotraqueitis.

Fig.1

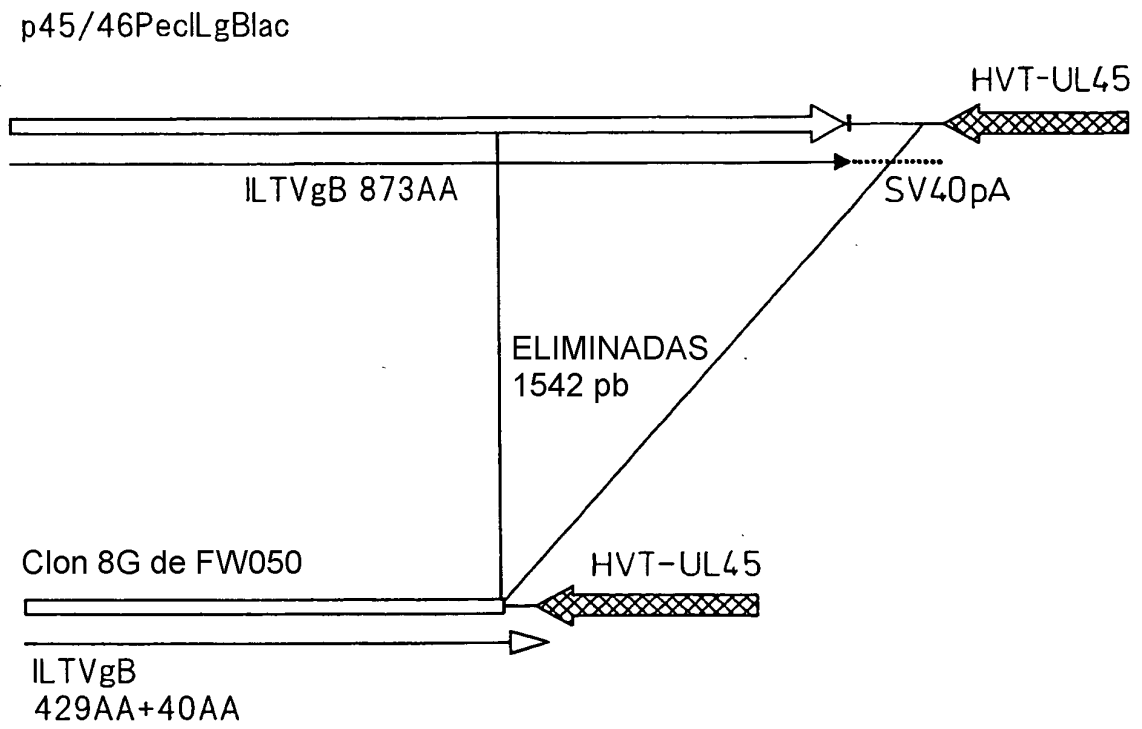




Fig.2

