

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 845**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2008 E 08727197 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2129390**

54 Título: **Herpesvirus de pavo vectorial recombinante que contiene genes de la influenza aviar**

30 Prioridad:

30.03.2007 US 729978

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

03.04.2013

73 Titular/es:

**CEVA SANTE ANIMALE SA (100.0%)
10, avenue de la Ballastière
33501 Libourne Cedex , FR**

72 Inventor/es:

**DORSEY, KRISTI, M.;
JENSEN, LAUREN, ELIZABETH y
ESAKI, MOTOYUKI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 399 845 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

Herpesvirus de pavo vectorial recombinante que contiene genes de la influenza aviar.

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a vacunas aviares contra la influenza aviar (AI). Más específicamente, la presente invención proporciona un herpesvirus de pavo recombinante modificado por la presencia del ADNc que codifica la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la influenza aviar bajo un promotor.

2. Descripción de la técnica relacionada

10 La influenza aviar es causada por los virus de la influenza aviar que se clasifican en la familia Orthomyxoviridae, género Influenzavirus A. El genoma del virus de la influenza aviar consta de ocho segmentos de ARN de cadena sencilla, de sentido negativo. El genoma viral codifica diez proteínas, de las cuales ocho proteínas son proteínas estructurales, incluyendo la HA y la neuraminidasa (NA), y dos proteínas no son estructurales. Los virus de influenza A se dividen en subtipos sobre la base de la antigenicidad de las proteínas HA y NA. Hay 16 antígenos HA y nueve antígenos NA reconocidos. Se considera que HA es el principal antígeno que puede inducir anticuerpos protectores en las aves.

15 Los virus de influenza A de aves de corral se clasifican en dos patotipos basados en su patogenicidad: virus de influenza aviar de alta patogenicidad (AIAP) y virus de influenza aviar de baja patogenicidad (AIBP). La mayoría de los virus de influenza aviar son de baja virulencia, pero algunos virus de los subtipos H5 y H7 puede causar enfermedad sistémica grave que da lugar a una elevada mortalidad. Aunque sólo unos pocos H5 y H7 de los virus de la influenza aviar son de alta virulencia, todos los virus H5 y H7 son identificados como virus de la influenza aviar notificados por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), debido al riesgo de que virus poco virulentos aumenten su virulencia por mutación.

20 Desde finales de 1990, ha habido un aumento significativo en el número de brotes de AI y en el número de aves que participan en dichos brotes (I. Capua et al., 2004, Avian Pathology, 33: 393-404). El ejemplo más notable es una serie de brotes de AIAP H5N1 en China y Asia Sur-Oriental, que ahora se ha extendido a otras partes del mundo como Europa, Oriente Medio y África. Los brotes han costado tantas como 160 vidas humanas en más de 10 países desde 2003, aunque aún no se ha confirmado la transmisión aparente de ser humano a ser humano. Estos brotes recientes han causado enormes pérdidas económicas a la industria avícola y han elevado la preocupación pública por temor a una posible pandemia humana.

25 La vacunación contra la AI no se había realizado extensamente hasta hace poco debido a que el llamado procedimiento de "sacrificio sanitario" ha sido la opción principal. En el procedimiento de "sacrificio sanitario", todos los pollos de bandadas infectadas con AI son eliminados selectivamente. La mayoría de los brotes de AI fueron erradicados o controlados mediante el "sacrificio sanitario" en el pasado. Sin embargo, en los últimos brotes de AI, especialmente en los brotes de H5N1, ha habido situaciones en las que la eliminación selectiva masiva no era práctica ni viable debido a los costes y pérdidas económicas intolerables asociados con la eliminación selectiva, la amplia presencia de los llamados pollos de corral, etc. En esas situaciones, la vacunación ha sido considerada una herramienta adecuada y de gran alcance para apoyar los programas de erradicación de la AI o de control de la AI ya que se ha demostrado que la vacunación protege las aves contra los signos clínicos y la muerte y reduce la diseminación del virus en las aves vacunadas, lo que reduce la transmisión del virus (D.E. Swayne., 2003, Developments in Biologicals, 114: 201-212). Con el fin de utilizar las vacunas en los programas de erradicación de la AI o en los programas de control de la AI, es muy importante para el comercio y la vigilancia que las aves vacunadas puedan ser diferenciadas de las infectadas con el virus de campo. De hecho, la exposición de campo en aves vacunadas debe ser detectada en pruebas serológicas sencillas. De lo contrario, el virus de campo puede circular en las aves vacunadas sin ser detectado. También es importante que las pruebas de vacunación puedan detectarse mediante análisis sencillos para confirmar que la mayoría o todas las aves en las bandadas vacunadas están adecuadamente vacunadas.

30 Las vacunas comerciales disponibles en la actualidad son antígenos de AI completos inactivados con un coadyuvante oleoso y una vacuna recombinante vectorizada con el virus de la viruela aviar. Aunque se ha demostrado que ambas vacunas son eficaces, requieren una vacunación parenteral de trabajo intensivo y costoso que implica el manejo de cada ave manualmente. Mientras que las vacunas para AI inactivadas se han utilizado en el denominado programa DIVA ("Diferenciación de animales infectados de vacunados"), no se han desarrollado ensayos asequibles comercialmente para la aplicación en masa. Se ha demostrado que los pollos previamente inmunizados con el virus de la viruela aviar, ya sea por exposición de campo o por vacunación con vacunas de la viruela aviar convencionales no desarrollarían inmunidad protectora consistente contra la AI después de ser vacunados con la vacuna de AI recombinante vectorizada con el virus de la viruela aviar (D.E. Swayne et al., 2000, Avian Diseases, 44: 132-137). La vacuna de AI recombinante vectorizada con el virus de la viruela aviar no ha logrado provocar una respuesta serológica detectable por medio del ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) de modo sistemático (D.E. Swayne et al., 1997, Avian Diseases, 41: 910-922). Por lo tanto, es deseable para la

industria de las aves de corral el desarrollo de vacunas que sean más fáciles de administrar y que puedan ser fácilmente diferenciadas de la infección por virus de campo.

La vacuna de AI recombinante vectorizada con el virus de la viruela aviar comercial contiene el gen HA del virus AI A/turkey/Ireland/1378/83 (H5N8) (J.R. Taylor et al., 1988, *Vaccine*, 6: 504-508). Se han desarrollado otras varias vacunas recombinantes vectorizadas con el virus de la viruela aviar experimentales y se ha demostrado que son eficaces contra la sensibilización con virus AI en condiciones experimentales. Los genes del virus de la influenza aviar contenidos en vacunas recombinantes vectorizadas con viruela aviar incluyen el gen HA de A/Chicken/Scotland/59 (H5N1) (C.W. Beard et al., 1991, *Avian Diseases*, 35: 356-359) y los genes HA y NA de A/Goose/Guangdong/3/96 (H5N1) (C. Qiao et al., 2003, *Avian Pathol.*, 32: 25-31). M. Mingxiao et al. fusionaron los genes HA de subtipo H5N1 y de subtipo H7N1 para formar un único marco abierto y los insertaron en un virus de la viruela aviar recombinante junto con Interleuquina 18 de pollo (M. Mingxiao et al., 2006, *Vaccine*, 24: 4304-4311). Se ha observado una amplia protección cruzada entre los subtipos H5 del virus AI. Se ha demostrado que la vacuna de AI recombinante vectorizada con virus de la viruela aviar y las vacunas de AI completo inactivado contra los subtipos H5 de la influenza aviar protegen los pollos frente a la sensibilización con diversos de virus AI de subtipo H5, de lo que se deduce que las similitudes de aminoácidos de HA con las vacunas son tan bajas como 87% (D.E. Swayne et al., 2000, *Veterinary Microbiol.*, 74: 165-172).

Las vacunas de nueva generación en desarrollo incluyen vacunas con virus de la enfermedad de Newcastle recombinantes (D.E. Swayne et al., 2003, *Avian Diseases*, 47: 1047-1050; J. Veits et al., 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:8197-8202; M. Park et al., 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:8203-8208; y J. Ge et al., 2007, *J. Virol.* 81: 150-158), vacunas del virus de la laringotraqueitis infecciosa recombinante (D. Luschow et al., 2001, *Vaccine* 19: 4249-4259 y J. Veits et al., 2003, *J. Gen. Virol.* 84: 3343-3352), una vacuna de adenovirus recombinante (W. Gao et al., 2006, *J. Virol.* 80: 1959-1964; documento WO 2007/022151), vacunas de subunidades expresadas en baculovirus (J. Crawford et al., 1999, *Vaccine*, 17:2265-2274 y D.E. Swayne et al., 2001, *Avian Diseases*, 45: 355-365) y vacunas de ADN (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.916.879 y M. Cherbonnel et al., 2003, *Avian Diseases*, 47: 1181-1186). Aunque las vacunas de virus de la enfermedad de Newcastle recombinantes, las vacunas de virus de la laringotraqueitis infecciosa recombinantes, y la vacuna de adenovirus recombinante fueron capaces de conferir protección de parcial a semicompleta frente a la sensibilización con AI en pollos libres de patógenos específicos, su eficacia en pollos con anticuerpos maternos contra los virus vectores o AI, o en pollos con infección previa o vacunación con virus vectores queda por demostrar. También se ha demostrado que las vacunas de ADN proporcionan inmunidad protectora en pollos, pero requieren al menos dos vacunaciones y la administración individual a cada pollo. Las vacunas de subunidades expresadas en baculovirus también requieren la administración individual a cada pollo.

Se han utilizado herpesvirus de pavo (HVT), serotipo-3 del virus de la enfermedad de Marek (MDV), como un vector para expresar antígenos de patógenos aviarios. El HVT de tipo salvaje o HVT recombinante se puede administrar ya sea en la fase de desarrollo tardío de los embriones a través de la ruta in ovo ya sea en pollos de un día de edad por medio de la ruta subcutánea en los criaderos. Se ha demostrado que las vacunas de HVT asociadas a células, recombinantes, después de la inoculación en embriones o en pollos de un solo día de edad con anticuerpos maternos contra antígenos insertados, son capaces de superar las influencias de los anticuerpos maternos y conferir inmunidad protectora a los pollos a medida que los anticuerpos maternos decaen (Patente de los Estados Unidos Núm. 6.764.684 y Patente de los Estados Unidos Núm. 6.866.852). También se consigue una excelente duración de la inmunidad mediante HVT recombinante (Patente de los Estados Unidos Núm. 6.866.852) probablemente porque HVT queda latente y permanece en el interior de las aves vacunadas durante toda su vida. De este modo, puede considerarse HVT como un vector excelente para los patógenos aviarios. No ha habido informes sobre la construcción de HVT o MDV recombinantes con antígenos de la influenza aviar. Aunque la reivindicación 15 de Patente de los Estados Unidos Núm. 5.853.733 se describe el HVT recombinante que comprende un gen de polipéptido de virus AI insertado dentro de una región que corresponde a un fragmento EcoRI Núm. 9 del genoma de HVT, no hay ningún ejemplo real de la construcción de HVT recombinante con antígenos de la influenza aviar. En las especies de mamíferos, la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.225.111 describe la construcción de virus del herpes equino recombinantes que contienen el gen HA del virus de la influenza equina, pero no existen datos sobre la eficacia de la vacuna de estos recombinantes.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un HVT recombinante modificado por la presencia del ADNc que codifica la proteína HA del virus de la influenza aviar bajo un promotor. El HVT recombinante es capaz de inducir una respuesta serológica que se detecta fácilmente mediante el análisis de HI pero no mediante kits de ELISA de diagnóstico disponibles en el mercado. Esta característica del virus recombinante permite una fácil diferenciación entre la vacunación y la infección de campo. También se proporciona una vacuna para volatería que comprende el HVT recombinante.

La presente invención se describe a continuación con más detalle.

(Gen de la hemaglutinina del virus de la influenza aviar)

El gen de la hemaglutinina se puede obtener de cualquier subtipo o cualquier cepa de virus de la influenza aviar. Preferiblemente, el gen de la HA se obtiene a partir de un virus de influenza aviar del subtipo H5. Más preferiblemente, el gen de la HA se obtiene de virus de la influenza aviar del subtipo H5N9. Lo más preferiblemente, el gen de la HA se obtiene de la cepa A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) del virus de la influenza aviar. Una secuencia de nucleótidos del gen de la HA de la cepa A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) se muestra en el SEQ ID NO: 1. La secuencia del SEQ ID NO: 1 difiere de la secuencia de nucleótidos publicada del gen de la HA de la cepa A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) (M. García et al., 1997, Virus Res. 51: 115-124, Núm. de acceso GenBank U79456) en varias bases. Estas diferencias se deben probablemente a la naturaleza genéticamente inestable de los virus de la influenza aviar, que tienen un genoma de ARN. Por lo tanto, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 es solo un ejemplo y la presente invención no debe limitarse a la secuencia.

(Promotor)

Adyacente al gen de HA en un genoma de HVT, típicamente en la región 5' del gen de la HA, se incluye una secuencia reguladora de ADN, que es referida aquí como un promotor, con el fin de controlar la transcripción del gen de la HA, y de ese modo controlar la expresión del gen de la HA (generación de la proteína HA). Cuando la transcripción, y por lo tanto la expresión, de un gen es controlada por un promotor, se considera que el gen está bajo el control del promotor. En la presente invención, el gen de la HA está bajo el control del promotor temprano inmediato de citomegalovirus (promotor de CMV). Los autores de la presente invención encontraron que el HVT recombinante con el gen de la HA combinado con el promotor de CMV era capaz de conferir títulos serológicos mayores y más uniformes por HI en los pollos que el HVT recombinante con otros promotores tales como el promotor de la beta-actina de pollo (T.A. Kost et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:8287-8301) y un promotor de la beta-actina de pollo modificado (Patente de los Estados Unidos Núm. 6.866.852). Se describe una secuencia de nucleótidos del promotor de CMV en la bibliografía (M. Boshart et al., 1985, Cell 41: 521-530, Núm. de acceso GenBank K03104). Sin embargo, siempre y cuando un promotor sea funcional en las células o en los organismos de las especies aviarias, la secuencia de nucleótidos de un promotor no tiene que ser idéntica a la secuencia de la bibliografía. El promotor de CMV, cuya secuencia se muestra en el SEQ ID NO: 3, está ligeramente modificado con respecto a la secuencia original por los autores de la presente invención, pero se demostró que expresaba el gen de la HA eficazmente.

(Herpesvirus de pavo)

El herpesvirus de pavo es un virus de ADN de doble cadena lineal de la familia *Herpesviridae* y la subfamilia *Alphaherpesvirinae*. El HVT es ubicuo y no oncogénico en los pavos domésticos y se clasifica como serotipo 3 del virus de la enfermedad de Marek. Se ha llevado a cabo exhaustivamente la vacunación de los pollos con HVT para prevenir la enfermedad de Marek en pollos. Siempre que no sea patógeno para los pollos, se puede utilizar cualquier HVT en la presente invención. Por ejemplo, las siguientes cepas de HVT, FC126, PB-THV1, H-2, YT-7, WTHV-1, y HPRS-2-, son adecuadas para el virus troncal. Entre estas, la cepa FC126 es favorable para el uso en la presente invención.

(Región para la inserción de genes)

En la presente invención, el gen de la HA y el promotor de CMV se insertan en un genoma de ADN de HVT. Preferiblemente, el gen de la HA y el promotor de CMV se insertan en una región del genoma de HVT que no es esencial para el crecimiento del virus, que es referida aquí como región no esencial. En otras palabras, una región no esencial puede ser definida como una región en la que una modificación o inserción de un gen foráneo no impide que el virus se replique satisfactoriamente in vitro o in vivo. Se ha informado sobre varias regiones no esenciales en el genoma de HVT. Por ejemplo, el gen de la HA y el promotor de CMV se pueden insertar en, pero sin limitarse a UL43 (documento WO 89/01040), US2 (documento WO 93/25665) o región inter-ORF entre UL44 y UL46 (documento WO 99/18215). Lo más preferiblemente, el gen de la HA y el promotor de CMV se insertan en la región inter-ORF entre UL45 y UL46.

Para la presente invención, una región no esencial puede ser identificada recientemente por el siguiente procedimiento general. En primer lugar, los fragmentos de ADN de HVT de longitudes apropiadas son clonados en un plásmido de *E. coli* y cartografiados físicamente mediante análisis con enzimas de restricción. A continuación, se inserta un casete génico que consiste en un promotor y un gen marcador en un sitio de restricción apropiado del fragmento de ADN clonado dando como resultado un plásmido de homología. Si la recombinación homóloga con el plásmido de homología obtenido da como resultado un virus recombinante que expresa el gen marcador insertado y si el virus es estable in vitro e in vivo, el fragmento de ADN originalmente seleccionado debe ser una región no esencial adecuada para la inserción del gen de HA y el promotor de CMV.

(Construcción de rHVT)

Para la presente invención, es aplicable cualquier método conocido para generar HVT recombinante. Un ejemplo típico es el siguiente. (1) En primer lugar, como se describió anteriormente, se construye un plásmido recombinante que contiene una región no esencial del genoma del HVT. A continuación, preferiblemente con un promotor en el extremo 5' y una señal de poliadenilación en el extremo 3', se inserta el gen de la HA en la región no

esencial para generar un plásmido de homología. (2) El plásmido de homología se transfecta en células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) infectados con el HVT parental o se co-transfecta en células CEF con el ADN genómico de HVT infeccioso. La transfección se puede realizar mediante cualquier método conocido. (3) Las células CEF transfectadas se cultivan en placa sobre placas de cultivo de tejidos y se incuban hasta que se hacen visibles las placas de virus. (4) Las placas identificables incluyen el virus recombinante, así como virus parental de tipo salvaje. El virus recombinante se puede purificar a partir de virus de tipo salvaje por cualquier método conocido para detectar la expresión de genes foráneos insertados.

(Vacuna bivalente de influenza aviar-enfermedad de Marek)

Puesto que la proteína HA es un antígeno protector del virus de la influenza aviar y el HVT troncal es una vacuna viva para la enfermedad de Marek, el HVT recombinante que contiene el gen de la HA de la presente invención se puede utilizar como vacuna bivalente contra la AI y la enfermedad de Marek o como vacuna monovalente contra la AI.

La vacuna, que consiste principalmente en el HVT recombinante en la presente invención, también puede incluir células de aves, ingredientes de medios de cultivo, tampones tales como un tampón de fosfato y tampón HEPES, y/o adyuvantes tales como citoquinas y oligodesoxinucleótidos CpG. Siempre que no sea farmacológicamente perjudicial, la vacuna puede contener cualquier ingrediente tal como conservantes. Además, la vacuna de la presente invención se puede utilizar en una mezcla con cualquier virus recombinante o no recombinante, tal como las cepas de vacuna con el serotipo 1 o serotipo 2 de MDV.

Cualquier método conocido es aplicable a la preparación de la vacuna recombinante bivalente de la presente invención. Por ejemplo, el HVT recombinante se puede inocular en células de cultivo permisivas, tales como células CEF y se puede desarrollar a un título apropiado. A continuación, las células se retiran de las placas de cultivo de tejidos o las botellas rodadoras con raspadores celulares o mediante tratamiento con tripsina y se recogen mediante centrifugación. Las células sedimentadas se suspenden después en medio de cultivo que contiene dimetilsulfóxido, se congelan lentamente, y luego se almacenaron en nitrógeno líquido. Alternativamente, el HVT recombinante se puede liberar de las células infectadas mediante la ruptura de las células en diluyentes que contienen estabilizadores tales como sacarosa y albúmina bovina. Estos HVT liberados se denominan HVT sin células. Los HVT sin células se pueden liofilizar y almacenar a 4°C.

La vacuna de HVT recombinante bivalente se puede administrar a pollos mediante cualquier método conocido de inoculación de la vacuna contra la enfermedad de Marek. Por ejemplo, la vacuna de la presente invención se diluye para dar 10^1 - 10^5 , o de manera más favorable 10^2 - 10^4 unidades formadoras de placas (PFU) por dosis con un diluyente que contiene los componentes del tampón, azúcares y colorantes. La vacuna diluida se puede inocular subcutáneamente detrás del cuello de los pollos de un día de edad o en huevos embrionados a través de la ruta in ovo con jeringas o con cualquier aparato para la inyección.

La presente vacuna aviar bivalente es capaz de conferir un título serológico mediante HI de más de 50 (media geométrica del título) en grupos de pollos vacunados durante 5 semanas después de la inoculación, cuando se utilizan cuatro unidades de hemaglutinación de un antígeno de subtipo H5 homólogo del virus de la influenza aviar inactivado para la los ensayos de HI. La vacuna bivalente en la presente invención proporciona también una excelente protección frente a la sensibilización letal con virus altamente patógenos de la influenza aviar (H5N1).

Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1 Construcción del plásmido pGICMVpA

FIGURA 2 Construcción del plásmido de homología p45CMVH5Wis68

FIGURA 3 Construcción del plásmido pGIBacpA2nd

FIGURA 4 Construcción del plásmido de homología p45BacH5Wis68

FIGURA 5 Construcción del plásmido de homología p45PecH5Wis68

FIGURA 6 Análisis de transferencia Western que detecta la expresión de la proteína hemaglutinina por el herpesvirus de pavo recombinante

FIGURA 7 títulos de inhibición de la hemaglutinación en pollos vacunados con el herpesvirus de pavo recombinante con gen de la hemaglutinina

FIGURA 8 títulos de ELISA en pollos vacunados con el herpesvirus de pavo recombinante con el gen de la hemaglutinina utilizando un kit de ELISA comercial (IDEXX Laboratories, FLOCKCHEKAIV)

FIGURA 9 títulos de ELISA en pollos vacunados con el herpesvirus de pavo recombinante con el gen de la hemaglutinina utilizando un kit de ELISA comercial (Synbiotics, kit de ensayo PROFLOK AIV Ab)

FIGURA 10 Títulos de inhibición de la hemaglutinación en pollos vacunados con el herpesvirus de pavo recombinante con el gen de la hemaglutinina (segunda prueba)

Descripción detallada de la invención

5 La clonación del gen y la construcción del plásmido se llevaron a cabo esencialmente mediante técnicas de biología molecular convencionales (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, NY 2001). La cepa FC126 de herpesvirus de pavo (R. L. Witter et al., 1970, Am. J. Vet. Res. 31, 525-538) se usó como virus troncal para generar un herpesvirus de pavo recombinante.

Ejemplo 1

Aislamiento del gen de la hemaglutinina de subtipo H5 del virus de la influenza aviar

10 La cepa A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) del virus de la influenza aviar se propagó en el saco alantoideo de huevos de pollo embrionados libres de patógenos específicos. El ARN genómico Total del virus A/Turkey/Wisconsin/68 se extrajo utilizando RNEASY MINI KIT (QAIGEN, Núm. de Cat. 74104). El ADNc de la primera cadena se sintetizó con SUPERSRIPT FIRST STRAND System para RT-PCR (Invitrogen, Núm. 11.904-018). Utilizando el ADNc resultante como molde, se amplificó el gen de la HA mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) con PFUULTRA HIGH FIDELITY DNA Polymerase (STRATAGENE, Núm. de Cat. 600380) y cebadores de PCR. El cebador BamHA-F (SEQ ID NO: 4) y el cebador SalHA-R (SEQ ID NO: 5), se recuecen con las secuencias de inicio y terminación del gen de HA y cada cebador contiene una secuencia en los extremos 5' para una enzima de restricción, BamHI o Sall, respectivamente. Después de la reacción de PCR, se añadió polimerasa Taq (Promega, Núm. de Cat. M2665) a la mezcla de PCR para añadir salientes en A 3' a los productos de PCR.

20 BamHA-F (SEQ ID NO: 4) 5'-TGACGGATCCATGGAAAGAATAGTGATTG-3'

SalHA-R (SEQ ID NO: 5) 5'-CTGACAGTCGACCTAGATGCAAATTCTGC-3'

25 El ADNc de HA de 1,8 kilobases (kb) amplificado se insertó en el vector PCR2.1-TOPO (INVITROGEN, Núm. de Cat. K4500-01), dando como resultado en pCR2.1-H5Wis68. Las secuencias de nucleótidos de los genes de HA en unos pocos clones del plásmido pCR2.1-H5Wis68 y el producto de la PCR se determinaron utilizando ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) con seis cebadores; cebador BamHA-F (SEQ ID NO: 4), cebador Salha-R (SEQ ID NO: 5), cebador directo M13 (SEQ ID NO: 6), cebador inverso M13 (SEQ ID NO: 7), cebador HA-F (SEQ ID NO: 8), y cebador R-HA (SEQ ID NO: 9).

cebador directo M13 (SEQ ID NO: 6) 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

cebador inverso M13 (SEQ ID NO: 7) 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

30 cebador HA-F (SEQ ID NO: 8) 5'-CTGGACAATACTAAGGCCGAACGAT-3'

cebador HA-R (SEQ ID NO: 9) 5'-CACTGGGGTCTGACATTTGGTA-3'

35 Las secuencias de los clones del plásmido pCR2.1-H5Wis68 eran idénticas entre sí y a la secuencia del producto de PCR. Aunque la secuencia de aminoácidos deducida era diferente de la secuencia referida de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) (M. García et al., 1997, Virus Res. 51: 115-124, Número de acceso GenBank U79456) en cuatro aminoácidos, los aminoácidos que obtuvieron los autores de la presente invención fueron los mismos que los aminoácidos de la mayoría de las proteínas HA del subtipo H5. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida del gen de la HA obtenida de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) se muestran en el SEQ ID NO: 1 y el SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 2

40 Construcción de los plásmidos de homología

2-1. Resumen de los plásmidos de homología y herpesvirus de pavo recombinantes

45 En la presente invención, se utilizaron tres promotores, el promotor de CMV, el promotor de la beta-actina de pollo (promotor Bac), y un promotor de la beta-actina de pollo modificado (promotor Pec), para controlar la expresión del gen de HA de la cepa A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) del virus de AI. En primer lugar, se construyeron los plásmidos de homología con el gen de la HA y uno de los promotores y a continuación se generaron herpesvirus de pavo recombinantes utilizando los plásmidos de homología. Los herpesvirus de pavo recombinantes con diferentes promotores se compararon para determinar sus capacidades para conferir títulos serológicos contra la AI en pollos como se muestra en el Ejemplo 6. Se presenta aquí un HVT recombinante con el promotor de CMV como ejemplo y se presentan aquí virus recombinantes con el promotor Bac o el promotor Pec como ejemplos comparativos. Una lista de los plásmidos de homología y los herpesvirus de pavo recombinantes construidos en la presente invención se muestra en la TABLA 1.

Tabla 1. Lista de los plásmidos de homología y herpesvirus de pavos recombinantes

| Núm. de Artículo | Nombre de plásmidos de homología | Nombre de virus recombinantes | Promotores | Ejemplos vs ejemplos comparativos |
|------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| 1 | p45CMVH5Wis68 | rHVT/CMVH5Wis68 | promotor CMV | Ejemplo |
| 2 | p45BacH5Wis68 | rHVT/BacH5Wis68 | promotor Bac | Ejemplo comparativo |
| 3 | p45PecH5Wis68 | rHVT/PecH5Wis68 | promotor Pec | Ejemplo comparativo |

2-2. Construcción del plásmido pGICMVpA

El promotor CMV se obtuvo de pBK-CMV (Stratagene, Núm. de Cat. 212209). Los tres BglI sitios para la enzima de restricción BglI en el promotor de CMV se desorganizaron para facilitar del proceso de construcción del plásmido mediante mutagénesis por PCR in vitro utilizando cuatro pares de cebadores. Los pares de cebadores fueron PrCMV1 (SEQ ID NO: 10) y PrCMV3 (SEQ ID NO: 12), PrCMV4 (SEQ ID NO: 13) y PrCMV5 (SEQ ID NO: 14), PrCMV6 (SEQ ID NO: 15) y PrCMV2' (SEQ ID NO: 11), y PrCMVo1 (SEQ ID NO: 16) y PrCMVR1 (SEQ ID NO: 17). Se llevaron a cabo por separado cuatro reacciones de PCR utilizando cada par de cebadores y pBK-CMV como molde. A continuación se combinaron los cuatro productos de la PCR y se utilizaron como molde para la PCR secundaria con los cebadores PrCMV1 y PrCMVR1, produciendo el fragmento de 604 pb con una secuencia promotora de CMV modificada. La secuencia de nucleótidos del promotor de CMV utilizada para expresar el gen de HA se proporciona en el SEC ID NO. 3. El fragmento del promotor de CMV se digirió con PstI y XbaI y se insertó en pUC18polyASfi digerido con PstI y XbaI (Patente de los Estados Unidos Núm. 6.866.852), dando como resultado pGICMV(-). La señal de poliA de SV40 se obtuvo de pBK-CMV mediante PCR utilizando los cebadores PolyA-SalKpn (SEQ ID NO: 18) y PolyA-SfiF2 (SEQ ID NO: 19). El fragmento de PCR que contenía la señal poliA de SV40 se digirió con Sall y SfiI y se ligó a pGICMV(-) digerido con Sall y SfiI dando como resultado pGICMVpA (FIGURA 1).

PrCMV1 (SEQ ID NO: 10) 5'-GGGCTGCAGAGTTATTAATAGTAATCAATT-3'

PrCMV2' (SEQ ID NO: 11) 5'-CGCGCCATTTACCGTCATTGACGTC-3'

PrCMV3 (SEQ ID NO: 12) 5'-GGGTCGTTGGGCGGTCAGCCGGCGG-3'

PrCMV4 (SEQ ID NO: 13) 5'-CTTACGGTAAATGGCCCGCCGGCTG-3'

PrCMV5 (SEQ ID NO: 14) 5'-TACACTTGATGTACTGCCAATGGGC-3'

PrCMV6 (SEQ ID NO: 15) 5'-TATTTACGGTAAACTGCCCATTGGC-3'

PrCMVo1 (SEQ ID NO: 16) 5'-ACGTCAATGACGGTAAATGGCGCGCCTGGC-3'

PrCMVR1 (SEQ ID NO: 17) 5'-CGTCTAGAGGATCTGACGGTTCACTAAACC-3'

PolyA-SalKpn (SEQ ID NO: 18) 5'-TGTGGTACCGTCGACGATTCACAGTCCCAAGGC-3'

PolyA-SfiF2 (SEQ ID NO: 19) 5'-CTTGGCCTTATTGGCCTAAGATACATTGATGAG -3'

2-3. Construcción del plásmido de homología p45CMVH5Wis68

El promotor de CMV y la señal poliA de SV40 (940 pb) se escindieron de pGICMVpA mediante BglI y se ligaron en p45/46Sfi digerido con SfiI (Patente de los Estados Unidos Núm. US 6.866.852), dando como resultado p45/46CMVpA. A continuación, se escindió el gen de HA de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) de pCR2.1-H5Wis68 utilizando Sall y BamHI. El gen de HA de 1701 pb se insertó en p45/46CMVpA digerido con Sall y BamHI, dando como resultado p45CMVH5Wis68 (FIGURA 2). El plásmido p45CMVH5Wis68 se utilizó como plásmido de homología para generar herpesvirus de pavo recombinante.

2-4. Construcción del plásmido pGIBacpA2nd

El promotor Bac se obtuvo mediante PCR utilizando el ADN celular de células CEF como molde. El grupo de cebadores utilizado para PCR fueron PrBac1 (SEQ ID NO: 18) y PrBac2' (SEQ ID NO: 19). Un fragmento de ADN de 1,5 kilobases obtenido se digirió con PstI y XbaI y se insertó en pUC18polyASfi digerido con PstI y XbaI, dando como resultado pGIBac2. A continuación, la señal poliA de SV40 obtenida mediante PCR usando los cebadores

PolyA-Salkpn (SEQ ID NO: 18) y PolyA-SfiF2 (SEQ ID NO: 19) se digirió con Sall y Sfil y se ligó a pGIBac2 digerido con Sall y Sfil dando como resultado pGIBacpA2nd (FIGURA 3).

PrBac1 (SEQ ID NO: 20) 5'-

CAGTGTCTGCTGCAGCTCAGTGCATGCACGCTCATTGCCC-3'

PrBac2' (SEQ ID NO: 21) 5'-

GCTCTAGAGGCGTGGAGCTTGGGGGCTGCGGAGGAACAGAGAAGGGAAG-3'

5 2-5. Construcción del plásmido de homología p45Bach5Wis68

El promotor Bac y la señal de poliA de SV40 (1866 pb) se escindieron de pGIBacpA2nd mediante BglI y se ligaron en p45/46Sfi digerido Sfil, dando como resultado p45/46BacpA2nd. A continuación, el gen de HA de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) escindido de pCR2.1-H5Wis68 utilizando Sall y BamHI se insertó en p45/46BacpA2nd digerido con Sall y BamHI, dando como resultado p45Bach5Wis68 (FIGURA 4).

10 2-6. Construcción del plásmido de homología p45Pech5Wis68

La construcción del promotor Pec se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.866.852. El promotor Pec se sintetizó mediante la fusión de una parte del promotor de la beta-actina de pollo con la región intensificadora del promotor de CMV. El promotor Pec fue escindido de pGIPec (Patente de los Estados Unidos Núm. 6.866.852) con PstI y BamHI y se insertó en p45/46BacpA2nd digerido con PstI y BamHI descrito en el Ejemplo 2-4, dando como resultado p45/46PecpA2nd. A continuación, el gen de HA de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) escindido de pCR2.1-H5Wis68 utilizando Sall y BamHI se insertó en p45/46PecpA2nd digerido con Sall y BamHI, dando como resultado p45Pech5Wis68 (FIGURA 5).

Ejemplo 3

Generación y aislamiento de herpesvirus de pavo recombinante

20 El ADN viral de la cepa FC126 de HVT se preparó como describen Morgan et al. (Avian Diseases, 1990, 34:345-351).

25 Se suspendieron 10^7 células de fibroblastos de embrión de pollo secundarias (CEF) en solución salina G (NaCl 0,14 M, KCl 0,5 mM, Na_2HPO_4 1,1 mM, NaH_2PO_4 1,5 mM, MgCl_2 0,5 mM, y glucosa al 0,011%) y se cotransfectaron con ADN viral del HVT y de 5 a 25 mg del plásmido de homología, p45CMVH5Wis68, p45Bach5Wis68, o p45Pech5Wis68 mediante electroporación. La electroporación se llevó a cabo utilizando BIO-RAD GENE PULSER. Las células transfectadas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se transfirieron a pocillos de placas de 96 pocillos. Después de incubar a 37°C durante 7 días en CO_2 al 4-5%, o hasta que las placas se hicieron visibles, las células se desprendieron de las placas mediante tratamiento con tripsina, se transfirieron igualmente a dos placas de 96 pocillos con CEF secundarias y se incubaron durante 3 a 4 días hasta que se observaron placas. El escrutinio se llevó a cabo mediante el análisis en placas de color negro, tiñendo solo las placas que expresaban la proteína HA. En pocas palabras, una de las placas se fijó con una mezcla de metanol:acetona (1:2) y se incubó con antisuero anti-HA de pollo. A continuación, se incubó con anticuerpo anti-IgG de pollo biotinilado (VECTOR LABORATORIES, Núm. de Cat. BA-9010) y después con el kit Vectastain ABC-AP (Vector Laboratories, Núm. de Cat. AK-5000), las placas que expresaban la proteína HA se tiñeron mediante la adición de solución de BCIP/NBT (BIO-RAD LABORATORIES, Núm. de Cat. 170-6539 y 170-6532). Se identificaron los pocillos que contenían las placas recombinantes teñidas y las células de los pocillos correspondientes de la otra placa de 96 pocillos se trataron con tripsina. Las células se diluyeron a continuación en células CEF secundarias de nueva aportación y se transfirieron a placas de 96 pocillos para completar la primera ronda de purificación.

40 El procedimiento de purificación se repitió hasta que todas las placas se tiñeron positivamente en el análisis en placa de color negro. El virus recombinante purificado con el gen de la HA bajo el promotor de CMV se denominó rHVT/CMVH5Wis68 (presente invención). Los virus recombinantes con el promotor Bac o el promotor Pec se denominaron rHVT/Bach5Wis68 y rHVT/Pech5Wis68, respectivamente (ejemplos comparativos).

Ejemplo 4

Verificación de la estructura y estabilidad del genoma de HVT recombinante

45 4-1. Análisis de transferencia Southern

Se utilizaron células fibroblásticas de embrión de pollo en una placa de 100 mm que habían sido infectadas con el virus recombinante, rHVT/CMVH5Wis68 o la cepa parental FC126 de HVT en el análisis de transferencia Southern para confirmar la inserción del gen de HA en el sitio de inserción deseado. Las células se recogieron mediante un rascador de células y mediante centrifugación a 913 xg durante 5 minutos. Las células recogidas se

lavarón con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en 1,0 mililitros (ml) de tampón de lisis (Triton X-100 al 0,5%, 2-mercaptoetanol 100 mM, y EDTA 20 mM en PBS). La suspensión celular se sometió a vórtice durante un total de 30 segundos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los núcleos de las células y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 2.060 xg durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 ml. Los virus se recogieron por centrifugación a 20.800 xg durante 20 minutos a 4°C. El sedimento se suspendió en 0,33 ml de una solución de nucleasa (Tris-Cl 12,5 mM (pH 7,5), ADNasa I de 1 mg/ml y ARNasa A de 1 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 83 µl de la disolución de SDS-proteasa (EDTA 50 mM, SDS al 5%, proteasa K de 0,5 mg/ml, y 2-mercaptoetanol 25 mM), a la suspensión de virus y se incubó a 55°C durante 30 minutos para desorganizar las envolturas de los virus. Se llevó a cabo la extracción con fenol-cloroformo dos veces y el ADN se precipitó mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol frío del 100% y NaCl a una concentración final de 0,16 M. Después de centrifugar a 20.800 xg durante 30 minutos a 4°C, el sedimento se lavó con etanol del 70% y se secó al aire. El sedimento se disolvió en tampón TE (Tris-Cl 10 mM (pH 8,0), y EDTA 1 mM).

El ADN viral del tampón TE y el plásmido de homología (control positivo) se digirieron con XhoI, BamHI y SpeI y se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa usando un gel de agarosa al 0,6%. Los fragmentos de ADN del gel se transfirieron a una membrana de nailon BIODYNE A (Pall, Núm. de Cat. BNXF3R). La membrana se hibridó con cualquiera de sonda de HA marcada con digoxigenina (DIG) o sonda de IS45/46 marcada con DIG. La sonda de HA y la sonda de IS45/46 marcadas con DIG se prepararon con el Kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche Applied Science, Núm. de Cat. 11636090910) utilizando los cebadores de HA1-PF (SEQ ID NO: 22) y HA1-PR (SEQ ID NO: 23) y los cebadores 45/46-F (SEQ ID NO: 24) y 45/46-R (SEQ ID NO: 25), respectivamente.

HA1-PF (SEQ ID NO: 22) 5'-GGGGGTGGCAAGGAATG-3'

HA1-PR (SEQ ID NO: 23) 5'-GCTAGGGAAGCTCGCCACTGT 3'

45/46-FB (SEQ ID NO: 24) 5'-TAGCGGCACGGAACAGATAGAGA-3'

45/46-RB (SEQ ID NO: 25) 5'-TGGCGATACGGTTCCTGGTTTGAC-3'

La membrana se lavó con disolución 2 X SSC a temperatura ambiente y después con disolución 0,5 X SSC a 68°C. La membrana se bloqueó y se incubó con fragmentos Fab anti-digoxigenina-AP (Roche Applied Science, Núm. de catálogo 11093274910) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar dos veces con tampón de lavado con ácido maleico (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M y Tween 20 al 0,3%, pH 7,5), las bandas de ADN que habían hibridado con las sondas se visualizaron mediante incubación de la membrana con una disolución de BCIP/NBT. La sonda de HA hibridó con las bandas de 3,6 kb en el ADN del virus recombinante y el plásmido de homología, si bien que no se detectaron bandas con el HVT parental. La sonda IS45/46 hibridó con las bandas de 3,6 kb y 1,2 kb en el ADN recombinante y el plásmido de homología, y con la banda de 2,3 kb en el HVT parental. Estos resultados demuestran que rHVT/CMVH5Wis68 obtenido en el Ejemplo 3 tenía una estructura la genómica esperada.

Se llevó a cabo el análisis de transferencia Southern de rHVT/BachH5Wis68 y rHVT/PechH5Wis68 de una manera similar a la de rHVT/CMVH5Wis68, excepto que se utilizaron las enzimas de restricción XhoI y SpeI para rHVT/BachH5Wis68. Para rHVT/BachH5Wis68, la sonda de HA hibridó con las bandas de 4,9 kb en el ADN del virus recombinante y el plásmido de homología, si bien que no se detectaron bandas con el HVT parental. La sonda IS45/46 hibridó con bandas 4,9 kb y 0,8 kb en el ADN recombinante y el plásmido de homología, y con la banda de 2,3 kb en el HVT parental. Para rHVT/PechH5Wis68, la sonda de HA hibridó con bandas de 3,6 kb en el ADN del virus recombinante y el plásmido de homología, si bien no se detectaron bandas con el HVT parental. La sonda IS45/46 hibridó con bandas 3,6 kb y 1,2 kb en el ADN recombinante y el plásmido de homología, y con la banda de 2,3 kb en el HVT parental. Se demostró que estos virus recombinantes también tenían las estructuras genómicas esperados.

4.2. Estabilidad de HVT recombinante

Los virus recombinantes, rHVT/CMVH5Wis68, rHVT/BachH5Wis68 y rHVT/PechH5Wis68, se hicieron pasar 20 veces a ciegas en células CEF. Después de los 20 pases, los virus se analizaron mediante el análisis de transferencia Southern como se describe en el Ejemplo 4,1. Las bandas detectadas en el ADN aislado del virus después de 20 pases fueron idénticas a las bandas descritas en el Ejemplo 4,1, lo que demuestra que los virus recombinantes fueron estables incluso después de 20 pases.

Ejemplo 5

Expresión de la proteína HA por HVT recombinante

La expresión de la proteína HA por los virus recombinantes, rHVT/CMVH5Wis68, rHVT/BachH5Wis68 y rHVT/PechH5Wis68, se confirmó mediante el análisis en placa de color negro y el análisis de transferencia Western. Los procedimientos para el análisis en placa de color negro se describen en el Ejemplo 3. La transferencia Western se llevó a cabo utilizando células CEF infectadas con los virus recombinantes y antisero anti-HA de pollo.

Brevemente, las células CEF en placas de 100 mm se infectaron con uno de los virus recombinantes o con la cepa FC126 de HVT parental a una multiplicidad de infección de aproximadamente 0,01. De dos a tres días después de la inoculación, las células se recogieron, con rascadores de células y se centrifugaron a 913 xg durante 5 minutos. El sedimento se lavó dos veces con PBS y se resuspendió en 50 a 100 µl de PBS. Después de añadir el mismo volumen de 2 x tampón de muestra de SDS (Tris-Cl 130 mM (pH 6,8), SDS al 6%, glicerol al 20%, 2-mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol al 0,01%), la suspensión celular se hirvió durante 5 minutos. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE usando gel de poliacrilamida al 8% y se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore). La membrana se secó completamente y después se incubó con antisuero anti-HA de pollo. Después de que el antisuero anti-HA se retirara mediante lavado, la membrana se incubó con anticuerpo Fc anti-IgG de pollo conjugado con fosfatasa alcalina (BETHYL, Núm. de Cat. A30-104AP). La proteína unida al antisuero anti-HA de pollo se visualizó mediante la adición de una disolución de BCIP/NBT. Como se muestra en la FIGURA 3, se observó una banda de proteína de 74 kilodaltons (kDa) solamente en la calle con células infectadas con virus recombinante, que tenía el tamaño esperado de la proteína HA no procesada.

Ejemplo 6

15 Evaluación serológica de pollos inoculados con HVT recombinante

Se evaluaron las respuestas serológicas contra AI en pollos que habían sido vacunados con los virus recombinantes, rHVT/CMVH5Wis68, rHVT/Pech5Wis68 y rHVT/Bach5Wis68. Se vacunaron subcutáneamente pollos libres de patógenos específicos (SPAFAS, Flock T-10) de un día de edad, con uno de los virus recombinantes. Los grupos 1 y 2 fueron inoculados con 1638 ufp por dosis (0,2 ml) y 375 ufp por dosis de rHVT/CMVH5Wis68, respectivamente (Tabla 2). Los Grupos 3 y 4 contenían pollos vacunados con 2800 ufp (Grupo 3) o 550 ufp (Grupo 4) de rHVT/Pech5Wis68. Los Grupos 5 y 6 se inocularon con 4350 ufp y 720 ufp por dosis de rHVT/Bach5Wis68, respectivamente. Un grupo de pollos (Grupo 8) se mantuvo como control negativo no inoculado. Otro grupo de pollos (Grupo 7) se vacunó subcutáneamente con vacuna de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) inactivada a las tres semanas de edad como control de vacuna inactivada. Se extrajo sangre de los pollos entre las 3 y 7 semanas de edad y los sueros obtenidos se evaluaron mediante los ensayos de HI de AI y ensayos ELISA de AIV. Los ensayos de HI de AI se realizaron utilizando cuatro unidades de hemaglutinación de un antígeno homólogo del virus de influenza aviar inactivado de la cepa A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9), cuyo gen de la HA se utilizó en los virus recombinantes, como describen D.E. Swayne et al (D.E. Swayne et al., 1998, Avian Influenza. En: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 150-155). Brevemente, antes del análisis de HI, se determinó el número de unidades de hemaglutinación en el antígeno de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) inactivado como la dilución más alta del antígeno que produce aglutinación completa, y el antígeno se diluyó para que contuviera cuatro unidades de hemoaglutinación en 25 µl. En placas de 96 pocillos de fondo en U, se diluyeron inicialmente los sueros 1:5 y a continuación se diluyeron seriadamente a la mitad a través de las placas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para que contuvieran 25 µl por pocillo. Se añadieron cuatro unidades de hemaglutinación del antígeno en 25 µl a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 50 µl de eritrocitos de pollo al 0,5% en PBS a cada pocillo y se incubaron durante aproximadamente 40 minutos a temperatura ambiente. Los títulos de HI son la dilución más alta de los sueros que muestra la inhibición de la hemaglutinación. Los títulos de HI iguales o mayores de 10 se consideraron positivos. Los ensayos de ELISA se llevaron a cabo utilizando dos kits de ELISA para AIV comerciales (IDEXX Laboratories, kit de ensayo FLOCKCHEK AIV and SYNBIOTICS, PROFLOK AIV Ab) que están disponibles en los Estados Unidos.

Como se muestra en la TABLA 3 y la FIGURA 7, los sueros de los pollos vacunados con rHVT/CMVH5Wis68 (Grupos 1 y 2) comenzaron a mostrar los títulos de HI desde tres semanas después de la vacunación y los títulos de HI continuaron aumentando hasta un título de HI de 100 (media geométrica del título) a las seis semanas de la vacunación. Asimismo, más de 80% de los pollos vacunados a las tres semanas de la vacunación y todos los pollos vacunados a las cinco semanas de la vacunación tuvieron títulos de HI iguales o mayores de 10 (TABLA 3). No se han observado de manera regular altos niveles de títulos de HI con la vacuna para AIV vectorizada con viruela aviar comercial y esto no se logró fácilmente. La diferencia de la dosis entre los dos grupos de vacuna (1638 ufp y 375 ufp) no tuvo una influencia significativa sobre las respuestas serológicas. Sorprendentemente, cuando se sometieron a ensayo con los kits de ELISA para AIV comerciales, estos sueros de pollos vacunados con rHVT/CMVH5Wis68 que eran altamente positivos por medio de los ensayos de HI no dieron títulos positivos de ELISA a las 3 y 7 semanas de la vacunación, mientras que los sueros recogidos del control con vacuna inactivada (Grupo 7) mostraron títulos de ELISA altamente positivos con ambos kits comerciales de ELISA (FIGURAS 8 y 9). Esta característica de la vacuna rHVT/CMVH5Wis68 haría extremadamente fácil la diferenciación de las reacciones a la vacuna de la exposición a los virus de campo y el seguimiento de los pollos vacunados. La media geométrica de los títulos de HI de los sueros de los pollos vacunados con rHVT/Pech5Wis68 (Grupos 3 y 4) o rHVT/Bach5wis68 (Grupos 5 y 6) no sería tan alta como la conferida por rHVT/CMVH5Wis68. Además, rHVT/Pech5Wis68 y rHVT/Bach5wis68 no lograron conferir el título serológico por HI a los pollos vacunados sistemáticamente como se muestra en la TABLA 3. Los controles negativos no inoculados (Grupo 8) no mostraron resultados serológicos positivos, en los ensayos de HI o en los ensayos de ELISA a lo largo de todo el período de observación.

En resumen, el HVT recombinante con el gen de la HA combinado con el promotor de CMV (rHVT/CMVH5wis68) proporcionó pollos vacunados con títulos serológicos más altos y más uniformes mediante HI

que el HVT recombinante con el promotor Bac (rHVT/BacH5Wis68) y el HVT recombinante con el promotor Pec (rHVT/PecH5Wis68), que se presentan aquí como ejemplos comparativos. Los sueros recogidos de los pollos vacunados con rHVT/CMVH5Wis68 fueron negativos mediante kits de ELISA AIV asequibles comercialmente aunque los sueros fueron altamente positivos mediante los ensayos de HI de AI, permitiendo de ese modo una fácil diferenciación entre la reacción de la vacunación y la infección de campo.

Ejemplo 7

Segunda evaluación serológica de los pollos inoculados con HVT recombinante

Con el fin de investigar adicionalmente la potencia del HVT recombinante con el gen de la HA, se llevó a cabo otro ensayo de evaluación serológica. Los de pollos libres de patógenos específicos (SPAFAS, Flock R105) se dividieron en cuatro grupos en este estudio (Tabla 4). Los embriones a los 18 días de incubación en el Grupo 1 se vacunaron con 980 ufp por dosis (0,1 ml) de rHVT/CMVH5Wis68 a través de la ruta in ovo. El Grupo 2 y Grupo 3 se vacunaron por vía subcutánea con un día de edad con 695 ufp por dosis (0,2 ml) de rHVT/CMVH5Wis68 o 1155 ufp por dosis de rHVT/BacH5Wis68, respectivamente. Un grupo de pollos (Grupo 4) se mantuvo como control negativo no inoculado. Se extrajo sangre de los pollos entre 2 y 7 semanas de edad y los sueros obtenidos se evaluaron mediante los ensayos de HI de AI y ensayos de ELISA para AIV. Los ensayos de HI de AI se llevaron a cabo utilizando cuatro unidades de HA de un antígeno de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) inactivado como describen D.E. Swayne et al (D.E. Swayne et al., 1998, Avian Influenza. En: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 150-155).

Como se muestra en la TABLA 5 y la FIGURA 10, rHVT/CMVH5Wis68 mediante administración subcutánea (Grupo 2) de nuevo mostró una potencia excelente como en la primera prueba. Los títulos de HI en este grupo alcanzaron 100 (media geométrica del título) a las tres semanas de la vacunación y se mantuvieron los altos niveles de los títulos de HI a lo largo de siete semanas después de la vacunación. Además, en este estudio, los autores de la presente invención encontraron que la administración in ovo de rHVT/CMVH5Wis68 (Grupo 1) es tan potente como la administración subcutánea. Los títulos de HI en el Grupo 1 fueron muy similares a los del Grupo 2. Los títulos de los pollos vacunados con rHVT/BacH5Wis68 (Grupo 3) fueron algo más bajos que los de los pollos vacunados con rHVT/CMVH5Wis68 (Grupos 1 y 2) de nuevo excepto a las 5 semanas de la vacunación, cuando Grupo 3 tuvo títulos de HI más altos que los otros grupos, pero el título de HI disminuyó en las semanas siguientes. No se observaron títulos de HI detectables a partir de los controles negativos no inoculados durante todo el período de observación.

Ejemplo 8

Eficacia de HVT recombinante contra las sensibilización con virus de influenza aviar altamente patógeno (H5N1)

En la tercera prueba, se examinó la eficacia del HVT recombinante con el gen de la HA contra virus de la influenza aviar altamente patógeno (subtipo H5N1). En este estudio, los pollos libres de patógenos específicos se dividieron en cuatro grupos (TABLA 6). Los pollos de un día de edad de los Grupos 1 y 2 se vacunaron con 1075 ufp por dosis (0,2 ml) de rHVT/CMVH5Wis68 y 1080 ufp por dosis de rHVT/BacH5Wis68, respectivamente. Los pollos del Grupo 3 (control positivo sensibilizado, no vacunados) se inocularon con diluyente de vacuna y se sensibilizaron a las cuatro semanas de edad. El grupo 4 mantuvo como control negativo, no sensibilizado, no vacunado.

A las cuatro semanas de edad, los pollos en los grupos 1, 2 y 3 se sensibilizaron intranasalmente con $10^{5.0}$ DIE_{50} (DL_{50} 200) del virus de la cepa A/Viet Nam/1203/04 (H5N1) del virus de influenza aviar altamente patógena. La protección se evaluó mediante la mortalidad y los signos clínicos de la influenza aviar. Todos los pollos del Grupo 3 (control positivo sensibilizado, no vacunado) murieron a los dos días de la sensibilización, lo que confirma la gravedad de la sensibilización (TABLA 7). El rHVT/CMVH5Wis68 mostró una excelente protección contra la sensibilización por influenza aviar altamente patógena letal, como en el Grupo 1, vacunado con rHVT/CMVH5Wis68, donde 95% de los pollos (19 de 20) fueron protegidos. Por otra parte, sólo 65% (13 de 20) de los pollos en el grupo 2 (rHVT/BacH5Wis68) sobrevivieron a la sensibilización. Todos los pollos del grupo 4 (control negativo, no sensibilizado, no vacunado) estuvieron libres de mortalidad y signos clínicos de influenza aviar. Coincidiendo con los dos estudios de evaluación serológica que se describen en los EJEMPLOS 6 y 7, el HVT recombinante con el gen de la HA combinado con el promotor de CMV (rHVT/CMVH5wis68) proporcionó una protección mucho mejor contra la sensibilización con virus de la influenza aviar altamente patógeno (H5N1) que el HVT recombinante con el promotor Bac (rHVT/BacH5Wis68), que se presenta aquí como ejemplo comparativo.

Tabla 2. Grupos de tratamiento

| Núm. de Grupo | Grupo de Tratamiento | Promotores | Edad de vacunación | Dosis de vacuna (ufp ¹) | Ruta de la vacuna | Núm. de pollos |
|---------------|------------------------|------------------------|--------------------|-------------------------------------|-------------------|----------------|
| 1 | rHVT/CMVH5Wis68 | CMV (Ex ²) | Un día de edad | 1638 | SQ ³ | 17 |
| 2 | rHVT/CMVH5Wis68 | CMV (Ex) | Un día de edad | 375 | SQ | 17 |
| 3 | rHVT/PecH5Wis68 | Pec (CE ⁴) | Un día de edad | 2800 | SQ | 17 |
| 4 | rHVT/PecH5Wis68 | Pec (CE) | Un día de edad | 550 | SQ | 17 |
| 5 | rHVTBacH5Wis68 | Bac (CE) | Un día de edad | 4350 | SQ | 17 |
| 6 | rHVT/BacH5Wis68 | Bac (CE) | Un día de edad | 720 | SQ | 17 |
| 7 | Vacuna H5N9 inactivada | N/A ⁵ | 3 semanas de edad, | 0,5 ml ⁶ | SQ | 17 |
| 8 | Controles negativos | N/A | N/A | Ninguna | N/A | 10 |

ufp¹ = Unidades formadoras de placa

Ej² = Ejemplo

SQ³ = Subcutánea

EC⁴ = Ejemplo comparativo

N/A⁵ = No aplicable

ml⁶ = Mililitro

ES 2 399 845 T3

Tabla 3. Títulos de HI

| Grupo | 3 semanas | | 4 semanas | | 5 semanas | | 6 semanas | | 7 semanas | |
|-------|------------------------------|-------------------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|
| | Positivo ¹ /Total | Título MGT ² | Positivo/Total | Título MGT |
| 1 | 16/17 (94%) | 23,5 | 15/17 (88%) | 47,1 | 17/17 (100%) | 62,6 | 17/17 (100%) | 94,2 | 17/17 (100%) | 70,8 |
| 2 | 14/17 (82%) | 18,4 | 17/17 (100%) | 47,1 | 17/17 (100%) | 53,2 | 16/16 (100%) | 113,1 | 16/16 (100%) | 118,1 |
| 3 | 15/17 (88%) | 17,7 | 16/17 (94%) | 24,5 | 16/17 (94%) | 28,9 | 17/17 (100%) | 38,4 | 16/17 (94%) | 47,1 |
| 4 | 14/17 (82%) | 23,5 | 16/17 (94%) | 28,9 | 15/17 (88%) | 23,5 | 13/17 (76%) | 23,2 | 14/17 (82%) | 28,9 |
| 5 | 16/17 (94%) | 35,4 | 16/17 (94%) | 32,6 | 15/17 (88%) | 25,5 | 14/17 (82%) | 21,4 | 13/17 (76%) | 28,5 |
| 6 | 11/17 (65%) | 11,0 | 11/17 (65%) | 11,6 | 12/17 (71%) | 9,5 | 10/17 (59%) | 13,9 | 10/16 (63%) | 10,9 |
| 7 | N/A ³ | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | 17/17 (100%) | 294,9 | 17/17 (100%) | 461,9 |
| 8 | 0/10 (0%) | N/A | 0/10 (0%) | N/A | 0/10 (0%) | N/A | 0/10 (0%) | N/A | 0/10 (0%) | N/A |

Positivo¹ = Los títulos HI iguales o mayores de 10 se consideraron positivos.

Título MGT² = Medio geométrica del Título

N/A³ = No aplicable

Tabla 4. Grupos de tratamiento para la segunda evaluación serológica

| Núm. de Grupo | Grupo de Tratamiento | Promotores | Edad de vacunación | Dosis de Vacuna (ufp ¹) | Ruta de Vacuna | Núm. de pollos |
|---------------|----------------------|------------------------|----------------------|-------------------------------------|-----------------|----------------|
| 1 | rHVT/CMVH5Wis68 | CMV (Ex ²) | embriones de 18 días | 980 | In ovo | 18 |
| 2 | rHVT/CMVH5Wis68 | CMV (Ex) | Un día de edad | 695 | SQ ³ | 10 |
| 3 | rHVT/BacH5Wis68 | Bac (EC ⁴) | Un día de edad | 1155 | SQ | 10 |
| 4 | Controles negativos | N/A ⁵ | N/A | Ninguno | N/A | 10 |

ufp¹ = Unidades formadoras de placa

Ex² = Ejemplo

SQ³ = Subcutánea

EC⁴ = Ejemplo comparativo

N/A⁵ = No aplicable

Tabla 5. Títulos de HI para la segunda evaluación serológica

| Núm. de Grupo | 2 semanas | | 3 semanas | | 4 semanas | | 5 semanas | | 6 semanas | | 7 semanas | |
|---------------|------------------------------|-------------------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|
| | Positivo ¹ /Total | Título MGT ² | Positivo/ Total | Título MGT |
| 1 | 12/18 (67%) | 8,3 | 18/18 (100%) | 66,0 | 18/18 (100%) | 83,1 | 18/18 (100%) | 148,1 | 18/18 (100%) | 201,6 | 18/18 (100%) | 179,6 |
| 2 | 9/10 (90%) | 17,0 | 10/10 (100%) | 105,6 | 10/10 (100%) | 171,5 | 10/10 (100%) | 91,9 | 10/10 (100%) | 105,6 | 10/10 (100%) | 80,0 |
| 3 | 7/10 (70%) | 7,1 | 10/10 (100%) | 45,9 | 10/10 (100%) | 65,0 | 10/10 (100%) | 211,1 | 10/10 (100%) | 60,6 | 10/10 (100%) | 49,2 |
| 4 | 0/10 (0%) | N/A ³ | 0/10 (0%) | N/A |

Positivo¹ = Los títulos de HI iguales o mayores de 10 se consideraron positivo.
Título MGT² = Media Geométrica del Título
N/A³ = No aplicable

Tabla 6. Grupos de tratamiento para la prueba de eficacia contra el virus de la influenza aviar altamente patógeno

| Núm. de Grupo | Grupo de Tratamiento | Promotores | Edad de vacunación | Dosis de vacuna (ufp ¹) | Ruta de vacuna | Núm. de pollos |
|---------------|----------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------------------|-----------------|----------------|
| 1 | rHVT/CMVH5Wis68 | CMV (Ex ²); | Un día de edad | 1075 | SQ ³ | 20 |
| 2 | rHVT/BacH5Wis68 | Bac (EC ⁴) | Un día de edad | 1080 | SQ | 20 |
| 3 | Controles de la exposición | N/A ⁵ | N/A | Ninguno | N/A | 20 |
| 4 | controles negativos | N/A | N/A | Ninguno | N/A | 5 |

ufp¹ = Unidades formadoras de placa
Ex² = Ejemplo
SQ³ = Subcutánea
EC⁴ = Ejemplo comparativo
N/A⁵ = No aplicable

Tabla 7. Protección de HVT recombinante contra el virus de la influenza aviar altamente patogénico

| Núm. de Grupo | Grupo de Tratamiento | Núm. de protegidos/total | % de protección |
|---------------|------------------------------|--------------------------|-----------------|
| 1 | rHVT/CMVH5Wis68 | 19/20 | 95% |
| 2 | rHVT/BacH5Wis68 | 13/20 | 65% |
| 3 | Controles de sensibilización | 0/10 | 0% |
| 4 | Controles negativos | 5/5 | 100% |

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Zeon Corporation Esaki, Motoyuki Jensen, Lauren Elizabeth Dorsey, Kristi M.
 <120> Herpesvirus de pavo vectorial recombinante que contiene genes de la influenza aviar.
 <130> Patente rHVT-AI
 <160> 25
 5 <170> Patent In versión 3.1
 <210> 1
 <211> 1695
 <212> ADN
 <213> Virus de Influenza A
 10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1695)
 <223> Gen de la hemaglutinina de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9)
 <400> 1
 atg gaa aga ata gtg att gcc ctt gca ata atc agc gtt gtc aaa ggt 48
 Met Glu Arg Ile Val Ile Ala Leu Ala Ile Ile Ser Val Val Lys Gly
 1 5 10 15
 gac caa atc tgc atc ggt tat cat gca aac aat tca aca aaa caa gtt 96
 Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val
 20 25 30
 gac aca atc atg gag aag aat gtg acg gtc aca cat gct caa gat ata 144
 Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45
 ctg gaa aaa gag cac aac ggg aaa ctc tgc agt ctc aaa gga gtg agg 192
 Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg
 50 55 60
 ccc ctc att ctg aag gat tgc agt gtg gct gga tgg ctt ctt ggg aac 240
 Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80
 cca atg tgt gat gag ttc cta aat gta ccg gaa tgg tca tat att gta 288
 Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95
 gag aag gac aat cca acc aat ggc tta tgt tat ccg gga gac ttc aat 336
 Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
 100 105 110
 gat tat gaa gaa ctg aag tat tta atg agc aac aca aac cat ttt gag 384
 Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His Phe Glu
 115 120 125
 aaa att caa ata atc cct agg aac tct tgg tcc aat cat gat gcc tca 432
 Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser

ES 2 399 845 T3

| 130 | 135 | 140 | |
|---|-----|-----|------|
| tca gga gtg agc tca gca tgc cca tac aat ggt aga tct tcc ttt ttc Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe 145 150 155 160 | | | 480 |
| agg aat gtg gtg tgg ttg atc aag aag agt aat gca tac cca aca ata Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Ala Tyr Pro Thr Ile 165 170 175 | | | 528 |
| aag agg acc tac aat aac acc aat gta gag gac ctt ctg ata ttg tgg Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp 180 185 190 | | | 576 |
| gga atc cat cac cct aat gat gca gcg gaa caa acg gaa ctc tat cag Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu Tyr Gln 195 200 205 | | | 624 |
| aac tcg aac act tat gtg tct gta gga aca tca aca cta aat cag agg Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg 210 215 220 | | | 672 |
| tca att cca gaa ata gct acc agg ccc aaa gtg aat gga caa agt gga Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly 225 230 235 240 | | | 720 |
| aga ata gaa ttt ttc tgg aca ata cta agg ccg aac gat gca atc agc Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser 245 250 255 | | | 768 |
| ttt gaa agt aat ggg aac ttt ata gct cct gaa tat gca tac aag ata Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile 260 265 270 | | | 816 |
| gtt aaa aag gga gat tca gca atc atg aga agc gaa ctg gag tat ggc Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu Tyr Gly 275 280 285 | | | 864 |
| aac tgt gat acc aaa tgt cag acc cca gtg ggt gct ata aat tcc agt Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser 290 295 300 | | | 912 |
| atg cct ttt cac aat gtt cat ccc ctt acc att gga gag tgt ccc aaa Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys 305 310 315 320 | | | 960 |
| tat gtc aaa tca gat aaa ctg gtc ctt gca aca gga ctg agg aac gtg Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val 325 330 335 | | | 1008 |
| cct cag aga gaa aca aga ggt ctg ttt gga gca ata gca gga ttc ata Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile 340 345 350 | | | 1056 |
| gaa ggg ggg tgg caa gga atg gta gat gga tgg tat ggt tac cat cat Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His 355 360 365 | | | 1104 |
| agc aac gag cag gga agt gga tat gct gca gac aaa gag tcc act cag Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln 370 375 380 | | | 1152 |
| aaa gca atc gac ggg atc acc aat aaa gtc aac tca atc att gac aaa Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys 385 390 395 400 | | | 1200 |

ES 2 399 845 T3

atg aac act caa ttc gaa gcc gtt ggg aaa gaa ttc aac aac tta gaa 1248
 Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu
 405 410 415

agg aga ata gaa aat ttg aat aag aaa atg gaa gat gga ttt cta gat 1296
 Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
 420 425 430

gta tgg act tac aat gca gaa ctt ctg gtg ctc atg gaa aat gaa aga 1344
 Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
 435 440 445

act ctg gat ttc cat gat tca tat gtc aag aac cta tac gat aag gtc 1392
 Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
 450 455 460

cga ctc cag ctg aga gat aat gca aaa gaa ttg ggc aat ggg tgt ttt 1440
 Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
 465 470 475 480

gag ttc tac cac aaa tgt gac aat gaa tgc atg gaa agt gtg aga aac 1488
 Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn
 485 490 495

gga acg tat gac tat cca caa tac tca gaa gaa tca agg ctg aac aga 1536
 Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg
 500 505 510

gag gaa ata gat gga gtc aaa ttg gag tca atg ggc acc tat cag ata 1584
 Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile
 515 520 525

cta tca atc tac tca aca gtg gcg agt tcc cta gca ctg gca atc atg 1632
 Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met
 530 535 540

gta gct ggt ctg tct ttt tgg atg tgc tcc aat gga tca ttg cag tgc 1680
 Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
 545 550 555 560

aga att tgc atc tag 1695
 Arg Ile Cys Ile

<210> 2
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> Virus de Influenza A
 <400> 2

5

Met Glu Arg Ile Val Ile Ala Leu Ala Ile Ile Ser Val Val Lys Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val
 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45

Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg
 50 55 60

10

ES 2 399 845 T3

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80
 Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95
 Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
 100 105 110
 Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His Phe Glu
 115 120 125
 Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser
 130 135 140
 Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160
 Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Ala Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175
 Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp
 180 185 190
 Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu Tyr Gln
 195 200 205
 Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220
 Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240
 Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser
 245 250 255
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285
 Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300
 Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320

ES 2 399 845 T3

Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val
 325 330 335
 Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
 340 345 350
 Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
 355 360 365
 Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
 370 375 380
 Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
 385 390 395
 Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu
 405 410 415
 Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
 420 425 430
 Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
 435 440 445
 Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
 450 455 460
 Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
 465 470 475 480
 Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn
 485 490 495
 Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg
 500 505 510
 Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile
 515 520 525
 Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met
 530 535 540
 Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
 545 550 555 560
 Arg Ile Cys Ile

<210> 3

<211> 587

5 <212> ADN

<213> Citomegalovirus

<220>

<221> promotor

<222> (1)..(587)

10 <223> promotor temprano inmediato de Citomegalovirus

ES 2 399 845 T3

<400> 3

```

agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc      60
gttacataac ttacggtaaa tggcccgcg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga      120
cgtcaataat gacgtatggt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat      180
gggtggagta tttacggtaa actgcccatt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaaag      240
tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcgcgcc tggcattatg cccagtacat      300
gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattacat      360
ggtgatgctg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt      420
tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga      480
ctttcaaaa tgtcgtaaca actccgccc attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg      540
gtgggaggtc tatataagca gagctggttt agtgaaccgt cagatcc                      587

```

5

<210> 4

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> cebador sintético para ADN para PCR

<400> 4

tgacggatcc atggaagaa tagtgattg 29

<210> 5

15

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador sintético para ADN para PCR

20

<400> 5

ctgacagtgc acctagatgc aaattctgc 29

<210> 6

<211> 17

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> cebador sintético para ADN para PCR

<400> 6

gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 7

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35

<223> cebador sintético ADN para PCR

<400> 7

ggaacagct atgaccatg 19

<210> 8

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

40

<220>

<223> cebador sintético ADN para PCR

<400> 8

45

ctggacaata ctaaggccga acgat 25

<210> 9

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

50

<220>

<223> cebador sintético para ADN para PCR

ES 2 399 845 T3

| | | |
|----|--|----|
| | <400> 9 cactggggtc tgacattgg ta | 22 |
| 5 | <210> 10 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| 10 | <400> 10 gggctgcaga gttattaata gtaatcaatt | 30 |
| 15 | <210> 11 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| 20 | <400> 11 cgcgccattt accgcattg acgtc | 25 |
| 25 | <210> 12 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| 30 | <400> 12 gggtcgttgg gcggtcagcc ggcgg | 25 |
| 35 | <210> 13 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| 40 | <400> 13 cttacggtaa atggcccgcc ggctg | 25 |
| 45 | <210> 14 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| 50 | <400> 14 tacactgat gtactccaa tgggc | 25 |
| 55 | <210> 15 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| 60 | <400> 15 tatttacggt aaactgccca ttggc | 25 |
| 65 | <210> 16 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial | |

ES 2 399 845 T3

| | | |
|----|--|----|
| | <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| 5 | <400> 16 acgtcaatga cggtaatgg cgcgctggc | 30 |
| 10 | <210> 17 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial | |
| 15 | <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| | <400> 17 cgtctagagg atctgacggt tcactaaacc | 30 |
| 20 | <210> 18 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial | |
| 25 | <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| | <400> 18 tgtgtaccg tcgacgattc acagtccaa ggc | 33 |
| 30 | <210> 19 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial | |
| 35 | <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| 40 | <400> 19 cttggcctta ttggcctaag atacattgat gag | 33 |
| 45 | <210> 20 <211> 39 <212> ADN <213> Artificial | |
| 50 | <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| | <400> 20 cagtgtcgct gcagctcagt gcatgcacgc tcattgccc | 39 |
| 55 | <210> 21 <211> 49 <212> ADN <213> Artificial | |
| 60 | <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| | <400> 21 gctctagagg cgtggagctt gggggctgcg gaggaacaga gaaggggaag | 49 |
| 65 | <210> 22 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial | |

ES 2 399 845 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| 5 | <400> 22 gggggtggca aggaatg | 17 |
| 10 | <210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial | |
| 15 | <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| | <400> 23 gctaggggaac tcgccactgt | 20 |
| 20 | <210> 24 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial | |
| 25 | <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| | <400> 24 tagcggcacg gaaacagata gaga | 24 |
| 30 | <210> 25 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial | |
| 35 | <220> <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| 40 | <400> 25 tggcgatacg gttcctggtt tgac | 24 |

LISTA DE SECUENCIAS TEXTO LIBRE

| | | |
|----|--|--|
| 45 | <210> 1 <223> Gen de la Hematoglutina de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) | |
| | <210> 3 <223> promotor temprano inmediato de Citomegalovirus | |
| 50 | <210> 4 <223> cebador sintético para ADN para PCR | |
| 55 | <210> 5 <223> cebador sintético para ADN para PCR <210> 6 <223> cebador sintético para ADN para PCR | |
| 60 | <210> 7 <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| | <210> 8 <223> cebador sintético ADN para PCR | |
| 65 | <210> 9 <223> cebador sintético ADN para PCR | |

- <210> 10
<223> cebador sintético ADN para PCR
- 5 <210> 11
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- 10 <210> 12
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- 15 <210> 13
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- 20 <210> 14
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- 25 <210> 15
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- 30 <210> 16
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- 35 <210> 17
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- 40 <210> 18
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- 45 <210> 19
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- <210> 20
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- <210> 21
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- <210> 22
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- <210> 23
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- <210> 24
 <223> cebador sintético ADN para PCR
- <210> 25
 <223> cebador sintético ADN para PCR

REIVINDICACIONES

1. Un herpesvirus de pavo recombinante que comprende un gen de la hemaglutinina del virus de la influenza aviar y el promotor temprano inmediato de citomegalovirus, en donde dicho gen de la hemaglutinina está bajo el control de dicho promotor.
- 5 2. Un herpesvirus de pavo recombinante como en la reivindicación 1, en donde dicho gen de la hemaglutinina y dicho promotor están presentes en una región no esencial del genoma del herpesvirus de pavo.
3. Un herpesvirus de pavo recombinante como en la reivindicación 2, en donde dicha región no esencial es entre UL45 y UL46 del genoma del herpesvirus de pavo.
- 10 4. Un herpesvirus de pavo recombinante como en la reivindicación 1, en donde dicho virus de la influenza aviar es el subtipo H5.
5. Un herpesvirus de pavo recombinante como en la reivindicación 1, en donde dicho virus de la influenza aviar es la cepa A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9).
6. Un herpesvirus de pavo recombinante como en la reivindicación 1, en donde una secuencia de nucleótidos de dicho gen de la hemaglutinina se muestra en SEQ ID NO: 1.
- 15 7. Una vacuna que comprende un herpesvirus de pavo recombinante como en la reivindicación 1.
8. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, capaz de inducir títulos de inhibición de la hemaglutinación.
9. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende adicionalmente un coadyuvante y/o un tampón.
10. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde los pollos desarrollan títulos de inhibición de la hemaglutinación de más de 50 (media geométrica del título) durante cinco semanas después de la vacunación.
- 20 11. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde dichos títulos de inhibición de la hemaglutinación son las diluciones más altas de sueros que muestran inhibición de la hemaglutinación cuando se utilizan cuatro unidades de hemaglutinación de un antígeno homólogo del virus de influenza aviar inactivado.
12. Una vacuna que comprende el herpesvirus de pavo recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 para la vacunación contra la influenza aviar.
- 25 13. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 12 para la vacunación contra la influenza aviar de volatería.
14. Una vacuna combinada que comprende el herpesvirus de pavo recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene adicionalmente otros virus recombinantes y/o no recombinantes.
15. Una vacuna que comprende el herpesvirus de pavo recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que puede ser monovalente o bivalente.
- 30 16. Un vector de homología para producir un herpesvirus de pavo recombinante de la reivindicación 1, que comprende el gen de la hemaglutinina de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) y el promotor de CMV.
17. Un herpesvirus de pavo recombinante como en la reivindicación 1, capaz de inducir una respuesta serológica que es detectada mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación, en comparación con los kits de ELISA de diagnóstico.

Fig.1

Construcción del plásmido pGICMVpA

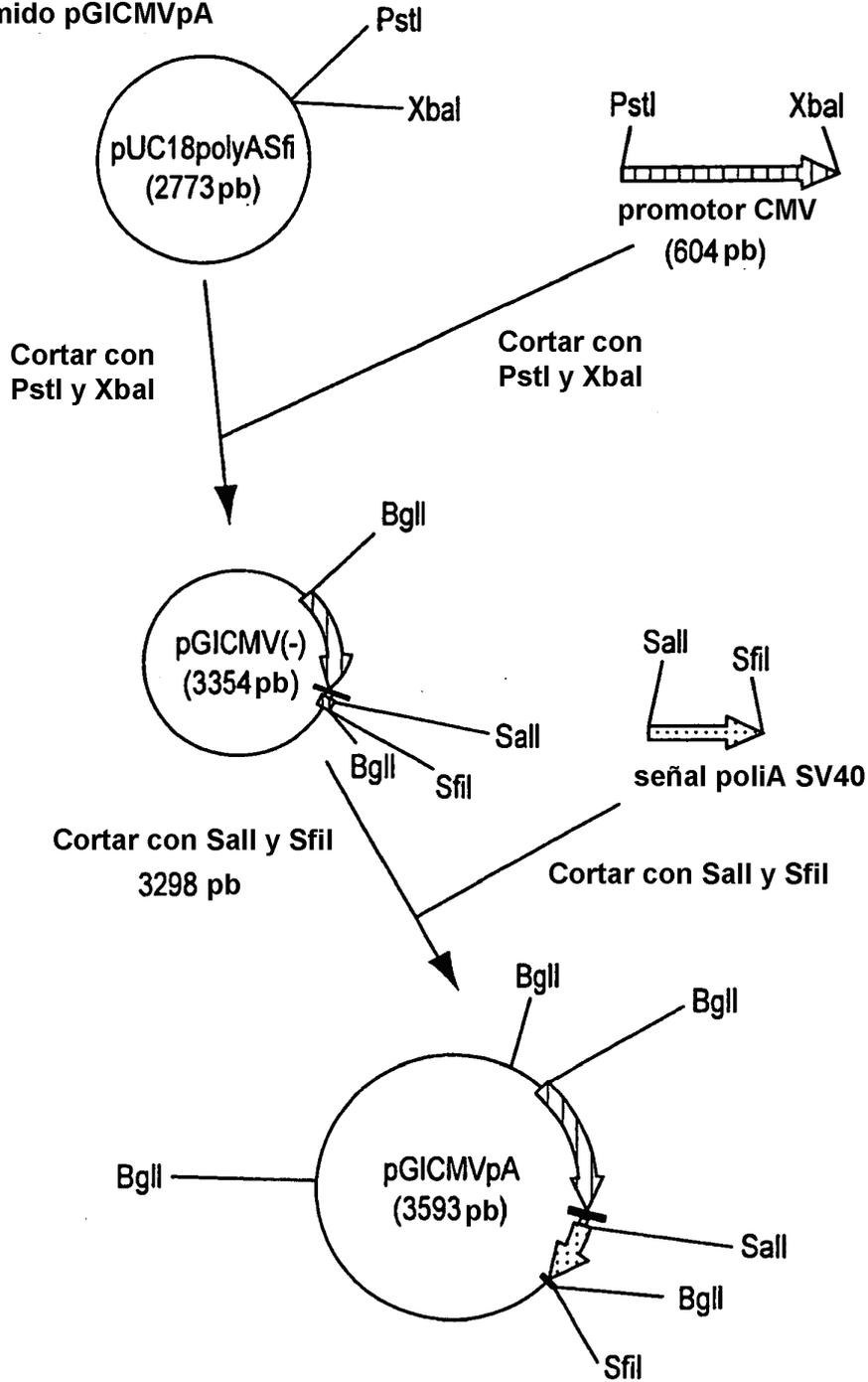


Fig.2

Construcción del plásmido p45CMVH5Wis68

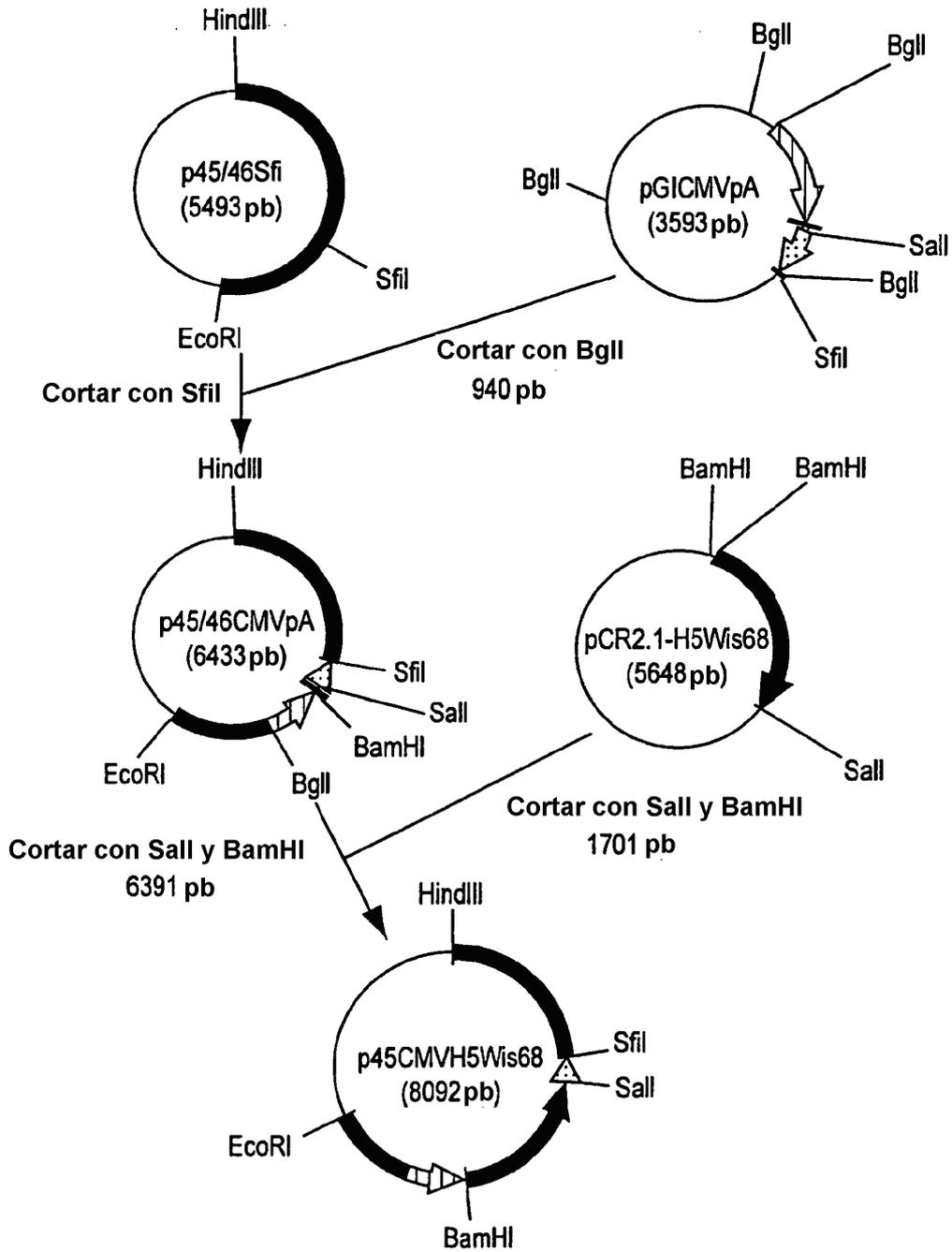


Fig.3

**Construcción del
plásmido pGIBacA2nd**

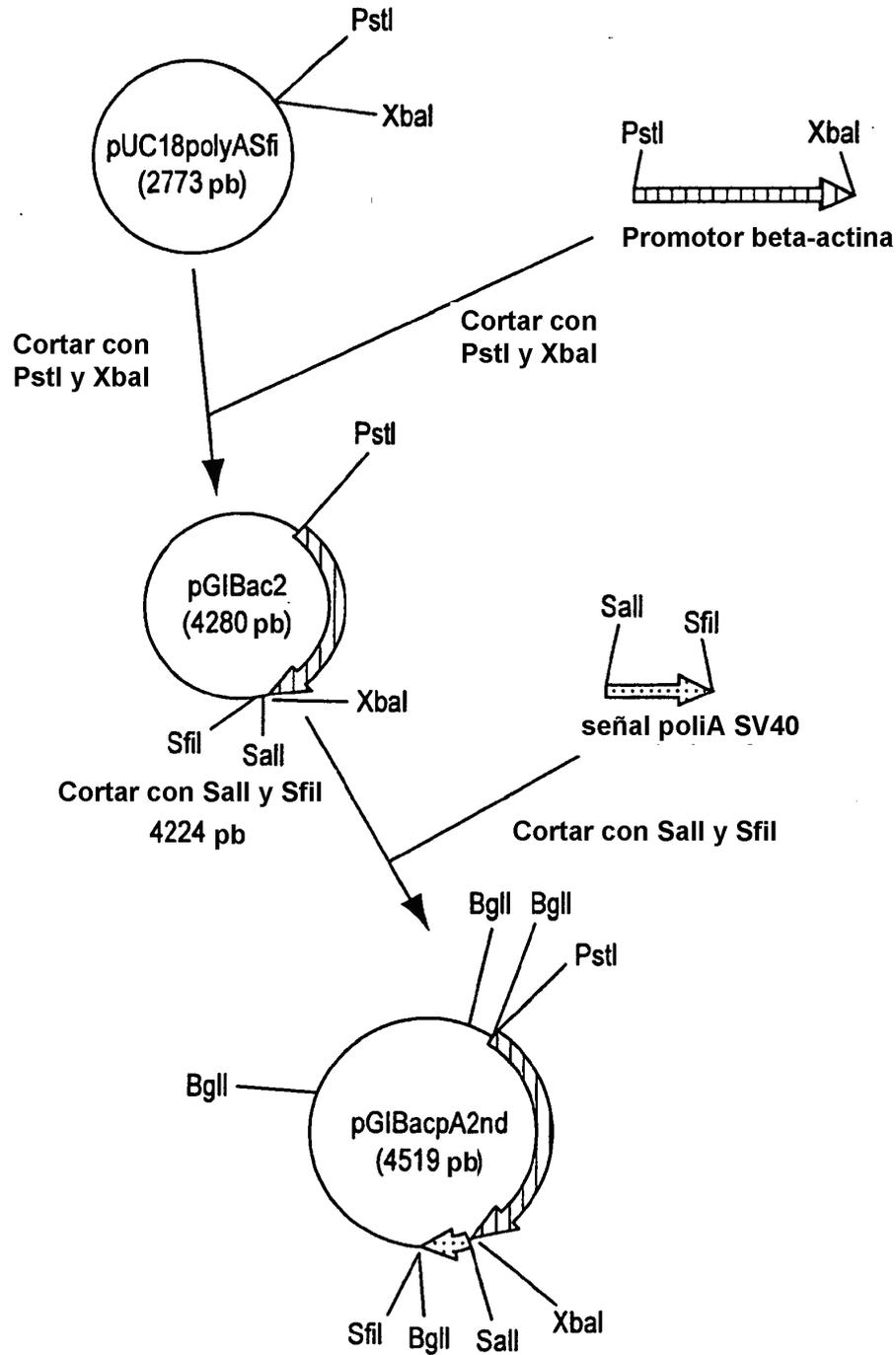


Fig.4

Construcción del plásmido p45BachH5Wis68

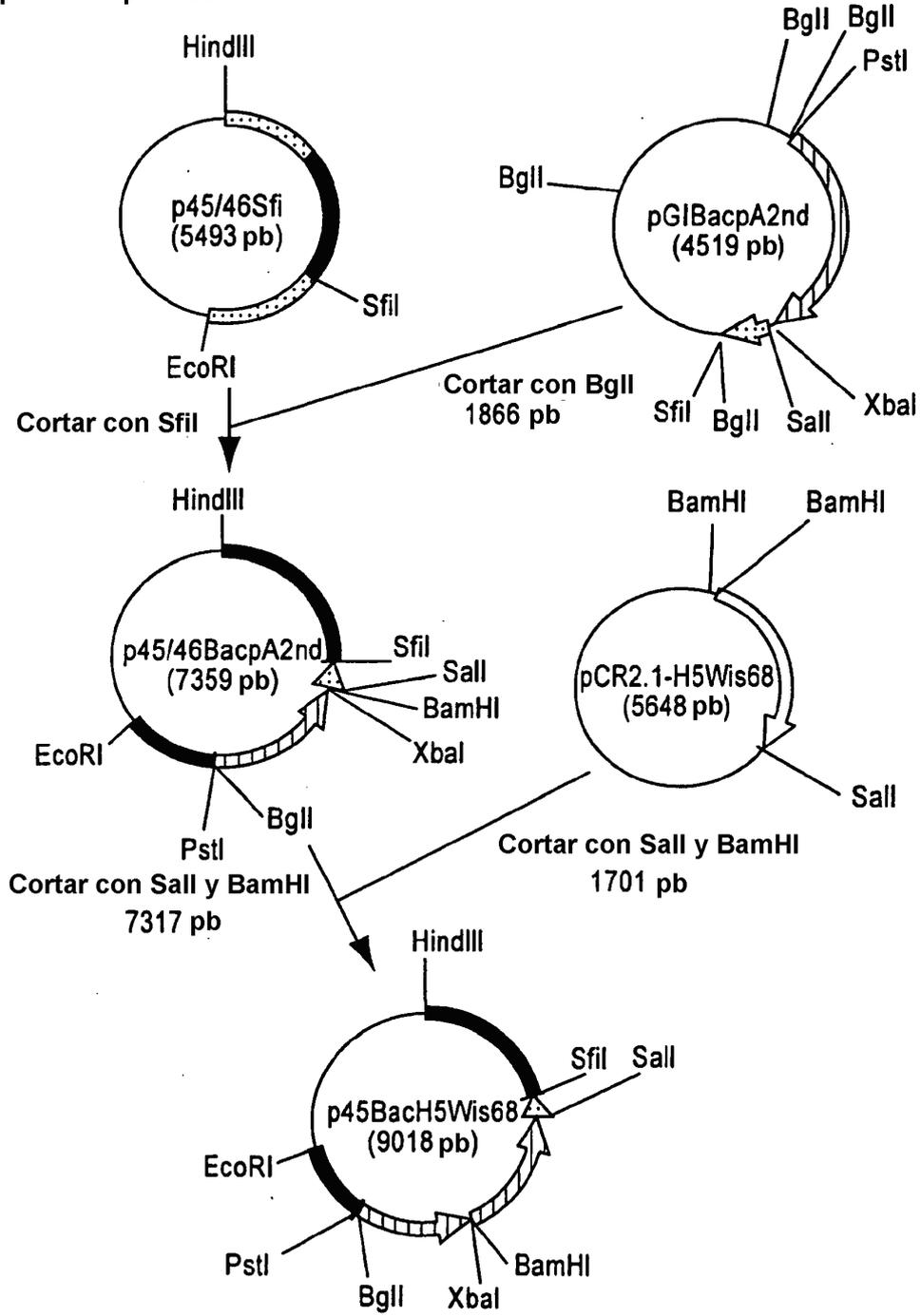


Fig.5

**Construcción del
plásmido p45PecH5Wis68**

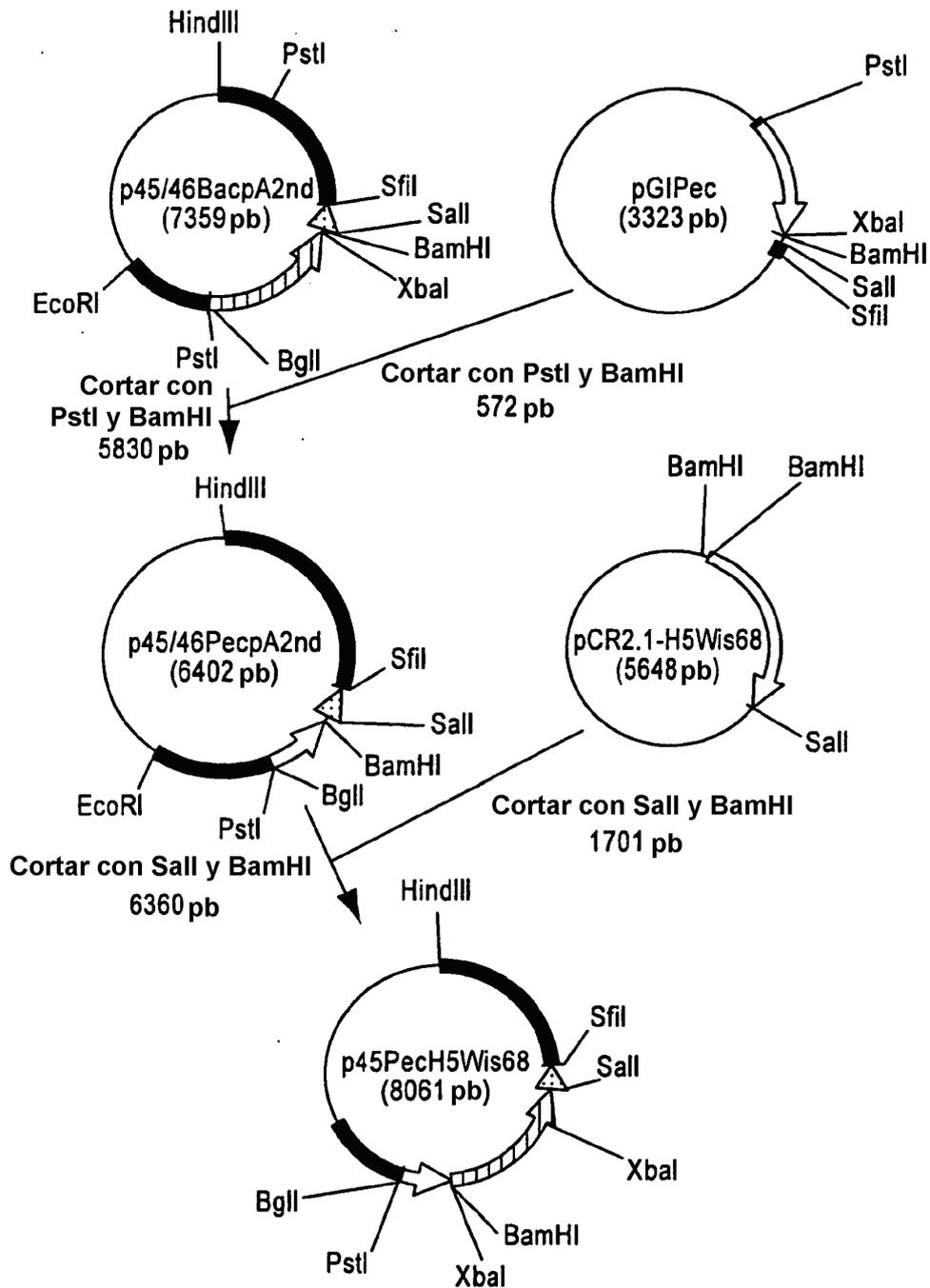


Fig.6

Análisis de transferencia Western que detecta la expresión de la hemaglutinina por el herpesvirus de pavo recombinante. Calle 1 = Precisión Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad Laboratories, Núm. Cat. 161-0373); Calle 2 = control CEF; Calle 3 = cepa parental FC126 de HVT; Calle 4 = HVT recombinante con gen de hemaglutinina. Una flecha indica la proteína hemaglutinina con un peso molecular de 74 kilodalton.

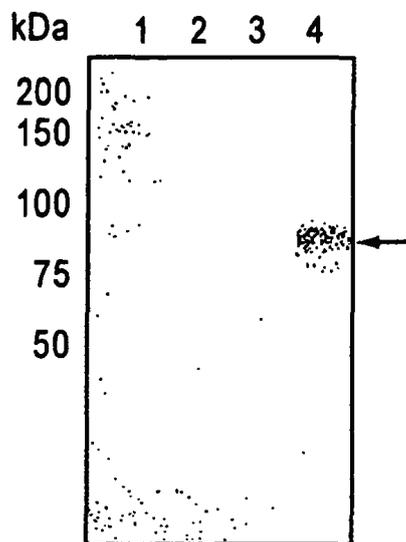
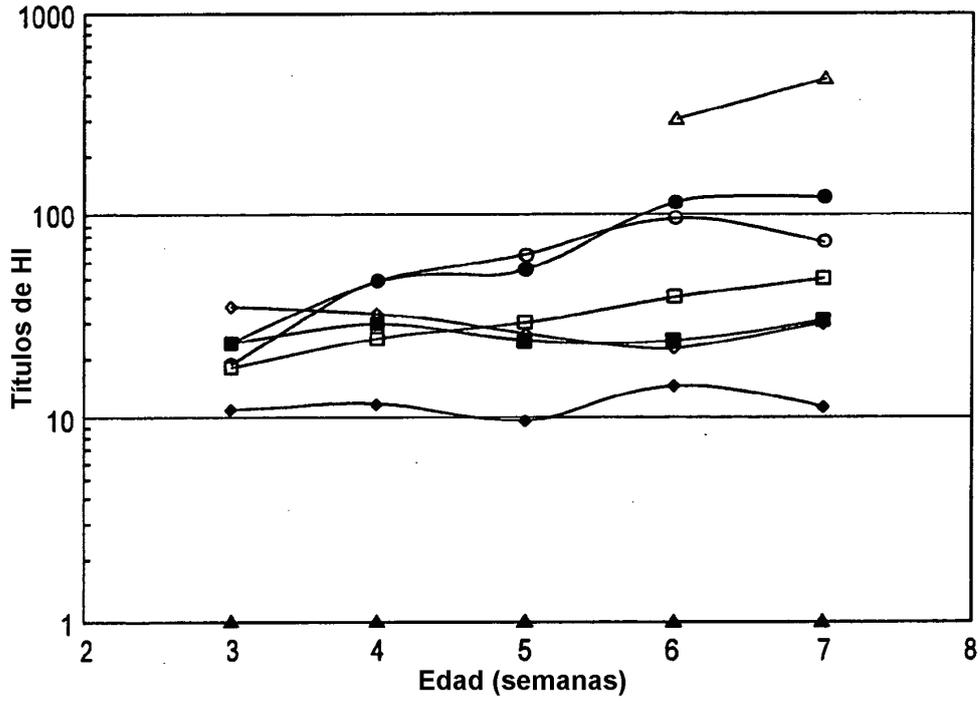


Fig.7

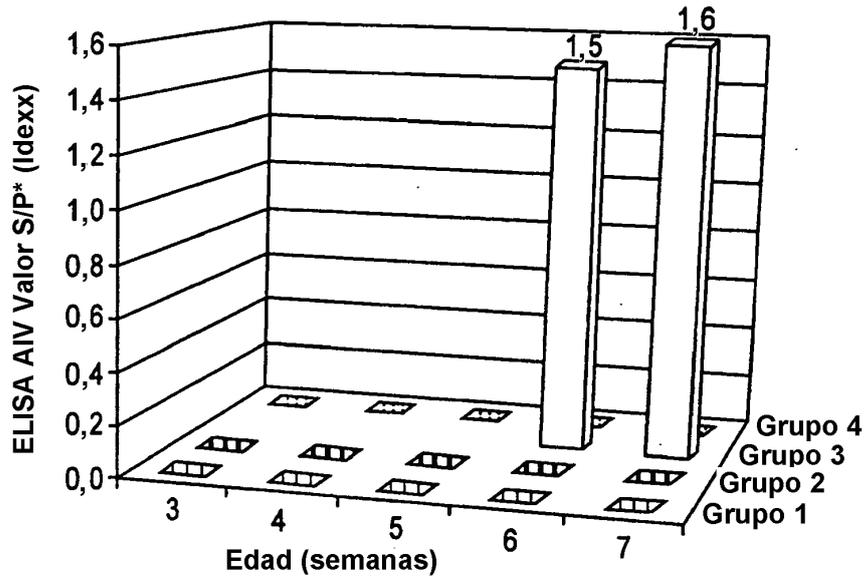
Títulos de inhibición de hemaglutinación en pollos vacunados con el herpesvirus de pavo recombinante con gen de hemaglutinina



- Grupo 1 rHVT/CMVH5Wis68 1638 ufp
- Grupo 2 rHVT/CMVH5Wis68 375 ufp
- Grupo 3 rHVT/PechH5Wis68 2800 ufp
- Grupo 4 rHVT/PechH5Wis68 550 ufp
- ◇ Grupo 5 rHVT/BachH5Wis68 4350 ufp
- ◆ Grupo 6 rHVT/BachH5Wis68 750 ufp
- △ Grupo 7 virus muerto AI H5N9 (3 semanas de edad)
- ▲ Grupo 8 Controles No Vacunados

Fig.8

Titulos ELISA en pollos vacunados con el herpesvirus de pavo recombinante con gen de hemaglutinina utilizando un kit de ELISA asequible comercialmente (Idexx Laboratories, Flockcheck AIV)

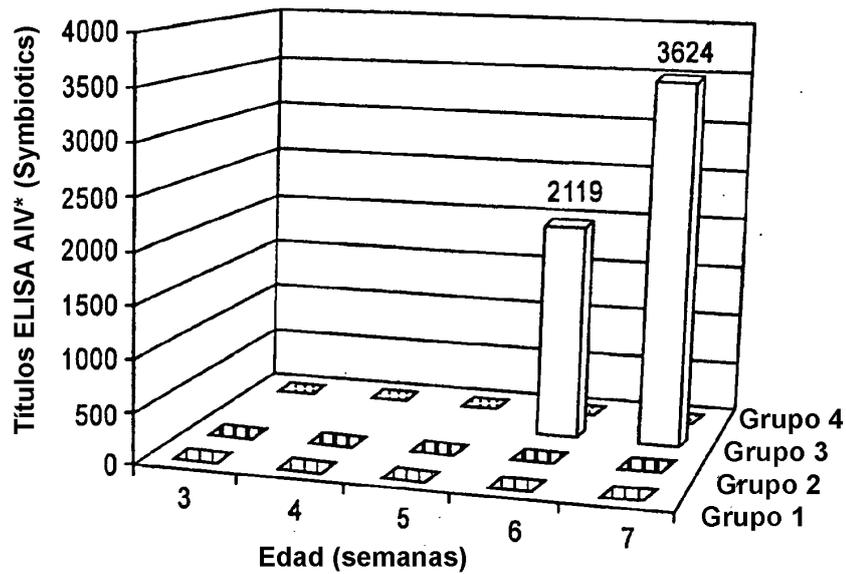


Valor S/P* = Los valores S/P iguales o mayores de 0,5 se consideran positivos.

- Grupo 1** rHVT/CMVH5Wis68 1638 ufp
- Grupo 2** rHVT/CMVH5Wis68 375 ufp
- Grupo 3** virus muerto AI H5N9 (3 semanas de edad)
- Grupo 4** Controles No Vacunados

Fig.9

Títulos ELISA en pollos vacunados con el herpesvirus de pavo recombinante con gen de hemaglutinina utilizando un kit de ELISA comercial (Synbiotics, kit de ensayo ProFlock AIV Ab)

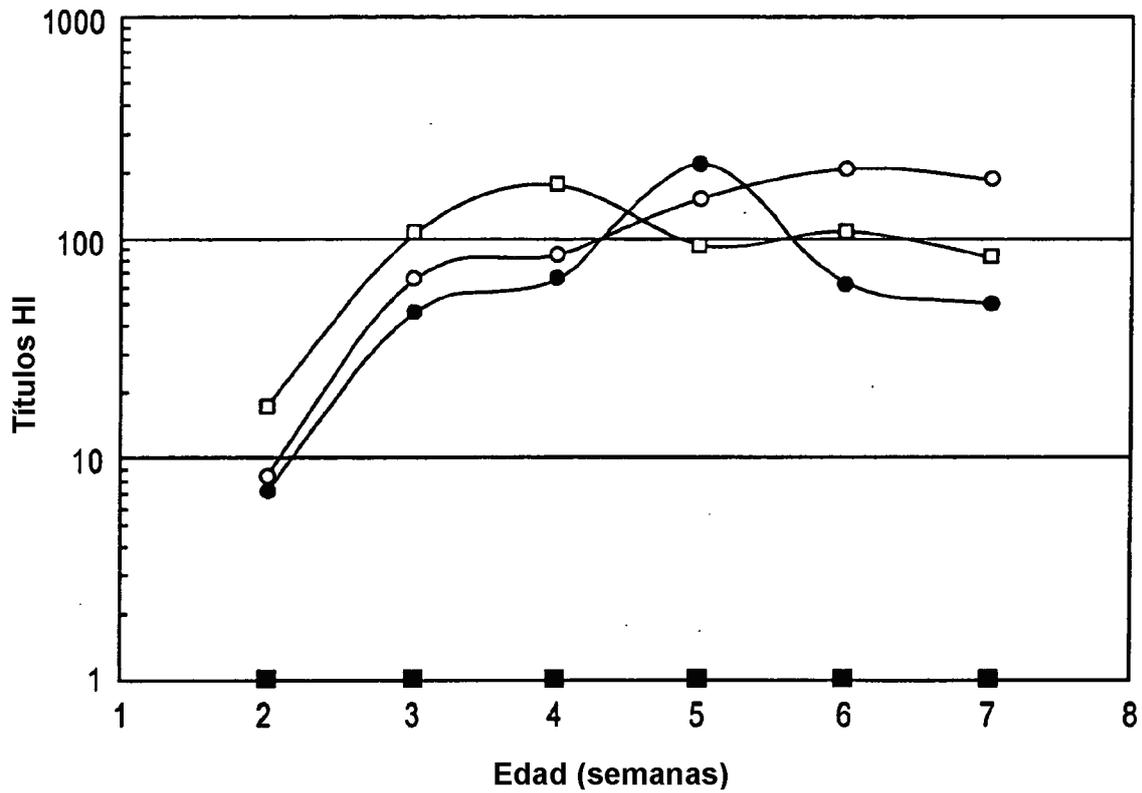


Títulos ELISA* = Los títulos ELISA iguales o mayores de 570 se consideran positivos

- Grupo 1 rHVT/CMVH5Wis68 1638 ufp
- Grupo 2 rHVT/CMVH5Wis68 375 ufp
- Grupo 3 virus muerto AI H5N9 (3 semanas de edad)
- Grupo 4 Controles No Vacunados

Fig.10

Títulos de inhibición de hemaglutinación en pollos vacunados con el herpesvirus de pavo recombinante con gen de hemaglutinina (segunda prueba)



- Grupo 1 rHVT/CMVH5Wis68 in ovo
- Grupo 2 rHVT/CMVH5Wis68 subcutáneo
- Grupo 3 rHVT/BacH5Wis68 subcutáneo
- Grupo 4 Controles No Vacunados