

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 019**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

C07K 14/11 (2006.01)

C12N 15/869 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2011** **PCT/EP2011/068073**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012** **WO12052384**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2011** **E 11771123 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017** **EP 2629794**

54 Título: **Vacuna con vector del herpesvirus de pavo contra la gripe aviar en aves de corral**

30 Prioridad:

28.10.2010 US 407724 P

18.10.2010 EP 10187948

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.10.2017

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)

Wim de Körverstraat 35

5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

SONDERMEIJER, PAULUS JACOBUS ANTONIUS

y

VERSTEGEN, IWAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 635 019 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

Vacuna con vector del herpesvirus de pavo contra la gripe aviar en aves de corral

- 5 La presente solicitud se aplica al campo de las vacunas veterinarias, en particular de vacunas para aves de corral contra la gripe aviar. La vacuna se basa en un vector vírico recombinante que expresa la proteína hemaglutinina de un virus de gripe aviar, en el que el vector es herpesvirus de pavo (HVT) y el gen de la hemaglutinina está conducido por un promotor génico de glucoproteína B de un herpesvirus de mamífero. Puede usarse una vacuna que comprende este vector de HVT+HA para inducir una respuesta inmunitaria protectora contra gripe aviar en aves de corral, y para reducir la propagación de VGA. La invención también se refiere a métodos, usos y vacunas que implican el vector de HVT+HA.

- 15 El herpesvirus de pavo (HVT) se describió alrededor de 1970 como un herpesvirus que infecta pavos y que tiene elementos antigénicos en común con el virus de la enfermedad de Marek (VEM). Mientras que VEM es altamente patógeno para pollos, HVT es apatógeno para pollos y podría usarse para vacunación eficaz contra infección y enfermedad provocada por VEM (Okazaki *et al.*, 1970, Avian Diseases, vol. 14, p. 413-429). Desde entonces, la vacunación de pollos contra VEM usando HVT se ha convertido en parte del programa de vacunación convencional de miles de millones de pollos producidos en todo el mundo cada año. Fue muy útil a este respecto el hallazgo de que el HVT, a diferencia del VEM, puede purificarse a partir de las células hospedadoras en las que se produjo, por ejemplo por ultrasonidos, y puede comercializarse como una vacuna estable y liofilizada.

- 25 El HVT se replica en los linfocitos de aves, en particular en los linfocitos de sangre periférica (PBL), por lo tanto es un virus sistémico. Induce una respuesta inmunitaria de larga duración, que se dirige principalmente al sistema inmunitario celular, no al humoral.

- 30 Las vacunas de HVT pueden aplicarse a pollos en una edad temprana, que es un resultado combinado de la naturaleza apatógena del HVT, así como su insensibilidad relativa a anticuerpos derivados por vía materna contra VEM o HVT. En consecuencia, las vacunas de HVT pueden inocularse en polluelos el día de la eclosión del huevo (día uno), o incluso antes de la eclosión, cuando aún están en el huevo. Este último enfoque, vacunación en el huevo, se aplica habitualmente el día 18 del desarrollo embrionario (DE), que es aproximadamente 3 días antes de la eclosión.

- 35 El HVT se clasifica en la actualidad en la subfamilia de alphaherpesvirinae, y también se conoce como: herpesvirus meleágrido 1, herpesvirus de pavo o virus de enfermedad de Marek de serotipo 3.

- 40 El virión del HVT tiene todos los elementos de un herpesvirus típico, y es de aproximadamente 160 nm de tamaño en su forma con envoltura. Dentro de la cápsida comprende un genoma grande de ADN bicatenario lineal. La secuencia completa de genoma vírico de aproximadamente 159 kb se conoce desde 2001 (número de referencia de Genbank AF291866).

- 45 Sin embargo, mucho antes de esto, se había estudiado y manipulado el genoma del HVT, particularmente sus propiedades apatógenas han conducido a investigación sobre el uso del HVT como un vector vírico para expresión y suministro de diversas proteínas a un pollo hospedador que se ha inoculado con el HVT recombinante. Son ejemplos la expresión de genes que codifican antígenos de otros patógenos de aves de corral tales como: virus de bursitis infecciosa (VBI) (Darteil *et al.*, 1995, Virology, vol. 211, p. 481-490) y virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) (Sondermeijer *et al.*, 1993, Vaccine, vol. 11, p. 349-358). Sin embargo también se ha descrito la expresión de un antígeno parasitario (Cronenberg *et al.*, 1999, Acta Virol., vol. 43, p. 192-197), o de una citocina, para manipular la respuesta inmunitaria del pollo (documento WO 2009/156.367; Tarpey *et al.*, 2007, Vaccine, vol. 25, p. 8529-8535).

- 50 Se han investigado muchas localizaciones para inserción del gen heterólogo en el genoma del HVT en loci no esenciales adecuados, por ejemplo, en la región corta única del genoma del HVT (documento EP 431.668); o en la región larga única (documento EP 794.257).

- 55 Se han descrito varios métodos para insertar ácidos nucleicos heterólogos en HVT: uso de recombinación homóloga (Sondermeijer *et al.*, mencionado anteriormente), regeneración de cósmidos (documento US 5.961.982) o bácmidos (cromosomas artificiales bacterianos) (Baigent *et al.*, 2006, J. of Gen. Virol., vol. 87, p. 769-776).

- 60 Para producción a gran escala se produce habitualmente HVT *in vitro*, en cultivos de células fibroblásticas de embrión de pollo (FEP). Estas son células primarias preparadas por tripsinización de embriones de pollo. Los FEP se siembran en monocapas y se infectan con el HVT. Este se replica después en estas células fibroblásticas, incluso aunque HVT *in vivo* se replica en células linfoides.

- 65 En la actualidad están disponibles varios productos de vacunas comerciales que comprenden un vector de HVT que expresa un antígeno heterólogo. Por ejemplo: el antígeno F de VEN: Innovax®-ND-SB (MSD Animal Health) y Vectormune® HVT-VEN (Ceva); el antígeno VP2 de VBI: Vaxxitek® HVT+IBD (Merial) y Vectormune® HVT-IBD

(Ceva); o antígenos de virus de laringotraqueítis infecciosa: Innovax®-ILT (MSD Animal Health).

La aplicación de dichas vacunas de vectores de HVT a aves de corral generará una respuesta inmunitaria contra el gen heterólogo expresado, así como contra HVT/VEM. Debido a la virulencia del VEM las cepas de campo han aumentado a lo largo del tiempo, una vacunación típica contra VEM en la actualidad incorpora un componente de vacuna de MVD adicional además del virus o vector de HVT, tal como una cepa de vacuna de VEM de serotipo 1 o 2, por ejemplo una cepa de VEM Rispons o VEM SB1 respectivamente.

El virus de la gripe (VG) es un ortomixovirus que es infeccioso para muchas especies de hospedadores. A partir de la partícula gripal en sí misma no es totalmente posible determinar qué tipo de hospedador se ha infectado, o se infectará en el futuro. Por lo tanto, en la práctica, un virus de la gripe que puede infectar y replicarse en una cierta especie se indica habitualmente como perteneciente a esa especie, aunque se producen regularmente infecciones cruzadas con otras especies, por ejemplo: de aves acuáticas a pollos; de pollos a cerdos, a gatos o a seres humanos; de seres humanos a caballos, etc. En consecuencia, el virus de gripe aviar (VGA) se refiere al virus que puede infectar aves. El VGA puede provocar la enfermedad: gripe aviar (GA), que también se conoce como "peste aviar" o "gripe de las aves" y es una enfermedad de notificación obligatoria en muchos países. Dependiendo del patotipo del VGA infeccioso y el estado inmunitario de las aves infectadas, la enfermedad puede variar de un resultado subclínico, a uno respiratorio leve, a uno altamente letal.

La gripe aviar en aves de corral comerciales se contrarresta habitualmente por vacunación en las áreas del mundo en las que el VGA es endémico, por ejemplo en Asia y Oriente Medio. En otras áreas, tales como Europa y Norteamérica, la vacunación está regulada por el gobierno y solamente se permite en casos de brotes, y en combinación con medidas de cuarentena y erradicación.

Son especialmente preocupantes los virus de VGA de tipo denominado altamente patógeno (AP), ya que presentan importantes riesgos zoonóticos de propagación de aves a otras especies, incluyendo seres humanos. El VGA AP posee una proteína HA que contiene un número de aminoácidos básicos en el sitio de escisión de las partes HA1 y HA2 de la proteína HA. La presencia de estos aminoácidos básicos hace que la activación de la proteína HA por escisión pueda realizarse por una proteasa que aparece también en órganos distintos del tracto respiratorio donde se replican VGA patógenos bajos. Esto da como resultado la viremia más sistémica y la gravedad de infección por VGA AP.

Un virión de gripe de tipo A, tal como VGA, comprende un genoma que consiste en ADN monocatenario de polaridad negativa, dividido en 8 segmentos, que codifica 10 proteínas. Las proteínas víricas más relevantes para fines inmunológicos son la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (N). La HA es el principal antígeno, que puede inducir una respuesta inmunitaria humoral protectora. Los VGA se clasifican por la variante de serotipo de sus proteínas HA y N: H1 - H16 y N1 - N9 se han descrito hasta la fecha. Los VGA AP son siempre del subtipo H5 o H7.

Incluso aunque una partícula gripal no está limitada a infección de una especie específica, sí parece haber una prevalencia de ciertos serotipos de VG en ciertas especies: serotipos de VG H1 y H3 en cerdos; H3 y H7 en caballos; H3 en perros; H5 en gatos; H7 y H9 en pavos; y H5, H7 y H9 en pollos.

Debido a que una respuesta inmunitaria contra la gripe es específica de serotipo, las vacunas contra la gripe generalmente coinciden con el subtipo inmunológico del VG en circulación en el campo. Las vacunas de GA comerciales comprenden VGA inactivado completo en una emulsión con aceite como adyuvante, o una cepa de vacuna de VGA atenuada viva.

No obstante, se producen cambios en el virus de campo VG a lo largo del tiempo, conocidos como "deriva genética". En la práctica, una cepa de VG que difiera de cepas existentes en más del 90 % en la identidad de secuencia de aminoácidos de su proteína HA se designará como una nueva clase antigénica, y obtendrá un nuevo número de "clado". Este fenómeno puede enfrentar a una población diana con un VG que ha cambiado más o menos su perfil inmunológico desde la última infección o vacunación. Esto puede hacer a las vacunas existentes, incluso cuando son del subtipo correcto, menos eficaces a lo largo del tiempo, lo que requiere por lo tanto una actualización del virus de vacuna. Entre otras razones, se han desarrollado vacunas de la gripe basadas en técnicas de ADN recombinante para facilitar dicha actualización. Por ejemplo una vacuna de una subunidad VG-HA que se expresa mediante el sistema de vector de expresión de baculovirus. Por medio de técnicas biológicas moleculares rutinarias, el gen de HA H5 expresado puede cambiarse por uno más reciente, cuando se requiera.

De forma similar, se han desarrollado vacunas de vectores para GA que expresan una proteína HA en el contexto de un microorganismo transportador vivo. Son ejemplos de dichos vectores virus tales como: virus de laringotraqueítis infecciosa (VLTi) (Lüschoff *et al.*, 2001, Vaccine, vol. 19, p. 4249-59); virus de la peste bovina (Walsh *et al.*, 2000, J. Virol., vol. 74, p. 10165-10175); virus de la estomatitis vesicular (Roberts *et al.*, 1998, J. Virol., vol. 247, p. 4704-4711); virus de la viruela aviar (Swayne *et al.*, 2000, Vaccine, vol. 18, p. 1088-1095); adenovirus (Toro *et al.*, 2010, Avian Diseases, vol. 54, p. 224-231) y VEN (Veits *et al.*, 2006, PNAS USA, vol. 103, p. 8197-8202).

De estos, la vacuna de VHA-H5 Trovac® basada en el vector de viruela aviar (Merial), está disponible en el

mercado.

Se pretende por supuesto que una vacuna de GA para aves de corral proteja al animal vacunado contra síntomas de la gripe aviar, y contra la reinfección en el futuro. Sin embargo, es casi igualmente relevante para una enfermedad vírica con potencial zoonótico y pandémico como VGA la capacidad de la vacuna para reducir la propagación del virus de tipo silvestre en el ambiente, por ejemplo a otros rebaños, a aves silvestres migratorias o indígenas o a otras especies animales. Puede obtenerse reducción de la propagación vírica induciendo una respuesta inmunitaria muy eficaz en el ave vacunada.

Las vacunas de GA que son vacunas de subunidades o de vector tienen la ventaja de que pueden aplicarse en un enfoque de DIVA: "diferenciación de animales infectados y vacunados", también conocido como: 'vacunas marcadoras'. Esto se aplica porque las vacunas recombinantes solamente inducen anticuerpos contra la proteína vírica expresada, no para otras proteínas víricas como aparecería en el caso de infección con un virus completo. DIVA es importante para los países o sectores económicos que desean mantener y certificar un estado libre de VGA, por ejemplo para fines de exportación.

Las vacunas actuales que se basan en VGA inactivado completo en una emulsión de aceite con adyuvante no permiten la distinción por DIVA. En el peor de los casos, las aves de corral vacunadas con dichas vacunas portarán un amplio espectro de anticuerpos contra VGA, pero si estos no son completamente protectores, las aves aún podrían ser portadores de VGA infeccioso vivo, aunque no se observaría.

Un vector vírico recombinante vivo para la expresión y suministro de un antígeno heterólogo debe ser capaz de superar varias tensiones biológicas sobre su estabilidad y eficacia: en primer lugar la capacidad de generar descendencia después de la transfección. Esto indica que el virus recombinante es viable. A continuación, la capacidad de replicarse *in vitro* en una línea celular hospedadora durante muchos ciclos manteniendo al mismo tiempo la expresión del gen heterólogo. Esto indica que el recombinante no se vio atenuado por la inserción, y el inserto se replica y expresa de forma estable. Después, la replicación y expresión *in vivo*. Esto indica que el recombinante puede superar la presión de selección significativa en un animal vivo, tal como la que presenta el sistema inmunitario. En general, la pérdida de expresión del gen ajeno favorece una replicación más rápida en el animal; dichos "mutantes de escape" tienen mutaciones adquiridas, o supresiones importantes en el gen ajeno, y crecen más que los vectores intactos. Finalmente, la replicación en el animal necesita poder generar tal respuesta inmunitaria eficaz que el animal inoculado esté protegido.

Es especialmente importante con respecto a la eficacia *in vivo*, el comportamiento de la vacuna de vector vírico en animales que ya poseen anticuerpos; contra el vector y/o el gen heterólogo que expresa. Para animales jóvenes estos anticuerpos derivan principalmente de sus madres que se han vacunado exhaustivamente contra patógenos habituales; de ahí su designación como anticuerpos derivados por vía materna (ADM). Dichos anticuerpos pueden alterar la replicación del vector y/o la expresión del gen ajeno, porque pueden estimular el sistema inmunitario de los animales para la eliminación (no pretendida) de la vacuna del vector.

Se han descrito construcciones de vectores víricos recombinantes de un vector de HVT con un inserto génico de VGA-HA: la compañía CEVA ha anunciado un producto "VECTORMUNE HVT-A1" en un sitio web (<http://www.ceva.com/en/Responsibility/Contributions>), pero no están aún disponibles detalles.

Lan *et al.* (2009, Acta Microbiologica Sinica, vol. 49, p. 78-84) describen un vector de HVT con un inserto génico de VGA-HA H5, generado usando una técnica mejorada de recombinación de bácmidos. A partir de una traducción de este artículo (que está en chino) así como de un artículo correspondiente sobre la tecnología de recombinación que se usó para VEM (Cui *et al.*, 2009, J. of Virol. Meth., vol. 156, p. 66-72), resulta evidente que Lan *et al.* construyeron su HVT recombinante por inserción de un casete de expresión en el gen Us2 de HVT; el casete de expresión contenía un gen de H5 HA de VGA bajo el control del promotor de gen temprano inmediato de citomegalovirus humano (IE-hCMV). El casete contiene elementos adicionales necesarios para el proceso de clonación y selección. El artículo de Lan *et al.* solamente describe la clonación y el rescate de un recombinante de HVT+H5; no se indica ningún ensayo animal, ni ningún dato de eficacia o estabilidad a partir de ensayos *in vitro* o *in vivo*.

Como alternativa, Zhou *et al.* (2010, Vaccine, vol. 28, p. 3990-3996) menciona el uso de un promotor de gB para la expresión de VP2 de VBI, a partir del locus Us10 de MDV1. Notablemente este elemento se menciona brevemente en el resumen, pero el resto del artículo describe la construcción y el uso de un vector de MDV1 que expresa lacZ y VP2 conducido por el promotor hCMV-IE a partir del locus Us2.

Sonoda *et al.* (2000, J. of Virol., vol. 74, p. 3217-3226) describen el uso de un promotor génico de gB de MDV1 para conducir la expresión de un gen F de VEN, a partir del locus Us10 de MDV1.

Takekoshi *et al.* (1998, Tokai J. Exp. Clin. Med., vol. 23, p. 39-44) describen el uso de un promotor génico de gB a partir de hCMV para la expresión de genes heterólogos en hCMV.

El documento US2008/0241188 describe el uso del promotor génico de IE de CMV para conducir un gen de HA de

VGA en un vector de HVT.

El documento WO2007/022151 describe el uso de un promotor génico temprano de hCMV para conducir un gen de HA de VGA en un vector de adenovirus humano.

5 El documento WO01/05988 describe el uso del promotor génico de IE de mCMV y el promotor de SV40 para conducir genes de virus de leucosis aviar en un vector de HVT.

10 Sonoda *et al.* (J. of Virol., vol. 74, p. 3217) describen el uso del promotor génico de gB de MDV1 para conducir el gen de F de VEN en un vector de MDV1.

El documento WO2010/119112 describe (en los ejemplos 23-25) el uso de un promotor génico de IE de CMV para conducir la expresión de un gen de HA de tipo H5 de VGA en el contexto de un vector de HVT.

15 Es un objetivo de la presente invención generar una vacuna de GA basada en un vector de HVT; la vacuna de vector debería inducir una protección inmunitaria eficaz contra infección y enfermedad provocada por VGA en aves de corral.

20 El principal requisito de dicho producto de vacuna de vector inmunológica y económicamente factible es que sea estable, tanto en replicación del vector como en la expresión del gen heterólogo insertado. Esta combinación permite los ciclos extensivos de replicación *in vitro* que son necesarios para producción a gran escala, así como la expresión y presentación continuada al sistema inmunitario del hospedador del gen ajeno insertado, cuando la vacuna de vector se replica en un animal hospedador inoculado. Además, la estabilidad permitirá que la vacuna del vector cumpla los estándares muy altos de seguridad y estabilidad biológica que debe cumplir un virus recombinante que se va a introducir en el campo, para obtener una autorización de comercialización de autoridades gubernamentales nacionales.

25 Los inventores se sorprendieron al descubrir que los promotores que se habían usado en la técnica anterior para conducir la expresión de genes heterólogos en HVT, no podían usarse para la expresión de un vector de HA de VGA en el contexto de un vector de HVT.

30 Se ensayaron varios promotores: un promotor de repetición terminal larga del virus de sarcoma de Rous (LTR de VSR) (como se describe en el documento EP 431.668: pRSVcat derivado (Gorman *et al.*, 1982, PNAS USA, vol. 79, p. 6777-6781)); y un promotor génico de IE de hCMV (derivado de pI17: Cox *et al.*, 2002, Scand. J. Immunol., vol. 55, p. 14-23), para conducir la expresión de un gen de HA H5 de VGA, en el locus Us10 del genoma de HVT. El vector con el promotor de IE de hCMV produjo placas después de la transfección, sin embargo estas no pudieron amplificarse durante varios ciclos; el vector de HVT con promotor de LTR produjo placas que pudieron amplificarse, sin embargo estas solamente mostraron expresión de HA muy débil, y cuando se ensayaron en animales como virus recombinante HVP142, no proporcionaron un efecto protector significativo en un periodo de 2-3 (véanse los Ejemplos).

35 En esta situación, era totalmente inesperado que un promotor génico de gB de un herpesvirus de mamífero, que no se había descrito antes para la conducción de expresión de genes heterólogos en HVT, ni para la expresión de un gen de HA de VGA, podría usarse para construir una vacuna de vector de HVT que expresara un inserto génico de HA de VGA, que mostraba provechosamente estabilidad en replicación de vector y eficacia inmunológica en la expresión de genes ajenos.

40 Sin desear quedar ligado a la teoría, los inventores especulan que el promotor génico de gB de un herpesvirus de mamífero, cuando se usa para la expresión de un gen de HA de VGA en el contexto de un vector de HVT, proporciona el equilibrio justo entre la fuerza de expresión del gen heterólogo y la tensión que esto pone en la capacidad replicativa del HVT recombinante.

45 Por lo tanto, la invención se refiere a un vector de HVT que comprende un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HA de VGA, caracterizada porque dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor génico de glucoproteína B (gB) de un herpesvirus de mamífero.

50 El vector de HVT de acuerdo con la invención es estable en replicación, y proporciona una expresión sostenida del gen de HA de VGA insertado, tanto *in vitro* como *in vivo*. El vector de HVT+HA cuando se usa en una vacuna para aves de corral indujo una respuesta inmunitaria fuerte que podría proteger a las aves contra la enfermedad provocada por una infección de exposición a VGA grave, y podría reducir significativamente la propagación del virus de exposición al ambiente.

55 Un "vector" para la invención es un microorganismo vehículo recombinante vivo, en el presente documento un HVT.

Un "ácido nucleico heterólogo" para la invención es un ácido nucleico que no aparecía en el HVT parental que se

usó para generar el vector de HVT recombinante de acuerdo con la invención.

Una "proteína" para la invención es una cadena molecular de aminoácidos. La proteína puede modificarse, si se requiere, *in vivo* o *in vitro*, mediante, por ejemplo, glucosilación, amidación, carboxidación, fosforilación, pegilación o cambios en el plegamiento espacial. Una proteína puede ser de origen biológico o sintético. La proteína puede ser una proteína nativa o madura, una pre o proproteína, o un fragmento funcional de una proteína. Entre otros, se incluyen dentro de la definición de proteína péptidos, oligopéptidos y polipéptidos inmunológicamente activos.

Se sabe bien que un "promotor" es una región funcional en el genoma de un organismo que dirige la transcripción de una región codificante cadena abajo. Un promotor es por lo tanto un fragmento de ADN que se sitúa cadena arriba, es decir hacia el lado 5', de una fase abierta de lectura, normalmente un gen.

Como se sabe bien, un promotor inicia la síntesis de ARNm del gen que controla, partiendo del "sitio de inicio de la transcripción" (SIT). El ARNm producido se traduce a su vez en proteína partiendo del codón de inicio del gen, que es la primera secuencia de ATG en la fase abierta de lectura (el primer AUG en el ARNm). Normalmente el SIT se localiza a 30-40 nucleótidos cadena arriba del codón de inicio. Un SIT puede determinarse secuenciando el extremo 5' del ARNm de un gen, por ejemplo por la técnica de RACE.

Un promotor no tiene una longitud específica, sin embargo en promotores generales está comprendido a una distancia de 1.000 nucleótidos cadena arriba de la posición de la A del codón de inicio, que generalmente se indica como A+1; la mayoría de los promotores se sitúan entre -500 y A+1, normalmente entre los nucleótidos -250 y A+1.

Además, los promotores no tienen una secuencia de nucleótidos fija, pero sí contienen varios elementos de secuencia conservados, reconocibles; estos elementos están implicados en la unión a factores de transcripción, y la dirección de la ARN polimerasa, pero también en la regulación del tiempo, la duración, las condiciones y el nivel de transcripción a continuación. De este modo el promotor es sensible a señales de elementos reguladores tales como potenciadores, o a factores de unión a ADN tales como fármacos, hormonas, metabolitos, etc. Un elemento promotor conservado bien conocido es la caja TATA, normalmente situada dentro de los 50 nucleótidos cadena arriba del SIT, habitualmente aproximadamente de 30 nt cadena arriba del SIT. Otros ejemplos de elementos promotores conservados son la caja CAAT, normalmente a aproximadamente 75 nt cadena arriba del SIT, y la caja GC normalmente a aproximadamente 90 nt cadena arriba del SIT.

La localización y el tamaño de un promotor pueden determinarse convenientemente usando ensayos convencionales, tales como la expresión de un gen marcador mediante secciones mayores o menores subclonadas de un promotor sospechado. De una manera similar, ensayando la expresión de un gen marcador (detectando ARN o producción de proteínas), la fuerza relativa de promotores diferentes puede determinarse y compararse.

En la práctica un promotor puede simplemente seleccionarse por subclonación de la región entre dos genes consecutivos, por ejemplo de la señal de poli A del gen cadena arriba al SIT del gen cadena abajo, seguido del recorte del área clonada cuando sea apropiado.

Debido a que un promotor está adyacente al gen del que controla la expresión en el contexto nativo, el conocimiento de la localización de un gen, o el inicio de la transcripción de su ARNm, desvela inherentemente la posición de su promotor adjunto. Esto se aplica también en la invención, donde el "promotor génico de gB de un herpesvirus de mamífero" se refiere al promotor que conduce la expresión de un gen de gB de herpesvirus, y se sitúa inmediatamente cadena arriba de ese gen de gB. La proteína de gB en replicación de herpesvirus normal está implicada en la entrada en células y la propagación celular. Debido a que el gen de gB es un gen tan bien documentado y claramente reconocible, y debido a que los genomas de muchos herpesviridae se han secuenciado (completamente o en parte), el experto en la materia puede identificar fácilmente y obtener dicho promotor por técnicas rutinarias.

Se presentó una revisión de proteínas gB de herpesvirus en Perreira (1994, Infect. Agents Dis., vol. 3, p. 9-28). El promotor del gen de gB de VHS1 se estudió en detalle en Pederson *et al.* (1992, J. of Virol., vol. 66, p. 6226-6232). Ninguno de estos, sin embargo, describe o sugiere el uso de un promotor de gB de herpesvirus para conducir la expresión de gen heterólogo, ni en HVT ni en ningún otro sistema de vector de expresión.

Para la invención, es necesario que el promotor génico de gB de un herpesvirus de mamífero sea capaz de conducir la expresión del gen de HA. Esto se indica habitualmente como que el promotor está "unido operativamente" al gen o que el gen está "bajo el control del" promotor. Esto significa habitualmente que en la construcción de vector de HVT final el promotor génico de gB y el gen de HA están conectados en el mismo ADN, en proximidad efectiva, y sin señales o secuencias entre ellos que interferirían con una transcripción y traducción eficaz.

En las construcciones de vector de la invención, el gen de HA proporciona el codón de partida. Además las construcciones de vector preparadas fueron tan limpias como fue posible, lo que indica que excepto por algunos sitios de enzimas de restricción, no hubo ningún elemento ajeno sustancial en la construcción de vector recombinante tal como un casete de expresión con elementos heterólogos requeridos para clonación o selección de

recombinantes.

Aunque no es estrictamente necesario, en una realización preferida el gen de HA se construye para contener una señal de poliA cadena abajo, por ejemplo de SV40. Dicha señal puede proporcionar una terminación de la transcripción más completa y poliadenilación del transcrito para traducción.

La generación de la construcción del vector de HVT+HA puede realizarse por técnicas biológicas moleculares bien conocidas, que implican clonación, transfección, recombinación, selección y amplificación.

Un “herpesvirus de mamífero” para la invención se refiere a un herpesvirus que infecta habitualmente y se replica en una especie de mamífero. Preferentemente estas son de la subfamilia taxonómica de Alphaherpesvirinae. Por ejemplo: herpesvirus 1 humano (virus del herpes simple 1), herpesvirus bovino 1, herpesvirus felino 1, herpesvirus equino 1 (HVE) o virus de pseudorrabia (VPR, también conocido como herpesvirus suid 1).

Los promotores génicos de gB de dichos herpesvirus de mamífero se usan provechosamente para la invención.

Por lo tanto, en una realización preferida el promotor génico de gB de un herpesvirus de mamífero para la invención es de VPR o HVE.

Se ha demostrado que los vectores de HVT que comprenden estos promotores génicos de gB son suficientemente estables tanto *in vitro* como *in vivo*, y cuando se usan en una vacuna para aves de corral fueron inmunológicamente muy eficaces en la protección de aves de corral de GA y reducción de la propagación del VGA.

Dichos promotores pueden obtenerse convenientemente de la técnica anterior, tal como de Genbank, por ejemplo para:

- VPR, de n.º de referencia de Genbank: BK001744, región 20139 - 19596 (el gen de gB VPR es UI 27 o gII), o
- HVE de n.º de referencia de Genbank: AY665713, región 60709 - 61570 (el gen de gB de HVE1 es ORF 33).

Además, el n.º de referencia de Genbank pfam00606 representa convenientemente un grupo de proteínas gB de herpesvirus.

La construcción del vector HVP311 como se describe en los ejemplos contenía el promotor génico gB de HVE (SEQ ID NO: 1) y demostró estabilidad *in vitro* e *in vivo*. Cuando se usó como una vacuna, esta construcción mostró una buena protección inmunitaria y reducción de la propagación del virus, véanse los Ejemplos.

Para mejorar la eficacia del promotor génico de gB de un herpesvirus de mamífero para la invención aún más, manteniendo al mismo tiempo su estabilidad, se adaptó el promotor. La adaptación fue una elongación de la secuencia promotora, de modo que ahora no terminaba antes de A+1, sino que se extendía cadena abajo de A+1 del codón de inicio del gen de gB, a la región codificante del gen de gB que normalmente se traduce en proteína.

Un resultado fue que el promotor extendido comprendía ahora uno o más codones ATG, concretamente el codón de inicio original y posiblemente otros tripletes codificantes de metionina. Dichos codones ATG, en esta posición cadena abajo de la caja TATA en el promotor podrían interpretarse por la maquinaria de transcripción celular como un codón de inicio, lo que conduce a inicio prematuro indeseado de la traducción. Por lo tanto los codones ATG cadena abajo de la caja TATA del promotor génico de gB, que estaban comprendidos ahora en la secuencia promotora extendida se modificaron por mutación para hacer a dichos ATG no funcionales como un codón de inicio potencial. Esto permitió que el promotor de gB para la invención incorporara nucleótidos que abarcaban el codón de inicio de gB nativo y se extienden a la región traducida del gen de gB, sin embargo estos nucleótidos adicionales no se están traduciendo, sino que actúan como la secuencia líder extendida.

En consecuencia, se construyeron secuencias promotoras que contenían nucleótidos de la región codificante de gB cadena abajo del A+1 original.

Por lo tanto, en una realización más preferida el promotor génico de gB de un herpesvirus de mamífero comprende secuencias de nucleótidos de la región traducida de dicho gen de gB, en el que cualquier secuencia de nucleótidos ATG se había cambiado.

El “cambio” de la secuencia de nucleótidos ATG en el promotor extendido para la invención, se realiza preferentemente por mutación. La secuencia de nucleótidos ATG puede cambiarse en principio a cualquier otro triplete, siempre que esto no reduzca la estabilidad de la replicación, o la expresión de la construcción del vector.

Preferentemente el cambio es por un único nucleótido, preferentemente de ATG a TTG.

El número de nucleótidos cadena abajo de ATG que están comprendidos en un promotor de gB extendido para la invención es de al menos 10, preferentemente de al menos 20, 30, 50, 75 o 100, en ese orden de preferencia. En la

práctica, el número de nucleótidos cadena abajo de A+1 que se incorporan en el promotor extendido para la invención pueden tomarse convenientemente como la secuencia de A+1 hasta, pero sin incluir, el siguiente codón ATG cadena abajo. En ese caso solamente es necesario cambiar por mutación una secuencia ATG (la del codón de inicio).

La construcción del vector HVP310 como se describe en los ejemplos contiene un promotor génico de gB de VPR extendido en 129 nt más allá de A+1. La única secuencia ATG comprendida en la secuencia extendida fue del codón de inicio original, esta se cambió a TTG por mutación. Este vector mostró una eficacia y estabilidad *in vitro* similares al promotor génico de gB de HVE inadaptado, sin embargo con una eficacia muy mejorada *in vivo*, véanse los Ejemplos.

El promotor génico de gB de VPR extendido es como se presenta en: SEQ ID NO: 2.

Por lo tanto en una realización preferida adicional del promotor génico de gB de un herpesvirus de mamífero de acuerdo con la invención, el promotor tiene una secuencia de nucleótidos como en SEQ ID NO: 2, o su equivalente.

El gen de HA que está comprendido en un vector de HVT de acuerdo con la invención, puede en principio ser cualquier gen de HA de virus de la gripe aviar, por lo tanto en principio de cualquier VGA, y de cualquier serotipo H1 - H16, o genes de HA similares descritos en el futuro.

Para eficacia óptima de la vacuna para aves de corral contra GA que se basa en el vector de HVT de la invención, el gen de HA insertado es preferentemente un gen de HA de tipo altamente patógeno (AP), que comprende por lo tanto los aminoácidos básicos en el sitio de escisión HA1-HA2. La expresión de un gen HA AP proporciona la posibilidad de vacunar aves de corral eficazmente contra una infección con un VGA de tipo AP, y reducir la propagación adicional al ambiente.

Por lo tanto, en una realización adicional preferida del vector de HVT de acuerdo con la invención, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HA de VGA derivó de un VGA AP.

Se conoce bien en la técnica que VGA se clasifica como AP, y están públicamente disponibles muchas secuencias. Además, pueden obtenerse fácilmente genes de HA AP en la invención a partir de aislados de campo de VGA AP, de diferentes especies de hospedadores, usando técnicas de biología molecular rutinarias tales como RT-PCR.

Preferentemente, la HA de tipo AP para la invención se obtiene a partir de un VGA AP.

NB: El trabajo con aislados de VGA AP vivos requerirá instalaciones de laboratorio de un nivel de contención apropiado.

Para mejorar adicionalmente la eficacia de una vacuna para aves de corral que comprende el vector de HVT de acuerdo con la invención, el gen de HA comprendido en este vector se sometió a optimización de codones. El proceso de optimización de codones se conoce bien en la técnica, e implica la adaptación de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína para codificar los mismos aminoácidos que la secuencia codificante original, aunque sea con otros nucleótidos, es decir las mutaciones son esencialmente silenciosas. Esto mejora el nivel al que se expresa la secuencia codificante en un contexto que difiere del origen del gen expresado. Por ejemplo cuando se expresa un cierto gen en el nuevo contexto de un sistema de expresión recombinante, el uso de codón adaptado se ajusta después a la preferencia codónica del nuevo sistema. En la práctica esto significará que aunque la mayoría de aminoácidos permanecerán iguales, la secuencia de nucleótidos codificante puede diferir considerablemente (hasta el 25 % de identidad) de la secuencia original.

Para la invención, la secuencia codificante del ADNc del gen de HA de VGA usado en la invención se optimizó para expresión en un vector vírico eucariota, tal como HVT.

Son ejemplos de secuencias génicas de HA de VGA de tipo AP, cuyos codones se han optimizado para la invención: SEQ ID NO: 3 y 3, de los genes de HA H5 y H7 respectivamente, y las proteínas HA codificadas correspondientes en SEQ ID NO: 4 y 6. Como se conoce bien, se considera habitualmente que las proteínas HA que están en un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos de estos genes son de la misma clase antigénica.

Por lo tanto, en una realización más preferida de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína HA de VGA para el vector de HVT de acuerdo con la invención, la proteína HA de VGA codificada tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como en SEQ ID NO 4 o 6. Aún más preferentemente 95, 96, 97, 98, 99 o 100 %, en ese orden de preferencia.

En una realización preferida adicional, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína HA de VGA de la invención tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos como en SEQ ID NO: 3 o 5, aún más preferentemente 95, 96, 97, 98, 99, o 100 %, en ese orden de preferencia.

El vector de HVT más preferido de acuerdo con la invención comprende un ácido nucleico heterólogo que comprende un promotor génico de gB extendido, de VPR (por ejemplo, SEQ ID NO: 2) y un gen de HA de VGA con codones optimizados, de un tipo H5 (por ejemplo, SEQ ID NO: 3), por lo que este ácido nucleico heterólogo se inserta en el genoma de HVT en el locus Us2.

5 Un ejemplo de dicho virus de vector de HVT+HA se representa por la construcción de vector HVP310 (véase Ejemplos), que proporcionó la mayor eficacia de inmunización y reducción de propagación vírica medida.

10 La secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico heterólogo que puede usarse para ensamblar dicho virus de vector de HVT+HA recombinante por técnicas rutinarias es como se presenta en SEQ ID NO: 7. La secuencia puede convenientemente incorporarse en un plásmido vehículo convencional tal como está disponible en el mercado de la serie pUC. El plásmido resultante se denomina entonces habitualmente "vector de transferencia", y es adecuado para uso en protocolos de transfección.

15 Como se ha descrito, en la construcción de vector de HVT+HA de acuerdo con la invención puede generarse por técnicas convencionales bien conocidas en este campo. Es central para estas técnicas la integración en el genoma de un HVT, de un ácido nucleico heterólogo que comprende un promotor génico de gB de un herpesvirus de mamífero y un gen HA de VGA, ambos de acuerdo con la invención.

20 Por lo tanto un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para la preparación del vector de HVT de acuerdo con la invención, que comprende la integración en el genoma de un HVT de un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HA de VGA, en el que dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor génico de gB de un herpesvirus de mamífero.

25 El uso ventajoso del vector de HVT +HA de acuerdo con la invención es en una vacuna para aves de corral contra GA; proteger las aves y su entorno de la infección y enfermedad provocada por VGA.

30 Por lo tanto, en un aspecto adicional la invención se refiere al vector de HVT de acuerdo con la invención, o al vector de HVT como puede obtenerse por el método de la invención, para su uso en la vacunación de aves de corral contra GA.

Dicho uso en la vacunación de acuerdo con la invención se realiza provechosamente usando una composición de vacuna que comprende el vector de HVT de acuerdo con la invención.

35 Por lo tanto, en un aspecto adicional la invención se refiere al vector de HVT de acuerdo con la invención, o al vector de HVT como puede obtenerse por el método de la invención, para uso en una vacuna contra GA en aves de corral.

Dicho uso del vector de acuerdo con la invención se realiza en una vacuna para aves de corral.

40 Por lo tanto en un aspecto adicional la invención se refiere a una vacuna contra GA en aves de corral, que comprende el vector de HVT de acuerdo con la invención, o como puede obtenerse por el método de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Se sabe bien que una vacuna es una composición que comprende un compuesto inmunológicamente activo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El "compuesto inmunológicamente activo" o "antígeno" es una molécula que es reconocida por el sistema inmunitario de la diana e induce una respuesta inmunológica. La respuesta puede originarse del sistema inmunitario innato o el adquirido, y puede ser del tipo celular y/o humoral. Para la presente invención, el antígeno es una proteína.

50 En general una vacuna induce una respuesta inmunitaria que ayuda a prevenir, aliviar, reducir la sensibilidad a, o el tratamiento de una enfermedad o un trastorno resultante de infección con un microorganismo. La protección se consigue como resultado de administrar al menos un antígeno derivado de ese microorganismo. Esto provocará que el animal diana muestre una reducción en el número, o en la intensidad de señales clínicas provocadas por el microorganismo. Esto puede ser el resultado de una invasión, colonización o tasa de infección por el microorganismo reducida, lo que conduce a una reducción del número o la gravedad de lesiones y efectos que están provocados por el microorganismo o por la respuesta de la diana al mismo.

55 Se pretende que el "vehículo farmacéuticamente aceptable" ayude a la administración eficaz de un compuesto, sin provocar efectos adversos (graves) para la salud del animal al que se administra. Dicho vehículo puede ser por ejemplo agua estéril o una solución salina fisiológica estéril. En una forma más compleja el vehículo puede ser, por ejemplo, un tampón, que puede comprender aditivos adicionales, tales como estabilizadores o conservantes. Se describen, por ejemplo, detalles y ejemplos en manuales bien conocidos tales como: "Remington: the science and practice of pharmacy" (2000, Lippincot, Estados Unidos, ISBN: 683306472) y "Veterinary vaccinology" (P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Ámsterdam, ISBN 0444819681).

60 La vacuna de acuerdo con la invención se prepara a partir de partículas de vectores víricos HVT+HA vivos de

acuerdo con la invención por métodos descritos en el presente documento, que son fácilmente aplicables por un experto habitual en la materia. Por ejemplo, el vector de HVT+HA de acuerdo con la invención se construye por transfección y recombinación y el vector de HVT recombinante deseado se selecciona como se describe en el presente documento. A continuación los virus de vector de HVT se producen industrialmente en volúmenes mayores o menores. Aunque es posible la producción en animales hospedadores, se prefiere la proliferación en cultivos *in vitro*, por ejemplo en FEP. Después de recoger una suspensión que comprende el virus, bien células completas o un producto celular de ultrasonidos, esta suspensión se formula en una vacuna y se envasa el producto final. Después de ensayos extensivos con respecto a calidad, cantidad y esterilidad dichos productos de vacuna se publican para su venta.

Se conocen bien en este campo técnicas generales y consideraciones que se aplican a vacunología y se describen por ejemplo en regulaciones gubernamentales (farmacopea) y en manuales tales como: "Veterinary vaccinology" y "Remington" (ambos mencionados anteriormente).

La vacuna de vector de HVT+HA de acuerdo con la presente invención en principio puede proporcionarse a aves de corral diana por diferentes vías de aplicación, y en diferentes puntos en su tiempo de vida, siempre que el virus de vector de HVT+HA inoculado pueda establecer una infección protectora.

Sin embargo, debido a que una infección con VGA puede establecerse ya a una edad muy temprana, es ventajoso aplicar la vacuna de acuerdo con la invención tan pronto como sea posible. Por lo tanto, la vacuna de acuerdo con la invención se aplica preferentemente en el día de la eclosión ("día 1") o en el huevo, por ejemplo a los 18 días DE. Además, la aplicación es preferentemente por un método de vacunación masiva. Esto proporciona la protección más temprana posible, minimizando al mismo tiempo el coste de trabajo.

Son métodos bien conocidos para dichas vías de aplicación en masa aplicables a edad temprana: por pulverización gruesa el día 1, o por inyección automática en el huevo. Está disponible en el mercado equipamiento adecuado para aplicación a escala industrial.

Por lo tanto, en una realización preferida adicional, la vacuna de acuerdo con la invención puede aplicarse en el huevo.

Se conocen diferentes vías de inoculación en el huevo, tales como en el saco vitelino, el embrión o la cavidad del líquido alantoideo; estos pueden optimizarse según se requiera. Preferentemente la inoculación es en la cavidad de líquido alantoideo.

Como alternativa, cuando la vacuna de acuerdo con la invención va a combinarse con un componente antigénico adicional, puede requerirse una aplicación parenteral, por ejemplo, mediante inyección en o a través de la piel: por ejemplo, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, etc.

Son formulaciones de la vacuna de acuerdo con la invención por ejemplo una suspensión, solución, dispersión o emulsión.

Cuando se aplica por vacunación de pulverización, el tamaño de las gotas usado es importante; en general se aplica una pulverización gruesa (tamaño de gota de más de 50 µm), que es en efecto una aplicación por vía oral, nasal y/u ocular.

Dependiendo de la vía de aplicación de la vacuna de acuerdo con la invención, puede ser necesario adaptar la composición de vacuna. Esto está dentro de las capacidades de un experto en la materia, y generalmente implica el ajuste de la eficacia o la seguridad de la vacuna. Esto puede realizarse adaptando la dosis, cantidad, frecuencia, vía de vacuna, usando la vacuna en otra forma o formulación o adaptando los otros constituyentes de la vacuna (por ejemplo un estabilizador o un adyuvante).

Por ejemplo, para que sea adecuada para aplicación en el huevo, se requiere que la composición de vacuna sea muy suave, para no reducir la capacidad de eclosión de los huevos. Puede ser aceptable algo de reducción de la capacidad de eclosión, por ejemplo en 10 %, más preferentemente 5, 4, 3, 2, 1 o 0 % en ese orden de preferencia.

En general la seguridad de la vacuna de acuerdo con la invención se proporciona por el empleo como virus de HVT parental para la construcción de vector de acuerdo con la invención, una cepa de vacuna de HVT segura establecida, tal como una cepa de HVT PB1 o FC126. Estos están en general disponibles y se sabe que son adecuados para inoculación en el huevo. La incorporación de un ácido nucleico heterólogo probablemente no aumente su virulencia o patogenicidad (por el contrario), y no es aplicable un retorno a la virulencia.

La cantidad exacta de virus de vector de HVT de acuerdo con la invención en una dosis de vacuna no es tan crítica como sería para una vacuna de tipo emulsión inactivada, porque el virus de vector de HVT se replicará y por lo tanto multiplicará en el hospedador hasta un nivel de viremia que es biológicamente sostenible. Solo es necesario que la dosis de vacuna sea suficiente para generar dicha infección productora. Una dosis de inóculo mayor apenas acorta

el tiempo que se tarda en alcanzar la viremia óptima en el hospedador; dosis muy altas no son eficaces porque la viremia que establecen no puede ser mayor que el óptimo natural, además dicha dosis de inóculo muy alto no es atractiva por razones económicas.

- 5 Una dosis de inóculo preferida es por lo tanto entre 1×10^0 y 1×10^6 unidades formadoras de placas (ufp) de virus de vector de HVT por dosis de animal, más preferentemente entre 1×10^1 y 1×10^5 ufp/dosis, aún más preferentemente entre 1×10^2 y 1×10^4 ufp/ dosis; más preferentemente entre 500 y 5.000 ufp/dosis.

- 10 La determinación de la cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna de acuerdo con la invención está dentro del alcance del experto en la materia, por ejemplo supervisando la respuesta inmunológica después de vacunación, o después de una infección de exposición, por ejemplo volviendo a aislar el patógeno o supervisando las señales clínicas de enfermedad de las dianas, o parámetros serológicos, y comparando estas con respuestas vistas en animales no vacunados.

- 15 El esquema de dosis para aplicar la vacuna de acuerdo con la invención a un organismo diana puede ser en una o múltiples dosis, que pueden proporcionarse al mismo tiempo o secuencialmente, de una manera compatible con la formulación de la vacuna, y en una cantidad tal que sea inmunológicamente eficaz.

- 20 La vacuna de acuerdo con la invención puede usarse para tratamiento tanto profiláctico como terapéutico, y por lo tanto interfiere con el establecimiento y/o con la progresión de una infección o sus síntomas clínicos de enfermedad.

La vacuna de acuerdo con la invención puede actuar eficazmente como una vacunación de sensibilización, que después puede seguirse y amplificarse por una vacunación de refuerzo, por ejemplo con un virus inactivado completo clásico, virus con adyuvante.

- 25 El protocolo para la administración de la vacuna de acuerdo con la invención está integrado idealmente en programas de vacunación existentes de otras vacunas.

- 30 Preferentemente la vacuna de acuerdo con la invención se aplica solamente una vez, en el momento de la eclosión, o en el huevo.

El volumen por dosis de animal de la vacuna del vector de HVT+HA de acuerdo con la invención puede optimizarse de acuerdo con la vía pretendida de aplicación: se aplica habitualmente inoculación en el huevo con un volumen de entre 0,05 y 0,5 ml/huevo, y se realiza habitualmente inyección parenteral con un volumen de entre 0,1 y 1 ml/ave.

- 35 La determinación y la optimización del volumen de dosificación están dentro de las capacidades del experto en la materia.

- 40 Es altamente eficaz formular la vacuna de acuerdo con la invención como una vacuna de combinación, ya que de esta manera pueden administrarse múltiples agentes inmunológicos a la vez, proporcionando reducción de costes de tiempo y trabajo, así como reducción de la incomodidad para los animales diana vacunados. Una vacuna de combinación comprende además de la vacuna de acuerdo con la invención, otro compuesto antigénico. En principio esto puede ser cualquier microorganismo vivo o muerto o producto de subunidades, siempre que esto no reduzca la estabilidad en replicación o la expresión de la construcción de vector de HVT+HA. El componente o los
- 45 componentes inmunoactivos adicionales pueden ser un antígeno, una sustancia potenciadora inmunitaria, una citocina y/o una vacuna.

Como alternativa, la vacuna de acuerdo con la invención puede añadirse en sí misma a una vacuna.

- 50 Por lo tanto, en una realización preferida adicional, la vacuna de acuerdo con la invención se caracteriza porque la vacuna comprende uno o más componentes inmunoactivos adicionales.

En una realización más preferida la vacuna de acuerdo con la invención es una vacuna de combinación, que comprende al menos un antígeno adicional de un microorganismo que es patógeno para aves de corral.

- 55 Preferentemente el antígeno adicional de un microorganismo que es patógeno para aves de corral se selecciona de los grupos que consisten en:

- 60 - virus: virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad de Newcastle, adenovirus, virus del síndrome de caída del huevo, virus de bursitis infecciosa (es decir gumborovirus), virus de anemia de pollo, virus de encefalomiелitis aviar, virus de viruela aviar, virus de rinotraqueítis de pavo, virus de peste de los patos (enteritis vírica de pato), virus de viruela de paloma, VEM, virus de leucosis aviar, VLT1, pneumovirus aviar y reovirus;
- bacterias: *Escherichia coli*, *Salmonella spec.*, *Ornitobacterium rhinotracheale*, *Haemophilis paragallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Erysipelas spec.*, *Mycoplasma spec.* y *Clostridium spec.*;
- 65 - parásitos: *Eimeria spec.*; y
- hongos: por ejemplo *Aspergillus spec.*

Se prefieren más VEM, VLTI, VBI y VEN.

Los animales diana de aves de corral preferidos para aplicación de la vacuna de acuerdo con la invención son pollos. Dichos pollos pueden ser ponedores, reproductores, razas de combinación o líneas parentales de cualquiera de dichas razas de pollos.

La edad, el peso, el sexo, el estado inmunológico y otros parámetros del ave de corral para vacunar no son críticos, aunque es evidentemente favorable vacunar a dianas sanas, y vacunar tan pronto como sea posible para evitar cualquier infección de campo.

La vacuna de acuerdo con la invención se usa provechosamente en un enfoque de DIVA, como una "vacuna marcadora". Una vacuna marcadora se conoce como una vacuna que permite la diferenciación entre sujetos vacunados e infectados en campo. Esto puede detectarse convenientemente por un ensayo serológico tal como un ensayo ELISA o de inmunofluorescencia.

Por lo tanto, en una realización preferida, la vacuna de acuerdo con la invención es una vacuna marcadora.

Como se describe, hay varios modos en que la vacuna de acuerdo con la invención puede componerse y formularse, dependiendo de la vía deseada de aplicación, combinación antigénica, etc.

Por lo tanto, en un aspecto adicional la invención se refiere al uso del vector de HVT de acuerdo con la invención o al vector de HVT como puede obtenerse por el método de la invención, para la fabricación de una vacuna contra GA en aves de corral.

Como alternativa, en un aspecto adicional la invención se refiere a un método para la preparación de la vacuna de acuerdo con la invención, comprendiendo el método la mezcla del vector de HVT de acuerdo con la invención o con el vector de HVT como se puede obtener por el método de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Debido a las propiedades ventajosas de HVT, la vacuna fabricada de acuerdo con el uso o el método de la invención puede presentarse en diferentes formas, en particular en forma sin células o asociada a células. Para obtener la forma asociada a células, el virus del vector de HVT+HA se recoge junto con sus células hospedadoras en las que se produjo, por ejemplo FEP. En la forma sin células, las células de producción hospedadoras se someten a ultrasonidos en una solución estabilizadora, y el HVT sin células se recoge como sobrenadante del producto de ultrasonidos.

La vacuna de acuerdo con la invención puede fabricarse para contener uno o más componentes que ayudan a la viabilidad y calidad del vector de HVT de acuerdo con la invención, promoviendo de este modo la replicación productiva y el establecimiento de una infección protectora en aves de corral diana.

Por lo tanto, en una realización preferida, la vacuna fabricada de acuerdo con el uso o el método de la invención comprende un estabilizador.

Los estabilizantes son compuestos que estabilizan la cantidad y la calidad del vector de HVT de acuerdo con la invención durante el almacenamiento, la manipulación y la inoculación, tal como por inyección o ingestión. En general estas son moléculas grandes de alto peso molecular, tales como lípidos, carbohidratos o proteínas; por ejemplo leche en polvo, gelatina, albúmina de suero, sorbitol, trehalosa, espermidina, dextrano o polivinilpirrolidona.

También pueden añadirse conservantes, tales como timerosal, mertiolato, compuestos fenólicos o gentamicina.

En una realización preferida, los compuestos usados para la fabricación de la composición de vacuna de acuerdo con la invención son sin suero (es decir sin suero animal); sin proteínas (sin proteína animal, pero pueden contener otros componentes derivados de animales); sin compuestos animales (SCA; que no contiene ningún componente derivado de un animal); o incluso "químicamente definidos", en ese orden de preferencia.

Resulta evidente que la mezcla de otros compuestos, tales como vehículos, diluyentes, emulsiones y similares con vacunas de acuerdo con la invención también están dentro del alcance de la invención. Dichos aditivos se describen en manuales bien conocidos tales como: "Remington" y "Veterinary Vaccinology" (ambos mencionados anteriormente).

Por razones de estabilidad o economía, una vacuna de acuerdo con la invención puede fabricarse en forma liofilizada. En general esto permitirá almacenamiento prolongado a temperaturas por encima de cero °C, por ejemplo a 4 °C. Los expertos en la materia conocen procedimientos para liofilización, y está disponible en el mercado equipamiento para liofilización a diferentes escalas.

Por lo tanto, en una realización preferida adicional, la vacuna fabricada de acuerdo con el uso o con el método de la invención está en forma liofilizada.

Para reconstituir una composición de vacuna liofilizada, se suspende habitualmente en un diluyente fisiológicamente aceptable. Dicho diluyente puede ser, por ejemplo, tan sencillo como agua estéril, o una solución salina fisiológica, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato (PBS); como alternativa el diluyente puede contener un compuesto adyuvante, tal como tocoferol, como se describe en el documento EP 382.271. En una forma más compleja la vacuna liofilizada puede suspenderse en una emulsión por ejemplo como se describe en el documento EP 1.140.152.

Como se ha descrito, la vacuna de acuerdo con la invención puede aplicarse provechosamente a aves de corral por un método de vacunación tal como por pulverización, inoculación o aplicación en huevo.

Por lo tanto, en un aspecto adicional la invención se refiere a un método de vacunación de aves de corral contra la gripe aviar, que comprende la etapa de inocular dichas aves de corral con una vacuna de acuerdo con la invención.

Ejemplos

1. Ensamblaje de construcciones de vector

1.1. HVP142

Los virus de vector de HVT de HVP142 portan como un inserto heterólogo un gen de VGA H5, conducido por el promotor de LTR de VSR. El casete de transfección se insertó en el locus US10 de la cepa de HVT PB1, usando la técnica de recombinación homóloga. El gen de H5 se obtuvo de un aislado de VGA H5N2 de 1998.

Los métodos para transfección, recombinación, selección y amplificación fueron esencialmente como se describe en Sondermeijer *et al.*, 2003 (mencionado anteriormente) y documento EP 431.668.

El antisuero usado para selección de placas de expresión de HA fue un antisuero de pollo policlonal contra una cepa de VGA de tipo H5N6.

1.2. HVP310

Los virus de vector de HVP310 comprendían un gen de H5 con codones optimizados (SEQ ID NO: 3), que se condujo por un promotor génico de gB de VPR que se había extendido cadena abajo del codón de inicio ATG del gen de gB (SEQ ID NO: 2). La construcción heteróloga se insertó en el locus Us2 del genoma de HVT de la cepa FC126, usando una técnica de regeneración de clon de cósmido. La construcción de expresión total fue como se representa en la SEQ ID NO: 7.

El gen de H5 se originó a partir de un aislado de H5N1 AP tomado de un gato asiático de 2005. Este se había corregido mediante optimización de uso codónico para expresión en un sistema de vector de expresión vírica.

Los métodos para transfección, recombinación, selección y amplificación fueron esencialmente como se describe en el documento US 5.961.982. Se sembraron células FEP transfectadas después de recombinación en placas de cultivo tisular de 10 cm; después de aproximadamente una semana las placas se volvieron claramente visibles. Las placas se tiñeron con colorante de contraste con azul de Evans, y las placas pudieron seleccionarse directamente de las placas de siembra. Se comprobó rutinariamente el ADN de virus de vectores de HVT recombinantes con respecto a corrección de recombinación e inserción del gen de HA y promotor por análisis de enzimas de restricción.

Se realizó expresión del gen de HA integrado por ensayos de inmunofluorescencia en placas de microtitulación, usando antisuero policlonal de pollo H5N6.

1.3. HVP311

Los virus de vector de HVP311 comprendían un gen de H5 con codones optimizados, que se condujo por un promotor génico de gB de HVE (SEQ ID NO: 1). La construcción, recombinación y selección fue similar a la del virus HVP310. Además, se usó el mismo inserto de gen de HA H5 con codones optimizados.

1.4. Ensayos de estabilidad *in vitro*

Para determinar la estabilidad *in vitro*, se pasaron virus de vector de HVT recombinantes HVP142, 310 y 311 al menos 15 veces en monocapas de FEP. Después de seleccionarse una placa, esta se amplificó durante 15 ciclos.

Finalmente, las placas de 10 cm se inocularon y después de la incubación, se tiñeron con antisuero H5N6 de pollo para un ensayo de inmunofluorescencia (EIF). Se contó el número de placas que mostraban inmunofluorescencia positiva por número total de placas. Se descubrió que todos los recombinantes ensayados eran completamente estables en cultivos *in vitro* ya que el 100 % de las placas presentaban fluorescencia positiva. Esto significó que en primer lugar el inserto de HA se había replicado correctamente a través de los más de 15 pases de cultivo celular, y

en segundo lugar, que el gen de HA aún estaba intacto y se estaba expresando correctamente.

2. Ensayo animal en pollos SPE

5 2.1. Preparación del ensayo animal

El experimento animal se preparó para determinar la eficacia de recombinantes HVT+HA después de vacunación de polluelos de engorde de un día de edad sin patógenos específicos (SPE). Se evaluó la eficacia protectora por exposición-infección con un virus HPAI H5N1 a las dos o tres semanas después de la vacunación (p.v.). Se observaron los polluelos diariamente con respecto a la aparición de señales clínicas de infección por gripe aviar o mortalidad. Además, se recogieron hisopos traqueales y cloacales para evaluar la excreción de virus de exposición por PCR.

Se colocaron grupos de 10 polluelos de engorde SPE en aislantes de presión negativa en las instalaciones de alta contención del instituto veterinario central (Lelystad, NL). Se tomaron muestras de sangre semanalmente durante el transcurso de la prueba.

Las vacunas ensayadas fueron los virus de vector de HVT recombinantes HVP142, 310 y 311, junto a una vacuna de emulsión inactivada convencional de tipo H5, y un grupo vacunado de forma simulada que recibió solamente PBS. Las vacunas de HVT recombinantes se habían preparado como preparaciones asociadas a células a aproximadamente 5×10^5 ufp/ml, que se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Los pollos se colocaron, se marcaron individualmente y se vacunaron; se administró HVT por vía intramuscular, con 0,2 ml/dosis a 2000 ufp/polluelo.

Después de dos o tres semanas los polluelos se expusieron a $10^{6,0}$ DIH50 por polluelo de virus de exposición VGA H5N1 AP (H5N1 Pavo/Pavo/01/05 Clado 2.2), con 0,1 ml mediante la vía nasal y 0,1 ml mediante la vía intratraqueal.

Después de exposición los pollos se observaron diariamente con respecto a señales de GA. Las puntuaciones clínicas se clasificaron variando de 0 a 3 (ninguna - grave) para síntomas de GA típicos tales como depresión, descarga oronasal, dificultad respiratoria, señales neurológicas, diarrea, etc. Los polluelos gravemente enfermos se sacrificaron. Los polluelos muertos se ensayaron por histopatología con respecto a la causa de la muerte.

Las muestras de suero de antes de la exposición y desde 14 días después de la exposición se determinaron por ensayo de inhibición de hemaglutinación (IH) usando principalmente el virus de exposición de tipo H5 HPAI.

Para evaluación de propagación del virus de exposición, se tomaron hisopos de la tráquea y la cloaca de cada pollo a los 2, 3, 4, 7 y 14 días después de la exposición. Los hisopos se examinaron individualmente por Q-PCR en el gen de proteína de matriz de VGA, para comparar si, y cuanto (valor Ct) del virus de exposición se desprendió por los pollos vacunados y de control.

2.2. Resultados

Los resultados de los ensayos en pollos SPE se presentan en las Tablas 1-3.

Con respecto a la "protección de señales clínicas" como se presenta en la Tabla 2, solamente se puntuaron los animales que no mostraron ninguna señal clínica de GA como protegidos.

En la Tabla 3, el "positivo en reaislamiento vírico" indica de qué animales fue posible reaislamiento el virus; solamente si un animal fue positivo durante dos días consecutivos se listó como positivo en reaislamiento de virus. Como ninguna de las muestras de hisopo de cloaca fue positiva, solamente se presentan resultados de hisopo de tráquea.

Tabla 1: títulos de IH antes de la exposición, en SPE vacunados i.m. a un día de edad

Vacuna	n.º de animales	IH (log2, ag. H5N1 AP)	
		Exp. a las 2 semanas p.v.	Exp. a las 3 semanas p.v.
HVP142	20	<4	<4
HVP310	20	5,9	8,6
HVP311	20	4,2	8,1
H5 inac	20	<4 *)	<4 *)
diluyente	10	<4	<4

*) Cuando se ensaya en un ensayo de IH con otro antígeno de tipo H5, hubo una prueba clara de seroconversión, con títulos de IH de 6,7 y 8,6, a las 2 y 3 semanas p.v. respectivamente.

Tabla 2: protección contra señales clínicas de GA, en SPE, vacunados i.m. a un día de edad, después de exposición letal (<48 h) con H5N1 de VGA AP.

Vacuna	n.º de animales	Protección contra señales clínicas	
		Exp. a las 2 semanas p.v.	Exp. a las 3 semanas p.v.
HVP142	20	0/10	1/10
HVP310	19	10/10	9/9
HVP311	20	10/10	10/10
H5 inac	20	3/10	8/10
diluyente	10	0/5	0/5

5 Tabla 3: protección contra reaislamiento de virus, en SPE, vacunados i.m. a un día de edad, después de exposición letal (<48 h) con VGA HSN1 AP.

Vacuna	n.º de animales	Positivo en reaislamiento de virus (tráquea)	
		Exp. a las 2 semanas p.v.	Exp. a las 3 semanas p.v.
HVP142	20	10/10	10/10
HVP310	20	6/10	1/10
HVP311	20	6/10	2/10
H5 inac	20	10/10	10/10
diluyente *)	0	--	--

*) No se pudieron tomar hisopos de animales en el grupo de diluyente ya que todos murieron en un periodo de 48 horas después de la exposición

3. Ensayo animal en pollos MDA+

10 3.1. Preparación de ensayo animal

La disposición del ensayo animal en polluelos de engorde MDA+ fue en general la misma que para el ensayo de pollos SPE excepto que no se incluyó vacuna de vector HVP142. Los polluelos de engorde MDA+ derivaron de progenitores que se habían vacunado dos veces con una vacuna de emulsión H5N2 inactivada convencional; los

15 polluelos tuvieron títulos de IH de H5 de partida entre 5 y 6.

3.2. Resultados

Los resultados de los ensayos en pollos MDA+ se presentan en las Tablas 4-6.

20

Para las Tablas 5 y 6 se aplican las mismas observaciones que para las Tablas 2 y 3 anteriores.

Tabla 4: títulos de IH el día de la exposición, en MDA+ vacunados i.m. a un día de edad

Vacuna	n.º de animales	IH (log2, ag. H5N1 AP)	
		Exp. a las 2 semanas p.v.	Exp. a las 3 semanas p.v.
HVP310	20	<4	5,4
HVP311	20	<4	4,4
H5 inac	20	<4	<4
diluyente	10	<4	<4

25

Tabla 5: protección contra señales clínicas de GA en MDA+, vacunados i.m. a un día de edad, después de exposición letal (<120 h) con VGA H5N1 AP.

Vacuna	n.º de animales	Protección contra señales clínicas	
		Exp. a las 2 semanas p.v.	Exp. a las 3 semanas p.v.
HVP310	20	1/10	9/10
HVP311	19	0/10	4/9
H5 inac	18	0/9	0/9
diluyente	20	0/10	0/10

Tabla 6: protección contra reisolamiento de virus, en MDA+, vacunados i.m. a un día de edad, después de exposición letal (<120 h) con VGA H5N1 AP.

Vacuna	n.º de animales	Positivo en reisolamiento de virus (tráquea)	
		Exp. a las 2 semanas p.v.	Exp. a las 3 semanas p.v.
HVP310	20	10/10	7/10
HVP311	19	10/10	9/9
H5 inac	18	9/9	9/9
diluyente	20	10/10	10/10

3.3. Cuantificación por Q-PCR

En el ensayo animal en el que se expusieron pollos MDA+, se obtuvieron muestras de reisolamiento de virus tomando hisopos de la tráquea el día 2 y 3 después de la exposición. A continuación se extrajeron ácidos nucleicos, y se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real como se describe en Maas *et al.* (2007, Emerging Infectious Diseases, vol. 13, p. 1219-1221). Los valores umbral (Ct) se expresaron en números de copias relativos y se compararon con el valor medido en aves que no se vacunaron (control) o se vacunaron con una vacuna de emulsión. El número de copias correspondiente al menor valor de Ct en este grupo se estableció arbitrariamente en 1000.

La Figura 1 presenta los resultados: una reducción de replicación del virus de exposición de aproximadamente 250 veces con la cepa HVP310.

4. Conclusiones de los resultados de ensayos animales

4.1. General:

- HVP142 carecía de eficacia en ensayo de SPE y no se incluyó en el ensayo de MDA+.
- Los virus de vectores de HVP310 y 311 se replicaron bien, en polluelos tanto SPE como MDA+, lo que indica su constitución estable, viable. La expresión del gen de HA insertado fue igualmente estable y eficaz, como se demuestra por la respuesta inmunitaria altamente eficaz que se generó.
- La infección de exposición aplicada resultó ser extremadamente pesada, considerando que todos los controles y muchas de las vacunas con vacuna de emulsión convencional murieron. Sin embargo, esto permitió que las vacunas de vector de HVT+HA demostraran sus capacidades protectoras en las condiciones más rigurosas.

4.2. Ensayo de SPE:

- La protección clínica inducida en polluelos SPE fue muy espectacular: los polluelos SPE vacunados con HVP310 y 311 se protegieron completamente contra todas y cada una de las señales clínicas de GA, ya a las 2 semanas después de la vacunación, mientras que la vacuna de emulsión proporcionó solamente protección parcial, y los polluelos no vacunados murieron en un periodo de 48 horas.
- Los polluelos SPE también se protegieron completamente de la propagación del virus de exposición, como se demostró por los resultados de reisolamiento del virus; se alcanzó reducción del aislamiento del virus del 80 y 90 % para HVP 311 y 310 respectivamente, mientras que no pudo alcanzarse ninguna reducción de la propagación del virus por la vacuna de emulsión.
- La eficacia de los vectores HVP310 y 311 en polluelos SPE difirió por tanto solamente de forma mínima.

4.3. Ensayo MDA+:

- La protección de polluelos MDA+ de señales clínicas de GA después de exposición fue mucho mejor a las 3 semanas p.v. que a las 2 semanas p.v. HVP 310 pudo proteger al 90 % de los polluelos MDA+ de la aparición de ninguna señal clínica; HVP311 alcanzó solamente 45 % de protección, mientras que la vacuna de emulsión no proporcionó protección. Todos los polluelos MDA+ no vacunados murieron en un periodo de 120 horas.
- En las condiciones duras del ensayo, la vacuna de vector HVP310 aún pudo conseguir reducir la propagación vírica en polluelos MDA+ en un 30 % a las 3 semanas después de la vacunación, mientras que no pudo alcanzarse ninguna reducción de la propagación del virus por las vacunas de HVP311 o emulsión.
- La reducción de la supresión vírica inducida por el vector de vacuna HVP310, en relación con las aves vacunadas con emulsión y vacunadas con control, fue un factor 250 el día 2 después de la exposición.

5. Ensayo de estabilidad de virus de vacuna reaislado:

- Se volverán a aislar vacunas de vector HVP310 y HVP311 de pollos a las 2 y 3 semanas después de la vacunación. El virus se sembrará en placas de 10 cm de FEP, y se dejarán infectar. A los 5-7 días, las placas se teñirán por EIF con antisuero H5N6 de pollo, como se ha descrito. El número de placas frente al número de placas positivas fluorescentes indicará si todos los virus aún contienen y expresan el gen de HA insertado.

6. Seguridad de uso para vacunación en huevo:

Para sellar la seguridad para uso en huevo de la vacuna del vector de HVT HVP310 y 311, estas se usarán en el huevo.

- Tres días antes del inicio del experimento (t = -3 días) se inocularán tres grupos de 40 huevos de pollo embrionados de 18 días de edad con las vacunas de vector HVP310 y 311, de la siguiente manera:

- antes de la vacunación los huevos se examinarán al trasluz. El extremo romo de huevos embrionados de 18 días de edad se desinfectarán con etanol al 70 %. Se taladrará un orificio en la cáscara del huevo usando un taladro de huevo. Los huevos se vacunarán insertando una aguja (jeringas de 1 ml Becton & Dickinson Plastipak® y agujas de 0,6x25, 23G, Microlance®) verticalmente en el huevo e inyectando 0,05 ml de las vacunas. Posteriormente los orificios se sellarán con pegamento y los huevos se colocarán en incubadoras, en condiciones apropiadas.

- A continuación los huevos eclosionarán en tres incubadoras en instalaciones animales. Después de su eclosión, se anillarán 25 pollos por grupo y se colocarán en el grupo 1 a 3 (t = 1 día), y se alojarán en tres aislantes respectivamente, y se observarán durante otra semana.

- Los números resultantes y la salud de los pollos nacidos se supervisarán para determinar si se produce cualquier efecto en la capacidad de eclosión o salud por la inoculación en el huevo de la vacuna de vector de HVT HVP310 y 311.

7. Diferencia de las propiedades de promotores génicos de gB derivados de herpesvirus aviares o de mamíferos, cuando se usa en un vector de HVT

- Cuando se ensayaron promotores diferentes con respecto a su idoneidad para conducir la expresión de un gen heterólogo en el contexto de un vector vírico de HVT, el promotor génico de gB de MDV1 demostró ser ineficaz en HVT. Por otra parte, el promotor génico de gB del herpesvirus equino (HVE) fue operativo en HVT.

- Las construcciones usadas para este fin se ensamblaron esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 1, y comprendían un gen de un parásito *Eimeria tenella*, el gen Etsc2. Este gen codifica un antígeno de aproximadamente 37 kDa, que es el homólogo del antígeno Easc2 de *Eimeria acervulina* que se describe por ejemplo en el documento EP 775.746. Se prepararon construcciones de vector de transferencia que contenían el gen de Etsc2 bajo el control del promotor génico de gB de HVE1 (en construcción de vector de transferencia pVEC102), o de MDV1 (construcción pVEC103).

- Se generaron HVT recombinantes por transfección y recombinación homóloga, y se sembraron en monocapas FEP como se ha descrito. Se seleccionaron placas de HVT recombinantes, y estas se ensayaron con respecto a expresión del antígeno Etsc2, por ensayo de inmunofluorescencia en placas de 96 pocillos con monocapas de células FEP. A partir de ambas construcciones se ensayaron dos placas, y cada placa se ensayó por duplicado. Se usó un antisuero de conejo anti Etsc2 como anticuerpo primario, seguido de un anticuerpo secundario conjugado con FITC. Esta exploración inicial reveló fluorescencia débilmente positiva para recombinantes de pVEC102, pero no fluorescencia de recombinantes de pVEC103.

- A continuación se amplificaron las cuatro placas, y se repitió el IFA. Esta vez todas las placas de pVEC102 (usando el promotor génico de gB de HVE) fueron claramente positivas para expresión de antígeno Etsc2; sin embargo, las

placas recombinantes de pVEC103 permanecieron negativas para expresión de antígeno Ets2, incluso aunque fueron claramente visibles placas de HVT.

Se concluyó que el promotor génico de gB de MDV1 no es eficaz en el contexto de un virus de vector de HVT recombinante, mientras que el promotor génico de gB de HVE sí lo es.

Leyenda de las figuras

Figura 1:

Se vacunaron pollos MDA positivos a un día de edad, y posteriormente se expusieron. Se descubrió que la reducción de supresión vírica inducida por el vector de vacuna HVP310, en relación con aves vacunadas con emulsión y vacunadas con control era de un factor 250 el día 2 después de la exposición.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Intervet

<120> Vacuna con vector del herpesvirus de pavo contra la gripe aviar en aves de corral

<130> 2010-025-EP-PD

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 723

<212> ADN

<213> Herpesvirus equino 1

<400> 1

```

ggcgactgcg gatgcttcgc agcgcaggcg catgtacgcg gagcgtctgt caaagcgctc      60
catcgccagt ttggggcgct gcgtgcgcga acagcgaaga gaactagaaa aaaccctgag      120
agttaacgtg tatggcgaag tgctgctaca tacgtacgta tcgtcctaca acgggttttg      180
cgccaggcgc gggttttgcg cggcgggtgag tcgagcgggt accatcatag ataaccgctc      240
tagcacgtcc gcgttcgact cgcacagtt catgaaggcg gcgtgcttc gccaccccat      300
tgaccagtgc ctcatgccgt ccataacaca caagtttttc gagctgatca acgggcccgt      360
gtttgacaac gctggccaca actttgcgca gccgccaaac acggcattat attacagcgt      420
tgaaaacggt gggttgttac cgcacaccaa ggaggaacta gctcggttta tgattactgc      480
ggctaaaggt gatttgtcaa ttagcgagtt tcaaagggtt tattgctttg agggagtgac      540
aggtgtgacg gccacgcagc ggctggcgtg gaaatatatc ggggagctca tcctagccgc      600
cgcagtattc tcctcggttt tccactgtgg agaggtgcgc tcctgcgcg cagatcgtag      660
ctacccggac tccagcggcg cacagcgtg cgtgagcggc atttacataa cctacgaggc      720
gtc                                                                    723

```

<210> 2

<211> 674

<212> ADN

<213> Virus de pseudorrabia

<400> 2

ES 2 635 019 T3

```

cgctgctgca cacgtacgtg gcggtggccg ccgggttccg cgcacggcgc gcgttctgag      60
aggccgcgcgc gcgcgcgggc accgtcgtgg acgagcgcga gacgggctgc ttcgacgcgc      120
acagcttcat gaaggccacg gtgcagcgcc acccctgga cgcgcgcctc ctcccggcgc      180
tcacgcacaa gttcttcgag ctcgtaacg gccgctctt cgcgcacgac acgcacgcct      240
tcgcccagtc ccccaacacg gcgctctact ttgcggtgga gaacgtgggc ctctgcccgc      300
acctgaagga ggagctggcg cgcttcatgg tggccgcga ttggtgcgtc agtgagtcc      360
gcggcttcta ccgcttcag acggccggcg taaccgccac ccagcggcag gcctggcgat      420

atatccgcga gctggtgctg gcggttgca gtttcaggtc cgtcttcac tgccggggaag      480
tcgaggtcct ccgcgcggat cgcttcgccg gacgcgacgg gctgtacctg acctacgagg      540
cgtcttgccc gctggtggcg gtctttggcg cgggccccgc ggcatcggc ccgggcacca      600
cggcgggtgct ggcctcggac gtctttggcc tgctccacac cacgctgctg ctgcgcgggg      660
cgccgtcgcg ctag                                          674

```

- 5 <210> 3
- <211> 1707
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Gen de HA H5 de VGA AP con codones optimizados
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1704)
- 15 <400> 3

atg gag aag atc gtc ctc ctg ctg gct atc gtc tcc ctg gtc aag agc Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser 1 5 10 15	48
gac cag atc tgc atc ggc tac cac gcc aac aac tct acc gag cag gtg Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val 20 25 30	96
gac acc atc atg gag aag aac gtg acc gtc act cac gcc cag gac atc Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile 35 40 45	144
ctc gag aag act cac aac gga aag ctc tgc gac ctc gac ggc gtc aag Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys 50 55 60	192
cct ctg atc ctg cgt gac tgc tcc gtg gct ggt tgg ctc ctg ggc aac Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn 65 70 75 80	240
ccc atg tgc gac gag ttc ctc aac gtg ccc gag tgg tcc tac atc gtc Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val 85 90 95	288
gag aag atc aac ccc gcc aac gac ctg tgc tac cct ggc aac ttc aac Glu Lys Ile Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn 100 105 110	336
gac tac gag gag ctc aag cac ctg ctc tcc cgt atc aac cac ttc gag Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu 115 120 125	384
aag atc cag atc atc ccc aag tcc tcc tgg tcc gac cac gag gct tct Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser 130 135 140	432
agc ggt gtg tcc agc gct tgc ccc tac cag ggc cgc tcc agc ttc ttc Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Arg Ser Ser Phe Phe 145 150 155 160	480

ES 2 635 019 T3

cgc aac gtc gtg tgg ctg atc aag aag gac aac gct tac cca act atc	528
Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asp Asn Ala Tyr Pro Thr Ile	
165 170 175	
aag cgc agc tac aac aac act aac cag gag gac ctg ctg gtg ctg tgg	576
Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp	
180 185 190	
ggc atc cac cac cct aac gac gcc gct gag cag act cgt ctc tac cag	624
Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln	
195 200 205	
aac cct act agc tac atc tcc gtg gga acc tct acc ctg aac cag agg	672
Asn Pro Thr Ser Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg	
210 215 220	
ctg gtg ccc aag atc gct acc agg tcc aag gtc aac ggt cag tct ggt	720
Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly	
225 230 235 240	
agg atg gag ttc ttc tgg act atc ctg aag ccc aac gac gct atc aac	768
Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn	
245 250 255	
ttc gag tct aac ggt aac ttc atc gct cct gag aac gcc tac aag atc	816
Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Asn Ala Tyr Lys Ile	
260 265 270	
gtc aag aag ggt gac tct act atc atg aag tct gag ctg gag tac ggt	864
Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly	
275 280 285	
aac tgc aac acc aag tgc cag acc cct atc ggt gcc atc aac tcc tct	912
Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly Ala Ile Asn Ser Ser	
290 295 300	
atg cct ttc cac aac atc cac ccc ctg acc atc ggt gag tgc cct aag	960
Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys	
305 310 315 320	
tac gtc aag tct aac cgt ctg gtc ctg gct act gga ctg cgt aac tct	1008
Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser	
325 330 335	
ccc cag ggt gag cgc cgt cgt aag aag agg ggc ctc ttc ggt gcc atc	1056
Pro Gln Gly Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile	
340 345 350	
gct ggc ttc atc gag ggt gga tgg cag ggc atg gtg gac ggc tgg tac	1104
Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr	
355 360 365	
ggt tac cac cac agc aac gag cag ggc tcc ggt tac gct gcc gac aag	1152
Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys	
370 375 380	
gag tct acc cag aag gct atc gac ggc gtc acc aac aag gtg aac tcc	1200
Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser	
385 390 395 400	
atc atc gac aag atg aac acc cag ttc gag gct gtg ggc agg gag ttc	1248
Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe	
405 410 415	

```

aac aac ctg gag cgt cgt atc gag aac ctg aac aag aag atg gag gac      1296
Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
          420          425          430

ggt ttc ctg gac gtc tgg act tac aac gcc gag ctc ctg gtg ctg atg      1344
Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
          435          440          445

gag aac gag cgc acc ctg gac ttc cac gac tcc aac gtg aag aac ctc      1392
Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
          450          455          460

tac gac aag gtc cgc ctc cag ctc cgc gac aac gct aag gag ctg ggt      1440
Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
          465          470          475          480

aac ggt tgc ttc gag ttc tac cac agg tgc gac aac gag tgc atg gag      1488
Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Arg Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
          485          490          495

tcc gtg cgt aac ggc acc tac gac tac ccc cag tac tcc gag gag gcc      1536
Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
          500          505          510

cgt ctc aag agg gag gag atc tcc ggt gtg cgc ctg gag agc atc ggt      1584
Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Arg Leu Glu Ser Ile Gly
          515          520          525

act tac cag atc ctc tcc atc tac tcc acc gtc gcc agc tcc ctc gcc      1632
Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
          530          535          540

ctg gct atc atg gtg gct ggc ctc tcc ctg tgg atg tgc tcc aac ggc      1680
Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
          545          550          555          560

agc ctg cag tgc aag atc tgc atc taa      1707
Ser Leu Gln Cys Lys Ile Cys Ile
          565

```

<210> 4
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4

```

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

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu 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 Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
          50          55          60

```

ES 2 635 019 T3

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

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335
 Pro Gln Gly Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350
 Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365
 Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380
 Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400
 Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415
 Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430
 Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460
 Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Arg Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495
 Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 500 505 510
 Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Arg Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525
 Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
 530 535 540
 Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
 545 550 555 560
 Ser Leu Gln Cys Lys Ile Cys Ile
 565

<211> 1683
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Gen de HA H7 de VGA AP con codones optimizados

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(1680)

<400> 5

atg aac act cag atc ctg gta ttc gct ctg gtg gcg atc atc cca acc	48
Met Asn Thr Gln Ile Leu Val Phe Ala Leu Val Ala Ile Ile Pro Thr	
1 5 10 15	
aac gcc gac aag atc tgc ctg gga cac cac gcc gtc tcc aac gga act	96
Asn Ala Asp Lys Ile Cys Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr	
20 25 30	
aag gtc aac acc ttg act gag cgt ggc gtg gag gtg gtc aac gct act	144
Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr	
35 40 45	
gag acc gtg gag cgc act aac gtc ccc cgt atc tgc tcc aaa ggt aag	192
Glu Thr Val Glu Arg Thr Asn Val Pro Arg Ile Cys Ser Lys Gly Lys	
50 55 60	
cgt acc gtg gac ctc ggt cag tgc ggc ctg ctg ggt act atc act ggc	240
Arg Thr Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly	
65 70 75 80	
ccc ccc cag tgc gac cag ttc ctg gag ttc tct gcc gac ctg atc atc	288
Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile	
85 90 95	
gag cgt cgc gag ggt tcc gac gtc tgc tac cct gcc aag ttc gtg aac	336
Glu Arg Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn	
100 105 110	
gag gag gct ctg cgt cag atc ctc cgc gag tcc gcc ggt atc gac aag	384
Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys	
115 120 125	
gag acc atg gcc ttc acc tac agc ggt atc cgc act aac gcc gcc acc	432
Glu Thr Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Ala Thr	
130 135 140	
tcc gct tgc cgc cgt tcc ggt tct tcc ttc tac gcc gag atg aag tgg	480
Ser Ala Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp	
145 150 155 160	
ctc ctg tcc agc act gac aac gct gct ttc ccc cag atg act aag tcc	528
Leu Leu Ser Ser Thr Asp Asn Ala Ala Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser	
165 170 175	
tac aag aac acc cgc aag gac cct gct ctg atc atc tgg ggc atc cac	576
Tyr Lys Asn Thr Arg Lys Asp Pro Ala Leu Ile Ile Trp Gly Ile His	
180 185 190	
cac tcc ggt tcc acc act gag cag acc aag ctg tac gcc tcc ggt aac	624
His Ser Gly Ser Thr Thr Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn	
195 200 205	

ES 2 635 019 T3

aag ctc atc acc gtc ggc tct tct aac tac cag cag tcc ttc atc ccc Lys Leu Ile Thr Val Gly Ser Ser Asn Tyr Gln Gln Ser Phe Ile Pro 210 215 220	672
tct ccc ggt gcc cgc cct cag gtg aac ggc cag tct ggc cgc atc gac Ser Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp 225 230 235 240	720
ttc cac tgg ctg atc ctg aac ccc aac gac act atc act ttc tcc ttc Phe His Trp Leu Ile Leu Asn Pro Asn Asp Thr Ile Thr Phe Ser Phe 245 250 255	768
aac ggt gcc ttc atc gct cct gac cgt gct agc ttc ctg cgt ggc aag Asn Gly Ala Phe Ile Ala Pro Asp Arg Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys 260 265 270	816
tct atg ggt atc cag tcc ggt gtc cag gtg gac gcc aac tgc gag ggt Ser Met Gly Ile Gln Ser Gly Val Gln Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly 275 280 285	864
gac tgc tac cac tct ggc ggt acc atc atc agc aac ctg ccc ttc cag Asp Cys Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile Ile Ser Asn Leu Pro Phe Gln 290 295 300	912
aac atc aac agc cgc gcc gtc ggc aag tgc cct cgc tac gtc aag cag Asn Ile Asn Ser Arg Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln 305 310 315 320	960
gag tcc ctg atg ctg gct act ggt atg aag aac gtg ccc gag atc cct Glu Ser Leu Met Leu Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Ile Pro 325 330 335	1008
aag ggc cgt ggc ctg ttc ggc gct atc gcc ggt ttc atc gag aac ggt Lys Gly Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly 340 345 350	1056
tgg gag ggt ctg atc gac ggc tgg tac ggc ttc agg cac cag aac gcc Trp Glu Gly Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ala 355 360 365	1104
cag ggt gag ggc act gct gct gac tac aag agc acc cag tcc gcc atc Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ser Ala Ile 370 375 380	1152
gac cag atc acc ggt aag ctg aac cgt ctc atc gag aag act aac cag Asp Gln Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Gln 385 390 395 400	1200
cag ttc gag ctc atc gac aac gag ttc act gag gtc gag aag cag atc Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Thr Glu Val Glu Lys Gln Ile 405 410 415	1248
ggc aac gtg atc aac tgg acc agg gac tcc atg act gag gtg tgg tcc Gly Asn Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Met Thr Glu Val Trp Ser 420 425 430	1296
tac aac gct gag ctc ctc gtc gcc atg gag aac cag cac acc atc gac Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr Ile Asp 435 440 445	1344
ctg gct gac tcc gag atg aac aag ctc tac gag cgt gtg agg agg cag Leu Ala Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Tyr Glu Arg Val Arg Arg Gln 450 455 460	1392

```

ctg cgc gag aac gct gag gag gac ggt act ggt tgc ttc gag atc ttc      1440
Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu Ile Phe
465                               470                               475                               480

cac aag tgc gac gac gac tgc atg gcc tcc atc cgt aac aac acc tac      1488
His Lys Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn Thr Tyr
                               485                               490                               495

gac cac agc aag tac agg gag gag gcc atg cag aac agg atc cag atc      1536
Asp His Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Met Gln Asn Arg Ile Gln Ile
                               500                               505                               510

gac ccc gtc aag ctg agc agc ggc tac aag gac gtg atc ctg tgg ttc      1584
Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu Trp Phe
                               515                               520                               525

agc ttc ggc gct tcc tgc ttc atc ctc ctg gcc atc gcc atg ggc ctg      1632
Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Ile Leu Leu Ala Ile Ala Met Gly Leu
                               530                               535                               540

gtc ttc atc tgc gtg aag aac ggt aac atg agg tgc act atc tgc atc      1680
Val Phe Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile Cys Ile
545                               550                               555                               560

taa                                                                    1683

```

<210> 6
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 6

```

Met Asn Thr Gln Ile Leu Val Phe Ala Leu Val Ala Ile Ile Pro Thr
1                               5                               10                               15

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

Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr
35                               40                               45

Glu Thr Val Glu Arg Thr Asn Val Pro Arg Ile Cys Ser Lys Gly Lys
50                               55                               60

Arg Thr Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly
65                               70                               75                               80

Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile
85                               90                               95

Glu Arg Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn
100                              105                              110

```

ES 2 635 019 T3

Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys
 115 120 125

Glu Thr Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Ala Thr
 130 135 140

Ser Ala Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp
 145 150 155 160

Leu Leu Ser Ser Thr Asp Asn Ala Ala Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser
 165 170 175

Tyr Lys Asn Thr Arg Lys Asp Pro Ala Leu Ile Ile Trp Gly Ile His
 180 185 190

His Ser Gly Ser Thr Thr Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn
 195 200 205

Lys Leu Ile Thr Val Gly Ser Ser Asn Tyr Gln Gln Ser Phe Ile Pro
 210 215 220

Ser Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp
 225 230 235 240

Phe His Trp Leu Ile Leu Asn Pro Asn Asp Thr Ile Thr Phe Ser Phe
 245 250 255

Asn Gly Ala Phe Ile Ala Pro Asp Arg Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys
 260 265 270

Ser Met Gly Ile Gln Ser Gly Val Gln Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly
 275 280 285

Asp Cys Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile Ile Ser Asn Leu Pro Phe Gln
 290 295 300

Asn Ile Asn Ser Arg Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln
 305 310 315 320

Glu Ser Leu Met Leu Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Ile Pro
 325 330 335

Lys Gly Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly
 340 345 350

Trp Glu Gly Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ala
 355 360 365

Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ser Ala Ile

ES 2 635 019 T3

370	375	380
Asp Gln Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Gln 385 390 395 400		
Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Thr Glu Val Glu Lys Gln Ile 405 410 415		
Gly Asn Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Met Thr Glu Val Trp Ser 420 425 430		
Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr Ile Asp 435 440 445		
Leu Ala Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Tyr Glu Arg Val Arg Arg Gln 450 455 460		
Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu Ile Phe 465 470 475 480		
His Lys Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn Thr Tyr 485 490 495		
Asp His Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Met Gln Asn Arg Ile Gln Ile 500 505 510		
Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu Trp Phe 515 520 525		
Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Ile Leu Leu Ala Ile Ala Met Gly Leu 530 535 540		
Val Phe Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile Cys Ile 545 550 555 560		

<210> 7

<211> 9792

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Inserto EcoR-EcoRI HVP310

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3661)

<223> Área Us2 cadena arriba de HVT

<220>

<221> misc_feature

<222> (3683)..(4357)

<223> Promotor de gB de PRV, extendido

5
10

<220>
<221> misc_feature
<222> (4361)..(6096)
<223> Gen de HA H5 con codones optimizados

<220>
<221> misc_feature
<222> (6139)..(9787)
<223> Área cadena abajo Us2 de HVT

<400> 7

gaattccaga ctaaattgcc cggcccaatt tgtcaagtgt gcagtcacgg aggcgtcgac	60
cgtgtccccg gcattaaaca ggaaagcgtt aaagtttttg aatgttaggt cacaggtaca	120
aacataaatg tttgtacaaa caggtaacag gtacaaacat aatgccccg gcataaatgt	180
cccttacggc ggatcgaaac gacattaggc atactcgggt accattttgc attccgatca	240
gcacggatga aattaggcag gaatgcggtt tatattatgc ggcattggac aaacgatatg	300
gcattgattg gcagtttatg aatgtcttca tgttggcgt aaacggattc ctattggttc	360
agaagacaac gacgatatat ttagagagaa aaagctaccc agcataggat aaacacacat	420
tgagcattga gagacatagg tatcgggtatg gatgggaaaa ctacacacgt gaacacccaaa	480
cgacttatat actcgagcgg tgatactact gagcaagaat gcactgcac tgagccactg	540
aatgaagact gtgatgaaaa tgtgaccac gatggaattg gagaagaata tgcgcagttc	600
ttcatgtccc cgcaatgggt cccaaatcta catcgcttga gcgaggatac caaaaaggta	660
taccgatgta tggtttccaa cagactcaat tattttccct attatgaggc gttcaggcgg	720
tctttgtttg atatgtatat gctaggtcgg ttggggcgtc gacttaagcg atctgactgg	780
gagactatta tgcatctgtc accaacgcaa agtcggcgtc tacatagaac tttaaagattt	840
gtggagcgtg gaattatccc atctaacagt tatatacgca catcgggcca cgttcgcct	900
tcgagggcac ttccgacaga tacgaattta aagatggatg aataattaaa ttggaaagag	960
taactacatt aatcgagcgt catgacggcg tcccgtagaa atgggaattt tctactcgaa	1020
acaccgtgac atttgacaga cctggaattg ttattctgat atatagtggg tgtgtctggc	1080
cggcaacata cataatgtgc atgcgaaacc actttttcag tgtacgctga cattgtgcaa	1140
cacggagggg tagcatctac atacaatata tgttgattaa tgattggaga aaaaactatg	1200
cagctcgccg atcatatggc taactgcct tcgtctatat ggcggacccc gcgggaaaaa	1260
tcgacgtacc atctgattta caacaccagt aatgaacatg tcgcatccct gccagatct	1320
gtgcgcccac tggcgcggat cgttgtgaat gccgccgaaa cacttcaggc cggatgaga	1380
gccgggaggg cggcatcagc aggagtttg cgagaggtgt ttgatagaat gatgacagcc	1440
ttccgtgacc acgagcctac tgcgacattt aatgctgcaa atcccattag aaaaatggtc	1500
gagacagttc tacagaataa tgaagagccc ccgcgacgc atgctgaaat gggtaatcgc	1560
cttatgaaca ttatgtactg gtgttgcttg ggacacgcag gacaatgctc gatatggcag	1620

ttgtacgaga	cgaatcaggc	cattttaagt	ttattagatg	aagtgggtat	cggcacaaca	1680
aatccctttt	gcaccctoga	gcaatactgg	aagccattat	gcaccgcaat	cgccaacaag	1740
gggacctcat	cgcttggtga	ggatgccaaa	gtggccgagt	acctgggttag	catgcgcaaa	1800
ttgatataac	ataggcacgc	tctgatgtta	cagaccacaa	taccgcatac	atttattgta	1860
aggttggtta	taaaggttta	ttctatgtaa	gactacaata	ctttcgacat	tgcttgata	1920
catattaaat	actttctcaa	gttcctatta	cataaaatgg	gatctatcat	tacattcggt	1980
aagagtctgg	ataattttac	tgtttgccag	cttcgatctt	ggaacgtact	gtggatagtg	2040
ccttacttgg	aatcgtgaaa	atttgaaacg	tccattatit	ggatatcttc	cggttgtccc	2100
atatcccgcc	ctggtaccgc	tccgatacct	tgcccgtatg	gattcgtatt	gacagtcgcg	2160
caatcgggga	ccaacaacgc	gtgggtccac	actcattcgg	aaatcttcgg	atgattctga	2220
atatttattg	ccgctcgtta	cgagtcgttg	gacatatctg	taatacattt	cttcttctga	2280
aggatcgctg	cacatttgat	ctatacattg	gccaggatgt	tcaagtcctca	gatgttgcat	2340
tctggcacag	cacaacttta	tggcatttcc	gatgtaatcg	tccggcagcc	ctgggggagt	2400
tctatattcg	catattggga	tggtaaggac	aatagcagat	ctcgcaacct	ccaggggaggc	2460
tataataacg	tttttaaaag	atggatttct	cataaaaatc	tgtcgcaaat	tacactgaga	2520
atataccttta	ctagcgccga	ttgagagcat	cgtcgtccaa	ttttctaaat	ggaaagaaaa	2580
caaggcgggc	aagagtgttc	caaacatttt	cattttcggc	gaatctctca	aatcccatgg	2640
cgtgcaattg	attgcaaaat	tggcacttcc	gttcacgttt	gtatctccaa	actctaagac	2700
acttttaatt	gaaaaactac	gttctagtgt	ggaaagaaac	ctataggcag	accatagaac	2760
tatttgacac	cacatatctt	tttgtatgtc	aaactgacca	tgatcgtatg	ttgctgaatg	2820
cactagggca	attcgctcgc	gogactccat	acattgaata	attccacacg	tcagctcatc	2880
ggttagcaag	gtccagtagt	tgaagtcatt	tattttttccc	cgcggctggc	caaactctacc	2940
tctgggaata	tccaagttgt	cgaatatgat	cgcaccggct	ctgggtcatgg	tgaaggaaact	3000
gtagcataaa	gacgcaggta	tcataggggt	aatatttttt	tattcactca	cataactaaa	3060
gtaacgcata	ttagcaccat	gtatgggcta	tcaattgaca	tttgcgtagc	actacatcac	3120
gattatgtac	aacataatgg	gacaacatat	ggcaagtaga	tgcaatttcc	tcacactagt	3180
tgggtttatc	tactattgaa	ttttccctta	tctgtgatac	acttgggagc	ctctacaagc	3240
atattgccat	catgtacgtt	tttatctact	gtcttaacgc	ccatgggaac	ggaggcgtcg	3300
tcgtcatgta	ttggacggca	acataggcag	caacacaaat	tgcgttttagg	tgggggtgcat	3360
gtggactcga	taccaagccc	ctgcagctgg	ggaacgtctg	gtggagagcc	gataatttga	3420
tatacgcacg	ccatattact	gtcgttgaag	tacgccttat	cttctatgtt	ttcaaattta	3480
ggttcccaag	tggacgtgag	aagtgtttgt	atctcacatg	gaatggccca	aggcattcca	3540

gcccaggtgc	ctggtacttt	aatggcaaac	aaacgttttg	gtagaggtat	tgattctatt	3600
gcagttctgc	agatatctgc	agccccgagt	atccacaggc	tatacgatac	gttatcgag	3660
gcaagcttgg	cgcgcgcgat	ctcgcctgctg	cacacgtaog	tggcgggtggc	cgcgcgggttc	3720
cgcgcacggc	gcgcgttctg	cgaggccgcc	gcgcgcgcgg	gcaccgtcgt	ggacgagcgc	3780
gagacgggct	gcttcgacgc	gcacagcttc	atgaaggcca	cgggtgcagcg	ccaccccggtg	3840
gacgcgcgc	tcctcccggc	gctcacgcac	aagtctctcg	agctcgtcaa	cgggcgcgtc	3900
ttcgcgcacg	acacgcacgc	cttcgcccag	cccccaaca	cggcgtctta	ctttgcgggtg	3960
gagaacgtgg	gcctcctgcc	gcacctgaag	gaggagctgg	cgcgccttcac	ggtggcccg	4020
gattggtgcg	tcagtgagtt	cgcgcgcttc	taccgcttcc	agacggcccg	cgtaaccgccc	4080
accagcggc	aggcctggcg	atatatccgc	gagctgggtgc	tggcgggttc	agtcttcagg	4140
tccgtcttcc	actgcgggga	cgtcgaggtc	ctccgcgcgg	atcgtctcgc	cggacgcgac	4200
gggctgtacc	tgacctacga	ggcgtcttgc	cccgctgggtg	gcggctctttg	gcgcggggccc	4260
cgcggggcatc	ggcccgggca	ccacggcggt	gctggcctcg	gacgtctttg	gcctgctcca	4320
caccacgctg	ctgctgcgcg	gggcgcgcgc	gcgctagaga	tccaagatat	caaagccatg	4380
gagaagatcg	tcctcctgct	ggctatogtc	tccttggtca	agagcgacca	gatctgcac	4440
ggctaccacg	ccaacaactc	taccgagcag	gtggacacca	tcatggagaa	gaacgtgacc	4500
gtcactcacg	cccaggacat	cctcgagaag	actcacaacg	gaaagctctg	cgaacctcgac	4560
ggcgtcaagc	ctctgatcct	gcgtgaactgc	tcggtggctg	gttggctcct	gggcaacccc	4620
atgtgcgacg	agttcctcaa	cgtgcccag	tggctctaca	tcgtcgagaa	gatcaacccc	4680
gccaacgacc	tgtgctaccc	tggcaacttc	aacgactacg	aggagctcaa	gcacctgctc	4740
tcccgtatca	accacttcga	gaagatccag	atcatcccca	agtcctcctg	gtccgaccac	4800
gaggcttcta	gcgggtgtgtc	cagcgccttg	ccctaccagg	gccgctccag	cttcttccgc	4860
aacgtcgtgt	ggctgatcaa	gaaggacaac	gcttacccaa	ctatcaagcg	cagctacaac	4920
aacactaacc	aggaggacct	gctgggtgctg	tggggcatcc	accaccctaa	cgaacgcgct	4980
gagcagactc	gtctctacca	gaaccctact	agctacatct	ccgtgggaac	ctctaccctg	5040
aaccagaggc	tgggtgccaa	gatcgctacc	aggtccaagg	tcaacggtca	gtctggtagg	5100
atggagttct	tctggactat	cctgaagccc	aacgacgcta	tcaacttoga	gtctaacggt	5160
aacttcacgc	ctctcgagaa	cgcctacaag	atcgtcaaga	agggtgactc	tactatcatg	5220
aagtctgagc	tggagtagcg	taactgcaac	accaagtgcc	agacccttat	cgggtgccatc	5280
aactcctcta	tgcctttcca	caacatccac	cccctgacca	tcggtgagtg	ccctaagtac	5340
gtcaagtcta	accgtctggg	cctggctact	ggactgcgta	actctcccca	gggtgagcgc	5400
cgtcgtaaaga	agaggggcct	cttcggtgcc	atcgttggct	tcatcgaggg	tggatggcag	5460
ggcatggtgg	acggctggta	cggttaccac	cacagcaacg	agcagggctc	cggttacgct	5520

gccgacaagg	agtctaccca	gaaggctatc	gacggcgctca	ccaacaagg	gaactccatc	5580
atcgacaaga	tgaacaccca	gttcgaggct	gtgggcaggg	agttcaacaa	cctggagcgt	5640
cgtatcgaga	acctgaacaa	gaagatggag	gacgggtttcc	tggacgtctg	gacttacaac	5700
gccgagctcc	tgggtgctgat	ggagaacgag	cgcaccctgg	acttccacga	ctccaacgtg	5760
aagaacctct	acgacaagg	cgcctccag	ctccgcgaca	acgctaagga	gctgggtaac	5820
ggttgcttcg	agttctacca	caggtgcgac	aacgagtgc	tggagtccgt	gcgtaacggc	5880
acctacgact	acccccagta	ctccgaggag	gcccgtctca	agagggagga	gatctccggt	5940
gtgcgcctgg	agagcatcgg	tacttaccag	atcctctcca	tctactccac	cgtcgccagc	6000
tccctcgccc	tggctatcat	ggtggctggc	ctctccctgt	ggatgtgctc	caacggcagc	6060
ctgcagtgc	agatctgcat	ctaactggat	atcaaggatc	tctcgaggat	atcctgcagg	6120
tcgactctag	gaagcttgcc	tccgattcta	gcattacata	gccggtcagt	agatcctgcc	6180
attcggtagc	gcaaccggct	acatcttcaa	acagtctcac	gataaatgca	tctctcgttc	6240
ctgccaatcc	ggaaccgggc	ataccactcc	cgcctgcgca	tttaattctc	acaattgggc	6300
gatgccggcg	gggcaaaacg	aatgtggatt	tggcaaaccg	acacaggtct	gctgtacgga	6360
ctaatatggg	cacacccaca	tcattcttca	gatgctccat	gcattgttct	atgagaaaga	6420
tccataggg	ggaggcagcg	tcacgagatc	gccagggcaa	tcgatcgcat	tcgtctagta	6480
aagtgcgag	agttatcatg	cacacaccca	tgccacgccc	ttccgaataa	ctggagctgt	6540
ggaagatcgg	aaacgtcttt	ttgactgccg	gtctcgtact	actttcgcac	aggtgtatac	6600
ccggacgcgt	actatatatt	ttatatcatc	caacgtccga	aattacatac	gtggcggcga	6660
tggaagtaga	tgttgagtct	tcgaaagtaa	gtgcctcgaa	tatgggtatt	gtctgtgaaa	6720
atatcgaaa	cggtacgacg	gttcgagaac	cgtcgatgtc	gccagatact	agtaacaata	6780
gcttcgataa	cgaagacttc	cgtgggcctg	aatacgatgt	ggagataaat	accagaaaat	6840
ctgctaattc	tgatcgtatg	gaatcttcgt	gccgtgaaca	acgagcggcg	tgcgaacttc	6900
gaaagtgttc	gtgtcctacg	tctgccgtgc	gcatacaata	cagtattctt	tcattctctg	6960
ctccgggttc	agagggtcat	gtatatatat	gtactagata	cggggacgcg	gacccaaaaa	7020
aatgcatagt	gaaggcagtc	gttgaggag	agaatcccg	gagggaagt	gatatattta	7080
aaaccatctc	acataaatca	attataaaat	taatccatgc	ctataaatgg	aaaaatgttg	7140
tgtgtatggc	aatgcgtgta	tatcgttatg	atcttttcac	atatattgac	ggagtcggcc	7200
ctatgcccct	tcaacagatg	atctatatcc	aacgtggact	actagaggcg	ctagcataca	7260
tacatgaaag	gggcatcatt	caccgagacg	taaagacgga	gaatatattc	ttggataatc	7320
acgaaaatgc	agttttgggt	gacttcgggt	ctgcatgcc	actaggagat	tgtatagata	7380
cgcaccaatg	ttacgggttg	agcgggaact	tggaaacaaa	ttcgccggaa	ttatctgcac	7440

ttgatccgta ttgcacaaaa acagatat	ttt ggagtgccgg attggttcta tatgagatgg	7500
caattaaaaa tgtaccattg tttagtaagc	agggtgaaaag ttccgggatct cagctgagat	7560
ccataatacgt gtgcacgcaa gtgcacgaac	tggagtttcc ccgcaacgat tctaccaacc	7620
tctgtaaaaca tttcaaacaa tatgcgggttc	gtgtacgacc gccttataacc attcctcgag	7680
ttataagaaa tgggggggatg ccaatggatg	ttgaatatgt catttctaaa atgcttacgt	7740
ttgaccagga gttcagacct tctgctaagg	aaatattgaa tatgccccta tttactaagg	7800
cgcggattaa cctgcttaat atcacacct	ctgacagtggt ctaacgggat acaggcggga	7860
gcggttcgtg ggcgtcatcat caccacttga	gaatttatat tttgaattgt tgattgataa	7920
attaacctga ttcattgaga actgaaacgc	catattgggt tcttgatat gtctacaaca	7980
attagttaaa ttgctatgtt ctactgcgag	taacatttga taagttgtaa gagacgggcg	8040
actcatgtcg aagttgacga atataaagta	cataacgtgt ttagaatacc cagaatccga	8100
atagtccgcg ggggcgtctt ctgcgctgag	taccaaatac tgagttgaac ttgaaaatgc	8160
taaatctgtg acactctttg tgtgatgatt	attgtcacca cttcgaagat ggcttcgaca	8220
ttcatgatgt tctggtgttt gtttggaatc	gtaatagcgc ttgtttcgtc caagtctgac	8280
aacaaagaaa atctgaagaa ttatatcacg	gataaagtaa ccaatattag aatacccacg	8340
ccattatttg tatcaacgga aaactcttat	cccacaaaac atgtaatcta cgatgaaaac	8400
tgtggcttcg ctgtactcaa tccataaagt	gaccccaaat atgtcctttt gagccagctt	8460
ctaattgggaa ggcgcaaata tgatgcgacg	gtcgcgtggt ttgttctcgg taaaatgtgt	8520
gccagattaa tataatttgcg cgaattttat	aactgctcga caaatgagcc ttttggcaca	8580
tgttctatga gctctcctgg atggtgggac	aggcgtacg tctcaaccag tttcatttct	8640
cgcgacgaat tacagctggt ttttgcagcg	ccgtcccag aattagatgg tttatatacg	8700
cgcgtagtag ttgtcaacgg ggactttact	acggccgata taatgtttaa tgttaaagtg	8760
gcatgtgcct tttcaaagac tggaatagaa	gatgatacat tatgcaaacc ctttcatttc	8820
tttgccaatg caacattgca caatttaacc	atgattagat cggtaactct tcgagcgcac	8880
gaaagccatt taaaggaatg ggtggcacgg	agaggtggta acgtccctgc agtgctactt	8940
gagtctacca tgtatcatgc atccaatctg	cctagaaaatt tcagggattt ctacataaag	9000
tctccagatg attataagta taatcaccta	gatgggccat ctgtaatgct catcactgac	9060
agacctagtg aagattttgga tgggaggctc	gttcacccaa gtgacatttt tactactaca	9120
agtcctataa aacagggtccg gtatgaagag	catcagtcac atacaaagca gtatcctgta	9180
aacaaaatac aagctataat ttttttgata	gggttaggct cgttcattgg aagcatattc	9240
gtagttttg tagtatggat tatacgcaga	tattgcaatg gagcgcgag tgggggaacg	9300
ccccccagtc ctgcgcggtg tgtgtatacc	aggctatgat cacgtgtgaa acttgggagg	9360
acctgtatca tatgtacacc gtccctattc	gtttatagcc agtacgtgtt atctgcacat	9420

ES 2 635 019 T3

agaggaacat gtgtcatact gggatcgcat gcatgggatg tgtgactcta atattattct	9480
gtatcataat aaaaacacag tgcattggat atagaggatc gctggtaagc actacggtag	9540
accaatcggc tcagattgca ttctttggca tcgataccgt tgttaattta tatggcaaag	9600
tcttgttcat gggagatcag tatttggagg aaatatactc tggaacgatg gaaataactca	9660
aatggaatca agctaaccgc tgctattcta ttgcgcatgc aacatattac gccgactgtc	9720
ctataatcag ttctacggta ttcagaggat gccgggacgc cgttgtttat actaggcccc	9780
acagcagaat tc	9792

REIVINDICACIONES

1. Vector de herpesvirus de pavo (HVT) que comprende un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína hemaglutinina (HA) de virus de la gripe aviar (VGA), **caracterizado por**
 5 **que** dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor génico de glucoproteína B (gB) de un herpesvirus de mamífero.
2. El vector de HVT de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el promotor génico de gB de un
 10 herpesvirus de mamífero comprende secuencias de nucleótidos de la región traducida de dicho gen de gB, en el que se cambió cualquier secuencia de nucleótidos ATG.
3. El vector de HVT de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** el promotor génico de gB de un herpesvirus de mamífero tiene una secuencia de nucleótidos como en la SEQ ID NO: 2.
- 15 4. El vector de HVT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado por que** la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HA de VGA derivó de un VGA altamente patógeno.
5. El vector de HVT de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** la secuencia de nucleótidos que
 20 codifica la proteína HA de VGA codifica una proteína HA de VGA que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como en las SEQ ID NO: 4 o 6.
6. El vector de HVT de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, **caracterizado por que** la secuencia de nucleótidos
 25 que codifica la proteína HA de VGA tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos como en las SEQ ID NO: 3 o 5.
7. Método para la preparación del vector de HVT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que
 30 comprende la integración en el genoma de un HVT de un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HA de VGA, en el que dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor génico de gB de un herpesvirus de mamífero.
8. El vector de HVT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o como puede obtenerse por el
 método de la reivindicación 7, para uso en la vacunación de aves de corral contra la gripe aviar.
9. El vector de HVT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o como puede obtenerse por el
 35 método de la reivindicación 7, para uso en una vacuna contra la gripe aviar en aves de corral.
10. Vacuna contra la gripe aviar en aves de corral, que comprende el vector de HVT de acuerdo con una cualquiera
 40 de las reivindicaciones 1-6 o como puede obtenerse por el método de la reivindicación 7, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada por que** la vacuna puede aplicarse en el huevo.
12. Uso del vector de HVT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o como puede obtenerse por
 45 el método de la reivindicación 7, para la fabricación de una vacuna contra la gripe aviar en aves de corral.
13. Método para la preparación de la vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, comprendiendo dicho
 método la mezcla del vector de HVT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o como puede
 obtenerse por el método de la reivindicación 7, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

