

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 672**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/17** (2006.01)

**A61K 39/295** (2006.01)

**C07K 14/005** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2015 PCT/EP2015/081121**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16102647**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2015 E 15817860 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 3185899**

54 Título: **Vacuna ND-IBD vectorizada con HVT mejorada**

30 Prioridad:

**24.12.2014 EP 14200340**

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

**05.01.2018**

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)**

**Wim de Körverstraat 35**

**5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**VERSTEGEN, IWAN;**

**SONDERMEIJER, PAULUS, JACOBUS,**

**ANTONIUS y**

**VERMEIJ, PAUL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 648 672 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 ND-IBD vectorizada con HVT mejorada

5 La presente invención se refiere al campo de vacunas veterinarias, concretamente a vacunas para aves de corral contra ND e IBD, basadas en virus del herpes del pavo (HVT) recombinante como vector viral. En particular, la invención se refiere a un casete de expresión de ADN recombinante, a un HVT recombinante que comprende el casete de expresión de ADN recombinante, a una vacuna para aves de corral basada en el HVT recombinante o en células hospedadoras que comprenden el HVT recombinante. Adicionalmente, la invención se refiere a métodos y  
10 usos del casete de expresión, el HVT recombinante y las células hospedadoras, para la preparación y uso de la vacuna.

La enfermedad de Marek (MD) es una enfermedad altamente infecciosa de las aves de corral, que se produce en el mundo, y se caracteriza por la presencia de linfomas de linfocitos T en varios órganos y nervios. Esto conduce a  
15 varios síntomas, entre otros, parálisis y mortalidad. Los pollitos recién nacidos pueden protegerse por anticuerpos maternalmente derivados (MDA) de las madres inmunes. La MD se produce por el virus de la enfermedad de Marek (MDV) que pertenece a la familia alphaherpesvirinae, y el género Mardivirus. El virión está envuelto y tiene aproximadamente 160 nm de tamaño. Dentro de la cápside está comprendido un gran genoma de ADN bicatenario lineal, entre 100 y 200 kpb de tamaño.

Hay diferentes serotipos de MDV, cada uno con distintas características. Mientras que el serotipo 1 de MDV (MDV1) y MDV2 es patógeno para aves de corral, MDV3 no es. MDV3 se conoce más comúnmente como: virus del herpes 1 de Meleagrid, virus del herpes del pavo, pero normalmente como: virus del herpes del pavo (HVT). El HVT se describió en 1970 (Witter et al., 1970, Am. J. Vet. Res., vol. 31, p. 525) como un virus del herpes del pavo que es  
25 apatógeno para los pollos. Las cepas del HVT tales como PB1 o FC-126 ya se han usado desde entonces comúnmente para vacunar a los pollos contra la MD producida por MDV1 o MDV2. Y en caso de que se requiera protección contra variantes más virulentas de MDV1, el HVT se usa en combinación con una cepa de la vacuna de MDV2, por ejemplo SB1, como en Nobilis™ Marexine CA126+SB1 (MSD Animal Health), o con una cepa de vacuna de MDV1 atenuada tal como Rispens, por ejemplo en Nobilis™ RISMVAC+CA126 (MSD Animal Health).

30 El HVT se replica en los linfocitos de sangre periférica (PBL) de las aves, y así es un virus sistémico que induce una respuesta inmunitaria de larga duración que principalmente se dirige al sistema inmunitario celular. Las vacunas de HVT están comercialmente disponibles como células infectadas por HVT congeladas, y pueden aplicarse a pollos en la edad temprana, ya que son relativamente insensibles a anticuerpos contra HVT tales como en MDA. Debido a que un pollito recién nacido se enfrenta a la presión infecciosa de MDV desde su primer día, por tanto, las vacunas de HVT se inoculan en pollitos tan pronto como sea posible; por ejemplo, en el día de su eclosión del huevo (día uno), o incluso antes de la eclosión, mientras que todavía está en el huevo. Este último enfoque, la denominada 'vacunación in ovo', es una forma de vacunación del embrión que comúnmente se aplica en el día 18 del desarrollo embrionario (ED), aproximadamente 3 días antes de la eclosión.

40 A continuación de ser usado como una vacuna de por sí, el HVT también se usa como una vacuna de vector viral para la expresión y administración de diversas proteínas inmunogénicas a aves de corral, véase por ejemplo el documento WO 87/04463. Normalmente, el gen expresado codifica (una parte de) un antígeno protector de un microorganismo patógeno para las aves de corral, contra el que se requiere vacunación. A través de los años, muchos genes heterólogos han sido expresados en vectores de HVT, tales como de: virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) (Sondermeijer et al., 1993, Vaccine, vol. 11, p. 349-358), virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV) (Darteil et al., 1995, Virology, vol. 211, p. 481-490) y de un antígeno de parásito (Cronenberg et al., 1999, Acta Virol., vol. 43, p. 192-197).

La administración de una vacuna de vector de HVT a aves de corral genera así una respuesta inmunitaria contra el gen heterólogo expresado, además de contra HVT que protege contra MD. Esto se aplica en varios productos de  
50 vacuna de vector de HVT comercial, por ejemplo: el gen de la proteína F de NDV: Innovax™-ND (MSD Animal Health) y Vectormune™ HVT-NDV (Ceva); o el gen VP2 de IBDV: Vaxxitek™ HVT+IBD (Merial; previamente llamado: Gallivac™ HVT-IBD) y Vectormune™ HVT-IBD (Ceva).

Alternativamente, puede usarse un vector de HVT para la expresión y administración de una proteína terapéutica, por ejemplo una citocina, para manipular la respuesta inmunitaria del pollo (documento WO 2009/156.367; Tarpey et al., 2007, Vaccine, vol. 25, p. 8529-8535).

La secuencia genómica de nucleótidos de HVT está disponible, por ejemplo, de GenBank™ como: AF291866 (cepa FC-126). Se han descrito varios métodos para insertar genes heterólogos en HVT, tal como usando recombinación homóloga (Sondermeijer et al., arriba), regeneración de cósmidos (documento US 5.961.982) o bácmidos (cromosomas bacterianos artificiales) (Baigent et al., 2006, J. de Gen. Virol., vol. 87, p. 769-776).

Se han investigado muchas localizaciones genéticas para la inserción de una construcción de gen heterólogo en el genoma de HVT, y se han descrito varios loci no esenciales adecuados, por ejemplo, en la región corta única (Us) del genoma de HVT (documento EP 431.668); o en la región larga única (UL) de HVT (documento EP 794.257).

Se han usado diferentes promotores para conducir la expresión de un gen heterólogo en un casete de expresión  
65 para HVT, tales como: el promotor gpX de PRV (documento WO 87/04.463), el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous, el promotor del gen temprano SV40, el promotor del gen de beta-actina de pollo (documento EP

1.298.139), o el promotor del gen inmediato temprano 1 de citomegalovirus humano (hCMV-IE1) o murino (mCMV-IE1), véase: el documento EP 728.842. Recientemente, se describió una vacuna de vector de HVT que expresaba antígenos de tanto NDV como IBDV de una única construcción: documento WO 2013/057.235.

5 Para la construcción de vectores recombinantes, el ácido nucleico heterólogo que va a insertarse en el genoma del vector normalmente comprende al menos un gen heterólogo o región codificante, que codifica (al menos una parte inmunogénica de) un antígeno. La construcción también puede comprender una secuencia promotora para conducir la expresión del gen heterólogo, y señales reguladoras tales como un potenciador, o un terminador de la transcripción. Una inserción combinada tal se denomina frecuentemente un 'casete de expresión'.

10 El efecto de la inserción de un casete de expresión en el genoma de un vector se diferencia, dependiendo de la localización y de la forma en la que se inserta: el genoma del vector puede llegar a ser más grande, igual, o más pequeño en tamaño, dependiendo de si el resultado neto sobre el genoma es una adición, sustitución o delección de material genético, respectivamente. También la localización de la inserción puede tener un efecto: dispuesta dentro de una región codificante, una no codificante, o una reguladora del genoma. Entre otros, estas elecciones influyen en las características de la vacuna de vector resultante, en términos de su capacidad para replicación y expresión, y su estabilidad genética.

15 Sea cual sea la construcción precisa, el casete de expresión insertado debe permitir que el vector viral recombinante vivo venza varias tensiones biológicas sobre su estabilidad y eficacia: primero, la capacidad de replicación y generación de progenie después de haber recibido la inserción heteróloga. Esto indica que el propio virus de vector recombinante es todavía viable, a pesar de la inserción en su genoma. A continuación, la capacidad de replicarse *in vitro* en una línea de célula hospedadora durante muchos ciclos mientras que se mantiene la replicación y expresión del inserto heterólogo, correctamente y completamente. Esto indica que el recombinante no se atenuó en su replicación por la inserción, y el casete de expresión insertado es establemente mantenido y expresado. En tercer lugar, replicación y expresión *in vivo*. Esto indica que el virus recombinante puede vencer la fuerte presión de selección en un animal vivo, tal como la planteada por su sistema inmunitario. En este entorno, la pérdida de expresión de un gen heterólogo por el vector favorecería una replicación más rápida en el animal; tales 'mutantes de escape' pueden tener mutaciones adquiridas o delecciones importantes en el gen extraño o en sus secuencias reguladoras, y este mutante podría hacer crecer demasiado los vectores de virus intactos. Finalmente, y lo que es más importante, la replicación del vector y la expresión del gen heterólogo en la diana necesitan ser capaces de generar una respuesta inmunitaria eficaz contra el microorganismo que era el donante de la inserción heteróloga que expresa el vector.

20 Por consiguiente, una vacuna de vector recombinante debe proporcionar una buena replicación del vector y de su inserción, tanto *in vitro* como *in vivo*, y una expresión eficaz del (de los) gen(es) heterólogo(s) *in vivo*, preferentemente de alto nivel, y coherente con el tiempo, para inducir y mantener una respuesta inmunitaria protectora en una diana.

25 Esta combinación de características permitirá las amplias rondas de replicación *in vitro* que son necesarias para la producción a gran escala, además de para la expresión continuada y presentación al sistema inmunitario del hospedador del gen extraño insertado, cuando la vacuna de vector se está replicando en un animal diana inoculado. Además, se requiere esta estabilidad en la replicación y en la expresión de la vacuna de vector para cumplir las normas muy altas de seguridad y estabilidad biológica que deben ser cumplidas por un virus recombinante que va a introducirse en el campo como producto comercial, después de obtener una autorización de comercialización de las autoridades gubernamentales o reguladoras.

30 45 La enfermedad de Newcastle (ND) y la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBD) son enfermedades importantes de las aves de corral, que se producen en el mundo, y pueden producir efectos negativos graves en la industria de las aves de corral con respecto al bienestar animal y la economía de operación. Esto se describe, por ejemplo, en manuales como: 'The Merck veterinary manual (2010, 10ª ed., 2010, C.M. Kahn ed., ISBN: 091191093X), y: 'Disease of poultry' (2008, 12ª ed., Y. Saif ed., Iowa State Univ. press, ISBN-10: 0813807182).

50 La ND se produce por el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), que pertenece al orden de los Mononegavirales, específicamente de la familia Paramyxoviridae, y puede agruparse en distintos patotipos según su virulencia: NDV de tipo lentogénico no patógeno difícilmente produce síntomas en aves de corral. A diferencia, las cepas de NDV mesogénicas (patógenas medias) y velogénicas (altamente patógenas) producen una amplia enfermedad y mortalidad, y son, por tanto, enfermedades notificables en muchos países. Los síntomas de enfermedad incluyen anomalías respiratorias y nerviosas, con jadeo y 'tortícolis' como los signos más notorios.

55 En operaciones de aves de corral comerciales, la protección contra la infección y/o enfermedad producida por cepas de NDV patógenas se logra por la vacunación rutinaria de las aves de corral, normalmente en el día de la eclosión, con cepas de NDV lentogénicas vivas, tales como Nobilis™ ND Clone 30 (MSD Animal Health).

60 El NDV tiene un genoma de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado, que tiene aproximadamente 15 kb de tamaño y contiene seis genes, entre los que está el gen para la glucoproteína de fusión (F). La proteína F participa en la unión de NDV y la entrada en células hospedadoras, y como proteína inmunodominante puede ser la base de una respuesta inmunitaria eficaz contra NDV. La proteína F de NDV se expresa como una proteína F0 nativa, que se activa tras la escisión por peptidasas extracelulares.

65 La IBD se produce por el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV), también llamada 'virus de la

enfermedad de Gomaboro', un miembro de la familia Birnaviridae. Estos virus tienen un genoma que consiste en dos segmentos (A y B) de ARN bicatenario. El segmento A más grande codifica una poliproteína de 110 kDa, que posteriormente se escinde por autoproteólisis para formar proteínas virales maduras VP2, VP3 y VP4. De éstas, VP2 y VP3 son las proteínas de la cápside estructurales para el virión, y VP2 es el principal inmunogén protector del hospedador.

En el caso de IBDV, existen dos serotipos, serotipo 1 y 2. Los dos serotipos pueden diferenciarse por pruebas de diferenciación de virus (VN). Se ha mostrado que los virus del serotipo 1 son patógenos para los pollos, mientras que el IBDV de serotipo 2 solo produce enfermedad sub-aguda en pavos.

Históricamente, los virus de serotipo 1 de IBDV consistieron solo en un tipo que se conoce como virus de IBD "clásico". Más reciente, emergieron las llamadas cepas de IBDV de "variante", que pueden identificarse y distinguirse por una prueba de neutralización de virus usando un panel de anticuerpos monoclonales o por RT-PCR; esto se revisa por Wu et al. (2007, Avian Diseases, vol. 51, p. 515-526). Cepas de IBDV clásico muy conocidas son: D78, Faragher 52/70 y STC.

El IBDV produce una infección viral altamente contagiosa aguda, de un tejido linfoide de ave, con, como su diana primaria, el órgano inmunológico esencial del ave: la bolsa de Fabricio. La tasa de morbilidad en bandadas susceptibles es alta, con pérdida de peso rápida y tasas de mortalidad de moderadas a altas. Las aves que se recuperan de la enfermedad pueden tener deficiencias inmunitarias debido a la destrucción de (partes de) la bolsa de Fabricio. Esto las hace vulnerables a infecciones secundarias.

Se realizan vacunaciones rutinarias contra IBD tan pronto como sea posible en la vida de las aves de corral usando cepas de IBDV atenuadas, pero éstas solo pueden aplicarse cuando el nivel de MDA contra IBDV haya disminuido suficientemente, que comúnmente es en algún momento entre 15 y 20 días después de la eclosión. Muchas vacunas de IBDV 'vivas' o inactivadas están comercialmente disponibles, por ejemplo, una vacuna 'viva' tal como Nobilis™ Gomaboro D78 (MSD Animal Health).

Para lograr rentabilidad, un enfoque común es diseñar vacunas veterinarias que comprenden una combinación de antígenos. De esta forma, una única ronda de vacunaciones puede inmunizar al animal contra varias enfermedades de una vez. No solo esto ahorra tiempo y costes de trabajo, sino que también reduce la molestia y el estrés a los animales vacunados que de otro modo se produciría al tener que recibir vacunaciones repetidas. Esto es incluso más aplicable a vacunas que necesitan ser administradas por inyección individual, tal como vacunas basadas en HVT recombinante como vector viral, por tanto vacunas de combinación en este contexto también son altamente deseables, y la capacidad para proteger contra varias enfermedades diferentes de una vez -además de protección de MDV del propio vector de HVT- sería un gran beneficio. Sin embargo, en el pasado, la mera combinación de dos vectores de HVT separados con inserciones de un solo gen heterólogo resultó ser no satisfactoria: la interferencia entre los vectores de replicación causó que uno o el otro llegaran a ser suprimidos en la diana vacunada. Por tanto, la investigación se ha centrado en la expresión combinada y la administración de más de un antígeno heterólogo de un único vector de HVT recombinante.

Varias publicaciones describen construcciones de vector de HVT que comprenden inserciones multi-génicas, por ejemplo: en los documentos WO 93/025.665 y WO 96/005.291, que describen 'vacunas' bivalentes y trivalentes. Similarmente: los documentos EP 719.864 y EP 1.026.246. Sin embargo, la mayoría de las construcciones multi-génicas descritas son solo sugeridas, y solo se construyeron y aislaron en realidad algunos de los vectores recombinantes con múltiples inserciones. Muy pocos se probaron alguna vez en pollos. En general, no se dan resultados sobre su estabilidad tras la replicación, o los niveles de expresión de los genes extraños, y mucho menos cualquier dato sobre la inducción de una protección inmunitaria eficaz en animales diana.

En realidad, de las muchas publicaciones del estado de la técnica sobre vacunas vectorizadas con HVT multigénicas, las únicas construcciones que han sido minuciosamente probadas y demostraron ser vacunas de vector eficaces contra más de dos patógenos aviares son la construcción de HVT que comprende el gen F de NDV y el gen VP2 de IBDV, como se describe en el documento WO 2013/057.235, y la vacuna ILT-ND vectorizada con HVT como se describe en el documento WO 2013/057.236.

Desafortunadamente, tras la prueba prolongada durante el desarrollo de producto, una de las principales construcciones como se describe en el documento WO 2013/057.235, llamada HVP309, no mostró estabilidad genética y expresión sostenida adecuadas de inserciones heterólogas. Este vector de HVT recombinante HVP309 comprende un casete de expresión con el gen F de NDV, conducido por un promotor de núcleo del gen temprano inmediato 1 del citomegalovirus humano, seguido en la dirección 3' por un gen VP2 de IBDV que es conducido por un promotor de núcleo del gen de beta-actina de pollo.

La inestabilidad de la construcción de vector HVP309 llegó a ser evidente después de su replicación *in vitro* e *in vivo*, ya que entre el 1 y el 3 % del virus HVP309 presentado ya no expresó uno o ambos de los genes heterólogos. Esto no es deseable desde un punto de vista de la eficacia de la vacuna, y es un obstáculo para conseguir la autorización de comercialización de las autoridades gubernamentales. Por tanto, actualmente no es todavía una vacuna de vector de HVT segura y eficaz contra tanto ND como IBD que tenga estabilidad genética consistente y fiable.

Es un objetivo de la presente invención acomodar esta necesidad en el campo, y proporcionar, por primera vez, una vacuna de vector de HVT recombinante que permita la inmunización eficaz de aves de corral contra ND y IBD, y que tenga estabilidad genética consistente y fiable.

Inicialmente, los inventores estuvieron decepcionados al saber que la construcción de HVP309 tenía esta inestabilidad genética inherente, que condujo a la pérdida de expresión de sus inserciones de gen heterólogo. Sin orientación del estado de la técnica sobre las formas para vencer esta inestabilidad -mientras que se mantiene la eficacia de vacunas y los niveles de replicación viral- tuvieron que rediseñar completamente una vacuna de vector.

5 Esto no fue en absoluto directo y requirió hacer elecciones y selecciones no obvias. Esto es evidente de muchas construcciones de HVT recombinante que se hicieron y probaron, pero no mostraron la combinación deseada de características favorables. Aunque ocasionalmente una de las nuevas construcciones era mejor en un aspecto específico, tal como la viremia, o nivel de expresión de uno de los genes insertados; sin embargo, se encontró que esto carecía de otras propiedades, o no tenían estabilidad genética adecuada. Ejemplos se describen en lo sucesivo.

Los inventores estuvieron, por tanto, sorprendidos de encontrar que una vacuna de HVT recombinante específica demostrara buena replicación de vector viral, una expresión génica de F de NDV F y de VP2 de IBDV sostenida, e inmunoprotección eficaz contra ND y IBD, y también tuviera una estabilidad genética mejorada con respecto a las construcciones del estado de la técnica. De hecho, la estabilidad es ahora tal que ya no puede encontrarse ninguna placa que no exprese virus, incluso después de 15 pases consecutivos en cultivo celular, y después de un pase en aves. Además, el nivel de eficacia de la vacuna contra ND y IBDV fue ligeramente (ND) o incluso considerablemente (IBDV) mejorado con respecto a las construcciones de vector previas.

En vista de la escala posiblemente grande a la que una vacuna de vector tal puede usarse en la industria productora de aves de corral, estos efectos y mejoras son significativos, y representan un efecto técnico sorprendente que tiene gran significancia comercial. Por tanto, de esta forma puede cumplirse el objetivo de la invención, y por consiguiente pueden vencerse las desventajas del estado de la técnica.

Actualmente no se sabe por qué la nueva vacuna ND-IBD vectorizada con HVT recombinante tiene las características de eficacia mejorada y estabilidad mejorada.

Aunque los inventores no quieren quedar ligados por teoría alguna o modelo que pudiera explicar estas observaciones, suponen que la selección de elementos usados, y su disposición específica en el casete de expresión comprendido en este virus de HVT, permite en una forma u otra que el nuevo vector de HVT recombinante acomode mejor la expresión de los genes heterólogos, mientras que se replican *in vitro*, o *in vivo*. Esto puede ser lo que hace que el nuevo vector sea genéticamente estable e inmunológicamente eficaz.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un casete de expresión de ADN recombinante que comprende en la dirección 5' a 3' y en este orden:

- a. un promotor del gen temprano inmediato 1 del citomegalovirus murino (mCMV-IE1),
- b. un gen de proteína viral 2 (VP2) del virus infeccioso de la bolsa (IBDV),
- c. un terminador de la transcripción,
- d. un promotor del gen temprano inmediato 1 del citomegalovirus humano (hCMV-IE1),
- e. un gen de proteína de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

El casete de expresión de ADN recombinante según la invención puede usarse para la generación de una vacuna de virus del vector de HVT recombinante, que es eficaz en prevenir o reducir la infección por IBDV, y NDV, o signos de enfermedad asociados, y tiene estabilidad genética consistente y fiable, tanto cuando se somete a pases *in vitro* como *in vivo*.

"Recombinante" es una molécula de ácido nucleico, o un microorganismo del que el material genético se ha modificado con respecto a su condición inicial o nativa, para producir una constitución genética que no poseía originalmente.

El "casete de expresión" para la invención comprende los genes y elementos reguladores como se describen y definen en el presente documento. Opcionalmente, el casete de expresión también puede contener otros elementos de ADN que pueden ayudar en su generación y manipulación, tales como sitios para el reconocimiento de enzimas de restricción o cebadores de PCR, para permitir la clonación molecular. Aunque el casete de expresión puede existir en forma de ADN o de ARN, debido a su uso previsto en un vector de HVT, por tanto, el casete de expresión se emplea como ADN.

Como será evidente para un experto, un casete de expresión es un módulo de expresión auto-contenido, por tanto su orientación en un genoma del vector del virus es generalmente no crítica. Eso significa que el casete en conjunto puede integrarse por ejemplo en la región Us del genoma del HVT en cualquiera de dos orientaciones: lectura bien hacia la TR, o hacia la IR. La Figura 1 en ese respecto solo muestra una de estas dos posibles orientaciones. Sin embargo, si se desea una orientación específica, el casete de expresión puede usarse con secciones flanqueantes del genoma del vector, que pueden dirigir su integración en un locus específico del genoma del vector, y en una orientación deseada.

La generación, construcción y ensamblaje del casete de expresión de ADN recombinante según la invención, y de otros elementos genéticos descritos en el presente documento, puede hacerse por técnicas de biología molecular muy conocidas, que implican la clonación, transfección, recombinación, selección y amplificación. Estas y otras

técnicas se explican en gran detalle en libros de texto estándar como Sambrook & Russell: "Molecular cloning: a laboratory manual" (2001, Cold Spring Harbour Laboratory Press; ISBN: 0879695773); Ausubel et al., en: Current Protocols in Molecular Biology (J. Wiley and Sons Inc, NY, 2003, ISBN: 047150338X); C. Dieffenbach & G. Dveksler: "PCR primers: a laboratory manual" (CSHL Press, ISBN 0879696540); y "PCR protocols", por: J. Bartlett and D. Stirling (Humana press, ISBN: 0896036421).

El término "que comprende" (además de variaciones tales como "comprenden", "comprende" y "comprendido"), como se usa en el presente documento, pretende referirse a todos los elementos, y en cualquier combinación posible concebible para la invención, que están cubiertos por o están incluidos en la sección de texto, párrafo, reivindicación, etc., en la que se usa este término, aunque tales elementos o combinaciones no se citen explícitamente; y no a la exclusión de cualquiera de tal(es) elemento(s) o combinaciones.

Por tanto, cualquier sección de texto tal, párrafo, reivindicación, etc., puede, por tanto, también referirse a una o más realizaciones en las que el término "que comprende" (o sus variantes) está sustituido por términos tales como "consisten en", "que consisten en", o "consisten esencialmente en".

El término "en la dirección 5' a 3'", también conocido como: 'en la dirección 3"', es muy conocido en el campo. Junto con los términos "en este orden" sirve para indicar la orientación relativa que necesitan tener los elementos que son resumidos a continuación los unos con respecto a los otros, con el fin de ser funcionales con la maquinaria de expresión genética de la célula hospedadora en la que se replicará y expresará un HVT recombinante que comprende el casete de expresión según la invención. Como se dará cuenta el experto, esta dirección se refiere a la hebra de ADN desde el genoma de ADN bicatenario de HVT que es la 'hebra codificante', y se refiere a la molécula de ARNm codificada que esté en la orientación '+' o 'sentido'.

Sin embargo, y sin perjuicio a la sección anterior: en la hebra complementaria del genoma de ADNbc de HVT, la hebra 'molde', el orden relativo de los elementos enumerados es el mismo, pero en la hebra de ADN la dirección de estos elementos es 3' a 5'.

El término "gen" se usa para indicar una sección de ADN que es capaz de codificar una proteína. Un gen para la invención preferentemente codifica una proteína completa. Sin embargo, un gen puede también codificar una sección de una proteína, por ejemplo que codifica solo la forma madura de una proteína, es decir, sin un 'conductor', 'anclaje' o 'secuencia señal'. En ese respecto, gen como se usa en el presente documento se corresponde con marco de lectura abierto u ORF. Un gen puede incluso codificar una sección específica de una proteína, tal como la sección que comprende un epítipo inmunoprotector.

A este respecto, una "proteína" para la invención es una cadena de aminoácidos molecular. La proteína puede ser una proteína nativa o madura, una pre- o pro-proteína, o un fragmento funcional de una proteína. Entre otros: péptidos, oligopéptidos y polipéptidos están incluidos dentro de la definición de proteína.

Un "promotor" para la invención es muy conocido por ser una región funcional en el genoma de un organismo que dirige la transcripción de una región codificante en la dirección 3'. Un promotor está así situado en la dirección 5' de un gen.

La síntesis de ARNm dirigida por el promotor, empieza desde el 'sitio de inicio de la transcripción' (TSS). El ARNm producido es a su vez traducido en proteína a partir del codón de iniciación del gen, que es la primera secuencia de ATG en el marco de lectura abierto (la primera AUG en el ARNm). Normalmente, el TSS está localizado 30-40 nucleótidos en la dirección 5' del codón de iniciación. Un TSS puede determinarse por secuenciación del extremo 5' del ARNm de un gen, por ejemplo, por la técnica RACE.

En general, los promotores están comprendidos dentro de aproximadamente 1000 nucleótidos en la dirección 5' de la posición de la A del codón de iniciación, que generalmente se indica como A+1, y la mayoría de los promotores están situados entre los nucleótidos -500 y A+1.

La nomenclatura para un promotor se basa comúnmente en el gen del cual controla la expresión. Por ejemplo, el término 'promotor del gen mCMV-IE1' se refiere al promotor que en la naturaleza conduce la expresión del gen IE1 de mCMV, y así está situado inmediatamente en la dirección 5' de ese gen. Debido a que el gen IE1 es un gen tan bien documentado y claramente reconocible, y debido a que los genomas de varios mCMV han sido secuenciados (por completo o en parte), un promotor tal puede ser fácilmente identificado por técnicas rutinarias. Por ejemplo, en un protocolo básico, un promotor puede obtenerse simplemente subclonando aproximadamente la región entre dos genes consecutivos, por ejemplo de la señal de poli A de un gen en la dirección 5' al TSS de un gen en la dirección 3'. El promotor puede entonces identificarse por pruebas estándar, por ejemplo por la expresión de un gen marcador por secciones progresivamente más pequeñas de un supuesto promotor.

Comúnmente, los promotores contienen varias regiones reguladoras reconocibles, tales como la región potenciadora, que participa en la unión de factores reguladores que influyen en el tiempo, la duración, las condiciones y el nivel de transcripción. Aunque la región de potenciador está comúnmente situada en la dirección 5', un promotor también contiene una región más en la dirección 3' que participa en la unión de factores de transcripción y el direccionamiento de la propia ARN polimerasa. Esta región en la dirección 3' generalmente contiene varios elementos de secuencia promotora conservada tales como la caja TATA, la caja CAAT y la caja GC.

Un promotor que comprende tanto la región de potenciador como en la dirección 3' se llama un promotor "completo"; un promotor que comprende solo la región en la dirección 3' se llama un promotor de "núcleo".

Un promotor para la expresión de un gen (heterólogo) en un vector (de virus) necesita ser capaz de conducir eficazmente la transcripción de aquella región codificante en la dirección 3'. Esto se denomina comúnmente el promotor que está "operativamente unido" al gen, de forma que el gen esté 'bajo el control' del promotor, o sea 'conducido por' el promotor. Esto significa comúnmente que en el casete de expresión el promotor y el gen están

5 conectados en el mismo ADN, en proximidad eficaz, y sin señales o secuencias entre ellos que intervendrían con una transcripción eficaz.

Por tanto, en el casete de expresión de ADN recombinante según la invención, el promotor del gen mCMV-IE1 y el promotor del gen hCMV-IE1 para la invención están "operativamente unidos" a sus genes en la dirección 3', respectivamente, el gen VP2 de IBDV y el gen F de NDV.

10 Un "terminador de la transcripción" es un elemento de ADN regulador implicado en la terminación de la transcripción de una región codificante en ARN. Comúnmente, un elemento tal codifica una sección con una estructura secundaria, por ejemplo una horquilla, que puede producir que el complejo de ARN polimerasa detenga la transcripción. Un terminador de la transcripción está siempre, por tanto, situado en la dirección 3' del codón de

15 terminación de la región que va a traducirse, la región no traducida 3'. Un terminador también puede comprender una señal de poli-adenilación, o señal de poliA. Ésta induce la poliadenilación, que se produce para ARN más eucariotas, y que es relevante para el transporte y la estabilidad de moléculas de ARNm.

Para la invención, el uso de un terminador de la transcripción entre los dos genes heterólogos proporciona una separación eficaz de su expresión, previniendo la posible ultralectura de la transcripción de ARN.

20 Para la invención, un gen es "heterólogo" al vector de HVT recombinante que lo lleva si ese gen no estaba presente en el HVT parental que se usó para generar el vector de HVT recombinante.

Los promotores del gen mCMV-IE1 o hCMV-IE1 son muy conocidos en la técnica, y pueden ser fácilmente obtenidos a partir de varias fuentes comerciales, tales como de proveedores de plásmidos comerciales para clonación y

25 expresión. El gen IE1 también se llama el 'gen IE principal'.

La proteína mCMV-IE1 también se llama pp89. El promotor del gen mCMV-IE1 se describió en 1985 (K. Dörsch-Häsler, et al., 1985, PNAS, vol. 82, p. 8325). El uso de este promotor en la expresión heteróloga se describe en los documentos WO 87/03.905 y EP 728.842. La secuencia de nucleótidos del locus IE de mCMV completo está

30 disponible de GenBank con el N.º de acc. L06816.1 (desde marzo de 2004). El propio mCMV está disponible de la ATCC: inicialmente con el N.º de acc. VR-194, y más recientemente éste ha continuado con el N.º de acc. VR-1399.

El promotor del gen hCMV-IE1 en su versión completa tiene aproximadamente 1,5 kb de tamaño y consiste en un potenciador, un promotor de núcleo y un intrón, por lo que la actividad de promotor continúa en la región de intrón,

35 véase Koedood et al. (1995, J. de Virol., vol. 69, p. 2194-2207).

Puede obtenerse un promotor del gen hCMV-IE1 del genoma de un virus hCMV (que están ampliamente disponibles) subclonando el área genómica que precede al gen IE1, usando herramientas de biología molecular rutinarias y métodos. Alternativamente, el promotor puede derivarse, por ejemplo, de los plásmidos de tipo

40 expresión de mamífero tales como las series pCMV (Clontech) o pCMV-MCS (Stratagene; N.º de acc. de GenBank™ AF369966).

A partir del promotor del gen hCMV-IE1, se conocen muchas versiones altamente similares, por ejemplo de GenBank. Tales homólogos y variantes están dentro del alcance de la invención.

Un "gen de proteína F de NDV" para la invención es muy conocido y la información de secuencia está ampliamente disponible en el estado de la técnica. El gen de proteína F puede obtenerse de varias construcciones de plásmido comúnmente disponibles. Alternativamente, puede obtenerse de un NDV aislado de la naturaleza, usando técnicas

45 rutinarias para manipular un virus de ARN. El NDV puede ser fácilmente identificado usando serología, o biología molecular.

Para la invención, homólogos del gen de proteína F de NDV serían igualmente aplicables, además de variantes, por ejemplo, de NDV de tipo lentogénico, mesogénico o velogénico, ya que la propia secuencia del gen de proteína F está altamente conservada en estos patotipos de NDV diferentes.

En una realización del casete de expresión según la invención, el promotor del gen mCMV-IE1 es un promotor completo, que comprende tanto la región promotora de núcleo, además de la región de potenciador para el gen

55 mCMV-IE1. El promotor del gen mCMV-IE1 completo tiene aproximadamente 1,4 kb de tamaño.

Como el experto conoce muy bien, puede producirse alguna varianza en la longitud, ya sea del promotor del gen mCMV-IE1, pero también de los otros elementos que constituyen el casete de expresión de ADN recombinante según la invención. Esto puede resultar de diferencias en las condiciones exactas que se usan para la clonación y

60 construcción; por ejemplo, de usar diferentes sitios de enzimas de restricción, cebadores de clonación de PCR, o diferentes condiciones para adaptar los extremos de las moléculas de clonación usadas. Por consiguiente, puede producirse alguna variación en la longitud -más pequeños o más grandes- de los elementos constituyentes, sin afectar la estabilidad y eficacia del casete de expresión global. En ese caso, estas diferencias de longitud son irrelevantes, y están dentro del alcance de la invención.

Por tanto, con respecto al promotor del gen mCMV-IE1 para la invención, "aproximadamente 1,4 kb" es: 1,4 kb ±

65 aproximadamente el 25 %, preferentemente ± aproximadamente el 20, 15, 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, o incluso ±

aproximadamente el 1 %, en ese orden de preferencia.

Similarmente, pueden usarse homólogos o variantes del elemento promotor que son igualmente eficaces y estables. Por tanto, en una realización, el promotor del gen mCMV-IE1 para la invención es una molécula de ADN de aproximadamente 1,4 kb, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia de nucleótidos con la longitud completa de la región de nucleótidos 630 - 2020 de SEQ ID NO: 1. Es más preferida una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 96, 97, 98, o incluso el 99 %, en ese orden de preferencia.

10 En una realización, el promotor del gen mCMV-IE1 es la región de nucleótidos 630 - 2020 de SEQ ID NO: 1.

15 En una realización del casete de expresión según la invención, el gen VP2 de IBDV para la invención codifica una proteína VP2 de un IBDV que es del tipo clásico. Tales genes son muy conocidos y su información de secuencia está fácilmente disponible en el estado de la técnica, véase, por ejemplo, N.º de acc. de GenBank: D00869 (F52/70), D00499 (STC) o AF499929 (D78). Alternativamente, este gen puede obtenerse del genoma de un IBDV clásico aislado de la naturaleza, usando técnicas rutinarias para manipular un birnavirus. IBDV de tipo clásico pueden ser fácilmente identificados usando serología, o biología molecular.

20 Como los homólogos o variantes del gen VP2 de IBDV pueden tener eficacia y estabilidad iguales, por tanto, en una realización, el gen de proteína VP2 de IBDV para la invención tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia de nucleótidos con la longitud completa de la región de nucleótidos 2052 - 3410 de SEQ ID NO: 1. Preferentemente, una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 92, 94, 95, 96, 97, 98, o incluso el 99 %, en ese orden de preferencia.

25 En una realización, el gen de proteína VP2 de IBDV para la invención deriva de la cepa de IBDV clásica Faragher 52/70.

30 En una realización, el gen de proteína VP2 de IBDV para la invención es la región de nucleótidos 2052 - 3410 de SEQ ID NO: 1.

Para el casete de expresión según la invención, la selección de un tipo específico de terminador de la transcripción no es crítica, en tanto que se proporcione terminación eficaz de la transcripción de ARN.

35 En una realización del casete de expresión según la invención, el terminador de la transcripción comprende tanto una región de terminador como una región de poliA.

40 En una realización, el terminador de la transcripción deriva del virus simio 40 (SV40), preferentemente del gen tardío SV40. Este terminador y su uso en expresión heteróloga se ha aplicado en virología molecular durante muchos años, y se comercializó por Clontech con sus plásmidos de clonación 'pCMV $\beta$ ', que están comercialmente disponibles desde finales de los años 80.

En una realización, el terminador de la transcripción deriva del gen tardío SV40 y tiene aproximadamente 0,2 kb de tamaño.

45 Como el tamaño exacto no es crítico, por tanto, con respecto al terminador de la transcripción para la invención, "aproximadamente 0,2 kb" es: 0,2 kb  $\pm$  aproximadamente el 25 %, preferentemente  $\pm$  aproximadamente el 20, 15, 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, o incluso  $\pm$  aproximadamente el 1 %, en ese orden de preferencia.

50 En una realización, el terminador de la transcripción derivado del gen tardío SV40 y aproximadamente 0,2 kb de tamaño comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia de nucleótidos con la longitud completa de la región de nucleótidos 3441 - 3650 de SEQ ID NO: 1. Es más preferida una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 96, 97, 98, o incluso el 99 %, en ese orden de preferencia.

En una realización, el terminador de la transcripción del gen tardío SV40 es la región de nucleótidos 3441 - 3650 de SEQ ID NO: 1.

55 En una realización del casete de expresión según la invención, el promotor del gen hCMV-IE1 es un promotor de núcleo. Un promotor de núcleo tal normalmente será más pequeño de 1 kb de tamaño; preferentemente aproximadamente 0,4 kb de tamaño.

60 Como se describe, el tamaño exacto no es crítico, por tanto, con respecto al promotor de núcleo del gen hCMV-IE1 para la invención, "aproximadamente 0,4 kb" es: 0,4 kb  $\pm$  aproximadamente el 25 %, preferentemente  $\pm$  aproximadamente el 20, 15, 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, o incluso  $\pm$  aproximadamente el 1 %, en ese orden de preferencia.

65 En una realización, el promotor del gen hCMV-IE1 para la invención es una molécula de ADN de aproximadamente 0,4 kb, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia de nucleótidos con la longitud completa de la región de nucleótidos 3789 - 4149 de SEQ ID NO: 1. Es más preferida una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 96, 97, 98, o incluso el 99 %, en ese orden de preferencia.

## ES 2 648 672 T3

En una realización, el promotor de núcleo del gen hCMV-IE1 es la región de nucleótidos 3789 - 4149 de SEQ ID NO: 1.

5 En una realización del casete de expresión según la invención, el gen de proteína F de NDV es de un NDV que es del tipo lentogénico.

Preferentemente, el gen de proteína F de NDV de una cepa de NDV lentogénica es de la cepa de NDV Clone 30.

10 En una realización, el gen de proteína F de NDV para la invención tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia de nucleótidos con la longitud completa de la región de nucleótidos 4174 - 5835 de SEQ ID NO: 1. Preferentemente, una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 92, 94, 95, 96, 97, 98, o incluso el 99 %, en ese orden de preferencia.

15 En una realización, el gen de proteína F de NDV para la invención es la región de nucleótidos 4174 - 5835 de SEQ ID NO: 1.

En una realización, el casete de expresión según la invención comprende un terminador de la transcripción adicional que está localizado en la dirección 3' del gen de proteína F de NDV.

20 El terminador de la transcripción adicional, localizado en la dirección 3' del gen de proteína F de NDV, puede ser igual o diferente en comparación con el terminador de la transcripción que está en el casete de expresión según la invención, entre el gen de proteína VP2 de IBDV y el promotor hCMV-IE1, en tanto que se proporcione la apropiada terminación de la transcripción, y no se afecten la estabilidad y expresión.

En una realización, el terminador de la transcripción adicional deriva del gen hCMV-IE1. Preferentemente, el terminador de la transcripción adicional tiene aproximadamente 0,3 kb de tamaño.

25 Como el tamaño exacto no es crítico, por tanto, con respecto al terminador de la transcripción adicional derivado del gen hCMV-IE1, "aproximadamente 0,3 kb" es: 0,3 kb  $\pm$  aproximadamente el 25 %, preferentemente  $\pm$  aproximadamente el 20, 15, 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, o incluso  $\pm$  aproximadamente el 1 %, en ese orden de preferencia.

30 En una realización, el terminador de la transcripción adicional derivado del gen hCMV-IE1, y aproximadamente 0,3 kb de tamaño, comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia de nucleótidos con la longitud completa de la región de nucleótidos 5847 - 6127 de SEQ ID NO: 1. Es más preferida una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 96, 97, 98, o incluso el 99 %, en ese orden de preferencia.

35 En una realización, el terminador de la transcripción adicional derivado del gen hCMV-IE1 es la región de nucleótidos 5847 - 6127 de SEQ ID NO: 1.

En una realización del casete de expresión de ADN recombinante según la invención, una o más o todas de las condiciones aplicadas se seleccionan del grupo que consiste en:

- 40
- el promotor del gen mCMV-IE1 es un promotor completo,
  - el gen VP2 de IBDV codifica una proteína VP2 de un IBDV de tipo clásico,
  - el terminador de la transcripción comprende tanto una región de terminador como una región de poliA,
  - el terminador de la transcripción deriva del virus simio 40 (SV40),

45

  - el promotor del gen hCMV-IE1 es un promotor de núcleo,
  - el gen F de NDV es de una cepa de NDV lentogénica,
  - el casete de expresión comprende un terminador de la transcripción adicional que está localizado en la dirección 3' del gen F de NDV, y
  - el terminador de la transcripción adicional deriva del gen hCMV-IE1.

50

En una realización, el casete de expresión de ADN recombinante según la invención comprende regiones flanqueantes 5' y/o 3' de un gen de HVT. Estas regiones flanqueantes permiten la recombinación homóloga para dirigir la inserción a un locus de inserción genética diana en el genoma del vector, y en una orientación deseada.

55 En una realización preferida, el casete de expresión de ADN recombinante según la invención está flanqueado en ambos lados por secciones del gen Us2 de HVT.

Un ejemplo es la secuencia de ADN como se representa en SEQ ID NO: 1.

Tabla 1: Elementos de SEQ ID NO:1:

Región de nucleótidos		Elemento
1	399	parte 5' del gen Us2 de HVT
630	2020	promotor del potenciador del gen mCMV-IE1
2052	3410	cepa de IBDV F 52/70, gen VP2
3441	3650	Terminador del gen tardío SV40 + señal de poliA
3789	4149	promotor de núcleo del gen hCMV-IE1
4174	5835	gen F de Clone 30 de NDV

5847	6127	terminador del gen hCMV-IE
6156	6674	parte 3' del gen Us2 de HVT

5 En una realización, el casete de expresión de ADN recombinante según la invención tiene aproximadamente 5,5 kb de tamaño. Debido a que -como se describe- el tamaño exacto no es crítico, por tanto, con respecto al casete de expresión de ADN recombinante según la invención, su tamaño es aproximadamente 5,5 kb, que significa 5,5 kb ± aproximadamente el 25 %, preferentemente ± aproximadamente el 20, 15, 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, o incluso ± aproximadamente el 1 %, en ese orden de preferencia.

10 Como se describe, homólogos o variantes de los elementos del casete de expresión de ADN recombinante según la invención pueden ser igualmente seguros, estables y eficaces.

10 Por tanto, en una realización, el casete de expresión de ADN recombinante según la invención es una molécula de ADN de aproximadamente 5,5 kb, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia de nucleótidos con la longitud completa de la región de nucleótidos 630 - 6127 de SEQ ID NO: 1. Es más preferida una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 96, 97, 98, o incluso el 99 %, en ese orden de preferencia.

15 En una realización, el casete de expresión de ADN recombinante según la invención es la región de nucleótidos 630 - 6127 de SEQ ID NO: 1.

20 Para facilitar la conveniente construcción, manipulación y uso del casete de expresión de ADN recombinante según la invención, éste puede él mismo estar comprendido en una molécula de ADN.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula de ADN recombinante que comprende el casete de expresión de ADN recombinante según la invención.

25 En una realización, la molécula de ADN recombinante según la invención consiste en un plásmido de clonación que comprende el casete de expresión de ADN recombinante según la invención. Ejemplos de plásmidos de clonación comunes son, por ejemplo, plásmidos de las series pBR322 o pUC. Éstos están ampliamente comercialmente disponibles.

30 En una realización de un plásmido que es la molécula de ADN recombinante según la invención, el plásmido puede contener secuencias reguladoras que permiten el mantenimiento estable de grandes inserciones, y que controlan el número de copias de plásmidos tras la amplificación en bacterias a un bajo número. Tales plásmidos de clonación para grandes inserciones son comúnmente conocidos como: cósmidos, o bácidos.

35 Cuando la molécula de ADN recombinante según la invención va a usarse en protocolos de transfección, se denomina comúnmente un 'vector de transferencia', 'vector lanzadera' o 'plásmido donante'. En esta situación, la molécula de ADN recombinante según la invención comprende el casete de expresión de ADN recombinante según la invención, y el casete puede estar flanqueado en ambos lados por secuencias derivadas del genoma del vector, para dirigir la inserción.

40 Normalmente, un vector de transferencia que se usa en transfección no está el mismo integrado en el genoma del vector, solo facilita la integración del casete de expresión que lleva.

En una realización, la molécula de ADN recombinante según la invención comprende la región de nucleótidos 630 - 6127 de SEQ ID NO: 1.

45 En una realización, la molécula de ADN recombinante según la invención comprende la molécula de ADN como se presenta en SEQ ID NO: 1.

50 El casete de expresión de ADN recombinante según la invención se usa preferentemente para la generación de una vacuna de virus del vector de HVT recombinante.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un virus del herpes del pavo (HVT) recombinante, que comprende un casete de expresión de ADN recombinante según la invención, por lo que el casete de expresión se inserta en la región Us del genoma del HVT recombinante.

55 El término "virus del herpes del pavo" (HVT) se refiere a un microorganismo viral que muestra las características caracterizadoras de sus miembros de grupo taxonómico tales como las características morfológicas, genómicas y bioquímicas, además de las características biológicas de ese grupo, tales como en su comportamiento fisiológico, inmunológico o patológico. Éste también incluye HVT que son sub-clasificados de algún modo, por ejemplo como una subespecie, cepa, cepa clínica, genotipo, variante, subtipo, serotipo, patotipo, o subgrupo y similares.

60 Será evidente para un experto que la actual clasificación taxonómica de un microorganismo descrito en el presente documento, tal como un HVT, MDV, NDV o IBDV para la invención, podría cambiar con el tiempo, ya que nuevas percepciones conducen a la reclasificación en un grupo taxonómico nuevo o diferente. Sin embargo, como esto no cambia al propio microorganismo o su comportamiento biológico, sino solo su nombre científico o clasificación, tales

microorganismos reclasificados siguen estando dentro del alcance de la invención.

Para la invención, "que comprende un casete de expresión de ADN recombinante" se refiere a la inserción del casete de expresión de ADN recombinante según la invención en el genoma de un HVT. Esta inserción puede en principio hacerse por cualquier disponible técnica, y puede producir una inserción, una sustitución o una delección, con respecto al genoma del vector de HVT, siempre que el HVT recombinante resultante sea capaz de presentar sus efectos favorables de expresión de antígeno multivalente segura, estable y eficaz. Detalles y ejemplos se describen en el presente documento más adelante.

El HVT recombinante según la invención comprende el casete de expresión de ADN recombinante según la invención en un único locus genético, y en la región de su genoma que se conoce como la región corta única, o Us. La región Us de un HVT es muy conocida y es fácilmente identificable; está situada entre dos elementos repetidos muy conocidos en el genoma del HVT, el IRS y el TRS.

Se conocen varios loci de inserción para la región Us de HVT, y en principio éstos son todos adecuados para su uso en la invención, siempre que el casete de expresión insertado y el HVT recombinante resultante sean capaces de presentar sus propiedades estables y eficaces.

En una realización, el HVT recombinante según la invención comprende el casete de expresión de ADN recombinante según la invención insertado en el gen Us2 o Us10 del genoma del HVT recombinante.

Vectores de HVT recombinantes particularmente estables y eficaces para la invención podrían prepararse empleando el gen Us2 del HVT genoma como el único locus de inserción genética para la invención.

Por tanto, en una realización de HVT recombinante según la invención, el casete de expresión de ADN recombinante según la invención se inserta en el gen Us2 del genoma del HVT recombinante.

Para la invención, los términos "en el gen Us2" o "en el gen Us10" pretenden indicar que se ha hecho una inserción en la región del genoma de HVT que comprende el gen Us2, respectivamente Us10; esto puede referirse al promotor del gen o a su región codificante. Por tanto, el efecto neto de la inserción con respecto al genoma del HVT puede ser una inserción, una sustitución o una delección, como se describe. Como consecuencia esperada de tal inserción es que la función codificante normal del gen Us2, respectivamente Us10, está alterada, o incluso completamente suprimida en el HVT recombinante resultante.

En una realización, la inserción del casete de expresión de ADN recombinante en la región Us de HVT es una inserción; es decir, aparte de algunos nucleótidos que pueden estar ausentes o sustituidos como resultado del proceso de clonación, no se produce delección sustancial en la región del genoma Us. Por consiguiente, con el aumento neto de tamaño, de esta forma el HVT recombinante resultante tiene un tamaño del genoma que es mayor que el genoma de su padre.

En una realización, el HVT recombinante según la invención comprende una molécula de ADN de aproximadamente 5,5 kb, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia de nucleótidos con la longitud completa de la región de nucleótidos 630 - 6127 de SEQ ID NO: 1. Es más preferida una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 96, 97, 98, o incluso el 99 %, en ese orden de preferencia.

En una realización, el HVT recombinante según la invención comprende la región de nucleótidos 630 - 6127 de SEQ ID NO: 1.

En una realización, el HVT recombinante según la invención comprende una secuencia de nucleótidos como se presenta en SEQ ID NO: 1.

Para hacer el HVT recombinante según la invención seguro para su uso para vacunas, el HVT recombinante puede basarse en un HVT parental que es una cepa de vacuna de HVT estable que se replica bien, y se sabe que es adecuada para inoculación de aves jóvenes o embriones, por ejemplo las cepas de vacuna de HVT PB1 o FC-126. Éstas están generalmente disponibles: FC-126 de ATCC: VR N.º 584-C, y PB1 está comercialmente disponible, por ejemplo, de MSD Animal Health. La incorporación del casete de expresión de ADN recombinante según la invención no aumenta la virulencia o patogenicidad del HVT parental (por el contrario), y no cabe esperar inversión a la virulencia, ya que los HVT son naturalmente apatógenos.

Por tanto, en una realización, el HVT parental usado para la generación del HVT recombinante según la invención es una cepa de vacuna de HVT; preferentemente, una cepa de vacuna de HVT de la cepa PB1 o FC-126.

El HVT recombinante según la invención es un microorganismo portador recombinante vivo, o un virus de "vector", que puede usarse ventajosamente para la vacunación de aves de corral. Combina las características de ser una vacuna segura y eficaz contra ND e IBD, y además, es genéticamente estable.

Ser "genéticamente estable" para la invención significa que la constitución genética del HVT recombinante según la

- invención no cambia en rondas posteriores de replicación del virus, o al menos no cambia a un grado que fuera detectable. Alternativamente, construcciones inestables pueden conducir a la pérdida de expresión de uno o ambos del (de los) gen(es) heterólogo(s) insertado(s). Esta estabilidad puede monitorizarse convenientemente con técnicas rutinarias, por ejemplo sometiendo el HVT recombinante según la invención a pases posteriores en cultivo celular, seguido de un pase en animales. Los virus re-aislados durante estas etapas pueden sembrarse en placas de cultivo celular, cubrirse con agar e incubarse hasta que las placas específicas de HVT lleguen a ser visibles; todo usando técnicas rutinarias. A continuación, las placas pueden teñirse para la expresión de la proteína F o VP2 usando preparaciones de anticuerpo adecuadas en un protocolo de ensayo de inmunofluorescencia (IFA), y controles positivos y negativos adecuados. El número de placas que no muestran fluorescencia puede registrarse, por lo que deben monitorizarse al menos 100 placas individuales de una muestra particular.
- Una prueba rigurosa para la estabilidad genética del HVT recombinante según la invención es aplicar 15 pases consecutivos de cultivo de tejido, seguido de una inoculación en animales diana, reaislamiento y exposición-infección. Los detalles se describen en lo sucesivo.
- Se encontró sorprendentemente que el HVT recombinante según la invención en una prueba de estabilidad rigurosa como se ha descrito anteriormente mantuvo la presencia y la expresión de tanto los genes de proteína F de NDV como VP2 de IBVD, en todas las placas probadas, y durante 15 pases de cultivo celular, además de para un pase en animales. Detalles se describen en los ejemplos.
- Esto es una mejora importante y altamente significativa con respecto a los resultados encontrados con los recombinantes de HVT del estado de la técnica, y con respecto a otros recombinantes hechos y probados en el transcurso de los experimentos para la invención.
- El HVT recombinante según la invención puede amplificarse por técnicas comunes, principalmente por replicación en cultivos *in vitro* de células de pollo primarias, normalmente células de fibroblasto de embrión de pollo (CEF). Éstas pueden prepararse por tripsinización de embriones de pollo, todos muy conocidos en la técnica. Las CEF se siembran en monocapas y se infectan con el HVT. Este proceso puede ser cambiado de escala hasta producción de tamaño industrial.
- Comúnmente, el HVT recombinante se recoge recogiendo las células hospedadoras infectadas que contienen el HVT recombinante en su forma asociada a célula. Estas células se recogen en una composición de vehículo apropiada para proporcionar la estabilización durante la congelación y almacenamiento. A continuación, las células infectadas se envasan comúnmente en ampollas de vidrio, que se tapan, congelan y guardan en nitrógeno líquido. Aunque se prefiere el almacenamiento congelado asociado a célula de HVT, en situaciones donde el uso de nitrógeno líquido no sea factible, una alternativa es usar liofilización: esto emplea la característica favorable de que HVT puede aislarse de su célula hospedadora por rotura de células, por ejemplo por prensa francesa o sonicador, usando el cultivo entero. Éste puede aclararse por centrifugación, y entonces se recoge en un estabilizador, y se liofiliza para almacenamiento.
- Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende un HVT recombinante según la invención.
- Una "célula hospedadora" para la invención es una célula que es susceptible a infección y replicación por un HVT. Ejemplos de tales células son células aviares, y en particular linfocitos, o fibroblastos.
- En una realización, la célula hospedadora según la invención es una célula aviar primaria; es decir, una célula que deriva directamente de un animal o un órgano de animal, y no de una línea celular. Normalmente, las células primarias pueden solo realizar un número pequeño y limitado de divisiones celulares, mientras que células de una línea celular son eficazmente inmortales, y -bajo las condiciones correctas- pueden seguir dividiéndose.
- En una realización, la célula hospedadora aviar primaria según la invención es un fibroblasto de embrión de pollo primario (CEF).
- En una realización, la célula hospedadora según la invención es una célula aviar inmortalizada. Se han descrito varias células aviares inmortalizadas, por ejemplo en los documentos WO 97/044.443 y WO 98/006.824.
- En una realización preferida, la célula hospedadora aviar inmortalizada según la invención es una CEF inmortalizada; preferentemente una CEF inmortalizada como se describe en el documento EP 14196345.
- Por diferentes métodos de clonación y transfección, el casete de expresión de ADN recombinante según la invención puede usarse para obtener el HVT recombinante según la invención, que comprende el casete de expresión establemente integrado en la región Us del genoma del HVT recombinante.
- Por tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para la construcción de un HVT recombinante según la invención, comprendiendo dicho método la inserción de un casete de expresión de ADN recombinante según la invención en la región Us del genoma del HVT recombinante.
- La inserción del casete de expresión de ADN recombinante según la invención en un genoma de HVT para generar el HVT recombinante según la invención puede realizarse de diferentes formas, todas conocidas en la técnica. Una

forma conveniente es usar un vector de transferencia; en una realización, éste puede ser la molécula de ADN recombinante según la invención.

5 La inserción directa del casete de expresión de ADN recombinante según la invención en un genoma de HVT es el método preferido para generar un HVT recombinante según la invención. Sin embargo, hay otras formas muy conocidas en las que puede generarse un HVT recombinante. Por ejemplo, por inserción indirecta, por la cual partes del casete de expresión se insertan en HVT en ronda(s) individual(es) o múltiple(s) de transfección. Estas partes pueden concebirse de tal forma que tras la integración de todas las partes, la inserción total forme el casete de expresión completo, por ejemplo empleando regiones de solapamiento para conducir el orden y la orientación de las partes. Una alternativa es el uso de bácmidos, como se describe en el documento EP 996,738.

15 La técnica de inserción preferida para generar un HVT recombinante según la invención es usando regeneración de cósmidos, por ejemplo como se describe en el documento WO 93/25.665. Esta técnica emplea esencialmente un conjunto de grandes fragmentos sub-genómicos de solapamiento del genoma de HVT para reconstruir un genoma de HVT completo por cotransfección en células hospedadoras. A medida que se prepara uno de los cósmidos para comprender el casete de expresión de ADN recombinante según la invención, este llega a ser establemente integrado en el genoma del HVT recombinante.

20 Como se describe, el uso preferido del HVT recombinante según la invención es en una vacuna para aves de corral.

Por tanto, en un aspecto adicional la invención se refiere a una vacuna para aves de corral que comprende un HVT recombinante según la invención, y/o una célula hospedadora según la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Una "vacuna" es muy conocida por ser 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 inoculada 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.

30 La vacuna según la invención proporciona una protección segura y temprana de pollos contra ND e IBD. Este efecto se obtiene previniendo o reduciendo el establecimiento o la proliferación de una infección productiva por una infección de campo con NDV o IBDV en sus órganos diana respectivos. Esto se logra, por ejemplo, reduciendo la carga viral o acortando la duración de la replicación viral. A su vez, esto conduce a una reducción en el animal diana del número, la intensidad, o la gravedad de lesiones y signos clínicos asociados de la enfermedad producida por la infección viral. Una vacuna tal se denomina coloquialmente una vacuna 'contra' NDV, o IBDV.

35 Además de la eficacia de la vacuna contra ND e IBD, la vacuna según la invención también es eficaz contra MD, debido a la capacidad de vacunación por el propio HVT. Esto no se reduce por la inserción del casete de expresión de ADN recombinante según la invención en la región Us. Sin embargo, dependiendo de la virulencia del virus de campo de MDV en una cierta área, puede ser necesario añadir un componente de vacuna de MD adicional, como se describe, con el fin de ser completamente eficaz como una vacuna contra MDV. La determinación de la eficacia de una vacuna según la invención está perfectamente dentro de las habilidades del médico rutinario, y puede hacerse, por ejemplo, monitorizando la respuesta inmunológica tras la vacunación o probando la aparición de síntomas clínicos o la mortalidad después de una infección por exposición, por ejemplo monitorizando los signos de enfermedad de la diana, puntuaciones clínicas, parámetros serológicos, o por re-aislamiento del patógeno de exposición, y comparando estos resultados con una respuesta de vacunación-exposición buscada en animales vacunados de referencia. Para evaluar la eficacia de la vacuna contra ND, la supervivencia a la exposición es una medición conveniente; para IBD, pueden usarse convenientemente signos clínicos de enfermedad en la bolsa.

50 Diversas realizaciones, preferencias y ejemplos de una vacuna según la invención se explicarán resumidamente a continuación.

El término "aves de corral" para la invención se refiere a una especie de ave de relevancia para la práctica veterinaria, y que es susceptible a inoculación con HVT; las especies de aves de corral preferidas son: pollo, pavo y perdiz. Los pollos son las especies más preferidas.

55 Para la invención, las aves de corral pueden ser de cualquier tipo, raza o variedad, tal como: ponedoras, reproductoras, de engorde, razas de combinación, o líneas parentales de cualquiera de tales razas. Tipos preferidos son: de engorde, reproductoras y ponedoras. Las preferidas son pollos de engorde, ya que para este tipo de aves la protección temprana contra ND e IBD produce mejora de la supervivencia, tasa de crecimiento y conversión de pienso.

65 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" está previsto para ayudar en la estabilización y administración de la vacuna, mientras que sea inocuo y bien tolerado por la diana. Un vehículo tal puede, por ejemplo, ser 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. Detalles y ejemplos se describen, por ejemplo, en manuales muy conocidos tales como: "Remington: the science and practice of pharmacy"

(2000, Lippincott, USA, ISBN: 683306472), y: "Veterinary vaccinology" (P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN 0444819681).

Para la presente invención, cuando la vacuna es HVT asociada a célula, entonces el vehículo farmacéuticamente aceptable es preferentemente una mezcla de medio de cultivo, y aproximadamente 10 % de suero, y aproximadamente 6 % de DMSO. El suero puede ser cualquier suero rutinariamente usado para el cultivo de células tal como suero de ternero fetal o de recién nacido.

La vacuna según la invención se prepara a partir de un HVT recombinante según la invención por métodos como se describen en el presente documento, que son fácilmente aplicables por un experto en la materia. Por ejemplo, el HVT recombinante según la invención se construye por inserción de un casete de expresión recombinante según la invención por transfección y recombinación. A continuación, se selecciona el HVT recombinante deseado, y se amplifica industrialmente en volúmenes más pequeños o más grandes, preferentemente en cultivos celulares *in vitro*, por ejemplo en CEF. A partir de tales cultivos se recoge una suspensión que comprende el virus, bien como células infectadas completas o bien como una preparación libre de células, obtenida por rotura de células. Esta suspensión se formula en una vacuna y el producto final se envasa. La vacuna asociada a célula se almacena entonces en nitrógeno líquido y se liofiliza la vacuna a -20 o a +4 °C. Después de amplias pruebas para calidad, cantidad y esterilidad, el producto de vacuna se saca al mercado.

Técnicas y consideraciones generales que se aplican a la preparación de vacunas son muy conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en las regulaciones gubernamentales (Farmacopea) y en manuales tales como: "Veterinary vaccinology" y: "Remington" (ambos arriba).

En una realización, la vacuna según la invención es una vacuna asociada a célula.

Significando "asociada a célula" que comprende células hospedadoras según la invención, que se infectan con un HVT recombinante según la invención. Por consiguiente, una vacuna de este tipo comprende tanto células hospedadoras, además de HVT recombinante, ambos según la invención.

En una realización, la vacuna según la invención es una vacuna de virus libre de células.

Significando "libre de células" que comprende el HVT recombinante según la invención, y que está sustancialmente libre de células hospedadoras según la invención. La vacuna libre de células puede, sin embargo, contener cantidades (muy) pequeñas de fragmentos de células hospedadoras, que quedan del proceso de rotura de las células. La vacuna libre de células está preferentemente en forma liofilizada. Los procedimientos de liofilización son conocidos para los expertos en la materia, y está disponible comercialmente equipo para liofilización a diferentes escalas.

Por tanto, en una realización, la vacuna de virus libre de células según la invención está en una forma liofilizada.

Para reconstituir una vacuna liofilizada, se suspende en un diluyente fisiológicamente aceptable. Esto se hace comúnmente inmediatamente antes de la administración, para determinar la mejor calidad de la vacuna. El diluyente puede ser, por ejemplo, agua estéril, o una solución salina fisiológica. El diluyente que va a usarse para reconstituir la vacuna pueden él mismo contener compuestos adicionales, tales como un adyuvante.

En una realización adicional de la vacuna libre de células liofilizada según la invención, el diluyente para la vacuna se suministra por separado de la torta liofilizada que comprende la composición de vacuna activa. En este caso, la vacuna liofilizada y la composición de diluyente forman un kit de partes que juntos se integran en la vacuna según la invención.

Por tanto, en una realización preferida de la vacuna libre de células liofilizada según la invención, la vacuna es un kit de partes con al menos dos tipos de recipientes, un recipiente que comprende la vacuna liofilizada y un recipiente que comprende un diluyente acuoso.

El animal diana para la vacuna según la invención puede estar en principio sano o enfermo, y puede ser positivo o negativo para la presencia de NDV o IBDV, o para anticuerpos contra NDV o IBDV. La diana también puede ser de cualquier peso, sexo o edad a la que sea susceptible a la vacunación. Sin embargo, es evidentemente favorable vacunar dianas no infectadas sanas, y vacunar tan pronto como sea posible para prevenir cualquier infección de campo y sus consecuencias.

Una vacuna según la invención puede así usarse ya sea como un tratamiento profiláctico o terapéutico, o ambos, ya que interfiere tanto con el establecimiento como con la progresión de una infección por NDV o IBDV.

A ese respecto, un efecto ventajoso adicional de la reducción de carga viral por la vacuna según la invención es la prevención o reducción de la muda y así la diseminación del virus, tanto verticalmente a la descendencia, como horizontalmente dentro de una bandada o población, y dentro de un área geográfica. Por consiguiente, el uso de una vacuna según la invención conduce a una reducción de la prevalencia de NDV o IBDV.

Por tanto, un aspecto adicional de la invención es la vacuna según la invención para su uso en reducir la prevalencia de NDV o IBDV en una población o en un área geográfica.

La vacuna según la invención puede ser administrada en principio a aves de corral diana por diferentes vías de

administración, y en diferentes momentos de su vida, siempre que el HVT recombinante inoculado pueda establecer una infección protectora.

5 Sin embargo, debido a que una infección con NDV o IBDV puede establecerse ya a edad muy joven, es ventajoso administrar la vacuna según la invención tan pronto como sea posible. Por tanto, la vacuna según la invención puede administrarse en el día de la eclosión ("día 1"), o en el huevo, por ejemplo 18 días ED. Por tanto, en una realización, la vacuna según la invención va a administrarse en el huevo.

10 Está disponible comercialmente equipo para la inyección automatizada de una vacuna en un huevo a escala industrial. Esto proporciona la protección más temprana posible, mientras que minimiza el coste de trabajo. Se conocen vías de inoculación en el huevo diferentes, tales como en el saco vitelino, el embrión, o la cavidad de líquido alantoideo; éstos pueden optimizarse según se requiera. Preferentemente, la inoculación en el huevo se realiza de forma que la aguja en realidad toque el embrión.

15 En una realización, la vacuna según la invención es para administración por vía parenteral. Preferentemente, por vía intramuscular o subcutánea.

Una vacuna según la invención puede prepararse en una forma que es adecuada para administración a un ave de corral diana, y que se corresponde con la vía de aplicación deseada, y con el efecto deseado.

20 Preferentemente, una vacuna según la invención se formula como un líquido inyectable, adecuado para inyección, ya sea en el huevo, o parenteral; por ejemplo como: una suspensión, solución, dispersión o emulsión. Comúnmente tales vacunas se preparan estériles.

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

30 Por ejemplo, para ser adecuada para administración en el huevo, se requiere que la composición de vacuna sea muy segura, con el fin de no reducir la capacidad de eclosión de los huevos. Sin embargo, incluso entonces todavía puede ocurrir algo de reducción en la capacidad de eclosión, por ejemplo resultante de daño mecánico al embrión por la propia inoculación, o una infección, etc.

35 La cantidad exacta de HVT recombinante según la invención por dosis de animal de la vacuna según la invención no es tan crítica como sería para una vacuna de tipo inactivada; esto es debido a que el HVT recombinante puede replicarse y así multiplicarse en el animal diana hasta un nivel de viremia que es biológicamente sostenible. En principio, la dosis de vacuna solo necesita ser suficiente para iniciar una infección productiva tal. Una dosis de inóculo más alta no acorta el tiempo que necesita para alcanzar una infección virémica óptima en el hospedador. Por tanto, dosis muy altas no son eficaces y además no son atractivas por motivos económicos.

40 Una dosis de inóculo preferida está, por tanto, entre  $1 \times 10^1$  y  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de placa (ufp) de HVT recombinante según la invención por dosis de animal, más preferentemente entre  $1 \times 10^2$  y  $1 \times 10^4$  ufp/dosis, incluso más preferentemente entre 500 y 5000 ufp/dosis; lo más preferentemente entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 3000 ufp/dosis.

45 Cuando la vacuna según la invención está asociada a célula, estas cantidades de HVT recombinante están comprendidas en células hospedadoras infectadas.

Métodos para contar partículas virales del HVT recombinante según la invención son muy conocidos.

50 El volumen por dosis de animal del HVT recombinante según la invención puede optimizarse según la vía de administración prevista: la inoculación en el huevo se administra comúnmente con una dosis de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,5 ml/huevo, y la inyección parenteral se hace comúnmente con una dosis de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1 ml/ave.

La determinación de lo que es una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna según la invención, o la optimización del volumen de vacuna por dosis, están ambos perfectamente dentro de las capacidades del experto.

55 La pauta de dosificación para administrar la vacuna según la invención a un organismo diana puede ser en dosis únicas o dosis múltiples, de un modo compatible con la formulación de la vacuna, y en una cantidad tal como sea inmunológicamente eficaz.

Preferentemente, la pauta para la administración de una vacuna según la invención se integra en los programas de vacunación existentes de otras vacunas que pueden requerir las aves de corral diana, con el fin de reducir el estrés a los animales y para reducir los costes de trabajo. Estas otras vacunas pueden administrarse en un modo simultáneo, concurrente o secuencial, de un modo compatible con su uso registrado.

60 Ni que decir tiene que mezclar otros compuestos, tales como estabilizadores, vehículos, adyuvantes, diluyentes, emulsiones, y similares, con vacunas según la invención también está dentro del alcance de la invención. Tales aditivos se describen en manuales muy conocidos tales como: "Remington" y "Veterinary Vaccinology" (ambos arriba).

65 De esta forma, puede optimizarse adicionalmente la eficacia de una vacuna según la invención, para proteger aves de corral con una única inoculación a edad muy temprana contra ND, IBD e MD.

La vacuna según la invención es eficazmente una 'vacuna de marcador' para NDV y para IBDV, debido a que la inmunidad que genera solo está dirigida contra una proteína de estos virus. Esto permite la "diferenciación de animales infectados y vacunados", el llamado enfoque de DIVA. Esto puede ser convenientemente detectado por un ensayo serológico tal como un ensayo de ELISA o de inmunofluorescencia.

5 La vacuna según la invención ya proporciona inmunidad múltiple: contra NDV e IBDV por la expresión de las inserciones heterólogas, y además, contra MDV por el propio vector de HVT. Sin embargo, puede ser ventajoso hacer combinaciones adicionales mediante componentes inmunoactivos adicionales. Esto puede servir para potenciar la protección inmunitaria ya proporcionada, o para expandirla a otros patógenos.

10 Por tanto, en una realización, la vacuna según la invención comprende al menos un componente inmunoactivo adicional.

15 Un "componente inmunoactivo adicional" tal puede ser un antígeno, una sustancia potenciadora inmunitaria, una citocina, una vacuna, o cualquier combinación de los mismos. Esto proporciona ventajas en términos de coste, eficiencia y bienestar del animal. Alternativamente, la vacuna según la invención puede añadirse ella misma a una vacuna.

20 En una realización, el al menos un componente inmunoactivo adicional es un compuesto inmunoestimulante; preferentemente una citocina o un oligodesoxinucleótido inmunoestimulante.

El oligodesoxinucleótido inmunoestimulante es preferentemente un oligodesoxinucleótido que contiene CpG no metilado inmunoestimulante (INO). Un INO preferido es un agonista de receptor del tipo Toll aviar (TLR) 21, tal como se describe en los documentos WO 2012/089.800 (familia X4), WO 2012/160.183 (familia X43) o WO 2012/160.184 (familia X23).

25 En una realización, el al menos un componente inmunoactivo adicional es un antígeno que deriva de un microorganismo patógeno para las aves de corral. Éste puede 'derivar' de cualquier forma adecuada, por ejemplo como un antígeno atenuado 'vivo', inactivado, o de subunidad, de ese microorganismo patógeno para las aves de corral.

30 El antígeno adicional derivado de un microorganismo patógeno para las aves de corral deriva preferentemente de uno o más microorganismo seleccionados de los siguientes grupos que consisten en:

- 35 - virus: virus infeccioso de la bronquitis, NDV, adenovirus, virus del síndrome de caída de postura, IBDV, virus de la anemia del pollo, virus de la encefalomiелitis aviar, virus de la viruela aviar, virus de la rinotraqueítis del pavo, virus de la plaga del pato (enteritis viral del pato), virus de la viruela de la paloma, MDV, virus de la leucosis aviar, ILTV, neumovirus aviar y reovirus;
- bacterias: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Ornitobacterium rhinotracheale*, *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Erysipelas*, *Mycoplasma* y *Clostridium*;
- 40 - parásitos: *Eimeria*; y
- hongos: *Aspergillus*.

El antígeno adicional puede ser una vacuna de vector de HVT adicional.

45 Todas estas combinaciones son posibles siempre que no se influya negativamente en la eficacia, seguridad y estabilidad de la vacuna según la invención.

En una realización de la vacuna según la invención, el antígeno adicional derivado de un microorganismo patógeno para las aves de corral es una cepa de vacuna de MDV, NDV o IBDV atenuada 'viva'. Ésta sirve para mejorar y expandir la inmunogenicidad de la vacuna según la invención, y ésta es ventajosa en aquellos casos o áreas geográficas donde son predominantes cepas de campo muy virulentas de MDV, NDV o IBDV.

50 A este respecto, se conoce la combinación de un HVT con un MDV1, MDV2 o HVT; para la invención, se prefiere un MDV de la cepa Rispens (MDV1), cepa SB1 (MDV2), o cepas FC-126 o PB1 (HVT) como componente inmunoactivo adicional.

Para mejorar la respuesta contra NDV, el HVT recombinante según la invención puede combinarse con una cepa de vacuna de NDV tal como la cepa C2 de vacuna de NDV viva leve.

55 Similarmente, para mejorar la respuesta contra IBDV, el HVT recombinante según la invención puede combinarse con una cepa de vacuna de IBDV viva leve tal como D78, PBG98, Cu-1, ST-12 u 89-03.

60 Como apreciará el experto, estas 'combinaciones' también incluyen programas de vacunación en los que el HVT recombinante según la invención y el componente inmunoactivo adicional no son administrados simultáneamente, sino concurrente o secuencialmente; por ejemplo, el HVT recombinante puede aplicarse en el huevo, el C2 de NDV en el día uno, y la cepa 89-03 de IBDV en el día 17.

65 Por tanto, en una realización de la vacuna según la invención que comprende al menos un componente inmunoactivo adicional, el al menos un componente inmunoactivo adicional es un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en una cepa de vacuna de: MDV, NDV e IBDV, o cualquier combinación de los mismos.

Más preferentemente, el componente inmunoactivo adicional está seleccionado del grupo que consiste en: MDV

Rispens, MDV SB1, NDV C2, IBDV D78 e IBDV 89-03.

Tales vacunas de combinación pueden prepararse en varias formas: combinando preparaciones de virus o células hospedadoras, o una mezcla de estos; todos están dentro del alcance de la invención. En una realización preferida, los componentes para una vacuna de combinación tal se producen convenientemente por separado y luego se combinan envasando en el mismo recipiente de vacuna.

Por los métodos descritos anteriormente, y ejemplificados en lo sucesivo, puede prepararse una vacuna según la invención.

Por tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a un método *ex vivo* para la preparación de la vacuna según la invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

- infectar células hospedadoras con un HVT recombinante según la invención,
- recoger las células hospedadoras infectadas, y
- mezclar las células hospedadoras infectadas recogidas con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Células hospedadoras adecuadas y vehículos farmacéuticamente aceptables para la invención se han descrito anteriormente. Por tanto, métodos adecuados para la infección, cultivo y recogida son muy conocidos en la técnica y se describen y ejemplifican en el presente documento.

Como se explica resumidamente anteriormente en detalle, el HVT recombinante según la invención puede administrarse ventajosamente en una vacuna para aves de corral, proporcionando una vacunación segura, estable y eficaz contra MD, ND e IBD o signos de enfermedad asociados, y puede administrarse a aves de corral a una edad muy joven.

Por tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere al HVT recombinante según la invención, para su uso en una vacuna para aves de corral.

Los diferentes aspectos y realizaciones de 'uso en una vacuna' del HVT recombinante según la invención han sido explicados resumidamente anteriormente, y comprenden el uso como virus libres de células o como asociados a célula en diferentes composiciones de vacuna para la inoculación de aves de corral.

Por consiguiente, los diferentes aspectos y realizaciones de la invención pueden usarse ventajosamente para producir una vacuna segura, estable y eficaz para aves de corral.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un casete de expresión, una molécula de ADN recombinante, un HVT recombinante, o una célula hospedadora, todos según la invención, o cualquier combinación de los mismos, para la fabricación de una vacuna para aves de corral.

Como se ha descrito anteriormente, y como se ejemplifica en lo sucesivo, la vacuna según la invención puede usarse ventajosamente para prevenir o reducir la infección por IBDV y/o NDV, o signos de enfermedad asociados, por una única inoculación a edad muy temprana.

Por tanto, aspectos adicionales de la invención son:

- una vacuna según la invención, para su uso en prevenir o reducir la infección por IBDV y/o NDV, o signos de enfermedad asociados.
- una vacuna según la invención para su uso en un método de prevención o reducción de la infección por IBDV y/o NDV, o signos de enfermedad asociados, en los que dicho método comprende la administración de dicha vacuna a aves de corral.
- una vacuna según la invención, para su uso en un método de vacunación de aves de corral que comprende la etapa de inocular dichas aves de corral con dicha vacuna.

Detalles sobre el uso de la vacuna según la invención, por inoculación de aves de corral, se han descrito anteriormente; específicamente, la inoculación por inoculación intramuscular o subcutánea de pollitos de días, y la inoculación en el huevo de embriones 18 días de edad.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

## Ejemplos

### 1. Las diferentes inserciones de casete de expresión probadas

En la búsqueda de HVT recombinante estable y eficaz que expresara tanto F de NDV como VP2 de IBDV, los inventores construyeron una serie de construcciones de HVT recombinante con diferentes casetes de expresión insertados en Us2, usando diferentes elementos y orientaciones. En la Figura 2 se da una representación gráfica (no dibujada a escala) de los elementos relevantes de un número representativo de construcciones similares probadas. Para comparación, la también se representa la construcción del estado de la técnica HVP309.

Las variaciones probadas estuvieron en el orden de los genes de proteína, en los diferentes promotores usados, y en el tipo de gen de inserción usado.

En más detalle: el gen VP2 de IBDV se conectó a los siguientes promotores:

- el promotor del gen mCMV-IE1 (que incluye regiones de potenciador y de núcleo),
- el promotor de repetición terminal larga (LTR) del extremo 3' del virus del sarcoma de Rous (cepa Schmidt-Ruppin D), y
- el promotor del gen gB del virus de la pseudorabia, de la cepa de vacuna Bartha (N.º de acc. De GenBank: BK001744)

Por tanto, se probó el gen VP2 en una versión nativa y en una de codón optimizado, usando la tabla de codones de HVT. Además, en varias construcciones, los genes heterólogos estuvieron en orden inverso entre sí.

Todos estos HVT recombinantes diferentes se construyeron, se transfectaron y se amplificaron. A continuación, se seleccionaron probando la expresión *in vitro* sobre células CEF, y para la expresión y viremia *in vivo* por inoculación en animales experimentales.

## 2. Viremia y serología de diferentes construcciones de HVT recombinante

En un ensayo animal, se probaron la viremia y las respuestas serológicas inducidas por las diversas construcciones de HVT recombinantes. Se realizaron experimentos en animales esencialmente como se describe en el documento WO 2013/057.235. En resumen: pollos ponedores SPF de un día de edad se vacunaron por vía intramuscular y se mantuvieron en aisladores bajo presión negativa. 10, 24 y 38 días después de la vacunación, se re-aisló el virus HVT del bazo (10 y 38 días) o de muestras de sangre (24 días; linfocitos de sangre periférica: PBL), para probar la viremia. Se determinaron respuestas serológicas en muestras de sangre tomadas 37 días después de la vacunación. Los resultados se presentan en la Tabla 2 y en las Figuras 3 y 4.

Tabla 2: Viremia y respuestas serológicas de diferentes construcciones de HVT recombinante, probadas en ponedoras SPF vacunados i.m. de 1 día de edad

Vacuna	Casete de expresión	dosis (ufp)	Viremia (1)			serología a 37 d. p.v. (2 log)	
			10 d	24 d	38 d	HI-NDV	VN-IBDV
HVP309	hIE-NDV/F + β.act.-IBDV/VP2	2760	43	10	7	2,9	8,2
HVP360	mIE-IBDV/VP2 + hIE-NDV/F	2320	107	28	25	3,4	10
HVP361	LTR-IBDV/VP2 + hIE-NDV/F	2320	58	23	3	3,8	0,7
HVP362	gB-IBDV/VP2* + hIE-NDV/F	3060	175	57	25	3,4	<0,5
HVP364	LTR-IBDV/VP2* + hIE-NDV/F	3480	14	25		3,1	4,8
HVP366	hIE-NDV/F + gB-IBDV/VP2*	3340	97	27	13	5	<0,5
HVP367	hIE-NDV/F + LTR-IBDV/VP2*	2300	15	16		2,4	4,4
FC-126/435	HVT parental (de cósmidos)	2600	205	60	18	0,8	<0,5

VP2\* = gen VP2 de IBDV – optimizado en codón para HVT  
 (1) La viremia se expresa en ufp / 5x10<sup>6</sup> células de bazo

Todos los recombinantes de HVT se replicaron en los pollos vacunados. Los niveles de viremia de HVP364 y su construcción reflejo HVP367 fueron bajos en comparación con los otros recombinantes. Una porción de las placas de ambos virus de viremia a los 10 y 24 días no mostró expresión de VP2 y/o F en ensayos de IF. Por tanto, no se realizaron los niveles de viremia a los 38 días, y HVP364 y HVP367 se excluyeron de estudios adicionales. Todos los otros recombinantes mostraron expresión de VP2 y F en todas las placas en todos los momentos de tiempo probados.

Se determinaron las respuestas serológicas inducidas tras la inoculación en animales experimentales: para F de NDV los valores de ELISA no fueron discriminatorios, por tanto se usó hemaglutinación (HI) contra NDV (Clon 30) como herramienta de selección; para IBDV se usó neutralización (VN) contra D78; Figura 4.

Aún cuando HVP364 y HVP367 mostraron placas que no expresan, se midió la inducción de anticuerpos. El HVT recombinante HVP362 dio excelente viremia, pero no respuesta del suero contra VP2 de IBDV. Similarmente, HVP361 y HVP366 dieron seroconversión contra NDV, pero muy poca o ninguna en absoluto contra IBDV. Por consiguiente, estos tres recombinantes también se excluyeron de estudios adicionales. Sorprendentemente, solo la construcción HVP360 dio buenos niveles de viremia y de serología, y este HVT recombinante se seleccionó, por tanto, para estudios adicionales.

## 3. Caracterización de HVT recombinante: HVP360

### 3.1. Introducción

HVP360 es un HVT recombinante según la invención, y expresa tanto el gen VP2 de IBDV como el gen F de NDV. Se usó un conjunto de cósmido basado en FC-126 de HVT para insertar su casete de expresión en el locus del gen Us2 en el genoma de HVT.

En HVP360, el gen VP2 de IBVD se aisló de la cepa F52/70 de tipo clásico y es conducida por el promotor del gen IE1 de la cepa de mCMV ATCC VR-194. El gen F se originó de la cepa de vacuna de NDV Clone 30 y es conducido por el promotor del gen IE1 de la cepa de hCMV AD169. También HVP360 contiene la señal de terminación de SV40 y el terminador del gen hCMV-IE1, como se define en el presente documento. La Figura 1 muestra una vista esquemática del casete de expresión en HVP360, con todos los elementos dibujados a escala, y secuencias flanqueantes del gen Us2 de HVT. En este ejemplo, se describe la construcción y caracterización de HVP360.

### 3.2. Materiales y métodos

#### 3.2.1. Construcción de recombinantes de HVP:

Para la construcción de HVP360, se realizó la inserción del casete de expresión de ADN recombinante en el locus del gen Us2 de HVT con un conjunto de fragmentos de ADN derivados de cósmido que se solapan de la cepa de vacuna de HVT FC-126 que, después de la transfección en CEF, regeneró el virus infeccioso, como se describe en el documento WO 2013/057.235. También se usó un plásmido basado en pBR322 como vector de transferencia. Cuando fuera posible, se usaron sitios de digestión de enzima de restricción únicos; cuando no estuvieron disponibles éstos se introdujeron por inserción dirigida por PCR de una secuencia conectora sintética que comprendía un sitio único tal.

Los fragmentos de ADN viral de los vectores de cósmido y del plásmido de transferencia se escindieron por digestión con enzimas de restricción apropiadas. Los fragmentos de ADN lineales se transfectaron entonces en células CEF por medio de precipitación con fosfato de calcio. Después de que el ADN hubiera entrado en la célula, se regeneró virus HVT infeccioso por recombinación homóloga entre las secuencias de solapamiento de los fragmentos de ADN, generando así un genoma de FC-126 de HVT intacto, que comprendía el casete de expresión en Us2. Esta construcción de virus se llamó HVP360.

La progenie de los cultivos transfectados se amplificó una vez sobre CEF fresco y se comprobó para la presencia de HVT que expresaba VP2 y F por ensayo de inmunofluorescencia (IFA) usando antisueros monoclonales contra estos antígenos. El virus recombinante se aisló por purificación en una sola placa: se cubrieron monocapas de CEF infectadas con agarosa en medio de cultivo, cuando CPE de HVT fue claramente visible. Se recogieron varias placas al azar y se sometieron a pases dos veces en CEF antes de la recogida y almacenamiento como preparación de virus asociado a célula.

Se sometieron a pases dos cepas clínicas de placas paralelas VP360 (A1 y B1) quince veces en cultivos celulares CEF consecutivos, y se cribaron para la expresión de VP2 y F por IFA a diferentes niveles de pases.

#### 3.2.2. Análisis de ADN

Para la caracterización detallada de la construcción HVP360, se realizaron varios análisis de ADN en ADN de plásmido del vector de transferencia, y en ADN total de cultivos de CEF infectados con FC-126 o con el pase 5 de HVP360 de ambas cepas clínicas en paralelo. El análisis de secuencias y el análisis de transferencia Southern de la secuencia de nucleótidos codificante del casete insertado y las regiones flanqueantes Us2 de HVT se realizaron para confirmar la correcta integración en Us2, y la estabilidad genética tras someter a pases. También se realizó el análisis de transferencia Southern en el genoma completo de HVP360 para confirmar la correcta recombinación en las regiones de solapamiento de los fragmentos de ADN de HVT del conjunto de cósmidos que se usó para la reconstrucción del virus.

Se aisló el ADN de HVT de cultivos celulares de CEF infectadas con HVP360 o FC-126 de HVT de control parental que también se había ensamblado de un conjunto de cósmidos como se usa para HVP360, pero sin el casete de expresión Us2; éste se usó como virus de control en experimentos posteriores, y se llamó FC-126/435 de HVT. Las reservas de virus se sometieron a pases una vez sobre CEF y se aisló ADN total usando el kit Easy-DNA™ (Invitrogen). El ADN de plásmido del vector de transferencia se aisló de cultivos de *E. coli* transformados con el vector de transferencia, y el ADN se aisló usando el kit Quantum Prep™ Plasmid Midiprep (Bio-Rad).

#### 3.2.3. Caracterización por transferencia Southern

Se realizaron transferencias Southern para análisis de profundidad de la estructura del genoma de HVP360 para verificar que el ensamblaje de virus era exactamente como se pretendió y no habían ocurrido inserciones o deleciones involuntarias durante la regeneración de virus.

Se dirigió ADN viral de HVT con las enzimas de restricción *PvuI* y *AatII*; o con *BamHI*, *KpnI*, *BglII* y *EcoRI*. Se dirigió ADN de plásmido de transferencia con las enzimas de restricción *PvuI* y *AatII*.

Después de la digestión, se cargaron fragmentos de ADN en múltiples carriles en paralelo sobre geles de 0,7 % de agarosa/TAE, se sometieron a electroforesis y se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa. Las transferencias se cortaron en trozos idénticos y se hibridaron individualmente con una de las sondas de HVT marcadas con <sup>32</sup>P y una sonda que detecta el marcador de tamaño de ADN (Smartladder™, Eurogentec). Después

de 16 h de incubación, el exceso de sonda se eliminó en dos etapas de lavado y la transferencia se expuso a una película de rayos X. Después de desarrollar el autorradiograma, fueron visibles fragmentos de restricción de ADN que se hibridaban específicamente con la sonda.

5 Para detectar si se había incorporado cualquier parte de los plásmidos de clonación en el HVT recombinante, se preparó una sonda por digestión del plásmido pBR322 en fragmentos más pequeños con *Hae*III. Estos fragmentos se marcaron con <sup>32</sup>P. Todos los vectores de clonación usados en la reconstrucción de HVT son derivados de pBR322, y serán detectados por esta sonda si están presentes secuencias de vector. Por tanto, se usó el plásmido de transferencia HVP360 en un carril de las transferencias Southern como control positivo para la detección de  
10 secuencias de plásmido.

Para comprobar el ensamblaje correcto en las regiones de solapamiento de las inserciones de cósmido y las regiones de repetición del genoma de HVT, se diseñaron pares de cebadores para hibridarse en estas regiones relevantes y se obtuvieron sondas por PCR en ADN viral de FC-126 de HVT preparado a partir de cultivos celulares CEF infectados. Se digirieron amplicones en fragmentos más pequeños con *Sau*3AI, se marcaron con <sup>32</sup>P y se usaron como sondas en la hibridación de transferencia Southern.

A continuación, las diversas sondas se hibridaron con ADN de HVP360 que había sido digerido con *Bam*HI, *Kpn*I, *Bgl*II o *Eco*RI.

20 Se compararon las longitudes de los fragmentos de restricción detectados en las transferencias Southern con aquellos esperados basándose en la secuencia publicada para la cepa de HVT FC-126 (N.º de acc. de GenBank AF291866).

#### 25 3.2.4. Caracterización por análisis de secuencias

Para confirmar la correcta inserción y estabilidad de las secuencias codificantes, se hizo un análisis de secuencias de ADN completo en el casete de expresión y en las regiones flanqueantes de Us2 de HVT.

30 Para permitir la secuenciación de ADN, se amplificaron fragmentos específicos de ADN del HVT por PCR usando cebadores específicos. Se purificaron amplicones usando el kit Qiaquick™ (Qiagen). A continuación, se realizó secuenciación por PCR en estos amplicones, usando el kit Big Dye Terminator™ v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante. La secuenciación se hizo usando un analizador 3500 series Genetic Analyzer™ (Applied Biosystems). Las lecturas de secuencias se analizaron usando el software Sequencher™ v. 5.0 (Gene Codes Corporation).

35 Se ensambló una secuencia contigua de las lecturas de secuencias de solapamiento. Cualquier ambigüedad se resolvió por repetición de las reacciones de secuenciación y compilación de lecturas de secuencias múltiples.

#### 3.2.5. Caracterización de la expresión por IFA

40 Después de la transfección, purificación en placa y pases en serie, se monitorizaron cepas clínicas para ambas cepas clínicas en paralelo de HVP360, de los niveles de pase 5, 10 y 15 para la expresión mantenida de los genes insertados por IFA. Se infectaron monocapas de CEF con las cepas clínicas recombinantes, se incubaron durante 2-3 días hasta que la CPE fue claramente visible, y entonces se fijó con 80 % de etanol. Se detectó la expresión de VP2 de IBDV o F de NDV con anticuerpos monoclonales como primer reactivo, y un conjugado marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) como anticuerpo secundario, y se leyó por microscopía UV.

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Resultados de hibridaciones de transferencia Southern

50 Se confirmó la homogeneidad y estabilidad genética por análisis de transferencia Southern usando sondas específicas. Las transferencias hibridadas con una sonda de plásmido pBR322 en carriles que contienen ADN restringido de la cepa HVP360 y FC-126 no dieron señal con la sonda de plásmido. Sin embargo, la sonda de plásmido reaccionó positivamente con carriles que contenían ADN restringido del plásmido de transferencia, mostrando fragmentos específicos para el esqueleto de plásmido como se predijo. Por tanto, la sonda de plásmido fue positiva para la mayoría de las bandas del marcador de tamaño de ADN.

La misma transferencia se hibridó entonces con una sonda específica para el locus de inserción Us2, revelando otra vez los fragmentos de restricción como se predijo.

60 Como era de esperar, se observó un patrón de bandas diferente -esperado- para la región del genoma donde se había insertado el casete de expresión.

Las hibridaciones mostraron que el genoma viral de HVP360 se reensambló correctamente y se correspondió con el patrón observado para la cepa reconstruida de cósmido de HVT parental FC-126/435.

65 En las hibridaciones con sondas que detectaron secuencias de solapamiento y regiones de repetición, se encontró

que los patrones para HVP360 y FC-126 eran ampliamente idénticos, aunque en algunas regiones el patrón encontrado difirió ligeramente del patrón de hibridación de transferencia Southern predicho para la unión entre la región de repetición larga única y terminal, basándose en la secuencia de ADN publicada para FC-126 de HVT. Sin embargo, el patrón en estas regiones es idéntico para tanto cepas de virus recombinantes como paternos.

5 Por consiguiente, estas diferencias se produjeron por diferencias en la secuencia del genoma viral de la cepa parental FC-126 de HVT y la secuencia publicada, y no por reordenamientos durante el ensamblaje del genoma del virus por la tecnología de reconstrucción de cósmidos.

### 3.3.2. Resultados de caracterización por análisis de secuencias

10 Se determinó la secuencia de ADN completa de las regiones de casete y flanqueantes insertadas del plásmido de transferencia usado por secuenciación por PCR. La secuencia consenso de la inserción en el genoma viral de HVP360 se alineó para ambas cepas clínicas A1 y B1, y se comparó con la secuencia en el plásmido de transferencia, además de con la secuencia de la región de inserción de la cepa parental FC-126. El resultado del  
15 alineamiento confirma que la secuencia insertada en HVP360 es idéntica para las cepas clínicas A1 y B1. Además, se mostró que esta secuencia era idéntica al casete de expresión original en el plásmido de transferencia. Por tanto, se mostró que las regiones flanqueantes del locus de inserción Us2 del plásmido de transferencia, de A1 y B1 de HVP360, y de FC-126 eran idénticas en secuencia de ADN.

### 20 3.3.3. Resultados de la caracterización de expresión por IFA

Se cribó por IFA el virus purificado en placa de HVP360 para ambas cepas clínicas en paralelo, y de los niveles de pases 5, 10 y 15, para la expresión de VP2 y F. Todas las placas probadas mostraron la expresión completa de los genes F y VP2. Esto confirma la expresión funcional y estable de VP2 y F, hasta (al menos) el nivel de pase de  
25 células 15.

### 3.4. Conclusiones

30 HVP360 es un HVT recombinante que expresa tanto VP2 de IBDV como F de NDV. La caracterización detallada por IFA, análisis de transferencia Southern en ADN viral y secuenciación de ADN de las regiones de inserción y flanqueantes confirmó que dos cepas clínicas de HVP360 independientes A1 y B1 habían integrado correctamente el casete de expresión en la región Us2 de FC-126 de HVT y expresaban funcionalmente los genes VP2 de IBDV y F de NDV en cultivos infectados de CEF durante 15 pases posteriores en células CEF después de la purificación en placas.

35 El casete de expresión y el genoma total de las cepas clínicas de HVP360 A1 y B1 son correctos por que no se detectaron deleciones, transposiciones o secuencias extrañas adicionales en patrones de digestión de restricción obtenidos después de la hibridación por transferencia Southern con una serie de sondas genómicas específicas de HVT. Solo se integra una copia de la inserción en la región Us2.

40 Después del análisis de secuencias detallado de los casetes de expresión y las regiones flanqueantes del locus de inserción Us2, se llegó a la conclusión de que A1 y B1 de HVP360 son idénticos, entre sí, a la secuencia en el vector de transferencia, y al virus parental FC-126.

### 45 4. Ensayo de vacunación - exposición con HVP360

Se realizó un experimento de vacunación - exposición con HVT recombinante HVP360. En resumen: se vacunaron ponedoras SPF de un día de edad por vía intramuscular con cualquiera de las cepas clínicas en paralelo A1 o B1 de HVP360.

50 3 o 4 semanas después de la vacunación, se midió la protección inducida contra una infección por exposición grave con o bien IBDV o bien NDV: para la exposición a IBDV, la cepa CS89 se inoculó a 3000 CID50 en 0,1 ml, por vía ocular a cada ojo; para la cepa de NDV Herts 33/56 se administró a 6 Log 10 ELD50 en 0,2 ml por animal, por vía i.m. Se determinó el nivel de viremia de la vacuna y del virus de control por reaislamiento del virus de bazos de animales inoculados. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

55 El nivel de protección a la exposición se determinó del siguiente modo:

60 Para la exposición a NDV, la relación de animales vivos frente a muertos se determinó 2 semanas después de la exposición a 3 o 4 semanas p.v. Por ejemplo: 18 supervivientes de los 20 animales en el grupo da una puntuación de protección de NDV del 90 %.

65 Para la exposición a IBDV, los síntomas clínicos de la bolsa en la autopsia 10 días después de la exposición dan una puntuación entre 0 y 5, que representa de ninguno a agotamiento de linfocitos grave. Animales con una puntuación de 0 - 2 se consideran protegidos, mientras que no se protege una puntuación de 3 - 5. La protección de IBDV es el porcentaje de animales que se protegió (puntuación clínica de la bolsa 0 - 2) del número de animales en el grupo.

Los resultados mostraron que en este experimento la vacunación i.m. con HVP360 protegió a los pollos de un día de edad contra ND 3 semanas después de la vacunación, para del 59 al 73 %. La protección de ND a las 4 semanas fue del 79 al 93 %. La protección contra IBD 3 a 4 semanas después de la vacunación fue del 93 al 100 %.

5 Tabla 3: Viremia, serología y protección a la exposición contra IBDV y NDV, en ponedoras SPF vacunados i.m. de 1 día de edad con HVP360.

Vacuna	dosis (ufp)	Viremia promedio (1)		HI-NDV (2 Log)	VN-IBDV (2 log)	Protección de NDV (%)		Protección de IBDV (%)	
		10 d	25 d	25 d	25 d	21 d	28 d	21 d	28 d
360 A1	1880	176	17	3,1	6	73	79	94	100
360 B1	1820	158	13	3,4	6,6	59	93	94	93
FC-126/435	2440	404	36	0,9	0	0	0	0	0

(1) La viremia se expresa en ufp / 5x10<sup>6</sup> células de bazo

5. Aparición y duración de la inmunidad contra ND y contra IBD

10 En un experimento de vacunación - exposición posterior, usando HVP360 como vacuna, y exposición con NDV o con IBDV, se determinaron la aparición de inmunidad y la duración de la inmunidad. El virus de la vacuna HVP360 estuvo al nivel de pase 13; los animales fueron ponedoras SPF, 1 día de edad; la vía de vacunación fue: subcutánea; la dosis de vacunación estuvo entre 1500 y 2500 ufp/dosis de animal de 0,2 ml. El virus de exposición fue o bien CS89 de IBDV o bien Herts 33/56 de NDV. Los animales de control se inocularon s.c. con FC-126/435 de HVT.

15 Tabla 4. Protección por HVP360 contra la infección por exposición con NDV o IBDV, en pollitos de 1 día de edad por inoculación subcutánea con una dosis de aproximadamente 1500-2500 ufp/animal.

Vacuna	% de protección contra ND a las				
	2 semanas	3 semanas	4 semanas	6 semanas	8 semanas
HVP360	20	68	90	100	100
FC-126/435 de HVT	0	0	0	0	0

Vacuna	% de protección contra IBD a las				
	2 semanas	3 semanas	4 semanas	6 semanas	8 semanas
HVP360	90	95	100	100	100
FC-126/435 de HVT	0	0	0	0	0

20 Los resultados mostraron que después de la vacunación con HVP360, se obtiene más del 90 % de protección contra la exposición a NDV 4 semanas después de la vacunación a días de edad por vía s.c. Esto cumple los requisitos de la monografía de PhEur 0450 para una vacuna de ND viva.

25 Incluso mejor fue la protección lograda contra la exposición a IBDV: se obtiene más del 90 % de protección contra la exposición 2 semanas después de la vacunación con HVP360. Esto cumple los requisitos de la monografía de PhEur 0587 para una vacuna de IBD.

30 También demuestran estos resultados que la duración de la inmunoprotección continúa hasta (al menos) 8 semanas después de la vacunación a un nivel del 100 % de protección contra ND, y contra IBD.

6. Prueba de la respuesta a dosis contra ND, y diferentes vías de administración

35 En un ensayo animal, se aplicó vacunación con diferentes dosis de HVP360, y se probaron diferentes vías: en el huevo (i.o.) y subcutánea (s.c.), para probar la respuesta de estas dosis y estas vías contra la infección por exposición a NDV. Además, se determinaron los niveles de viremia de la vacuna de HVP360 y del virus de control FC-126 tras el reaislamiento de animales inoculados en los diversos grupos de tratamiento.

40 Después de la vacunación de huevos embrionados de 18 días de edad de ponedoras SPF (i.o.), o ponedoras SPF de un día de edad por vía s.c., los animales se expusieron a las 3 o a 4 semanas de edad a Herts 33/56 de NDV. El virus de vacuna/control se reaisló de bazo o muestras de sangre a los 4, 11 o 17 días para determinar los niveles de viremia alcanzados. Los resultados se presentan en la Tabla 5. La viremia se representa de dos formas: una vez como el número de aves positivas para el reaislamiento de virus de vacuna/control del número total de aves en ese grupo, y una vez como ufp de virus promedio por 2x10<sup>6</sup> células de bazo.

45 En la columna 'dosis' se presenta la dosis de inoculación real, determinada por retro-valoración de restos de los inóculos después de la vacunación.

Tabla 5: Viremia y protección a la exposición contra NDV en ponedoras SPF vacunadas en el huevo o por vía subcutánea con diferentes dosis de HVP360.

Vacuna	dosis (pfu)	Pos/total -- viremia promedio (ufp / $2 \times 10^6$ células)			Protección de NDV (%)	
		4 d.	11 d.	17 d.	3 sem	4 sem
HVP360	600		8/8 -- 117		65	89
	1563		9/10 -- 112		70	85
FC-126	975		10/10 -- 136		0	0
	2475		9/10 -- 116		0	0
HVP360	2456	10/ 10 -- 54		5/5 -- 83	65	84
FC-126	2481	10/10 -- 143		4/5 -- 171	0	0

5 La vacunación subcutánea pareció ser poco dependiente de la dosis usada; dosis entre 500 y 2500 ufp/animal alcanzaron todos niveles de inmunoprotección satisfactorios.

Por último lugar, ambas vías (i.o. y s.c.) podrían fomentar la misma protección a las 3 y 4 semanas, del 65 - 70 % y 84 - 90 %, respectivamente.

10 **Leyendas de las figuras**

Figura 1

15 Vista esquemática de la sección de inserción de una molécula de ADN recombinante preferida según la invención, que comprende el casete de expresión y las secuencias flanqueantes del gen Us2, que se usó para generar HVP360, un HVT recombinante preferido según la invención. Los elementos del casete de expresión están dibujados a escala.

20 Abreviaturas (de izquierda a derecha): 5' US2: secuencias de flanqueamiento en la dirección 5' del gen Us2 de HVT; mIE: promotor del gen CMV murino-IE1; VP2: gen VP2 de IBDV; term.: terminador de la transcripción de SV40; hIE: promotor de núcleo del gen CMV humano-IE1; F: gen F de NDV; term.: terminador del gen hCMV IE1; 3' US2: secuencias de flanqueamiento en la dirección 3' del gen Us2 de HVT.

Figura 2:

25 Representación gráfica (no mostrada a escala) de los elementos relevantes de un número representativo de construcciones de HVT recombinante probadas. Para comparación también se representa la construcción del estado de la técnica HVP309.

Figura 3:

30 Niveles de viremia de recombinantes de HVT diferentes 10, 24 y 38 días después de la vacunación de ponedoras SPF de un día, como promedio por grupo.

Figura 4:

35 Respuestas serológicas inducidas por los recombinantes de HVT diferentes, 37 días después de la vacunación de ponedoras SPF de un día, como promedio por grupo.

**Listado de secuencias**

40 <110> Intervet International BV

<120> Vacuna ND-IBD vectorizada con HVT mejorada

45 <130> 23888

<160> 1

50 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 6674

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

# ES 2 648 672 T3

<223> Casete de expresión de HVP360 con regiones flanqueantes

<220>  
<221> gen  
5 <222> (1)..(399)  
<223> Parte en la dirección 5' del gen Us2 de HVT; AF291866, nt 140143-140541

<220>  
10 <221> promotor  
<222> (630)..(2020)  
<223> promotor-potenciador del gen temprano inmediato 1 del citomegalovirus murino

<220>  
15 <221> gen  
<222> (2052)..(3410)  
<223> Cepa de BDV 52/70, gen VP2

<220>  
20 <221> señal\_poliA  
<222> (3441)..(3650)  
<223> señal de poliA de SV40 + terminador

<220>  
25 <221> promotor  
<222> (3805)..(4149)  
<223> Núcleo de promotor del gen temprano inmediato 1 del citomegalovirus humano

<220>  
30 <221> gen  
<222> (4174)..(5835)  
<223> Gen F de Clone 30 de NDV

<220>  
35 <221> terminador  
<222> (5815)..(6127)  
<223> terminador del gen hCMV IE

<220>  
40 <221> gen  
<222> (6156)..(6674)  
<223> Parte en la dirección 3' del gen Us2 de HVT; AF291866, nt 140541-141059

<400> 1

45 **atctactgtc ttaacgccca tgggaacgga ggcgtcgtcg tcatgtattg gacggcaaca** 60

ES 2 648 672 T3

taggcagcaa cacaaattgc gtttaggtgg ggtgcatgtg gactcgatac caagcccctg 120  
 cagctgggga acgtctggtg gagagccgat aatttgatat acgcacgcca tattactgtc 180  
 gttgaagtac gccttatctt ctatgttttc aaatttaggt tcccaagtgg acgtgagaag 240  
 tgtttgtatc tcacatggaa tggccaagc cattccagcc caggtgcctg gtactttaat 300  
 ggcaaacaaa cgttttggta gaggtattga ttctattgca gttctgcaga tatctgcagc 360  
 cccgagtatc cacaggctat acgatacgtt atcggaggca agctgcggcc gctctagaac 420  
 tagtggatcc cccgggctgc agcccaatgt ggaattogcc cttgcacatt gttactcctg 480  
 catcttaaaa atatatcctg tagtaatttt cacagcaatg tcataacatc atctcgctaa 540  
 agaatgacct gggattggag aagtaatgaa tatttgcaac caatgcattg aataaactaa 600  
 cattaacga attcaactagt ggatccccc aactcggccc ttttatgact agaaccaata 660  
 gtttttaatg ccaaattgac tgaatcccc taatttgcaa agccaaacgc cccctatgtg 720  
 agtaatacgg ggacttttta cccaatttcc caagcggaaa gccccctaat aactcatat 780  
 ggcatatgaa tcagcacggc catgcaactc aatggcggcc catagggact ttccacatag 840  
 ggggcgttca ccatttccca gcataggggt ggtgactcaa tggcctttac ccaagtacat 900  
 tgggtcaatg ggagtaagc caatgggtt ttcccattac tggcaagcac actgagtcaa 960  
 atgggacttt ccactgggtt ttgcccagt acattgggtc aatgggaggt gagccaatgg 1020  
 gaaaaacca ttgctgcca gtacactgac tcaatagga ctttccaatg ggtttttcca 1080  
 ttgttgcaa gcatataagg tcaatgtgg tgagtcaata gggactttcc attgtattct 1140  
 gccagtaca taaggtcaat aggggtgaa tcaacaggaa agtcccattg gagccaagta 1200  
 cactgctca atagggactt tccattgggt tttgccagc acataaggc aatagggat 1260  
 gagtcaatg gaaaaacca ttggagcca gtacactgac tcaatagga ctttccattg 1320  
 ggttttccc agtacataag gtcaatagg ggtgagtcaa caggaaagc ccattggagc 1380  
 caagtacatt gagtcaatag ggactttcca atgggttttg cccagtacat aaggccaatg 1440  
 ggagtaagc caatgggtt ttcccattac tggcacgtat actgagtcatt tagggacttt 1500  
 ccaatgggtt ttgcccagta cataaggc atagggtga atcaacagga aagtccatt 1560  
 ggagccaagt aactgagtc aatagggact ttccattggg tttgcccag taaaaagg 1620  
 caatagggg tgagtcaatg ggtttttccc attattggca cgtacataag gtcaatagg 1680  
 gtgagtcatt ggtttttcc agccaattta attaaaacgc catgtacttt cccaccattg 1740  
 acgtcaatg gctattgaaa ctaatgcaac gtgacctta aacggtactt tcccatagct 1800  
 gattaatgg aaagtaccg tctcgagcca atacaagtc atgggaagt aaagggcagc 1860  
 caaacgtaa caccgcccog gtttcccct ggaaattcca tattggcacg cattctattg 1920

ES 2 648 672 T3

gctgagctgc gttctacgtg ggtataagag gcgcgaccag cgtcgggtacc gtgcgagtct 1980  
 toggctctgac cacogtagaa cgcagagctc ctcgctgcag gcggccgctc tagaactcgt 2040  
 cgatcgagc gatgacaaac ctgcaagatc aaacccaaca gattgttccg ttcatacgga 2100  
 gccttctgat gccaaacaacc ggaccggcgt ccattccgga cgacaccctg gagaagcaca 2160  
 ctctcaggtc agagacctcg acctacaatt tgactgtggg ggacacaggg tcagggctaa 2220  
 ttgtcttttt ccctggattc cctggctcaa ttgtgggtgc tcactacaca ctgcagagca 2280  
 atgggaacta caagttogat cagatgctcc tgactgcca gaacctaccg gccagctaca 2340  
 actactgcag actagtgagt cggagtctca cagtgaggtc aagcacactc cctgggtggcg 2400  
 tttatgcact aaacggcacc ataaacgcg tgacctcca aggaagcctg agtgaactga 2460  
 cagatgttag ctacaatggg ttgatgtctg caacagccaa catcaacgac aaaattggga 2520  
 atgtcctggg aggggaaggg gtcactgtcc tcagcctacc cacatcatat gatcctgggt 2580  
 atgtgaggct tggtgacccc attcccgtc tagggctga cccaaaaatg gtagctacat 2640  
 gcgacagcag tgacaggccc agagtctaca ccataactgc agccgatgat taccaattct 2700  
 catcacagta ccaaccaggt gggtaacaa tcacactgtt ctgagccaac attgatgcta 2760  
 tcacaagcct cagcattggg ggagagctog tgtttcaaac aagcgtccaa ggocctgtac 2820  
 tgggcgccac catctacctt ataggctttg atgggactgc ggtaatcacc agagctgtag 2880  
 ccgacagataa tgggctgacg gccggcaccg acaatcttat gccattcaat cttgtcattc 2940  
 caaccaatga gataaccag ccaatcacat ccatcaaact ggagatagt acctccaaaa 3000  
 gtggtggtca ggcaggggat cagatgtcat ggtcggcaag tgggagccta gcagtgcga 3060  
 tccatggtgg caactatcca gggccctcc gtcccgtcac actagtagcc tacgaaagag 3120  
 tggcaacagg atcogtctgt acggtcgtg gggtgagtaa cttcgagctg attccaaatc 3180  
 ctgaactagc aaagaacctg gttacagaat acggccgatt tgaccagga gccatgaact 3240  
 acacaaaatt gatactgagt gagagggacc gtcttggcat caagaccgtc tggccaacaa 3300  
 gggagtacac tgattttcgt gagtacttca tggaggtggc cgacctcaac tctcccctga 3360  
 agattgcagg agcatttggc ttcaaagaca taatccggc tataaggagg taagcttgat 3420  
 ctagagcggc cgcggggatc cagacatgat aagatacatt gatgagttt gacaaaccac 3480  
 aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt 3540  
 tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatggt 3600  
 tcaggttcag ggggaggtgt gggaggtttt ttccgatcct ctagagtcga caattattc 3660  
 atttaataac atatagccca aagacctcta tgaacattta gtttcccgt tactcaacgg 3720  
 cgcgtgtaca cacaagggcg aattccacag tggatatcaa gcttaattaa gtaccgagct 3780  
 cgaattggcg cgccaggtca attccctggc attatgccc gtacatgacc ttatgggact 3840

ES 2 648 672 T3

ttctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt 3900  
 ggcagtacat caatgggogt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc 3960  
 ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc 4020  
 gtaacaactc cgccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata 4080  
 taagcagagc tcgttttagtg aaccgtcaga togcctggag acgccatcca cgctgttttg 4140  
 acctccatag aagacaccgg gcgogccgga tccatggggc ccagaccttc taccaagaac 4200  
 ccagtaccta tgatgctgac tgtccgagtc gogctggtag tgagttgcat ctgtccggca 4260  
 aactccattg atggcaggcc tcttgcggct gcaggaattg tggttacagg agacaaagcc 4320  
 gtcaacatat acacctcatc ccagacagga tcaatcatag ttaagctcct cccgaatctg 4380  
 cccaaggata aggaggcatg tgcgaaagcc cccttggatg catacaacag gacattgacc 4440  
 actttgctca ccccccttgg tgactctatc cgtaggatac aagagtctgt gactacatct 4500  
 ggagggggga gacaggggog ccttataggc gccattattg goggtgtggc tcttggggtt 4560  
 gcaactgccc cacaaataac agcggccgca gctctgatac aagccaaaca aaatgctgcc 4620  
 aacatcctcc gacttaaaga gagcattgcc gcaaccaatg aggctgtgca tgaggctact 4680  
 gagggattat cgcaactagc agtggcagtt ggggaagatgc agcagtttgt taatgaccaa 4740  
 ttaataaaaa cagctcagga attagactgc atcaaaattg cacagcaagt tgggtgtagag 4800  
 ctcaacctgt acctaaccga attgactaca gtattcggac cacaaatcac ttcacctgct 4860  
 ttaacaagc tgactattca ggcactttac aatctagctg gtggaaatat ggattactta 4920  
 ttgactaagt taggtgtagg gaacaatcaa ctacagctcat taatcggtag cggcttaatc 4980  
 accggtaacctc ctattctata cgactcacag actcaactct tgggtatata ggtaactcta 5040  
 ccttcagtcg ggaacctaaa taatatgogt gccacctact tggaaacctt atccgtaagc 5100  
 acaaccaggg gatttgccctc ggcaottgtc ccaaaagtgg tgacacaggt oggttctgtg 5160  
 atagaagaac ttgacacctc atactgtata gaaactgact tagatttata ttgtacaaga 5220  
 atagtaacgt tccctatgtc ccctggtatt tattcctgct tgagcggcaa tacgtcggcc 5280  
 tgtatgtact caaagaccga aggcgcactt actacacatc acatgactat caaaggttca 5340  
 gtcatcgcca actgcaagat gacaacatgt agatgtgtaa accccccggg tatcatatcg 5400  
 caaaactatg gagaagcogt gtctctaata gataaacaat catgcaatgt tttatcctta 5460  
 ggcgggataa ctttaaggct cagtggggaa ttcgatgtaa cttatcagaa gaatatctca 5520  
 atacaagatt ctcaagtaat aataacaggc aatcttgata tctcaactga gottgggaat 5580  
 gtcaacaact cgatcagtaa tgctttgaat aagtttagagg aaagcaacag aaaactagac 5640  
 aaagtcaatg tcaaaactgac tagcacatct gotctcatta cctatatcgt tttgactatc 5700

ES 2 648 672 T3

atatctcttg	tttttggtat	acttagcccg	attctagcat	gctacctaat	gtacaagcaa	5760
aaggcgcaac	aaaagacott	attatggctt	gggaataata	ctotagatca	gatgagagcc	5820
actacaaaa	tgtgaggatc	tctcgaggaa	ttctagatcc	caogtcacta	ttgtatactc	5880
tatattatac	tctatgttat	actctgtaat	cctactcaat	aaacgtgtca	cgctctgtgaa	5940
accgtactaa	gtctcccgtg	tcttcttate	accatcaggt	gacatcctcg	cccaggctgt	6000
caatcatgcc	ggtatcgatt	ccagtagcac	cggccccacg	ctgacaacct	actcttgcag	6060
cgtttagcagc	gccccotta	acaagccgac	ccccaccagc	gtogcgggta	ctaactctcc	6120
tctccccgac	ctgcaactag	tgoggcgca	gcttgcctcc	gattctagca	ttacatagcc	6180
ggtcagtaga	tcttgcatt	cggtagcga	accggctaca	tcttcaaaca	gtctcaagat	6240
aatgcactc	ctcgttctg	ccaatccgga	accgggcata	ccaactccgc	ctgccgattt	6300
aattctcaca	attgggcgat	gccggcggg	caaacgaat	gtggatttgg	caaaccgaca	6360
caggtctgct	gtacggacta	atatgggcac	accacatca	ttcttcagat	gctccatgca	6420
ttgttctatg	agaaagatcc	ataggtgga	ggcagcgtca	cgagatcgcc	caggcaatcg	6480
atcgattcg	tctagtaaag	tgacgagagt	tatcatgcac	acaccatgc	ccacgccttc	6540
ogaataactg	gagctgtgga	agatcggaaa	cgtctttttg	actgccggtc	tcgtactact	6600
ttcgcacagg	tgtatacccg	gacgcgtact	atatatttta	tatcatcaa	cgccccgaaa	6660
ttacatacgt	ggcg					6674

**REIVINDICACIONES**

1. Casete de expresión de ADN recombinante que comprende en la dirección 5' a 3' y en este orden:

- 5 a. un promotor del gen temprano inmediato 1 del citomegalovirus murino (mCMV-IE1),  
 b. un gen de proteína viral 2 (VP2) del virus infeccioso de la bolsa (IBDV),  
 c. un terminador de la transcripción,  
 d. un promotor del gen temprano inmediato 1 del citomegalovirus humano (hCMV-IE1),  
 10 e. un gen de proteína de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

2. Un casete de expresión de ADN recombinante según la reivindicación 1, en el que se aplican una o más o todas las condiciones seleccionadas del grupo que consiste en: el promotor del gen mCMV-IE1 es un promotor completo; el gen VP2 de IBDV codifica una proteína VP2 de un IBDV de tipo clásico; el terminador de la transcripción comprende tanto una región de terminador como una región de poliA; el terminador de la transcripción deriva del virus 40 simio (SV40); el promotor del gen hCMV-IE1 es un promotor de núcleo; el gen F de NDV es una cepa de NDV lentogénica; el casete de expresión comprende un terminador de la transcripción adicional que está localizado en la dirección 3' del gen F de NDV; y el terminador de la transcripción adicional deriva del gen hCMV-IE1.

3. Una molécula de ADN recombinante que comprende el casete de expresión de ADN recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.

4. Un virus del herpes del pavo (HVT) recombinante, que comprende un casete de expresión de ADN recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, a través del cual el casete de expresión se inserta en la región corta única (Us) del genoma del HVT recombinante.

5. Célula hospedadora que comprende un HVT recombinante según la reivindicación 4.

6. Método para la construcción de un HVT recombinante según la reivindicación 4, comprendiendo dicho método la inserción de un casete de expresión de ADN recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en la región Us del genoma del HVT recombinante.

7. Vacuna para aves de corral que comprende un HVT recombinante según la reivindicación 4 y/o una célula hospedadora según la reivindicación 5, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Una vacuna según la reivindicación 7, que comprende al menos un componente inmunoactivo adicional.

9. Método *ex vivo* para la preparación de una vacuna según la reivindicación 7, comprendiendo dicho método las etapas de:

- infectar células hospedadoras con un HVT recombinante según la reivindicación 4,
- recoger las células hospedadoras infectadas, y
- mezclar las células hospedadoras infectadas recogidas con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. Un HVT recombinante según la reivindicación 4, para su uso en una vacuna para aves de corral.

11. Uso de un casete de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, una molécula de ADN recombinante según la reivindicación 3, un HVT recombinante según la reivindicación 4, una célula hospedadora según la reivindicación 5, o cualquier combinación de los mismos, para la fabricación de una vacuna para aves de corral.

12. Una vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, para su uso en prevenir o reducir la infección por IBDV y/o NDV, o signos de enfermedad asociados.

13. Una vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 para su uso en un método de prevención o reducción de la infección por IBDV y/o NDV, o signos de enfermedad asociados, en donde dicho método comprende la administración de dicha vacuna a aves de corral.

14. Una vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 para su uso en un método de vacunación de aves de corral que comprende la etapa de inocular a dichas aves de corral dicha vacuna.

Figura 1

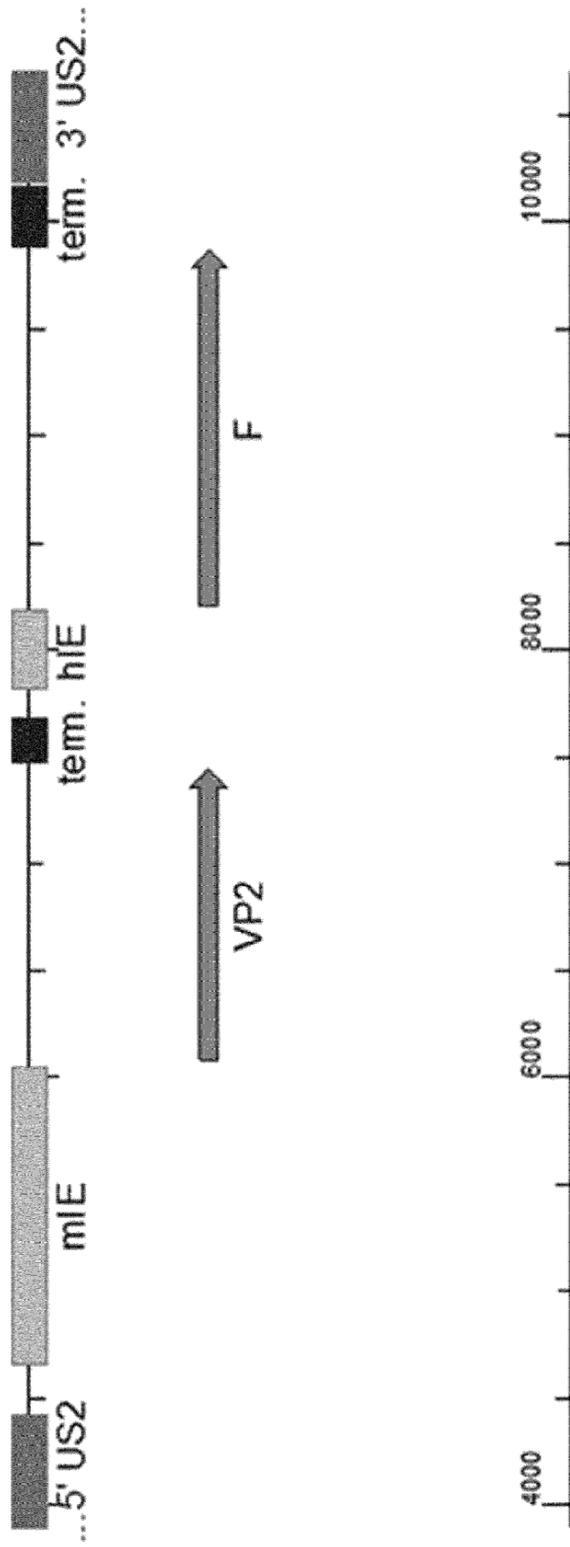


Figura 2

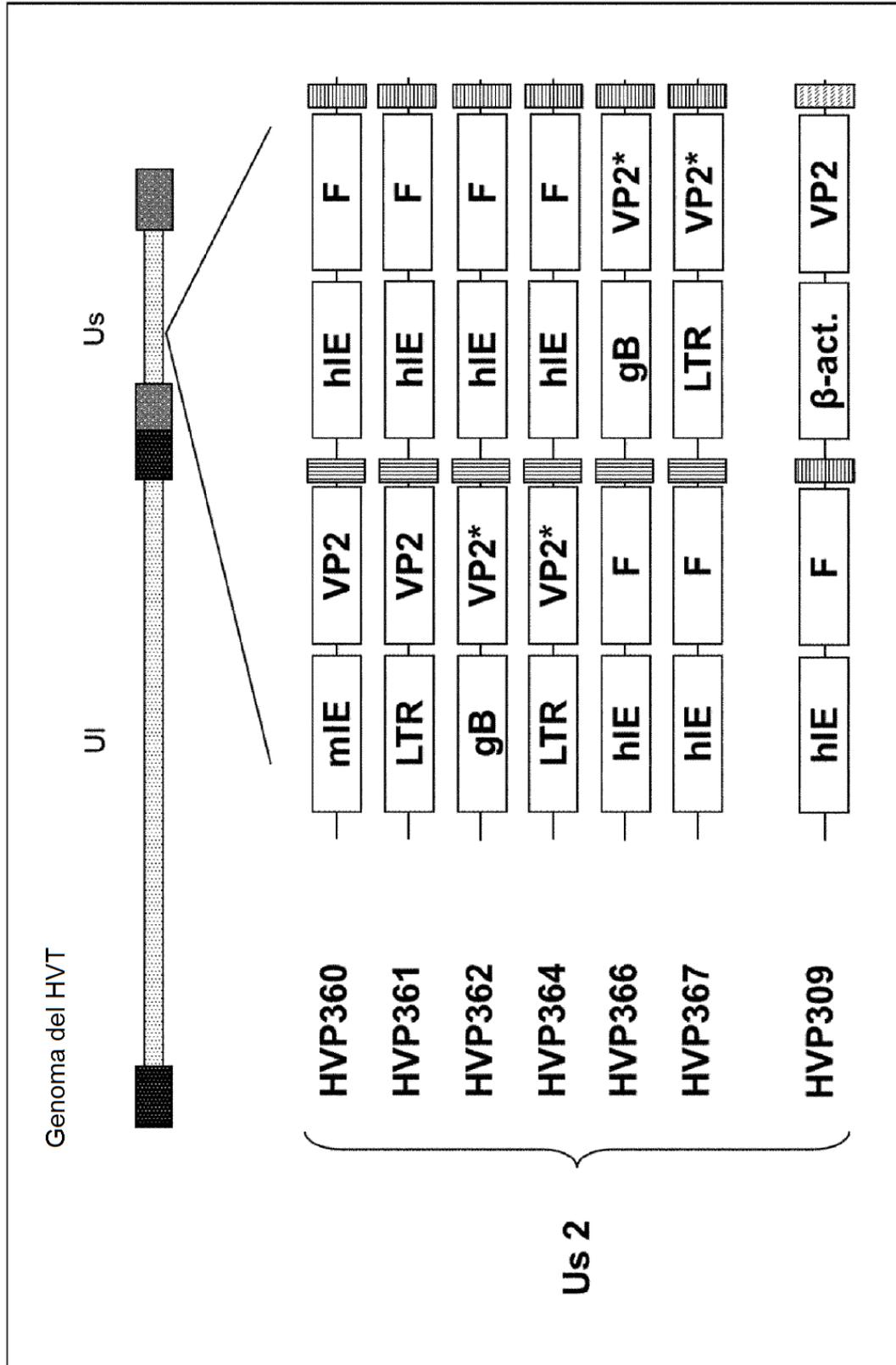


Figura 3

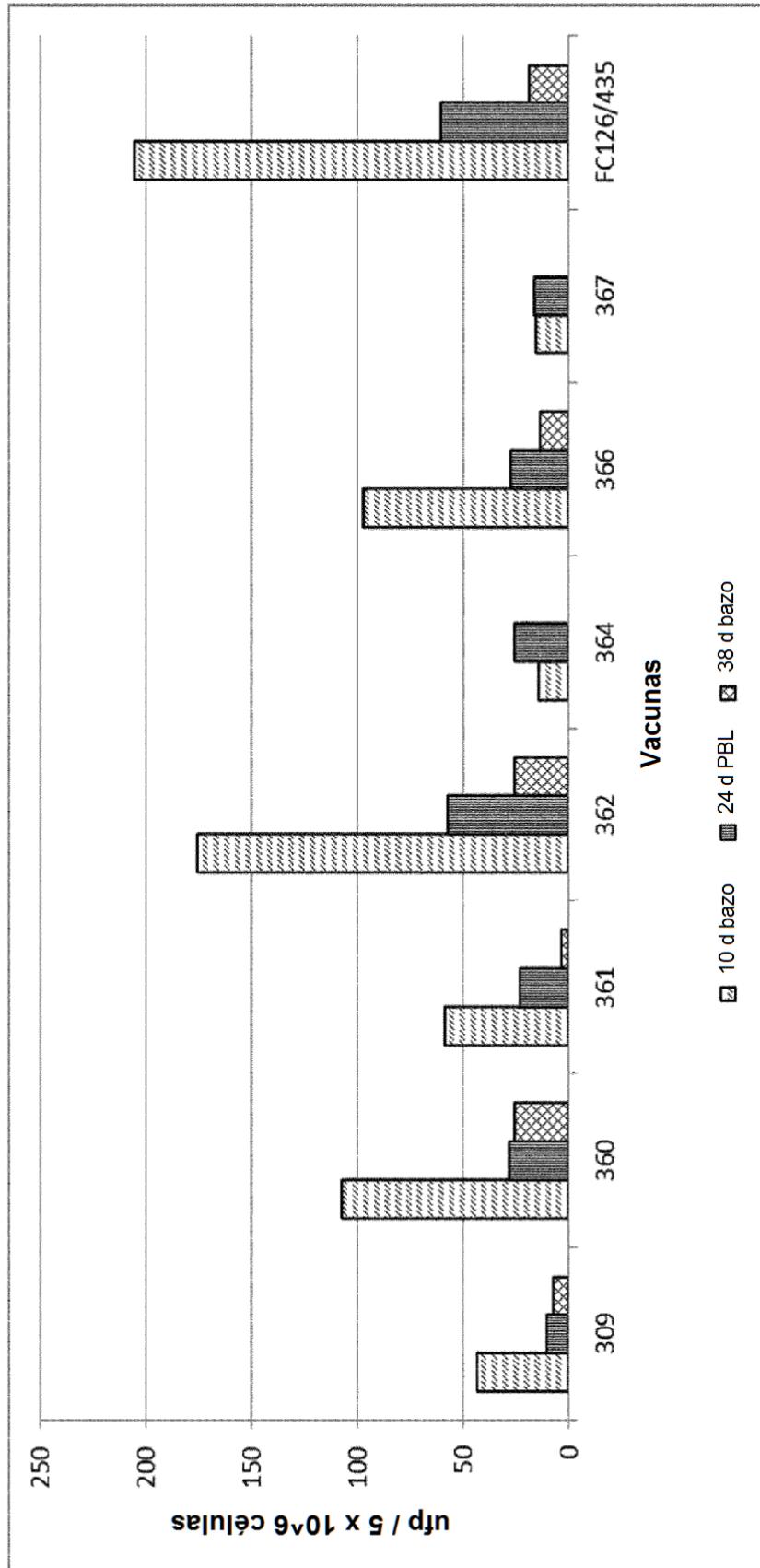


Figura 4

