

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 828**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2010** **PCT/EP2010/062846**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011** **WO11026882**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2010** **E 10749856 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018** **EP 2473599**

54 Título: **Vacuna contra el herpesvirus bovino**

30 Prioridad:

03.09.2009 EP 09169358

04.09.2009 US 239894 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.02.2019

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)

Wim De Körverstraat 35

5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

VANDERPLASSCHEN, ALAIN, FRANCIS,

CLAUDE y

THIRION, MURIEL, MICHÈLE, CHANTAL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 699 828 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 contra el herpesvirus bovino

La presente invención se refiere a genomas del herpesvirus bovino 4 mutante, a virus del herpesvirus bovino 4 mutante, a genomas de herpesvirus bovino 4 mutante y a virus que llevan una secuencia de ADN heterólogo, a células transfectadas con genomas de herpesvirus Bovino 4 mutante, a células infectadas con virus del herpesvirus bovino 4 mutante y a vacunas transportadoras que comprenden dichos virus del herpesvirus bovino 4 mutante, a métodos para la preparación de dichos genomas de herpesvirus bovino 4 mutante y a dichos virus del herpesvirus bovino 4 mutante y a kits de ensayo de diagnóstico.

El Herpesvirus Bovino 4 (BoHV-4) es un miembro de la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, género *Rhadinovirus*, que se distribuye a nivel mundial, entre otros, por ejemplo, en rumiantes. Se han recuperado cepas aisladas de ganado, pero también de bisonte americano y búfalo africano. También se han encontrado cepas aisladas en ovejas. Se refirieron cepas aisladas esporádicas en leones, gatos y monos nocturnos.

El virus se ha aislado de animales sanos y enfermos. Sin embargo, aunque esporádicamente se ha referido un posible papel para el BoHV-4 en la enfermedad respiratoria, la mayoría de las cepas aisladas del grupo BoHV-4 no inducen enfermedad clínica tanto en ganado como en animales de laboratorio. Por lo tanto, el papel patógeno de BoHV-4 sigue sin aclararse.

Aunque el BoHV-4 es un miembro de la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, se diferencia de otros miembros de esta subfamilia en que, a diferencia de la mayoría de otros miembros de la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, se replica en varios cultivos primarios y líneas celulares de especies de bovinos y de diversas otras especies de animales.

Además, no hay pruebas de oncogenicidad o transformación de crecimiento por BoHV-4.

Por otra parte, el BoHV-4, al igual que todos los herpesvirus, puede incorporar cantidades significativas de material genético exógeno.

Finalmente, como se ha mencionado en líneas anteriores, aparentemente el BoHV-4 no parece inducir enfermedad clínica.

Estas características hacen que el BoHV-4 sea atractivo para su uso como virus de vectores.

Dicho uso lo han sugerido, entre otros, Donofrio, G. *et al.*, (J. virol. Methods 101: 49-61 (2002), Donofrio, G. *et al.*, (Microb. Infect. 8: 898-904 (2006)), Gillet, L. *et al.*, (J. Gen. Virol. 86: 907-917(2005)).

Donofrio, G. *et al.*, (Clinical and Vaccine Immunology 13: 1246-1254 (2006)) proporcionan un ejemplo reciente de dicho uso. En este artículo, se describe cómo se utiliza el BoHV-4 para la expresión de la glucoproteína D del Herpesvirus Bovino 1, un alfa herpesvirus que se sabe que es un patógeno principal en ganado, que causa pérdidas significativas en todo el mundo. Se sabe que la infección con BoHV-1 causa rinotraqueitis bovina infecciosa, vulvovaginitis pustular infecciosa, balanopostitis, aborto e infección sistémica generalizada. También se sabe que el BoHV-1 desempeña un papel importante en el complejo de enfermedad respiratoria de bovinos, comúnmente denominado fiebre de embarque.

Esta palabra es una de las primeras demostraciones del uso de BoHV-4 como un vector con fines de vacunación y proporciona una base firme para la vacunación de ganado contra el BoHV-1 utilizando el BoHV-4 como un vector.

Sin embargo existe un serio inconveniente:

Al igual que todos los *Herpesviridae*, los gammaherpesvirus presentan dos fases distintas en su ciclo de vida; la replicación lítica caracterizada por un programa de transcripción en el que los genes temprano inmediato (IE, *immediate-early*), temprano (E, *early*) y tardío (L, *late*) se expresan sucesivamente; y la latencia, caracterizada por el mantenimiento del genoma vírico como un episoma no integrado y la expresión de un número limitado de genes víricos y micro ARN (Roizman y Pellett, 2007; Week *et al.*, 1999; Sarid *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 2005). Después de la reactivación, la latencia vuelve de nuevo a su replicación lítica y a la reexcreción de partículas infecciosas por sujetos latentemente infectados.

Por lo tanto, dado que el BoHV-4 tiene la propiedad de establecer latencia y reactivarse, hace que las cepas de tipo silvestre sean inapropiadas para desarrollar vectores recombinantes inocuos. De hecho, a lo largo de su vida, los animales infectados pueden reactivarse y contaminar a animales sin tratamiento previo.

Por lo tanto, desde un punto de vista vacunal, para utilizar el BoHV-4 como un vector, la latencia del virus se considera que es una desventaja.

El gammaherpesvirus Herpesvirus humano 8 (HHV-8 también denominado KSHV por Herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi) es el prototipo del género *Rhadinovirus*. Durante la latencia, el HHV-8 expresa tres fases de lectura abierta (ORF, *open reading frames*) principales: ORF71, ORF72 y ORF73 (Sarid *et al.*, 1998 y 1999). La ORF71 y la ORF72 codifican homólogos víricos de FLIP celular (v-FLIP) (Thome *et al.*, 1997) y la D ciclina (v-CYC) (Li *et al.*, 1997), respectivamente. La ORF71 y ORF72 se expresan junto con la ORF73 en un ARNm policistónico.

Los ortólogos de ORF73 codificados por diferentes *Rhadinovirus* se han estudiado ampliamente. Estos estudios revelaron que el producto de expresión de ORF73 (pORF73) es una proteína multifuncional esencial para la latencia. Las funciones múltiples de la proteína se basan en diversos dominios moleculares (Renne *et al.*, 2001; Fowler *et al.*,

2003; Calderwood *et al*, 2005). El mejor pORF73 caracterizado es el Antígeno Nuclear 1 Asociado a Latencia (LANA-1) del HHV-8. Se ha observado que LANA-1 se asocia con cromosomas mitóticos para permitir la adhesión del episoma durante la división de células latentemente infectadas y su posterior división entre células hijas (Ballestas *et al*, 1999; Barbera *et al*, 2006; Ye *et al*, 2004). Este papel crucial en la latencia está reforzado por la capacidad de LANA-1 para modular rutas celulares implicadas en el crecimiento y la supervivencia celular, dirigiéndose a reguladores o co-reguladores transcripcionales tales como p53, pRB, CBP y sin3A (Fribourg *et al*, 1999; Krithivas *et al*, 2000; Radkov *et al*, 2000; Lim *et al*, 2001). Por otra parte, LANA-1 impide la reactivación de la latencia regulando negativamente la expresión de ORF50 que codifica al activador de replicación y transcripcional (RTA, *replication and transcriptional activator*) (Lan *et al*, 2004, 2005; Lu *et al*, 2006).

BoHV-4 se comporta diferente en muchos aspectos, como se ha resumido anteriormente, en comparación con otros herpesvirus, incluso dentro de la subfamilia *Gammaherpesvirinae*. No obstante, si en BoHV-4 existe algún ortólogo de ORF73, entonces sería posible averiguar si dicho ortólogo de ORF73, si existe en BoHV-4, jugaría un papel comparable en la latencia.

Sin embargo, el único gen de ortólogo posible similar a ORF73, encontrado en BoHV-4, se consideró que era un pseudogen, por las siguientes razones:

1) La región ortóloga ORF73 de BoHV-4 es el sitio de recombinaciones múltiples (Dewals B., *et al*, J. Gen. Virol. 87: 1509-1519 (2006)). Esto es una característica de un pseudogen, pero ciertamente no un gen multifuncional que es muy dependiente de la conservación completa de su secuencia.

2) Las variaciones de la longitud del ortólogo ORF73 se observaron entre diversas cepas de BoHV-4. Por ejemplo, se observó una corta duplicación en la cepa M40. De nuevo, esto está completamente en línea con las características de un pseudogen, pero es muy inusual para un gen funcional, y mucho menos multifuncional.

3) La ORF73 de HHV-8 codifica una proteína grande y multifuncional, que se ha observado que a) se asocia con microsomos mitóticos para permitir la adhesión del episoma durante la división de células latentemente infectadas y su posterior división entre células hijas, b) modula las rutas celulares implicadas en el crecimiento y la supervivencia celular, dirigiéndose a reguladores o co-reguladores transcripcionales tales como p53, pRB, CBP y sin3A, y c) impide la reactivación de la latencia regulando negativamente la expresión de ORF50 que codifica al activador de replicación y transcripcional.

Dentro del género *Rhadinovirus*, el BoHV-4 parecía codificar con mucho al ortólogo ORF73 más corto con un tamaño equivalente a solo el 22 % de ORF73 de HHV-8 (LANA-1) (Fig. 1). La ORF73 de BoHV-4 consta solo de 253 aminoácidos. Únicamente los restos de aminoácido 138 N terminal y 102 C terminal presentan alguna homología con las regiones N y C terminales de LANA-1, respectivamente. Las otras regiones simplemente faltan. En consecuencia, no era de esperar que el ortólogo ORF73 extremadamente reducido encontrado en BoHV-4, que carece del 78 % de las estructuras esenciales de LANA-1, incluyendo el dominio rico en P, el dominio rico en D/E, el domino rico en Q/E y la cremallera de L, pudiese actuar como una proteína multifuncional que tiene las características de LANA-1.

4) Por mucho, la mayoría de los otros ortólogos conocidos de ORF73 no son mucho más pequeños en cuanto a tamaño que LANA-1, o son incluso más grandes. Solamente se ha descrito un ortólogo de ORF73 relativamente pequeño: para el herpesvirus murino 68, se encontró un ortólogo de ORF73. Sin embargo, esta ORF73 aún es el 123 % del tamaño del ortólogo de BoHV-4, y lo más sorprendente es que el porcentaje de identidad de aminoácidos es prácticamente insignificante: solo el 25 %.

Sorprendentemente se descubrió ahora, que este supuesto pseudogen, por razones desconocidas desempeña un papel que, con respecto a su función en cuanto a latencia, parece ser comparable al de la ORF73 en LANA-1. Además, por razones de conveniencia, se hará referencia a este gen como un ortólogo de ORF73.

Además, sorprendentemente se descubrió que la delección de la ORF73 de BoHV-4 no afectaba a la capacidad del virus para replicarse *in vitro*, mientras que impide la infección latente *in vivo*. En su conjunto, los resultados de la presente invención muestran que a pesar de su tamaño extremadamente pequeño y la ausencia notable de homología con cualquier ortólogo de ORF73 conocido, la ORF73 de BoHV-4 es un homólogo funcional de ortólogos de *Rhadinovirus* más grandes. La secuencia de la ORF73 de BoHV-4 está disponible en el Genbank/EMBL/DDBJ con los números de registro AY847342-AY847348.

Por tanto, uno de los méritos de la presente invención es que proporciona un virus BoHV-4 a partir del cual se deleciona el gen de ORF73, proporcionando de este modo un vector con todas las ventajas de los virus de vectores BoHV-4 sin tener la desventaja de causar infección latente.

La presente invención se refiere a un genoma de BoHV-4 mutante que tiene como una característica que no codifica una proteína ORF73 funcional.

Una proteína ORF73 funcional es una proteína que aún es capaz de causar latencia.

La presente invención se refiere a un virus BoHV-4 mutante que no es capaz de crear una proteína ORF73 funcional.

Preferentemente, el virus BoHV-4 mutante no es capaz de crear una proteína ORF73 funcional porque tiene una mutación en el gen ORF73.

Esto se refiere al virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención que tiene una característica que tiene una mutación en el gen ORF73.

Una mutación puede ser una inserción, una delección o una mutación por desplazamiento de fase de lectura. La forma más fácil de crear una mutación es mediante la inserción de un tramo de nucleótidos o mediante la delección de una parte de la región codificante de la ORF73 o de toda la región codificante de la ORF73.

Esto se refiere al virus BoHV-4 mutante en el que dicha mutación es una delección o una inserción.

Se sabe que diversos genes desempeñan una función en la virulencia de los herpesvirus en general, y también en el BoHV-4. La delección de genes que codifican dichos factores de virulencia mejora la seguridad del virus, porque se comporta de un modo menos virulento que los virus de tipo silvestre. Por lo tanto, especialmente cuando se utiliza el virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención como una vacuna o una vacuna transportadora, puede ser deseable deleccionar uno o más de dichos factores de virulencia. Dichas delecciones son para los fines de esta patente que aquí se definen como delecciones secundarias.

Esto se refiere al virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención que comprende una segunda delección.

Las delecciones secundarias preferidas son delecciones en el gen ORF71 que codifica un v-FLIP, el gen ORF16 que codifica un homólogo de v-Bcl-2, el gen Bo10 que codifica la glucoproteína gp80 o el gen ORF21 que codifica la timidina quinasa.

Por lo tanto, en una realización el virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención se refiere a dichos virus que tienen una segunda delección en el gen ORF71 que codifica un v-FLIP, el gen ORF16 que codifica un homólogo de v-Bcl-2, el gen Bo10 que codifica la glucoproteína gp80 o el gen ORF21 que codifica la timidina quinasa.

Aunque el virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención puede utilizarse como tal para fines vacunales, simplemente para impedir que animales susceptibles, tales como rumiantes de infección por BoHV-4, se utilicen más eficazmente como virus transportadores para secuencias de ADN heterólogos. En ese caso, las características ventajosas del virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención se utilizarían completamente y, además, el virus, obtendría, por ejemplo, propiedades inmunizantes o adyuvantes adicionales.

Por tanto, una realización adicional de la presente invención se refiere a un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención, que comprende una secuencia de ADN heterólogo.

Preferentemente, dicha secuencia de ADN heterólogo codifica una proteína inmunogénica de otro virus o microorganismo que es patógeno a animales, tales como rumiantes, que son sensibles a infección causada por BoHV-4. La ventaja de dicho virus BoHV-4 mutante sería que al administrar dicho virus a dichos animales, por ejemplo, rumiantes, uno podría protegerse contra el BoHV-4 y contra esos otros virus o microorganismo patógenos. E incluso si no hubiese ningún interés en obtener protección contra la infección por BoHV-4, dicho virus tendría todas las ventajas de un virus transportador vivo muy seguro: sería una vacuna viva contra el BoHV-4 muy segura que al mismo tiempo imitaría a una vacuna viva contra ese otro virus o microorganismo patógeno (por ejemplo, rumiante). Simplemente como ejemplo: un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención, sería una alternativa de transportador de la glucoproteína gD de BoHV-1, muy atractiva en lugar de la cepa BoHV-4 como la utilizada por Donofrio G., *et al.*, en *Clinical and Vaccine Immunology* 13: 1246-1254, (2006).

Además, preferentemente, dicha secuencia de ADN heterólogo codifica una citocina. Las citocinas comprenden, entre otros, interleucinas, interferones y factores de necrosis tumoral. Se sabe que diversas citocinas, por ejemplo interferones, desempeñan un papel importante como inmunomoduladores en mamíferos, por ejemplo, rumiantes. Por tanto puede ser ventajoso incluir un gen que codifique este tipo de molécula en dicho virus.

Por tanto, una forma preferida de esta realización se refiere a un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención que comprende una secuencia de ADN heterólogo que codifica una proteína inmunogénica de otro virus o microorganismo patógeno a animales, por ejemplo rumiantes, que son sensibles a infección por BoHV-4, y/o una citocina.

Los microorganismos y virus patógenos más comunes y/o importantes (entre otros rumiantes) están formados por el grupo que consiste en Herpesvirus Bovino, virus de la Diarrea Virica Bovina, virus Paragripal de tipo 3, Paramixovirus Bovino, virus de la fiebre aftosa, *Pasteurella haemolytica*, Virus Sincicial Respiratorio Bovino, especies de *Theileria* sp., *Babesia* sp., *Trypanosoma*, *Anaplasma* sp., *Neospora caninum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Streptococcus dysgalactiae*. Por lo tanto, una forma más preferida de esta realización se refiere a un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención en el que ese virus o microorganismo se selecciona del grupo que consiste en Herpesvirus Bovino, virus de la Diarrea Virica Bovina, virus Paragripal de tipo 3, Paramixovirus Bovino, virus de la fiebre aftosa, *Pasteurella haemolytica*, Virus Sincicial Respiratorio Bovino, especies de *Theileria* sp., *Babesia* sp., *Trypanosoma*, *Anaplasma* sp., *Neospora caninum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma*, *E. coli*. *Streptococcus dysgalactiae*.

Como se ha dicho anteriormente, el virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención no es capaz de crear una proteína ORF73 funcional. Esto puede, entre otros, obtenerse creando una inserción en el gen. Por lo tanto sería más

conveniente insertar la secuencia de ADN heterólogo directamente en el gen de ORF73. Esto evitaría la necesidad de encontrar una localización adecuada en el genoma vírico para introducir la secuencia de ADN heterólogo y al mismo tiempo se crearía el gen que codifique la ORF73 no funcional.

5 Además, desde un punto de vista de la seguridad, es muy beneficioso insertar la secuencia de ADN heterólogo directamente en la ORF73: si se produce una recombinación entre una cepa de tipo silvestre y la vacuna, el recombinante que adquiere la secuencia de ADN heterólogo también adquirirá el defecto genético de la vacuna y por tanto no podrá persistir como un virus latente.

10 Por tanto, una forma más preferida de esta realización se refiere a un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención, en el que la secuencia de ADN heterólogo se inserta en el gen de ORF73.

La secuencia de ADN heterólogo que codifica el antígeno o la citocina se coloca preferentemente bajo el control de un promotor funcional. Un promotor funcional es un promotor que reconocen las células del rumiante.

15 En la técnica se conoce gran cantidad de promotores adecuados, que son reconocidos por su nivel de expresión muy eficaz. Dichos promotores son, por ejemplo, el promotor gX del virus de la pseudorrabia, el promotor TK del virus de la pseudorrabia, el promotor Tardío Principal de Adenovirus, la Repetición Terminal Larga Retrovítica, los promotores Temprano y Tardío del SV40, el promotor temprano inmediato de Citomegalovirus de Ratón (MCMVe1), el promotor temprano de Citomegalovirus de Ratón (MCMVe1), el promotor temprano inmediato del Citomegalovirus Humano (HCMVe1) y el promotor gE del BHV. Todos estos promotores se han descrito y se conocen en la técnica desde hace muchos años. Únicamente como ejemplo en Donofrio G., *et al.* se describe el uso del promotor-potenciador de Citomegalovirus Humano para la expresión de gD de BoHV-1. (Donofrio G., *et al.*, Clinical and Vaccine Immunology 13: 1246-1254, (2006)).

25 Como se ha indicado extensamente en líneas anteriores, el virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención es muy adecuado como virus de vacunas o virus de vacunas transportadoras.

30 Por lo tanto, de nuevo otra realización de la presente invención se refiere a vacunas para combatir la infección causada por BoHV-4 en animales, tales como rumiantes, susceptibles al BoHV-4, comprendiendo dichas vacunas un genoma BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención o un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser tan simple como agua o un tampón. El vehículo farmacéuticamente aceptable también puede comprender estabilizantes. También puede comprender un adyuvante, o puede ser en sí mismo un adyuvante.

Cuando la vacuna se liofiliza puede conservarse con seguridad durante largos períodos de tiempo. Por lo tanto, la vacuna de acuerdo con la invención está preferentemente en forma liofilizada.

40 Incluso otra realización se refiere a vacunas transportadoras de BoHV-4 mutante que comprenden un virus BoHV-4 de acuerdo con la invención que comprende un ADN heterólogo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De nuevo otra realización de la invención se refiere a un genoma de BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención o un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención para su uso en una vacuna.

45 Incluso otra realización de la invención se refiere al uso de un genoma de BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención o de un virus de BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención para la preparación de una vacuna para la protección de animales susceptibles, tales como rumiantes, contra infección causada por BoHV-4.

50 Y de nuevo otra realización de la invención se refiere al uso de un genoma de BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención o de un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención para la fabricación de una vacuna transportadora de BoHV-4.

55 Como se indica, entre otros, en los Ejemplos, es posible crear *in vitro* el genoma de BoHV-4 mutante necesario. Si una célula se transfecta con este genoma, se produce la generación de un virus descendiente. Por tanto, otra realización de la presente invención se refiere a una célula que comprende un genoma de BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención.

60 El virus descendiente es en sí mismo completamente infeccioso, y por lo tanto, ese virus descendiente puede propagarse en células susceptibles, tales como, por ejemplo, células MDBK. Por lo tanto, otra realización de la presente invención se refiere a una célula que comprende un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención.

65 Para la administración a animales, el virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la presente invención puede administrarse, entre otras vías, por vía intranasal, intradérmica, subcutánea o intramuscular. Las vías y métodos de vacunación pueden ser iguales que las de otros virus BHV atenuados, más específicamente vacunas contra el BoHV-4.

La cantidad eficaz útil que a administrar variará dependiendo de la edad, peso, modo de administración y tipo de patógeno contra el que se desea la vacunación.

Para la mayoría de las aplicaciones, un intervalo de dosificación muy adecuado es entre aproximadamente $10^{3,0}$ - $10^{7,0}$ ufp/animal.

Otra realización de la presente invención se refiere a métodos para la producción de un genoma de BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención o de un virus de BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención, en el que el método comprende la etapa de mutar el gen de ORF73 de tal manera que ya no codifique una proteína ORF73 funcional.

Un efecto interesante del hecho de que el BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención pueda llevar un gen heterólogo, es que puede utilizarse como una vacuna marcadora. Una vacuna marcadora permite discriminar entre virus de campo y virus vacunales basándose en diferencias en paneles de anticuerpos suscitados contra virus BoHV-4 de tipo silvestre y BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención cuando lleva un gen adicional.

El suero de animales infectados con una cepa de BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención que lleva un gen heterólogo reaccionará con proteínas de BoHV-4 inmunogénicas y con una proteína inmunogénica codificada por un gen heterólogo insertado en el BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención. Sin embargo, los sueros de mamíferos infectados con una cepa de campo de BoHV-4 solamente reaccionarán con proteínas de BoHV-4 inmunogénicas. Los ensayos basados en proteínas purificadas codificadas por el gen heterólogo directamente muestran la presencia o ausencia de anticuerpos contra la proteína codificada por el gen heterólogo. Por lo tanto, los virus BoHV-4 mutantes de acuerdo con la presente invención que llevan un gen heterólogo resultan ser vacunas marcadoras muy adecuadas, es decir, vacunas que pueden discriminarse serológicamente de una cepa de campo. Pueden discriminarse utilizando ensayos de diagnóstico específicos, para diferenciar mamíferos infectados por el virus de campo BoHV-4 de mamíferos vacunados con una vacuna que comprende el BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención y que llevan un gen heterólogo. Dichos ensayos comprenden el ensayo de suero para determinar la ausencia o la presencia de anticuerpos contra la proteína codificada por el gen heterólogo.

Un kit de ensayo de diagnóstico para la diferenciación entre animales vacunados contra cepas de BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención y que llevan un gen heterólogo y animales infectados con cepas de campo de BoHV-4 puede comprender, por ejemplo, un ensayo de ELISA bloqueante sencillo en el que una cepa de BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención y que lleva un gen heterólogo se aplica a la pared de una placa de microtitulación. Dicha placa se incuba después con suero del animal a ensayar. Posteriormente, la placa se incuba con un antisuero específico y marcado contra la proteína heteróloga. Si el antisuero marcado reacciona con el virus aplicado, es decir, no está bloqueado por el antisuero del animal a ensayar, esto demuestra que el antisuero no contiene anticuerpos contra la proteína heteróloga. Por tanto, se puede llegar a la conclusión de que una cepa de campo infectó al animal.

Como alternativa, dicho kit de ensayo de diagnóstico puede comprender un ensayo de tipo ELISA en el que posiblemente la proteína heteróloga purificada se aplica a la pared de pocillos distintos de una placa ELISA. La incubación con suero de mamíferos a ensayar, seguido, por ejemplo, por la incubación con un anticuerpo marcado contra la proteína heteróloga podría por tanto revelar la presencia o la ausencia de anticuerpos contra la proteína heteróloga en los pocillos respectivos. Otro ejemplo de un sistema de ensayo de diagnóstico es, por ejemplo, la incubación de una transferencia Western que comprende la proteína heteróloga con suero de mamíferos a ensayar, seguido del análisis de la transferencia.

La detección de anticuerpos específicos contra la proteína heteróloga indica que el mamífero sometido a ensayo se ha vacunado con una cepa de BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención y que lleva un gen heterólogo, mientras que la ausencia de reacción de anticuerpos con la banda de la proteína heteróloga indica que el mamífero se ha infectado con una cepa de campo de BoHV-4.

Otra estrategia del uso de virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención en vacunas marcadoras es discriminar entre virus de campo y virus vacunales basándose en diferencias en reacciones en ensayos de PCR entre virus BoHV-4 de tipo silvestre y BoHV-4 mutantes de acuerdo con la invención. Dicho ensayo, en una forma muy básica, comprendería un primer conjunto de cebadores de PCR contra cualquier secuencia de BoHV-4 de tipo silvestre y un segundo conjunto de cebadores de PCR contra una región de la ORF73 que se haya deletado del virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención.

Si la sangre o el tejido de un animal muestran una reacción tanto con el primer como con el segundo conjunto de cebadores, esto indica que el animal se infectó con un virus de campo. Sin embargo, si la sangre o el tejido de un animal solo muestra una reacción con el primer conjunto de cebadores y no con el segundo, esto indica que el animal se vacunó con un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la invención.

A continuación, únicamente para ilustrar aspectos de la invención, se explicarán con más detalle ejemplos (sin ser restrictivos de ninguna manera) de varios aspectos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1.

Análisis computacional. Se analizaron secuencias proteicas con el programa de alineamiento de secuencias ClustalX (Thompson *et al.*, 1997).

Células y virus. La línea celular de riñón de bovino de Madin-Darby (MDBK; ATCC CCL-22) se cultivó en medio esencial mínimo (MEM, Invitrogen) que contenía suero de ternero fetal (FCS, Harlan) al 5 %. Las líneas celulares de pulmón embrionario de bovino (EBL, colección alemana de microorganismos y cultivos celulares DSMZ ACC192), EBL que expresa de manera estable la Cre recombinasa (EBL-NLS-Cre) (Gillet *et al.*, 2005) y de macrófagos de bovino (BOMAC) (Stabel y Stabel, 1995) líneas celulares se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen) que contenía FCS al 10 %. La cepa V. test de BoHV-4 V y el clon V. test BAC G procedente de cromosoma artificial bacteriano (BAC) se describen en cualquier parte (Gillet *et al.*, 2005).

RT-PCR, determinación de la clase de transcripción cinética. Para la determinación de la clase de transcripción cinética, se añadió cicloheximida (CHX, 100 µg/ml, Sigma) o ácido fosfonoacético (PAA, 300 µg/ml, Sigma) al medio de cultivo en el momento de la infección para inhibir la síntesis de proteínas de nueva aparición o la ADN polimerasa vírica, respectivamente. Veinticuatro horas después de la infección (p.i.) de las células MDBK (multiplicidad de infección (MOI) de 1 unidad formadora de placa (UFP)/célula), se extrajo ARN citoplasmático utilizando el Kit Mini RNeasy (Qiagen) con digestión de DNasa I en columna. Se realizaron reacciones de transcripción inversa y PCR utilizando el sistema Superscript III One-step para RT-PCR con el kit Platinum de la ADN polimerasa de *Taq* (Invitrogen). Se utilizaron cebadores específicos de genes (Tabla S1) para detectar los ARNm víricos. La ausencia de molde de ADN se verificó reemplazando la mezcla RT/*Taq* solo por la ADN polimerasa de *Taq*.

Transferencia de Northern. Las células MDBK se infectaron de manera simulada o se infectaron con la cepa V. test de BoHV-4 V a una MOI de 4 UFP/célula. Después de un período de incubación de 90 minutos, las células se lavaron con PBS y después se recubrieron con MEM que contenía FCS al 5 %. Las células se desecharon a las 4, 8 y 24 horas p.i.. Después, el ARN se purificó de las células y se analizó mediante transferencia Northern de acuerdo con un protocolo estándar (Sambrook y Russell, 2001). Como sonda, se utilizó toda la ORF73 para detectar los ARN que codificaban la ORF73.

Producción de cepas recombinantes ORF73 de BoHV-4. Se produjeron recombinantes de BoHV-4 utilizando tecnologías de clonación BAC y recombinación procariota, como se ha descrito anteriormente (Gillet *et al.*, 2005). Como plásmido precursor se utilizó el plásmido V. test BAC G (Gillet *et al.*, 2005). El V. test BAC G Δ ORF73 y los plásmidos retromutantes V. test BAC G ORF73 se produjeron utilizando selección positiva/negativa a galactosidasa (*galK*) en dos etapas en bacterias (Warming *et al.*, 2005, Fig. 1). El primer proceso de recombinación (selección positiva a *galK*) consistió en reemplazar la ORF73 por el gen *galK* dando como resultado el plásmido V. test BAC G Δ ORF73. La recombinación se realizó utilizando el casete H1-*galK*-H2 (Fig. 1). Este consistía en el gen *galK* flanqueado por secuencias de 60 pb correspondientes a regiones flanqueantes de la ORF73. Este casete se produjo por PCR utilizando, como molde, el vector *pgalK* (Warming *et al.*, 2005) y como cebadores directo (*forward*) e inverso (*reverse*) *galK*-H2endfw y *galK*-H1 startrev, respectivamente (Tabla S1). El segundo proceso de recombinación (selección negativa a *galK*) consistió en restaurar la ORF73 para generar un plásmido retromutante. La recombinación se realizó utilizando el casete H1-ORF73-H2 (Fig. 1), que consistía en la ORF73 flanqueada por secuencias de 60 pb correspondientes a regiones flanqueantes de ORF73. Este casete se produjo por PCR utilizando como molde el genoma de V. test de BOHV-4 y como cebadores directo e inverso, H2endfw y H1startrev, respectivamente (Tabla S1). La reconstitución de virus infecciosos de plásmidos BAC se obtuvo por transfección en células EBL. Para escindir el casete BAC, los virus reconstruidos se propagaron en células EBL-NLS-Cre que expresaban la Cre recombinasa para generar la cepa escindida correspondiente (Fig. 1).

Purificación de virus. Los virus que creían en células MDBK se semipurificaron como se ha descrito anteriormente (Vanderplasschen *et al.*, 1993). En resumen, después de retirar los restos celulares, el virus presente en el sobrenadante celular se sedimentó por ultracentrifugación a través de un cojín de sacarosa al 30 % (p/v).

Transferencia de Southern. Se realizó análisis por transferencia de Southern como se ha descrito anteriormente utilizando como sondas un casete de ORF73 y *galK* (Costes *et al.*, 2008).

Ensayo de tamaño de placa. Células MDBK se infectaron a una MOI de 0,5 UFP/célula. Después de un período de incubación de 90 minutos, las células se lavaron con PBS y después se recubrieron con MEM que contenía FCS al 5 % y carboximetilcelulosa al 0,6 % (p/v) (CMC, Sigma) para obtener placas aisladas como se describe en cualquier parte (Vanderplasschen *et al.*, 1993). A intervalos sucesivos después de la infección, las placas se tiñeron mediante tinción con inmunofluorescencia indirecta (véase más adelante) y se visualizaron a través de microscopía de epifluorescencia.

Curvas de crecimiento multietaapa. Cultivos por triplicado de células MDBK se infectaron a una MOI de 0,5 UFP/célula. Después de un período de incubación de 90 minutos, las células se lavaron con PBS y después se recubrieron con MEM que contenía FCS al 5 %. El sobrenadante de los cultivos infectados se recogió a intervalos sucesivos después de infección y la cantidad de virus infeccioso se determinó mediante ensayo de placa en células MDBK como se ha descrito anteriormente (Vanderplasschen *et al.*, 1993).

Ensayo de persistencia del episoma. Células BOMAC se infectaron a una MOI de 0,5 UFP/célula. Después de un período de incubación de 90 minutos, las células se lavaron con PBS y después se revistieron con MEM que contenía FCS al 5 %. Después, se efectuaron pases celulares cada dos días (proporción de división 1:2) durante 20 días. En cada pase, se fijó una fracción de las células en PBS que contenía la al 4 % (p/v) (Merck) a 4 °C durante 30 minutos. Después las células fijadas se lavaron con PBS, se resuspendieron en el mismo tampón y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de la proteína EGFP (Proteína verde fluorescente potenciada, *Enhanced Green Fluorescent Protein*) (el casete BAC codifica la proteína EGFP).

Animales. Conejos blancos de Nueva Zelanda sin patógenos específicos se enjaularon individualmente en todo el estudio. Se utilizaron cuatro grupos, cada uno de ellos comprendía tres conejos. Los animales del grupo 1 se infectaron de manera simulada, por vía intravenosa, con PBS. Los animales de los grupos 2, 3 y 4 se inocularon por vía intravenosa con 10^8 UFP de las cepas V. test BAC G escindida, V. test BAC G Δ ORF73 escindida y V. test BAC G ORF73 escindida retromutante, respectivamente. Al final del experimento, los conejos se sometieron a eutanasia y se realizó un examen de necropsia durante el cual se extrajo el bazo.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y preparación de suspensión de esplenocitos. Se recogieron muestras de sangre y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se separaron con Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare) a un gradiente de densidad como se ha descrito anteriormente (Dewals *et al*, 2008). Inmediatamente después de la eutanasia, se extirpó el bazo y media parte de este se homogeneizó utilizando un molinillo tisular (VWR), se pasó a través de un tamiz de acero inoxidable y se lavó en MEM sin FCS antes de su análisis posterior.

Detección del genoma vírico mediante PCR en tiempo real. El ADN se purificó del bazo y de las PBMC utilizando el Mini kit de ADN QIAamp (Qiagen). Se realizó PCR en tiempo real como se describe en cualquier parte (Boudry *et al*, 2007). Un fragmento de 103 pb correspondiente a la ORF8 de BoHV-4 se amplificó con el cebador directo 8startfw y con el cebador inverso 8middlerev (Tabla S1) en presencia de la sonda fluorescente 5'-FAM-AACACGTCAACA AGCAAGCCATCCACTG-TAMRA-3'. El genoma de V. test BoHV-4 purificado se utilizó para establecer curvas patrón. Las amplificaciones por PCR y las reacciones de fluorescencia se realizaron en un sistema iCycler (Bio-Rad) en las siguientes condiciones: activación inicial de la *Taq* polimerasa (Bio-Rad) a 94 °C durante 5 minutos seguido de 50 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 50 ciclos a 51 °C durante 30 segundos y 50 ciclos a 72 °C durante 1 minuto. Para la amplificación cuantitativa celular, se utilizó un fragmento de 178 pb del gen de la beta globina de conejo (número de registro Genbank V00882) y se amplificó como se ha descrito anteriormente (Boudry *et al*, 2007).

Ensayo de centro infeccioso. La detección vírica en la suspensión de esplenocitos se ensayó mediante un ensayo de centro infeccioso (ICA, *infectious centre assay*) de la siguiente manera. $5 \cdot 10^5$ células MDBK que crecieron en placas de grupos de 6 pocillos (Becton Dickinson) se cocultivaron durante 4 días a 37 °C con $5 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^5$ o $5 \cdot 10^4$ esplenocitos en MEM que contenía FCS al 5 %, PS al 2 %, CMC al 0,6 % y $5 \cdot 10^{-5}$ M de β -mercaptoetanol (Merck). Después, las células se fijaron y se tiñeron con inmunofluorescencia indirecta para la detección del antígeno vírico como se describe más adelante.

Cuantificación de anticuerpos contra BoHV-4 mediante ELISA. Placas ELISA Nunc Maxisorp (Nalge Nunc) se recubrieron durante 18 horas a 37 °C con Tween 20 al 0,1 % (v/v) – viriones de BoHV-4 alterados ($2 \cdot 10^6$ UFP/pocillo), se bloquearon en PBS que contenía Tween-20 al 0,1 % (v/v) y BSA al 3 % (p/v) y se incubaron con suero de conejo (diluido a 1/300 en PBS que contenía Tween-20 al 0,1 % (v/v) y BSA al 3 % (p/v)). Los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de conejo (Sigma) conjugado con fosfatasa alcalina. El lavado se realizó con PBS que contenía Tween-20 al 0,1 % (v/v) y BSA al 3 % (p/v). Como sustrato se utilizó nitrofenilfosfato (Sigma) y la absorbancia se leyó a 405 nm utilizando un lector de placa ELISA Benchmark (Thermo).

Tinción con inmunofluorescencia indirecta. Se realizó tinción con inmunofluorescencia indirecta como se ha descrito anteriormente (Gillet *et al*. 2005). Como anticuerpos primarios y secundarios se utilizó el anticuerpo monoclonal (Mab) 35 de ratón (diluido a 1:100) suscitado contra el complejo de glucoproteína de BoHV-4 gp6/gp10/gp17 y el anticuerpo de cabra contra IgG de ratón (H+L) Alexa Fluor 568 (Invitrogen, $2 \mu\text{g ml}^{-1}$), respectivamente

Análisis de microscopía. Las muestras se examinaron utilizando un microscopio de epifluorescencia TE2000-S Nikon y un sistema de cámara CCD Leica DC300F.

Citometría de flujo. Las adquisiciones y los análisis por citometría de flujo se realizaron utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia de Becton Dickinson de tres láseres (FACSaria).

Análisis estadístico. Para analizar las curvas de crecimiento multietapa víricas y las respuestas humorales anti BoHV-4 de conejo, se utilizó un modelo lineal $y = \mu + \text{grupo}_i + \text{tiempo}_j + \text{grupo}_i * \text{tiempo}_j + \text{experimento}_k + \text{error}_{ijkl}$. Para la comparación de las curvas de crecimiento multietapa, el factor del experimento no era significativo y por lo tanto no se incluyó en el modelo. Para analizar las respuestas humorales contra BoHV-4, se tuvo en cuenta la correlación entre mediciones sucesivas realizadas en el mismo animal utilizando una estructura de simetría del compuesto. Para

determinar el significado estadístico de los datos obtenidos con el ensayo de persistencia del episoma ($P < 0,0005$), se utilizó el ensayo Anova-2.

Resultados

La ORF73 de BoHV-4 se expresa como un gen IE.

Para determinar si la ORF73 de BoHV-4 era un gen auténtico, se determinó si se transcribía durante la infección por BoHV-4. Se realizó RT-PCR utilizando un ADNc de primera cadena fabricado a partir de células MDBK infectadas de manera simulada e infectadas con BoHV-4 (Fig. 2a). A diferencia de las células infectadas de manera simulada, el ADNc de las células infectadas generó un producto de PCR de 762 pb (Fig. 2a) correspondiente a la ORF73 como se determina mediante secuenciación. Cuando se omite la RT (transcriptasa inversa) de las reacciones, no se detecta ningún producto de PCR, lo que indica que no se produce la amplificación de ADN vírico contaminante. En su conjunto estos datos demuestran que la ORF73 se transcribe durante la replicación de BoHV-4 *in vitro*. Se llegó a una conclusión similar para la ORF71 basándose en los datos presentados en la Fig. 2a. Después, se utilizaron CHX y PAA para identificar la clase de transcripción cinética de la ORF73 y ORF71. Este experimento reveló que ni CHX ni PAA inhibió la expresión de ORF73 ni la de ORF71 lo que sugiere que ambas ORF se expresan como genes IE. Como controles se utilizaron la ORF21 y la ORF22 de Bo5 en este experimento; los resultados presentados en la Fig. 2a confirmaron que eran genes IE, E y L, respectivamente. La ausencia de ADN vírico contaminante en las preparaciones de ARNm se confirmó mediante la ausencia de un producto de PCR cuando se omitió la transcriptasa inversa de las reacciones (Fig. 2a). La expresión de la ORF73 de BoHV-4 como un gen IE es coherente con informes previos que describen la expresión de ortólogos de ORF73 codificados por *Rhadinovirus* después de infección temprana (Ibrahim *et al*, 2003; Martinez-Guzman *et al*, 2003; Saride *et al*, 1999).

La ORF73 de BoHV-4 se expresa como ARNm policistrónicos que incluyen la ORF71. Para caracterizar el transcripto (o transcriptos) de la ORF73, se realizó análisis de transferencia Northern en ARN total extraído de células MDBK infectadas con BoHV-4 e infectadas de manera simulada utilizando como sonda una ORF73 de longitud completa (Fig. 2b). Al cabo de tan solo 4 h p.i. se detectó una débil banda de aproximadamente 2,5 kb (Fig. 2b). A las 8 h p.i., se detectaron cuatro bandas con un tamaño aproximado de 2,0, 2,5, 3,0 y 4,5 kb (Fig. 2b). Se detectó una banda adicional de aproximadamente 7,5 kb 24 h p.i. (Fig. 2b). Estos resultados sugieren que la expresión de ORF73 implica a transcriptos de diferentes tamaños. No se detectó señal en el ARN extraído de células infectadas de manera simulada (Fig. 2b).

La ORF71 se expresa como un ARN policistrónico que incluye al menos la ORF73. La señal de poliadenilación (AATAAA) del transcripto se localiza 104 pb aguas abajo del codón de terminación de ORF71. Las reacciones RT-PCR se realizaron en ARN citoplasmático extraído de células MDBK infectadas con BoHV-4 para caracterizar adicionalmente moléculas de ARN policistrónico que codifican la ORF71 y la ORF73 (Fig. 2, paneles c y d). Se amplificaron los productos de la PCR correspondientes a la ORF71-73 (1454 pb), el extremo ORF73 de la ORF75 (1759 pb) y extremo ORF71 de la ORF75 (2453 pb) (Fig. 2d). Ninguna de las reacciones PCR que implicaban cebadores que se hibridaban cadena arriba del cebador 75 endrev generó ningún producto (Fig. 2d), mientras que todas las reacciones generaron los productos esperados cuando se realizó en ADN vírico de control. La ausencia de ADN vírico contaminante se confirmó mediante la ausencia de productos de PCR cuando la RT se omitió de las reacciones. En su conjunto, los datos presentados anteriormente sugieren que la ORF71 y la ORF73 se expresan como un ARNm bicistrónico. Se identificaron al menos dos ARNm mediante una estrategia combinada de transferencia de Northern/RT-PCR; una incluye tanto la ORF71 como la ORF73 y la segunda incluye la ORF71, la ORF73 y parte de la ORF75 (Fig. 2b y d). Mediante estrategia de transferencia Northern se identificaron ARN más largos, pero no mediante RT-PCR. Estas moléculas pueden representar pre-ARNm.

Producción y caracterización de recombinantes de ORF73 de BoHV-4. Para investigar la importancia de la ORF73 en la replicación del virus *in vitro* y la biología de la infección *in vivo*, se produjo una cepa de BoHV-4 delecionada para la ORF73 y una cepa retromutante derivada (Fig. 1). Como plásmido precursor se utilizó el plásmido V. test BAC G para generar el plásmido V. test BAC G Δ ORF73 en el que toda la ORF73 se había reemplazado por un casete *galK* como se ha descrito en Métodos. Después, se generó un plásmido retromutante. Los virus infecciosos se reconstituyeron eficazmente por transfección de plásmidos BAC en células permisivas. Finalmente, los virus infecciosos reconstruidos se propagaron en células EBL-NLS-Cre para generar cepas escindidas de BAC (Fig. 1). Las estructuras moleculares de las cepas recombinantes producidas se confirmaron mediante una estrategia combinada de endonucleasa de restricción *HindIII* y transferencia de Southern (Fig. 3) y mediante secuenciación de las regiones utilizadas para dirigir la recombinación. Además, la ausencia de efecto polar de la deleción de ORF73 en la expresión de ORF71 se demostró mediante RT-PCR. Todos los recombinantes ensayados expresaron ORF71 comparablemente. Finalmente, la presencia o ausencia del casete BAC se monitorizó mediante análisis de expresión de EGFP por placas víricas (Fig. 4a). Todas las estrategias confirmaron que los recombinantes producidos tenían la estructura molecular correcta.

La deleción de ORF73 no afecta al crecimiento del virus *in vitro*. Para abordar la función de ORF73 en el crecimiento de BoHV-4 *in vitro*, las cepas escindidas retromutantes V. test BAC G, V. test BAC G Δ ORF73 y V. test BAC G ORF73 se compararon utilizando ensayos de tamaño de placa y crecimiento multietapa (Fig. 4). También se

compararon cepas no escindidas correspondientes. Todos los virus ensayados exhibieron curvas de crecimiento similares ($p < 0,05$) en tamaños de placa comparables. En su conjunto estos resultados indican que la delección de ORF73 no afecta a la replicación de BoHV-4 *in vitro*.

La delección de ORF73 afecta la persistencia vírica *in vitro* en un modelo "similar a latencia". Se ha demostrado que las células BOMAC soportan una infección persistente no replicativa de BoHV-4 imitando la latencia (Donofrio y van Santen, 2001). Utilizando este modelo "similar a latencia", se investigó si la delección de ORF73 afectaba a la persistencia de infección por BoHV-4 en células BOMAC. Células BOMAC se infectaron con las cepas retromutantes V. test BAC G, V. test BAC G Δ ORF73 y V. test BAC G ORF73 y la persistencia vírica se monitorizó con el tiempo mediante cuantificación por citometría de flujo de células que expresaban EGFP (Fig. 5a). Independientemente de los recombinantes, aproximadamente el 90 % de las células fueron positivas para la expresión de EGFP el día 2 p. i.. Para los tres recombinantes ensayados, el porcentaje de células positivas a EGFP disminuyó gradualmente con el tiempo. Sin embargo, aunque se obtuvieron datos comparables para las cepas retromutantes V. test BAC G y V. test BAC G de la ORF73, se observó un decaimiento más rápido de células positivas para las células infectadas con la cepa V. test BAC G Δ ORF73 (Fig. 5a). Por ejemplo, el día 10 p.i. aunque los cultivos infectados con los retromutantes V. test BAC G y V. test BAC G ORF73 contenían aproximadamente un 50 % de células positivas a EGFP, el porcentaje de células positivas a EGFP en células BOMAC infectadas con la cepa V. test BAC G Δ ORF73 era casi de 0.

Al menos dos hipótesis, no mutuamente exclusivas, podían explicar el decaimiento más rápido de células positivas a EGFP en el cultivo infectado con V. test BAC G Δ ORF73 en comparación con V. test BAC G y V. test BAC G ORF73. En primer lugar, es probable que la delección de ORF73 alterase la persistencia del episoma vírico en el cultivo a través de la división celular. En segundo lugar, es posible que la ausencia de ORF73 pueda inducir la replicación lítica (liberando la inhibición en ORF50) de BoHV-4 en células BOMAC y consecuentemente la erradicación de células infectadas del cultivo. Para someter a ensayo la última hipótesis, células BOMAC se infectaron con cepas retromutantes V. test BAC G, V. test BAC G Δ ORF73 y V. test BAC G ORF73, después se analizaron 48 h p.i. por citometría de flujo para determinar la expresión de la proteína estructural gB. Los datos presentados en la Fig. 5b demuestran que, independientemente de la cepa vírica utilizada para la infección, no pudo detectarse la expresión de gB de BoHV-4 en células BOMAC infectadas (Fig. 5b, columna derecha). En cambio, la infección de células MDBK utilizadas como control positivo condujo a una gran proporción de células que expresaban la glucoproteína gB (Fig. 5b, columna izquierda). Todos los recombinantes ensayados condujeron a porcentajes comparables de células que expresaban la glucoproteína gB. En su conjunto, los resultados presentados anteriormente confirman el hecho de que la ORF73 de BoHV-4 desempeña un papel en la latencia y justifica la terminación de experimentos *in vivo*.

La ORF73 de BoHV-4 es esencial para la persistencia vírica *in vivo*. Para investigar la importancia de la ORF73 de BoHV-4 durante la latencia *in vivo*, se utilizó el modelo de conejo. Los conejos fueron inoculados con cepas escindidas retromutantes V. test BAC G, V. test BAC G Δ ORF73 y V. test BAC G ORF73 (Fig. 6a y b). Independientemente de los grupos, todos los conejos permanecieron sanos durante el experimento. Ninguno de los conejos mostró síntomas clínicos o lesiones a lo largo del experimento. En la necropsia no se observó ninguna lesión 64 días después de la inoculación. Para abordar la persistencia vírica, se realizó PCR en tiempo real en ADN extraído de PBMC a lo largo del tiempo y de bazo 64 días después de la inoculación (Fig. 6a). Después de una fase de eclipse de 12 días, se detectaron copias víricas que variaban de 10^1 a 10^2 copias víricas por 10^5 copias de beta globina en, en las PBMC de todos los conejos infectados con las cepas escindidas retromutantes V. test BAC G y V. test BAC G ORF73 (Fig. 6a). Cabe destacar que ninguno de los conejos infectados con la cepa escindida V. test BAC G Δ ORF73 tuvo un genoma vírico detectable en PBMC a lo largo del experimento (Fig. 6a). La PCR en tiempo real realizada en el bazo confirmó el papel esencial de la ORF73 para la persistencia vírica *in vivo*. De hecho, aunque los conejos infectados con las cepas escindidas retromutantes V. test BAC G y V. test BAC G ORF73 contenían al menos 10^3 copias víricas por 10^5 copias de beta globina celular, ninguno de los conejos infectados con la cepa escindida V. test BAC G Δ ORF73 presentó una cantidad detectable de genoma vírico (Fig. 6a). Para confirmar estos resultados por PCR en tiempo real, se intentaron aislamientos víricos cocultivando esplenocitos con células permisivas como se describe en Métodos. Se observaron placas víricas para los 3 conejos del grupo infectado con la cepa escindida V. test BAC G y para los 2 de los 3 conejos infectados con la cepa escindida retromutante V. test BAC G ORF73. En cambio, no se aisló ningún virus de esplenocitos de conejos infectados con la cepa escindida V. test BAC G Δ ORF73. Se realizaron ensayos de aislamiento de virus con las mismas fuentes de esplenocitos, pero congelados/descongelados antes de ensayo, que no condujeron a aislamiento vírico. En su conjunto, estos resultados presentados anteriormente demuestran que la ORF73 es esencial para latencia vírica.

Finalmente, la respuesta inmunitaria humoral inducida por la cepa con la ORF73 delecionada, se comparó con la observada con las cepas retromutante y precursora de tipo silvestre (Fig. 6b). Independientemente de la cepa vírica utilizada para inoculación, al cabo de tan solo 6 días después de la inoculación, se detectaron anticuerpos contra BoHV-4. Todos los conejos infectados mostraron respuestas inmunitarias humorales comparables. El ensayo estadístico utilizado para analizar los datos sugirió que, en algunos puntos temporales, los conejos infectados con la cepa escindida V. test BAC G Δ ORF73 presentaron una mayor respuesta ($p < 0,05$) (Fig. 6b) cuando se comparó con las cepas escindidas retromutantes V. test BAC G y V. test BAC G ORF73. Esta diferencia estadística no se observó cuando se utilizó ensayo de la *t* de Student. Sin embargo, estos datos muestran que la respuesta inmunitaria suscitada contra el recombinante con la ORF73 delecionada, es al menos comparable con las respuestas inducidas por las

cepas de tipo silvestre y retromutante. La ausencia de respuesta en el grupo infectado de manera simulada confirmó la ausencia de contaminación cruzada entre los grupos (Fig. 6b).

5 Diversas características hacen que BoHV-4 sea un buen candidato como un vector de suministro génico y estudios previos mostraron pruebas de que BoHV-4 podía utilizarse satisfactoriamente Para transducir la expresión de proteínas exógenas (Gillet *et al.*, 2005; Donofrio *et al.*, 2006). BoHV-4 (i) posee un genoma menos complejo que otros herpesvirus (Zimmermann *et al.*, 2001), (ii) puede alojar grandes cantidades de material genético exógeno (Gillet *et al.*, 2005), (iii) a diferencia de la mayoría de los gammaherpesvirus, puede replicarse en un amplio espectro de especies hospedadoras tanto *in vitro* como *in vivo* (Thiry *et al.*, 1992), y (iv) BoHV-4 presenta patogenicidad limitada o no presenta patogenicidad en hospedadores naturales y experimentales (Thiry *et al.*, 1992). Sin embargo, la propiedad de BoHV-4 para establecer latencia y reactivarse hace que las cepas de tipo silvestre sean inapropiadas para desarrollar vectores recombinantes seguros. De hecho, a lo largo de su vida, los animales infectados pueden reactivar y contaminar a animales sin tratamiento previo. Los resultados del presente estudio demuestran que la delección de ORF73 anula la propiedad de BoHV-4 para establecer infección persistente al menos en un modelo animal de laboratorio (Fig. 6). Por consiguiente, las cepas de BoHV-4 con la ORF73 delecionada, representan vectores básicos excelentes para el desarrollo de vectores de BoHV-4 en vacunología.

En conclusión, los resultados del presente estudio demuestran que, a pesar de su muy pequeño tamaño, la ORF73 de BoHV-4 es un homólogo funcional de ortólogos de ORF73 de *rhadinovirus* más grandes que es esencial para la latencia *in vivo*. Las cepas de BoHV-4 con la ORF73 delecionada, representan vectores básicos excelentes para el desarrollo de vectores de BoHV-4 en vacunología.

Tabla S1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR

Cebadores	Secuencia	Coordenadas según el n.º de registro NC_002665 del Genbank
Bo5endfw	5'-TCATGTCCTGAGTGGGTCTATG-3'	19414-19435
Bo5startrev	5'-GCTACAGAAAATGGCCAGTAAAG-3'	20541-20563
21 middlefw	5'-CATGGAGAGGCCATCAGGAG-3'	29044-29063
21endrev	5'-CTTAACACAGAACTCCTTTGC-3'	29521-29542
22middlefw	5'-CCGGGTGAAACAAGTTCCTG-3'	31114-31133
22endrev	5'-GGTCAGAGAACATATGATAACATC-3'	31654-31675
71endfw	5'-CCAAGCTTCTAGAGAGTGATTTGTAGTGT-3'	98883-98903
71startrev	5'-AAGGATCCGATGGTTACCAGGGATGTGTTG-3'	99411-99431
73endfw	5'-TCACTGATCAACGGGTATTCC-3'	99576-99596
73 startrev	5'-ATGCCGGGCCGCCACCTC-3'	100320-100337
75endrev	5'-GGGTACACCACAAAGTCCC-3'	101317-101335
75middlerev	5'-GAGCAGACCATCATCTATAGG-3'	101851-101871
75 startrev	5'-ATGGATCAAAGACATCTTGTGG-3'	104724-104745
Bo14startrev	5'-GGAGAGTCCTGTCTAGAACC-3'	105949-105968
Bo15startrev	5'-GGTGAGTAATGGGACCATGG-3'	106581-106600
ga/K-H2endfw	5'-TCTTTAAAAACAACCATAGAACATATCATGAA GAC ATTCAAAAATATTCAAATCAGGTGTCAGCACTGTCCTG CTCCTT -3'	99517-99575
ga/K-HI startrev	5'-GACATCTAGTGGTGGCTCGTATAGTTACACCAGTCTT GTGAATTTTCTTCTGCCAAAGGCCTGTTGACAATTAAT CATCGGCA -3'	100338-100397

H2endfw	5'-TCTTTAAAAAACAACCATAGAACATATCATGAAGAC ATTCAAAAATATTCAAATCAGGTG-3'	99517-99575
H1startrev	5'-GACATCTAGTGGTGGCTCGTATAGTTACACCAGTCT TGTGAATTTTCTTTCTGCCAAAGG-3'	100338-100397
galKstartfw	5'-GCCAACGCATTTGGCTACC-3'	
galKendrev	5'-CGGCAGGCACCAGCTCTTC-3'	
8startfw	5'-CAAATAGTTCATTAGCTGCCTCTCC-3'	11571-11595
8middlerev	5'-TCATCAGTAACAGTTGGAATAGTGG-3'	11649-11673

Subrayado: bases extra añadidas. En negrita: mutación específica en la cepa de BoHV-4 utilizada en el presente estudio (V. test, n.º de registro Z79633 del Genbank).

Tabla S2 complementaria. Números de registro del Genbank de regiones secuenciadas de BoHV-4

Cepa	ORF16	Bo10	ORF71	Región intergénica 71-73	ORF73	Bo17
V. test	AY847335	Z64S18	Z46385*	Z4B385*	Z4S385*	AF3211G5*†
LVR 140	AY847332	AY847310	AY84733S	AY847325	AYS47346	AF465330*‡
MOVAR	AY847334	AYS47305	AY847341	AY847327	AYS4734S	AF465331*‡
DN599	AY847331	AY8473G9	U2376Q	U2378G"	AY347345	AF455332*‡
66-p-347	AF31S573*§	AF31S573*§	AF318573"§	AF318573*§	AF318573*§	AF318573*§
Buf.	AY847330	AY847308	AY847338	AY847324	AYS47344	AY143157*‡
130	AY8S7323	AY847307	AY847337	AYS47323	AYS47343	AY143156*‡
108	AY847328	AYS47306	AY847336	AY847322	AY347342	AY 143155*‡
M40	AY847333	AYS47311	AY847340	AY847326	AY847347	AY143159*‡

Tabla S1 complementaria. Cebadores utilizados para amplificar secuencias del genoma de BoHV-4

La posición de cada cebador se describe de acuerdo con la secuencia de la cepa 66-p-347 (Zimmerman *et al*, 2001).

Región	Posición del nucleótido	Tipo	Secuencia (5'→3')
Región intergénica 71-73 y ORF73	98866-95903	Directo	GAGAGTGATTGTAGTGT
	98972-98993	Directo	CAAAGAGATCTAGGTTGTCTGG
	100123-100107	Inverso	AGTTAGGACACGTTCCAGCAACG
	100337-100318	Inverso	ATGCCGGGGCCGCCACCTCAG

Leyenda de las figuras

Fig. 1. Flujograma de estadios realizado para producir recombinantes de ORF73 de BoHV-4 utilizando tecnologías de clonación BAC y recombinación procariota.

Fig. 2. (a) Determinación de la clase de transcripción cinética de ORF73. Células MDBK se infectaron de manera simulada o se infectaron con la cepa V. test de BoHV-4, en ausencia o en presencia de CHX o PAA. Veinticuatro horas p.i., se estudió la expresión de IE Bo5, E ORF21, L ORF22, ORF71 y ORF73 utilizando una estrategia de RT-PCR como se describe en Métodos. Los productos de la PCR se representan como ARNm y ADN generados cuando la RT se omitió de las reacciones y de los productos de RT-PCR, respectivamente. (b) Se realizó análisis de transferencia Northern en ARN total recogido de células MDBK infectadas de manera simulada e infectadas 4, 8 y 24 h p.i. con la cepa V. test de BoHV-4. Como sonda se utilizó la ORF73. Para optimizar la visualización de las bandas en la muestra 24 h p.i., la línea correspondiente se expuso durante un período más corto (columna derecha). Bandas débiles e intensas identificadas en la transferencia se marcaron con flechas blancas y flechas respectivamente. (c) y (d) Caracterización de transcritos de ORF73 por RT-PCR. ARN citoplasmático extraído 24 h p.i. se analizó mediante RT-PCR utilizando los pares de cebadores descritos en el panel (c). Para cada par de cebadores se indica el tamaño del amplicón esperado. Los resultados de la PCR se presentan en el panel (d). La PCR que sugiere la naturaleza policistónica del transcrito de la ORF73 se marca con asterisco.

Fig. 3. Análisis estructural de cepas recombinantes de BoHV-4. El ADN de diversos productos intermedios se analizó mediante restricción con *HindIII* (panel de la izquierda) y además se ensayó mediante transferencia de

Southern (panel de la derecha) utilizando sondas correspondientes a la ORF73 y el casete *galK*. Las flechas y las flechas blancas indican fragmentos de restricción que contienen la ORF73 y el casete *galK*, respectivamente. Los tamaños de los marcadores (TM) se indican a la izquierda.

Fig. 4. Caracterización de la cepa V. test de BoHV-4 y de cepas recombinantes derivadas. (a) Análisis de epifluorescencia de placas de virus. Células MDBK se infectaron (MOI de 0,5 UFP/célula) con las cepas V. test BoHV-4 (i-iii), V. test BAC G (iv-vi), V. test BAC G escindida (vii-ix), V. test BAC G Δ ORF73 (x-xii), V. test BAC G Δ ORF73 escindida (xiii-xv), V. test BAC G ORF73 retromutante (xvi-xviii) y V. test BAC G ORF73 retromutante escindida (xix-xxi). Después, las células se recubrieron con MEM que contenía FCS al 5 % y carboximetilcelulosa al 0,6 % para obtener placas aisladas. Tres días p.i., las placas se revelaron mediante tinción inmunofluorescente indirecta utilizando, como anticuerpos primario y secundario, Mab 35 y anticuerpo de cabra contra ratón conjugado con Alexa Fluor 568, respectivamente. Cada conjunto de tres paneles horizontales representa el análisis de las mismas placas. Las fluorescencias de EGFP y Alexa Fluor 568 se muestran en la primera y segunda columna respectivamente; mientras que las señales que aparecen de EGFP y Alexa Fluor 568 se muestran en la tercera columna. El lado de cada panel corresponde a 75 μ m del espécimen. (b) Cinéticas de replicación de cepas recombinantes. Las cinéticas de replicación de la cepa V. test BAC G Δ ORF73 escindida (triángulo) y de la cepa V. test BAC G ORF73 escindida retromutante (cruz), se compararon con las de la cepa precursora V. test BAC G escindida (cuadrado) como se describe en Métodos. Los datos presentados son las medias $\pm$ DT de mediciones por triplicado.

Fig. 5. Persistencia del episoma y la replicación de BoHV-4 en células BOMAC. (a) Células BOMAC se infectaron de manera simulada (círculo blanco) o se infectaron con V. test BAC G (cuadrado), V. test BAC G Δ ORF73 (triángulo) o V. test BAC G ORF73 (cruz). Después, se midió la persistencia del episoma a lo largo del tiempo, como se describe en Métodos. Cada valor representa la media $\pm$ DT de mediciones por triplicado del porcentaje de células positivas a EGFP basándose en el análisis de 10.000 células. (b) 48 h p.i., células BOMAC y MDBK (utilizadas como control positivo para la replicación vírica) se tiñeron con Mab 35 suscitado contra la glucoproteína gB de BoHV-4 y se analizaron por citometría de flujo para investigar la replicación de BoHV-4. Los resultados representados se basan en el análisis de 10.000 células.

Fig. 6. Infección de conejos con recombinantes BoHV-4 ORF73. Grupos que consistían en 3 conejos se infectaron de manera simulada o se infectaron con las cepas V. test BAC G, V. test BAC G Δ ORF73 y V. test BAC G ORF73 escindidas retromutantes. (a) Cuantificación relativa con PCR en tiempo real del genoma de BoHV-4. Se extrajo ADN de las PBMC a diferentes momentos después de la inoculación y del bazo 64 días después de la inoculación. Los datos se expresan como el número de copias de genes BoHV-4 ORF8 por 10^5 copias de genes de beta globina de conejo para cada conejo. (b) Respuesta humoral en conejos contra BoHV-4. Se recogieron sueros a diferentes momentos después de la inoculación y se calculó el título de anticuerpos contra BoHV-4 mediante ELISA. En cada conejo se realizaron ensayos por triplicado. Cada valor representa la media $\pm$ DT de los datos obtenidos de los tres conejos de cada grupo.

Referencias bibliográficas

- Ballestas, M. E., Chatis, P. A. & Kaye, K. M. (1999). Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* 284, 641-4.
- Barbera, A. J., Chodaparambil, J. V., Kelley-Clarke, B., Joukov, V., Walter, J. C., Luger, K. & Kaye, K. M. (2006). The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. *Science* 311, 856-61.
- Boudry, C., Markine-Goriaynoff, N., Delforge, C., Springael, J. Y., de Leval, L., Drion, P., Russell, G., Haig, D. M., Vanderplasschen, A. F. & Dewals, B. (2007). The A5 gene of alcelaphine herpesvirus 1 encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor that is non-essential for the induction of malignant catarrhal fever in rabbits. *J Gen Virol* 88, 3224-33.
- Cai, X., Lu, S., Zhang, Z., Gonzalez, C. M., Damania, B. & Cullen, B. R. (2005). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of virico microRNAs in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 5570-5.
- Calderwood, M., White, R. E., Griffiths, R. A. & Whitehouse, A. (2005). Open reading frame 73 is required for herpesvirus saimiri AI 1-S4 episomal persistence. *J Gen Virol* 86, 2703-8.
- Costes, B., Fournier, G., Michel, B., Delforge, C., Raj, V. S., Dewals, B., Gillet, L., Drion, P., Body, A., Schynts, F., Lieffrig, F. & Vanderplasschen, A. (2008). Cloning of the Koi Herpesvirus Genome as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome Demonstrates That Disruption of the Thymidine Kinase Locus Induces Partial Attenuation in *Cyprinus carpio* koi. 10.1128/JVI.00211-08. *J. Virol.* 82,4955-4964.
- Dewals, B., Boudry, C., Farnir, F., Drion, P.-V. & Vanderplasschen, A. (2008). Malignant Catarrhal Fever Induced by *Alcelaphine herpesvirus 1* is Associated with Proliferation of CD8⁺ T Cells Supporting a Latent Infection. *PLoS ONE* 3, 1627.
- Dewals, B., Thirion, M., Markine-Goriaynoff, N., Gillet, L., de Fays, K., Minner, F., Daix, V., Sharp, P. M. & Vanderplasschen, A. (2006). Evolution of Bovine herpesvirus 4: recombination and transmission between African buffalo and cattle. *J Gen Virol* 87, 1509-19.

- Donofrio, G., Cavirani, S., Vanderplasschen, A., Gillet, L. & Flammini, C. F. (2006). Recombinant bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) expressing glycoprotein D of BoHV-1 is immunogenic and elicits serum-neutralizing antibodies against BoHV-1 in a rabbit model. *Clin Vaccine Immunol* 13, 1246-54.
- Donofrio, G. & van Santen, V. L. (2001). A bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus-4 persistent infection. *J Gen Virol* 82, 1181-1185.
- Ebrahimi, B., Dutia, B. M., Roberts, K. L., Garcia-Ramirez, J. J., Dickinson, P., Stewart, J. P., Ghazal, P., Roy, D. J. & Nash, A. A. (2003). Transcriptome profile of murine gammaherpesvirus-68 lytic infection. *J Gen Virol* 84, 99-109.
- Fowler, P., Marques, S., Simas, J. P. & Efsthathiou, S. (2003). ORF73 of murine herpesvirus-68 is critical for the establishment and maintenance of latency. *J Gen Virol* 84, 3405-16.
- Friberg, J., Jr., Kong, W., Hottiger, M. O. & Nabel, G. J. (1999). p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature* 402, 889-94.
- Gillet, L., Daix, V., Donofrio, G., Wagner, M., Koszinowski, U. H., China, B., Ackermann, M., Markine-Goriaynoff, N. & Vanderplasschen, A. (2005). Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J Gen Virol* 86, 907-17.
- Krithivas, A., Young, D. B., Liao, G., Greene, D. & Hayward, S. D. (2000). Human herpesvirus 8 LANA interacts with proteins of the mSin3 corepressor complex and negatively regulates Epstein-Barr virus gene expression in dually infected PEL cells. *J Virol* 74, 9637-45.
- Lan, K., Kuppers, D. A., Verma, S. C. & Robertson, E. S. (2004). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen inhibits lytic replication by targeting Rta: a potential mechanism for virus-mediated control of latency. *J Virol* 78, 6585-94.
- Lan, K., Kuppers, D. A., Verma, S. C., Sharma, N., Murakami, M. & Robertson, E. S. (2005). Induction of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen by the lytic transactivator RTA: a novel mechanism for establishment of latency. *J Virol* 79, 7453-65.
- Li, H., Gailbreath, K., Flach, E. J., Taus, N. S., Cooley, J., Keller, J., Russell, G. C., Knowles, D. P., Haig, D. M., Oaks, J. L., Traul, D. L. & Crawford, T. B. (2005). A novel subgroup of rhadinoviruses in ruminants. *J Gen Virol* 86, 3021-3026.
- Li, M., Lee, H., Yoon, D. W., Albrecht, J. C., Fleckenstein, B., Neipel, F. & Jung, J. U. (1997). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J Virol* 71, 1984-91.
- Lim, C., Gwack, Y., Hwang, S., Kim, S. & Choe, J. (2001). The transcriptional activity of cAMP response element-binding protein-binding protein is modulated by the latency associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Biol Chem* 276, 31016-22.
- Lu, F., Day, L., Gao, S. J. & Lieberman, P. M. (2006). Acetylation of the latency-associated nuclear antigen regulates repression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic transcription. *J Virol* 80, 5273-82.
- Markine-Goriaynoff, N., Georgin, J. P., Goltz, M., Zimmermann, W., Broil, H., Wamwayi, H. M., Pastoret, P. P., Sharp, P. M. & Vanderplasschen, A. (2003). The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-mucin encoded by bovine herpesvirus 4 was acquired from an ancestor of the African buffalo. *J Virol* 77, 1784-92.
- Martinez-Guzman, D., Rickabaugh, T., Wu, T. T., Brown, H., Cole, S., Song, M. J., Tong, L. & Sun, R. (2003). Transcription program of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* 77, 10488-503.
- Naeem, K., Caywood, D. D., Werdin, R. E. & Goyal, S. M. (1990). Evaluation of pregnant rabbits as a laboratory model for bovid herpesvirus-4 infection. *Am J Vet Res* 51, 640-4.
- Osorio, F. A., Reed, D. E. & Rock, D. L. (1982). Experimental infection of rabbits with bovine herpesvirus-4: acute and persistent infection. *Vet Microbiol* 1, 503-13.
- Radkov, S. A., Kellam, P. & Boshoff, C. (2000). The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat Med* 6, 1121-7.
- Renne, R., Barry, C., Dittmer, D., Compitello, N., Brown, P. O. & Ganem, D. (2001). Modulation of cellular and virion gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 75, 458-68.
- Roizman, B. & Pellett, P. E. (2007). The family *Herpesviridae*: a brief introduction. In *Fields Virology (fifth edition)*, pp. 2479-2499. Edited by H. P. M. Knipe D.M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In *Chapter 7: Extraction, Purification and Analysis of mRNA from Eukaryotic Cells*, Third Edition edn, pp. 7.1-7.45. Edited by N. Irwin. New-York: Cold Spring Harbor Lab.
- Sarid, R., Flore, O., Bohenzky, R. A., Chang, Y. & Moore, P. S. (1998). Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1). *J Virol* 72, 1005-12.
- Sarid, R., Wiezorek, J. S., Moore, P. S. & Chang, Y. (1999). Characterization and cell cycle regulation of the major Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) latent genes and their promoter. *J Virol* 73, 1438-46.
- Stabel, J. R. & Stabel, T. J. (1995). immortalization and characterization of bovine peritoneal macrophages transfected with SV40 plasmid DNA. *Vet Immunol Immunopathol* 45, 211-20.
- Thiry, E., Bublot, M., Dubuisson, J., Van Bresse, M. F., Lequarre, A. S., Lomonte, P., Vanderplasschen, A. & Pastoret, P. P. (1992). Molecular biology of bovine herpesvirus type 4. *Vet Microbiol* 33, 79-92.

- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinel, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schroter, M., Scaffidi, C., Krammer, P. H., Peter, M. E. & Tschopp, J. (1997). Virico FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-21.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. (1997). The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. 10.1093/nar/25.24.4876. *Nucl. Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Vanderplasschen, A., Bublot, M., Pastoret, P. P. & Thiry, E. (1993). Restriction maps of the DNA of cervid herpesvirus 1 and cervid herpesvirus 2, two viruses related to bovine herpesvirus 1. *Arch Virol* 128, 379-88.
- Warming, S., Costantino, N., Court, D. L., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. (2005). Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* 33, e36.
- Week, K. E., Kim, S. S., Virgin, H. I. & Speck, S. H. (1999). Macrophages are the major reservoir of latent murine gammaherpesvirus 68 in peritoneal cells. *J Virol* 73, 3273-83.
- Ye, F. C., Zhou, F. C., Yoo, S. M., Xie, J. P., Browning, P. J. & Gao, S. J. (2004). Disruption of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent nuclear antigen leads to abortive episome persistence. *J Virol* 78, 11121-9.
- Zimmermann, W., Broil, H., Ehlers, B., Buhk, H. J., Rosenthal, A. & Goltz, M. (2001). Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. *J Virol* 75, 1186-94.

LISTADO DE SECUENCIAS

20	<110> Intervet International B.V.	
	<120> Vacuna contra el herpesvirus bovino	
	<130> 2009.026	
25	<160> 27	
	<170> PatentIn versión 3.5	
30	<210> 1	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Herpesvirus bovino 4	
35	<400> 1	
	tcatgtcctg agtgggtcta tg	22
40	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Herpesvirus bovino 4	
45	<400> 2	
	gctacagaaa atggccagta aag	23
50	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Herpesvirus bovino 4	
	<400> 3	
55	catggagagg ccatcaggag	20
60	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Herpesvirus bovino 4	
	<400> 4	
	cttaaccaca gaactccttt gc	22

ES 2 699 828 T3

5	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 5 ccgggtgaaa caagttcctg	20
10	<210> 6 <211> 24 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 6 ggtcagagaa catatgataa catc	24
20	<210> 7 <211> 29 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 7 ccaagcttct agagagtgat ttgtagtgt	29
30	<210> 8 <211> 30 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 8 aaggatccga tggttaccag ggatgtgttg	30
40	<210> 9 <211> 21 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 9 tcactgatca acgggtattc c	21
50	<210> 10 <211> 18 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 10 atgccgggcc gccacctc	18
55	<210> 11 <211> 19 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 11 gggtacacca caaagtccc	19
60	<210> 12	

ES 2 699 828 T3

	<211> 21 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4	
5	<400> 12 gagcagacca tcatttatag g	21
10	<210> 13 <211> 22 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4	
15	<400> 13 atggatcaaa gacatcttgt gg	22
20	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4	
25	<400> 14 ggagagtcct gtctagaacc	20
30	<210> 15 <211> 20 <212> AND <213> Herpesvirus bovino 4	
35	<400> 15 ggtgagtaat gggaccatgg	20
40	<210> 16 <211> 80 <212> AND <213> Herpesvirus bovino 4	
	<400> 16 tcttttaaaaa acaaccatag aacatatcat gaagacattc aaaaatattc aaatcaggtg	60
	tcagcactgt cctgctcctt	80
45	<210> 17 <211> 84 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4	
50	<400> 17 gacatctagt ggtggctcgt atagttacac cagtcttgtg aattttcttt ctgccaaagg	60
	cctgttgaca attaatcatc ggca	84
55	<210> 18 <211> 60 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 18	

ES 2 699 828 T3

	tctttaaaaa acaaccatag aacatatcat gaagacattc aaaaatattc aaatcaggtg	60
5	<210> 19 <211> 60 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 19	
10	gacatctagt ggtggctcgt atagttacac cagtcttgtg aattttcttt ctgccaaagg	60
15	<210> 20 <211> 19 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 20	
20	gccaaacgcat ttggctacc	19
25	<210> 21 <211> 19 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 21	
30	cggcaggcac cagctcttc	19
35	<210> 22 <211> 25 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 22	
40	caaatagttc attagctgcc tctcc	25
45	<210> 23 <211> 25 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 23	
50	tcatcagtaa cagttggaat agtgg	25
55	<210> 24 <211> 18 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 24	
60	gagagtgatt tgtagtgt	18
	<210> 25 <211> 22 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 25	

ES 2 699 828 T3

	caaagagatc taggttgtct gg	22
5	<210> 26 <211> 22 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 26	
10	agttaggaca cgttcaccaa cg	22
15	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Herpesvirus bovino 4 <400> 27	
20	atgcggggcc gccacctcag	20

REIVINDICACIONES

1. Virus del herpesvirus bovino de tipo 4 (BoHV-4) mutante, caracterizado por que no es capaz de crear una proteína ORF73 funcional, caracterizándose dicho virus BoHV-4 por que tiene una mutación en el gen ORF73; por que dicho virus comprende una segunda delección, y por que dicha segunda delección es una delección en el gen ORF71 que codifica un v-FLIP, el gen ORF16 que codifica un homólogo de v-Bcl-2, el gen Bo10 que codifica la glucoproteína gp80 o el gen ORF21 que codifica la timidina quinasa.
2. Virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicho virus comprende una secuencia de ADN heterólogo.
3. Virus BoHV-4 mutante de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que dicha secuencia de ADN heterólogo codifica una proteína inmunogénica de otro virus o de un microorganismo patógeno para animales que son sensibles a una infección por BoHV-4, preferentemente rumiantes, y/o una citocina.
4. Virus BoHV-4 mutante de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3, caracterizado por que dicha secuencia de ADN heterólogo está insertada en el gen ORF73.
5. Virus BoHV-4 mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en una vacuna.
6. Vacuna para combatir una infección por BoHV-4, caracterizada por que dicha vacuna comprende un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Vacuna transportadora de BoHV-4 mutante, caracterizada por que dicha vacuna comprende un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, caracterizada por que dicha vacuna está en forma liofilizada.
9. Una célula que comprende un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
10. Método para la producción de un virus BoHV-4 mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo dicho método la etapa de mutación del gen ORF73 de manera que ya no codifique una proteína ORF73 funcional.
11. Kit de ensayo de diagnóstico para diferenciar animales infectados con el virus de campo BoHV-4 de animales vacunados con una vacuna contra el BoHV-4 mutante de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que dicho kit comprende cebadores de PCR contra un fragmento de ORF73 que no está presente en el virus BoHV-4 mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

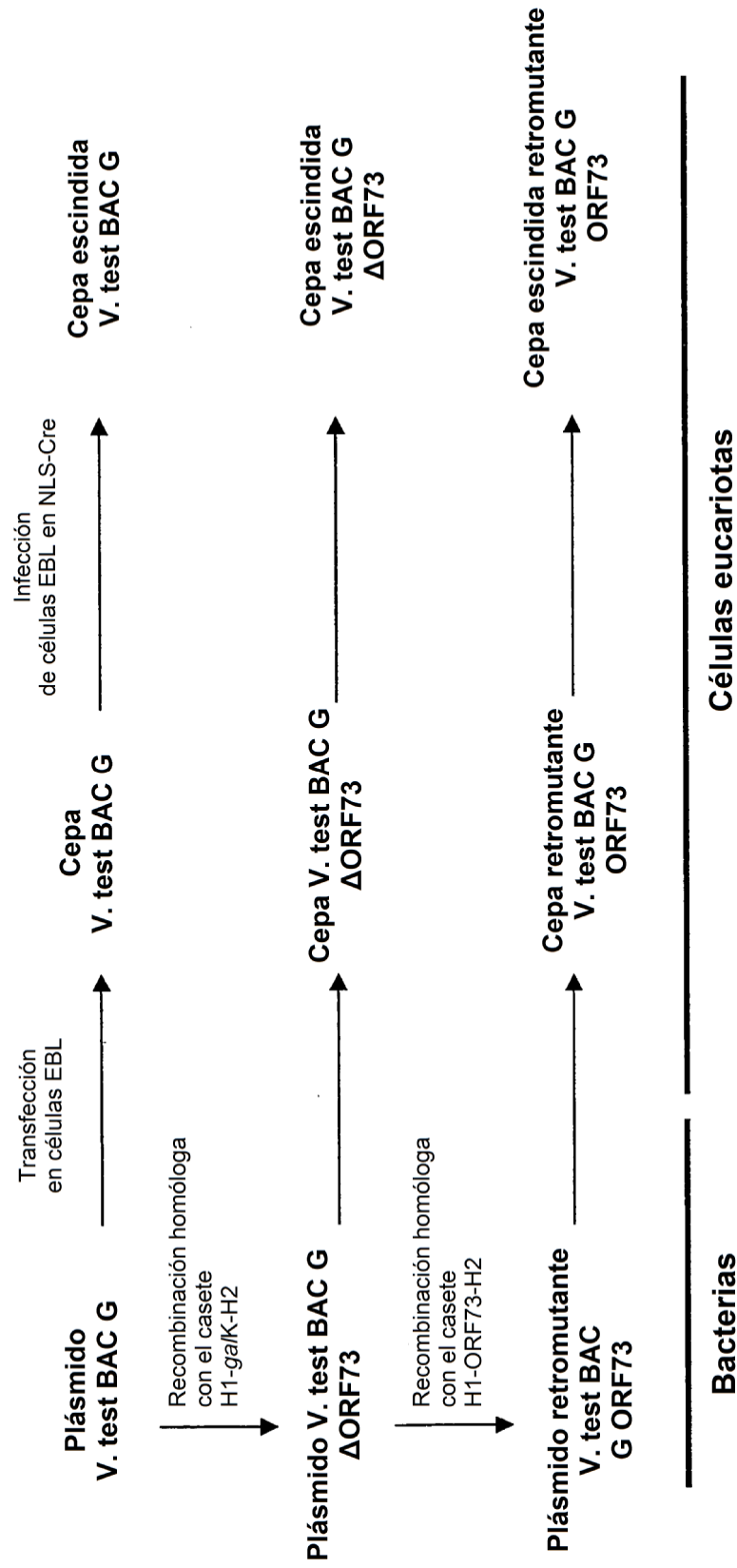


Figura 1

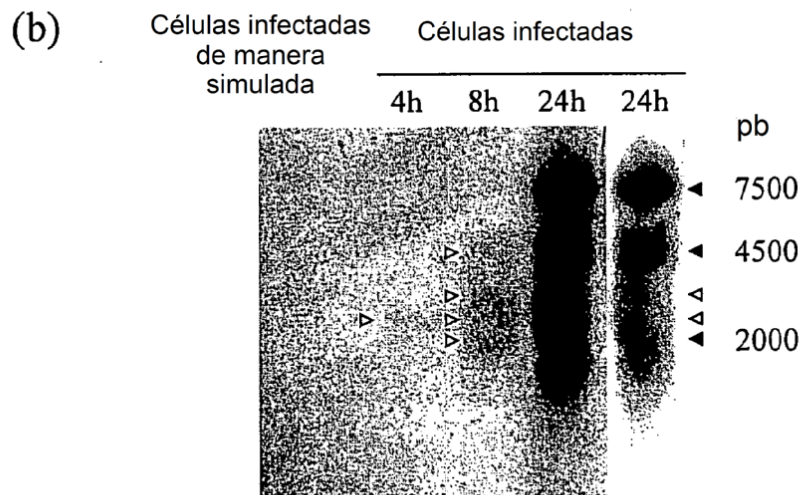
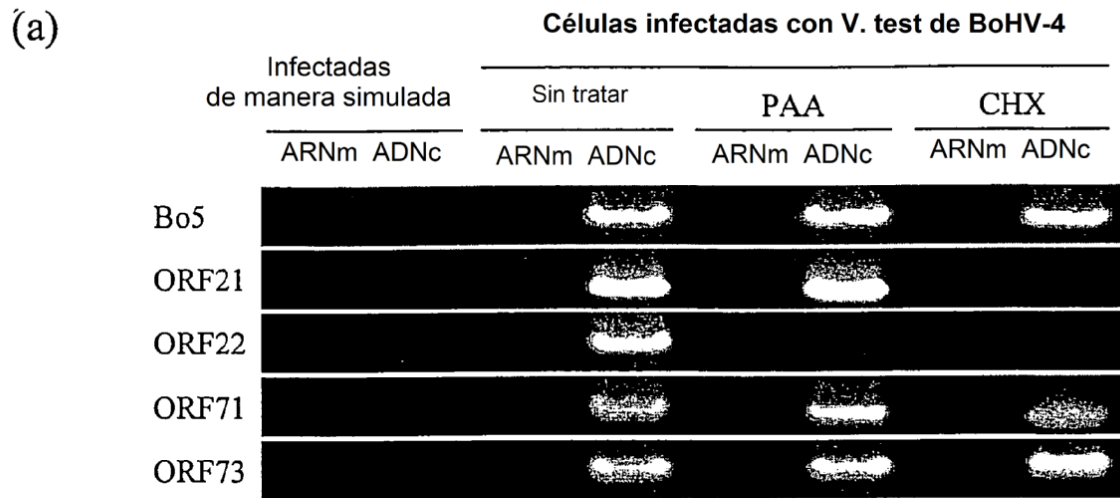


Figura 2 a y b

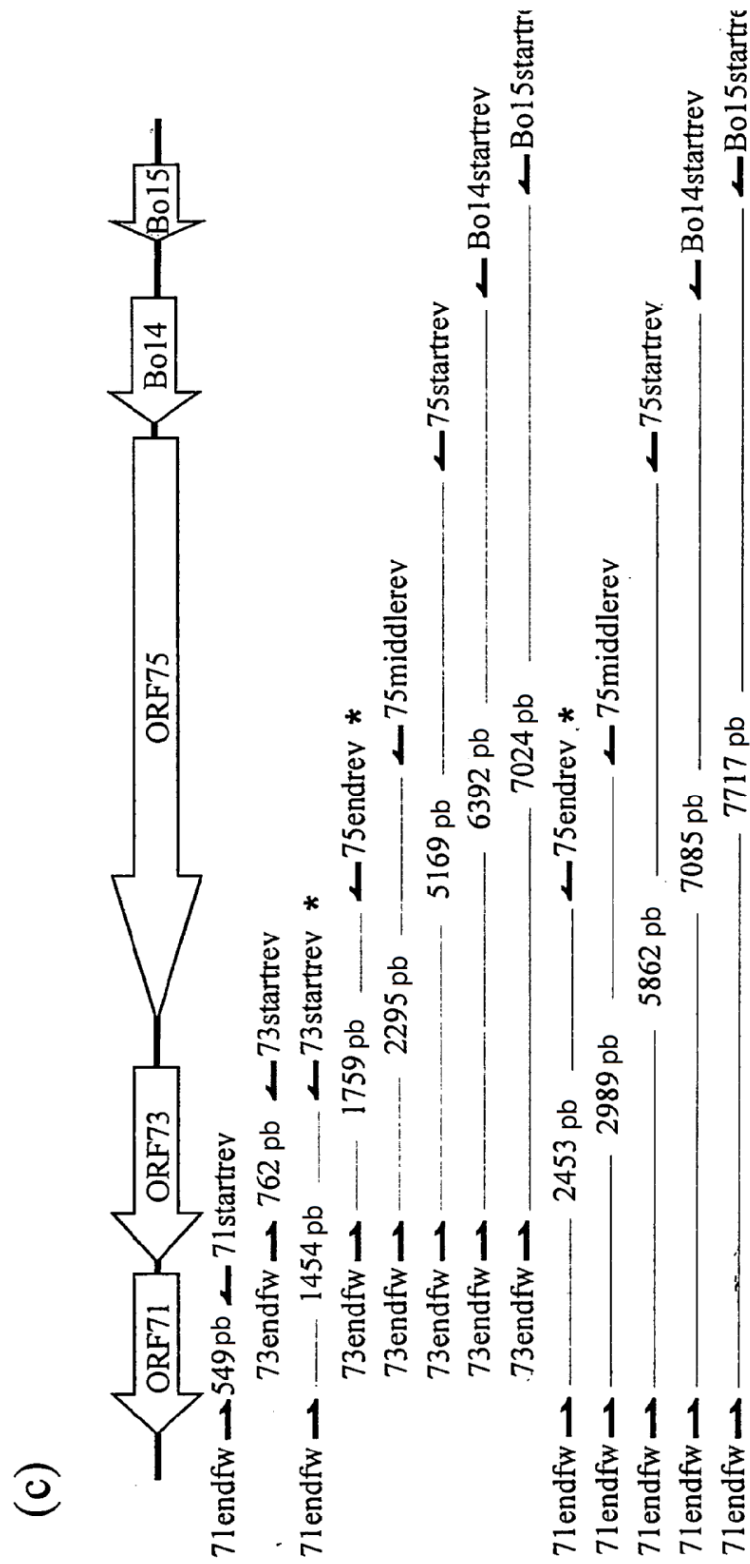


Figura 2 c

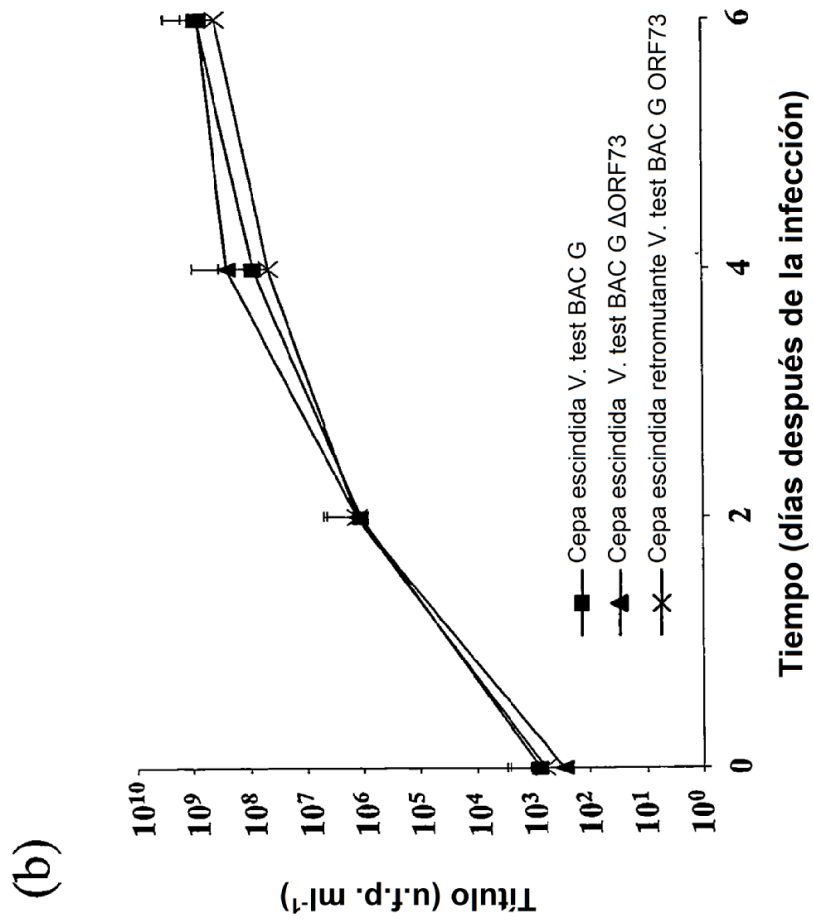


Figura 4 b

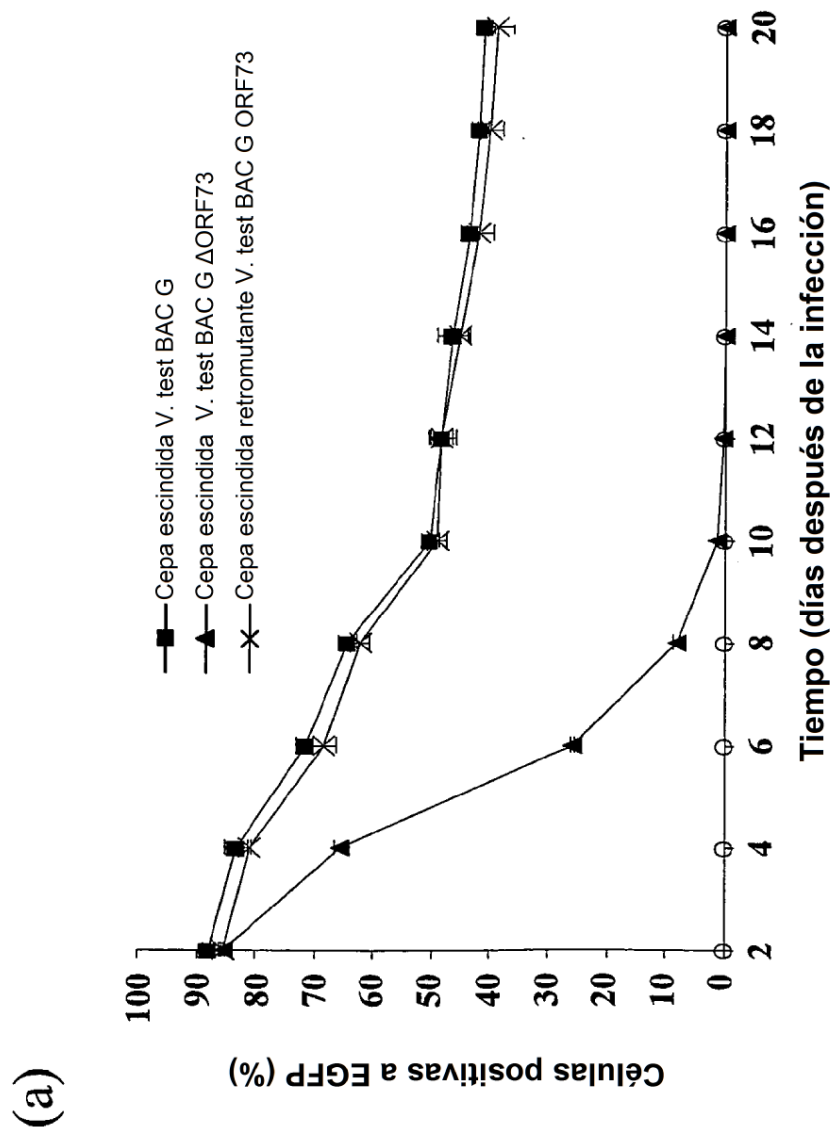


Figura 5 a

(b)

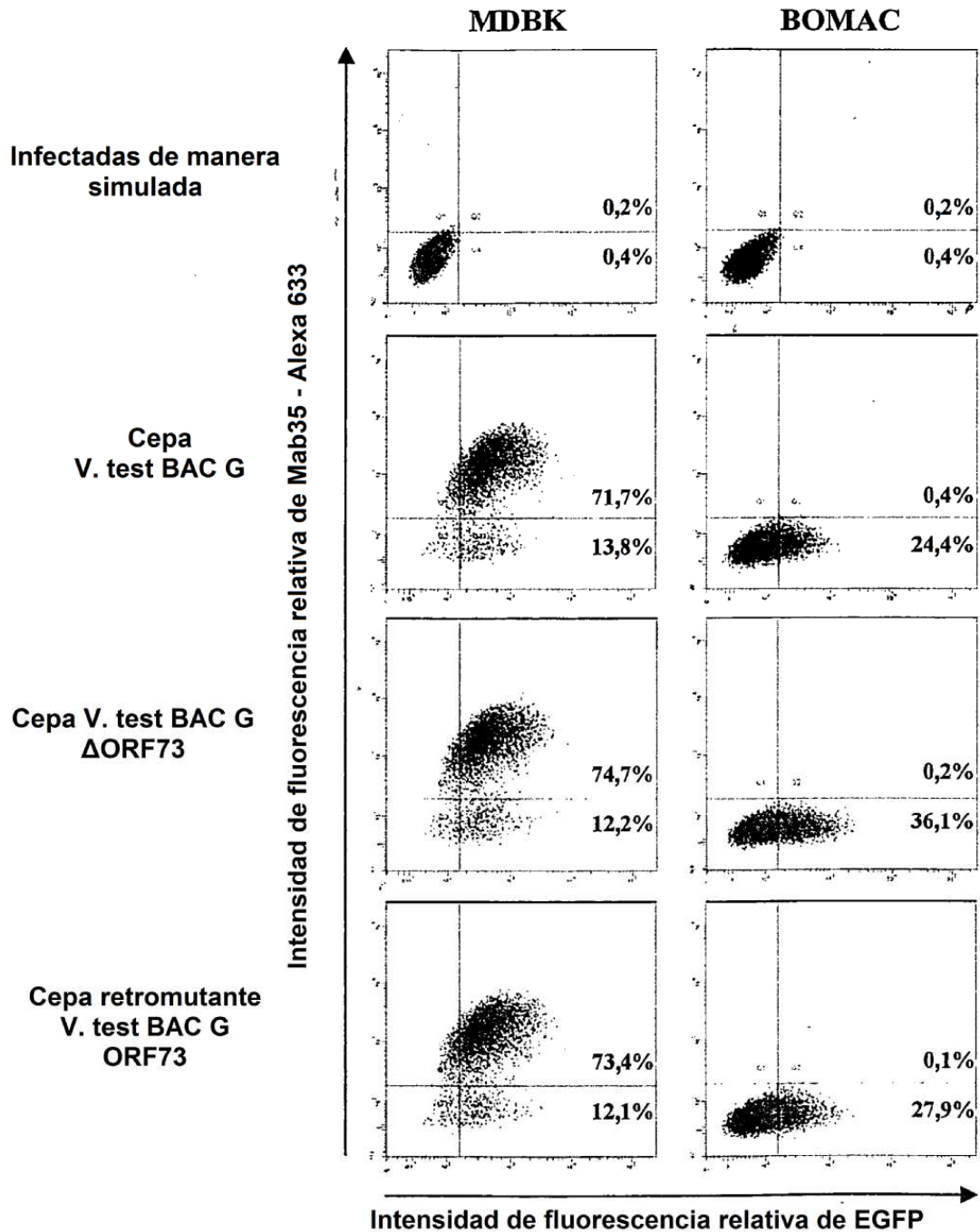
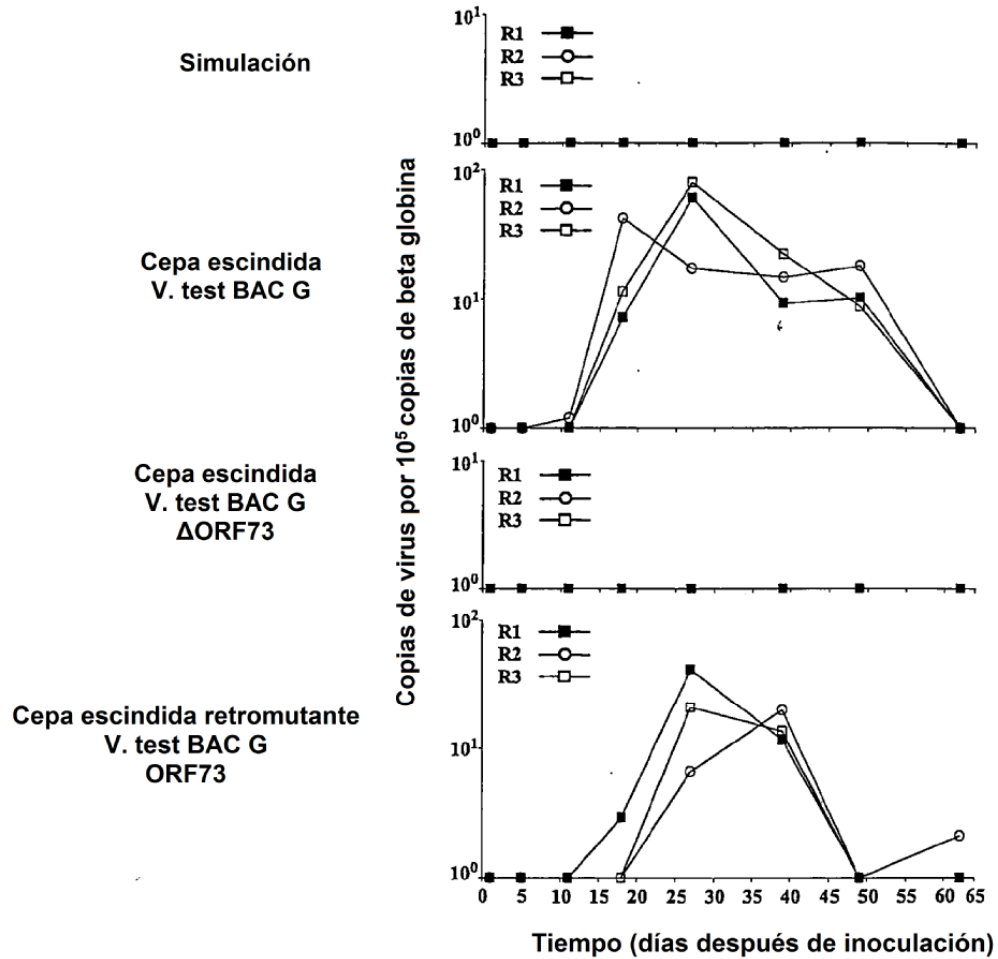


Figura 5 b

(a) PBMC a lo largo del tiempo



Bazo 64 días después de la inoculación

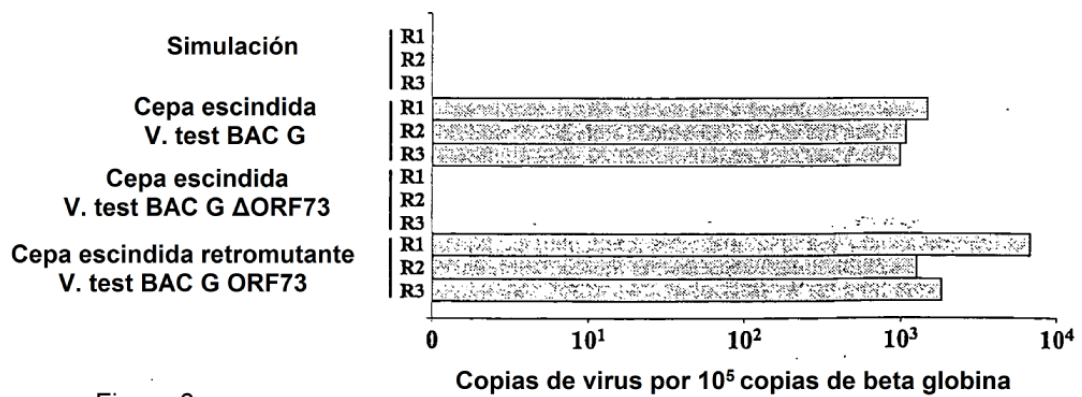


Figura 6 a

(b)

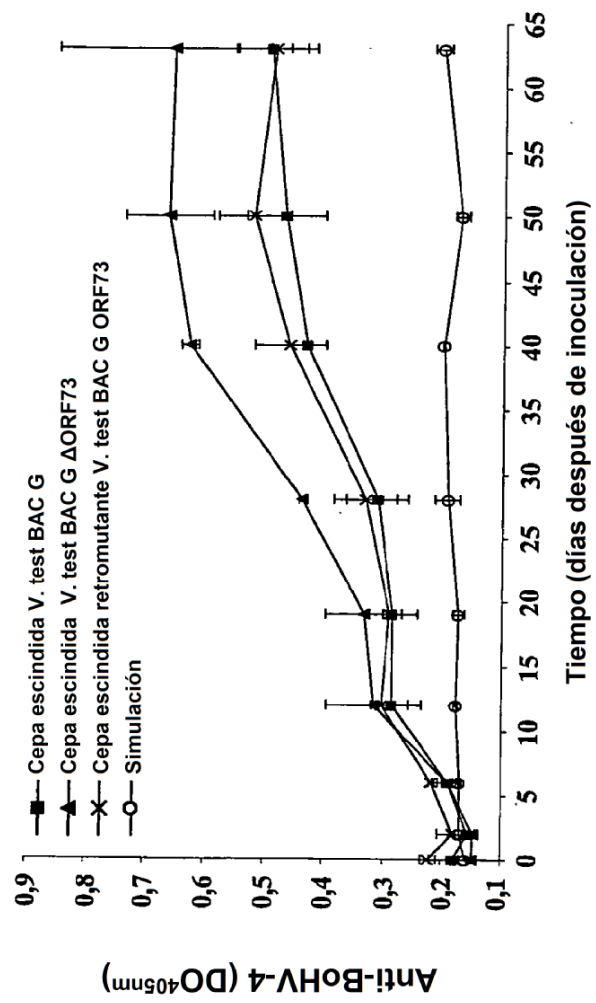


Figura 6 b