

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 828**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/17 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2014 PCT/EP2014/068964**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15032910**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2014 E 14759200 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3041939**

54 Título: **Virus de la enfermedad de Marek recombinantes y usos de los mismos**

30 Prioridad:

06.09.2013 EP 13183393

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2019

73 Titular/es:

**CEVA SANTÉ ANIMALE (100.0%)
 10 Avenue de La Ballastière
 33500 Libourne, FR**

72 Inventor/es:

**ESAKI, MOTOYUKI;
 SAITOH, SHUJI y
 SATO, TAKANORI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 732 828 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

Virus de la enfermedad de Marek recombinantes y usos de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a virus recombinantes y a los usos de los mismos. Más particularmente, la invención se refiere a virus de la enfermedad de Marek recombinantes innovadores que codifican polipéptido(s) de interés, y a su uso para expresar o entregar polipéptidos de este tipo a animales, particularmente, a aves de corral. La invención es particularmente adecuada para vacunar a aves de corral contra patógenos aviares.

Antecedentes de la invención

10 La carne y los huevos de aves de corral son fuentes importantes de alimentos, cuyo consumo aumenta de manera continua debido al crecimiento de la población humana y a su gran relación calidad-precio. La reciente epidemia de gripe aviar centró la opinión pública en la salud de las aves de corral al igual que en la seguridad y la inocuidad alimentarias. La tecnología de vacunación de aves de corral se convirtió en una preocupación mundial.

15 Los virus recombinantes que expresan proteínas de patógenos se utilizan comúnmente como vacunas para aves de corral contra patógenos diana. Las vacunas que incluyen virus de este tipo inducen la expresión de proteínas de patógenos extraños o de fragmentos de estas en células infectadas, que pueden inducir subsecuentemente una inmunidad humoral específica y protectora al igual que una inmunidad mediada por células.

20 Se conoce que diferentes virus pueden sobrevivir en el cuerpo de un animal infectado en el estado de infección latente o persistente. Por consiguiente, los virus de este tipo, en los que se ha integrado un gen extraño derivado de un patógeno, se han desarrollado para utilizarlos como vacunas de vectores virales que aumentan la duración de la inmunidad en un animal inmunizado.

Estos vectores virales (o virus recombinantes) se basan típicamente en virus avipox, tales como el de la viruela aviar (EP-A-0.517.292), virus del herpes, tales como el virus de la enfermedad de Marek de los serotipos 1, 2 y 3 (HVT) (por ejemplo, WO-A-87/04463, 5.980.906, 5.853.733) o, de manera alternativa, virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y adenovirus aviares.

25 Estos virus aviares recombinantes exhiben niveles variables de protección. Un HVT recombinante que expresa la VP2 de IBDV ha mostrado ventajas sobre las vacunas contra IBD clásicas (Vectormune® IBD). Otros vectores de HVT de interés expresan los antígenos de NDV (Vectormune® ND) o de ILTV (Vectormune® LT).

30 Uno de los problemas prácticos de los virus recombinantes basados en HVT es su interferencia cuando se utilizan varios virus en combinación para conferir inmunogenicidad contra distintos patógenos. En efecto, cuando se mezclan dos rHVT distintos que expresan diferentes antígenos, se provoca una protección menor al menos en contra de una de las enfermedades (véase, por ejemplo, Slacum G *et al.*, 2009, The compatibility of HVT recombinants with other Marek's disease vaccines, 58ª Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, EE. UU., 23-25 de marzo, p 84).

35 Por lo tanto, existe una necesidad de nuevos planteamientos para mejorar la vacunación en animales, particularmente en aves de corral, que permita protección concomitante contra varias enfermedades.

Se han desarrollado vectores de HVT multivalentes que pueden expresar dos péptidos antigénicos distintos (véase el documento PCT/EP2013/056839).

40 La presente invención describe virus recombinantes innovadores adecuados para inducir una protección inmune fuerte en animales y que puede, además, utilizarse en combinación con otras vacunas virales para conseguir una inmunidad prolongada.

Compendio de la invención

45 La presente invención se refiere a virus de la enfermedad de Marek recombinantes ("MDV") que pueden codificar uno o más polipéptidos de interés. Más específicamente, la invención se refiere a virus de MDV mejorados que comprenden un promotor derivado de beta-actina y que, sorprendentemente, muestran que, en el contexto de estos virus, los constructos de este tipo permiten una expresión sumamente mejorada y una inducción de inmunidad protectora fuerte. La invención muestra además que los virus de este tipo son compatibles para su uso combinado con distintos virus del herpes aviar, para inducir una respuesta inmune mejorada contra distintos patógenos antigénicos sin una interferencia cruzada importante.

50 Por lo tanto, un objeto de la descripción reside en un virus de la enfermedad de Marek recombinante ("rMDV") que comprende una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un polipéptido de interés unido de manera operativa a un promotor derivado de un promotor de beta-actina de gallina.

- Un objeto de la invención es un virus de la enfermedad de Marek recombinante del serotipo 1 (MDV1) que comprende (1) un promotor que comprende una secuencia de núcleo de un promotor de beta-actina de gallina que consiste en el SEQ ID NO: 5 y (2) bajo el control de dicho promotor, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un polipéptido. La secuencia de nucleótidos recombinante se puede insertar en varias regiones del genoma viral, preferiblemente, en una región que no sea esencial para la replicación o infección viral, preferiblemente, en el gen US2. Como se discutirá, el rMDV de la invención puede comprender una o varias secuencias de nucleótidos recombinantes que codifican distintos polipéptidos de interés. Más particularmente, el polipéptido de interés es un péptido antigénico, típicamente, un péptido antigénico de un patógeno aviar. El virus de la enfermedad de Marek recombinante (rMDV) de la invención es del serotipo 1 (MDV1).
- Otro objeto de la invención reside en una composición que comprende un virus de la enfermedad de Marek recombinante como se definió anteriormente y, opcionalmente, un excipiente o vehículo veterinaria o farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante adecuado.
- Un objeto adicional de la descripción se refiere a una composición de vacuna que comprende un virus de la enfermedad de Marek recombinante como se definió anteriormente. Una vacuna de este tipo se puede utilizar, por ejemplo, para inmunizar aves, tales como aves de corral.
- Otro objeto de la invención reside en un virus o composición de la enfermedad de Marek recombinante, como se definió anteriormente, para su uso en la vacunación de un ave, preferiblemente, una gallina.
- Otro objeto de la descripción reside en un virus o composición de la enfermedad de Marek recombinante, como se definió anteriormente, para inducir o estimular una respuesta inmune en un ave, preferiblemente, una gallina.
- Otro objeto adicional de la invención es un MDV1 recombinante, como se definió anteriormente, para su uso en combinación con un virus del herpes recombinante adicional de un serotipo distinto y para expresar un antígeno distinto, en la vacunación de un ave, preferiblemente, una gallina, por medio de administración simultánea, secuencial separada o alternada.
- En otro aspecto, la descripción proporciona un método para vacunar un animal que comprende al menos una administración de una composición o virus como se definió anteriormente.
- En un aspecto adicional, la descripción proporciona un método para inducir una respuesta inmunogénica o protectora en un animal contra uno o más patógenos aviares que comprenden al menos una administración de una composición o virus como se definió anteriormente.
- Un objeto adicional de la invención es un método para producir MDV1 recombinante que comprende (I) la introducción de una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un polipéptido bajo el control de un promotor que consiste en el SEQ ID NO: 5 en una región no esencial del genoma de un MDV1, (II) opcionalmente replicar el virus y (III) opcionalmente recolectar el virus.
- Un objeto adicional de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende el genoma de un MDV1 o un fragmento de este, en donde dicho genoma o fragmento comprende un gen US2 modificado por medio de inserción de una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende una secuencia que codifica un polipéptido bajo el control de un promotor que consiste en el SEQ ID NO: 5.
- La invención se refiere también a un plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente.
- Otro objeto de la invención es una célula huésped o un cultivo de dichas células que comprende una molécula de ácido nucleico o un plásmido como se definió anteriormente.
- La descripción se refiere además a un método para inmunizar un ave que comprende administrar a dicha ave una cantidad inmunizante eficaz de una vacuna o composición o virus descritos en la presente memoria.
- La descripción proporciona además un kit de vacunación para inmunizar un ave que comprende una cantidad eficaz de una vacuna descrita en la presente memoria y un medio para administrar dicha vacuna a dicha ave.
- La invención se puede utilizar para expresar un polipéptido en cualquier animal, preferiblemente, para vacunar un ave, y es adecuada para expresar cualquier polipéptido o péptido, específicamente, cualquier péptido inmunogénico de patógenos aviares.

Leyendas de las figuras

- La Figura 1 ilustra un diagrama esquemático del genoma de Rispens y la ubicación de la región clonada que incluye el sitio de inserción en el gen US2.
- La Figura 2 muestra un diagrama del genoma de Rispens/IBD recombinante, que indica las ubicaciones de la Unión 1 y Unión 2 amplificadas en reacciones PCR para confirmar las estructuras del genoma de los virus.

La Figura 3 es un ensayo de Western blot que detecta la expresión de la proteína de VP2 de IBDV por medio de los virus de Rispens/IBD recombinantes.

La Figura 4 ilustra títulos de IBDV ELISA en gallinas SPF vacunadas con Rispens/IBD recombinante utilizando un kit IBD ELISA comercial.

5 La Figura 5 ilustra títulos de IBDV ELISA en gallinas leghorn blancas comerciales vacunadas con Rispens/IBD recombinante utilizando un kit IBD ELISA comercial.

Las Figuras 6A y 6B ilustran títulos de IBDV ELISA y NDV en gallinas leghorn blancas comerciales vacunadas con Rispens/IBD recombinante y HVT/ND recombinante utilizando un kit IBD ELISA comercial y un kit ND ELISA comercial.

10 La Figura 7 ilustra la larga duración de la inmunidad a IBDV conferida por un virus recombinante de la invención.

Descripción detallada de la invención

En términos generales, la presente descripción se refiere a un rMDV que comprende una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un producto de interés colocado bajo el control transcripcional de un promotor derivado de beta-actina de gallina. La presente descripción se refiere también a composiciones que comprenden un rMDV de este tipo al igual que al uso de estas para vacunar animales, particularmente, aves de corral.

La presente descripción se entenderá mejor con referencia a las siguientes definiciones:

Definiciones

El término "virus" designa en particular una partícula viral que comprende una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un genoma) encapsulada en una cápside o cápsula. El término "virus" designa también un vector viral o un genoma viral aislado.

El término "recombinante" designa una molécula que se ha creado, diseñado o modificado utilizando tecnologías genéticas. Con relación a un virus, el término designa más específicamente un virus cuyo genoma ha sido modificado por medio de inserción de al menos un ácido nucleico heterólogo, es decir, un ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que no se encuentra de manera natural en el genoma del virus, o que se encuentra de manera natural en dicho genoma, pero en una forma diferente o en una posición diferente. Un virus recombinante se puede fabricar por medio de una variedad de métodos y, una vez hecho, se puede producir sin el uso adicional de tecnologías genéticas. Con relación a un ácido nucleico (por ejemplo, un gen), el término "recombinante" indica un constructo que no existe de manera natural o que se ha manipulado o clonado o reorganizado de modo que está, por ejemplo, flanqueado por secuencias que no flanquean de manera natural dicha secuencia.

En la presente descripción, las expresiones "ácido nucleico" o "secuencia de nucleótidos" se usan indistintamente y se refieren a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia determinada, que puede ser desoxirribonucleótido (ADN) y/o ribonucleótido (ARN). La secuencia de nucleótidos se puede preparar primero por medio de, por ejemplo, técnicas recombinantes, enzimáticas y/o químicas, y replicarse subsecuentemente en una célula huésped o en un sistema *in vitro*. Preferencialmente, una secuencia de nucleótidos comprende un marco de lectura abierto que codifica un producto de interés, tal como un polipéptido (por ejemplo, un péptido, proteína, etc.) o un ARN. La secuencia de nucleótidos puede contener secuencias adicionales tales como un terminador de transcripción, un péptido señal, un IRES, un intrón, etc.

La expresión "región no traducida", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una región de nucleótidos que no tiene ORF y que no define una secuencia de aminoácidos de la proteína que se va a expresar en la traducción, o una región de nucleótidos en la que el ORF no está implicado en ninguna transcripción, traducción o expresión de proteínas.

Se pretende que la expresión "especie aviar" abarque todos los tipos de aves tales como pájaros de la clase de Aves, es decir, animales vertebrados que tienen plumas, alas, son bípedos, endotérmicos y ponen huevos. En el contexto de la invención, las aves o especies de aves se refieren más particularmente a pájaros de interés económicos y/o agronómicos, tales como aves de corral, (como gallinas y pavos), aves acuáticas (como patos y gansos) y aves ornamentales (como cisnes y psitaciformes).

El término "vacuna", tal como se utiliza en la presente memoria, designa un agente que se puede utilizar para provocar, estimular o amplificar una respuesta inmune en un organismo.

Un "producto de interés" incluye, sin limitación, un polipéptido (por ejemplo, un péptido, una proteína, etc.) al igual que un ARN (por ejemplo, un ARN antisentido, un ARN de interferencia, un aptámero, etc.).

Una "respuesta inmune" designa el desarrollo en un huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpo a una composición o vacuna de interés. Normalmente, una "respuesta inmune" incluye la producción de anticuerpos, células B, células T cooperadoras y/o células T citotóxicas, dirigidos específicamente a un antígeno o

antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, la respuesta inmune es protectora de modo que la resistencia a una nueva infección se mejorará y/o la gravedad clínica de la enfermedad se reducirá.

Virus de la enfermedad de Marek

5 Los virus de la enfermedad de Marek son virus del herpes aviar. Se han documentado varios serotipos de MDV en la técnica, particularmente, el serotipo 1 de la enfermedad de Marek, tal como la cepa CVI988/Rispens, y el serotipo 2 de la enfermedad de Marek, tal como la cepa SB1. Los virus de la enfermedad de Marek preferidos de la invención derivan de serotipos o cepas que no son patogénicos para la especie animal diana (por ejemplo, aviar). El MDV más preferido de la invención es un MDV recombinante del serotipo 1.

10 Los MDV se describen en publicaciones (véase, por ejemplo, Kingham *et al.* "The genome of herpesvirus of turkeys: comparative analysis with Marek's disease viruses" - Journal of General Virology (2001) 82, 1123-1135) y generalmente están disponibles de colecciones. La secuencia del genoma de MDV está disponible también en bibliotecas de genes (N.º de acceso GenBank DQ530348 y AF291866).

15 La descripción se refiere a cualquier producto de rMDV o composición en donde una secuencia de nucleótidos recombinante se une de manera operativa a un promotor derivado de beta-actina. Por consiguiente, los autores de la invención han mostrado que los constructos de este tipo permiten una expresión e inducción sumamente mejoradas de inmunidad protectora fuerte. La invención muestra además que los virus de este tipo son compatibles para su uso combinado con distintos virus del herpes aviar, para inducir una respuesta inmune mejorada contra distintos patógenos antigénicos sin una interferencia cruzada importante. Como se demuestra en los ejemplos, los autores de la invención han descubierto sorprendentemente que, en el contexto de un rMDV, este promotor provoca una expresión mayor y más duradera de un polipéptido, y que una expresión de este tipo no se altera por la coadministración de un vector distinto del virus del herpes aviar, permitiendo así una inmunización concomitante contra varios antígenos distintos.

Promotor de beta actina

25 La secuencia del promotor de beta actina de gallina se ha documentado en la técnica y está disponible en bibliotecas de genes públicas. Una secuencia ilustrativa se representa en el SEQ ID NO: 12.

30 Un promotor "derivado" de un promotor de beta actina de gallina es un promotor que comprende una secuencia de un fragmento funcional de un promotor de beta actina de gallina, preferiblemente, una secuencia de un fragmento transcripcionalmente activo de un promotor de beta actina de pollo. El promotor puede comprender además residuos o dominios funcionales adicionales, que pueden ser artificiales y/u obtenidos de distinto(s) promotor(es). Un promotor derivado de un promotor de beta actina de gallina comprende típicamente al menos 50 nucleótidos consecutivos de la secuencia de dicho promotor de beta actina de gallina, o una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con esta, preferiblemente, al menos un 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con esta, y que exhibe actividad transcripcional tanto sola como cuando se combina con un dominio adicional.

35 La secuencia del promotor de beta actina de gallina para su uso en la presente descripción es más preferiblemente una secuencia que comprende al menos una secuencia de núcleo de un promotor de beta actina de gallina. Típicamente, la secuencia de núcleo se ubica en la región entre los nucleótidos -1200 a -900 del promotor nativo, incluso más preferiblemente entre los nucleótidos -1192 y -922. Un ejemplo específico de una secuencia de núcleo de un promotor de beta actina de gallina se presenta en el SEQ ID NO: 5:

```
TATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGG
CGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCC
GAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGC
GGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCCCGCCTCGCGCCGCC
GCCCGGCTCTGACTGACCGCGT
```

40 En una realización particular, el promotor utilizado en la presente memoria contiene una secuencia de núcleo de un promotor de beta actina de gallina que comprende (I) el SEQ ID NO: 5 o (II) una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 5, preferiblemente, al menos un 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 5, y que exhibe actividad del promotor transcripcional.

45 En una realización particular, la descripción se refiere a un rMDV que comprende un ácido nucleico unido de manera operativa a un promotor que comprende el SEQ ID NO: 12.

En otra realización particular, la descripción se refiere a un rMDV que comprende un ácido nucleico unido de manera operativa a un promotor que comprende el SEQ ID NO: 5.

Polipéptido de interés

El rMDV de la invención se puede utilizar para entregar y/o expresar cualquier polipéptido de interés tal como polipéptidos biológicamente activos o polipéptidos inmunogénicos (es decir, antigénicos). En una realización preferida, el polipéptido de interés es un polipéptido antigénico, incluso más preferiblemente, un péptido o un polipéptido derivado de un antígeno de un organismo patógeno capaz de provocar una infección en un animal, particularmente, en un ave. Los ejemplos de patógenos que provocan infección en aves incluyen virus, bacterias, hongos, protozoos, etc. Preferiblemente, el (poli)péptido inmunogénico puede ser (derivar de) una proteína de superficie, una proteína secretada, o una proteína estructural de dicho patógeno, o fragmentos de estos. El polipéptido puede derivar de cualquier fuente, por ejemplo, viral, procariota, eucariota o sintética.

En una realización preferida, el ácido nucleico codifica un péptido antigénico de un agente patogénico de pájaro.

Los ejemplos específicos de agentes patogénicos incluyen, sin limitación, virus de la gripe aviar, paramixovirus aviar tipo 1, también denominado virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), metapneumovirus aviar, virus de la enfermedad de Marek, virus de la enfermedad de Gumboro, también denominado virus de la bursitis infecciosa (IBDV), virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV), virus de la bronquitis infecciosa (IBV), *Escherichia coli*, especie de *Salmonella*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, microorganismos micoplasmas que infectan especies aviares y coccidias.

Preferencialmente, el polipéptido inmunogénico se selecciona de entre la proteína F de NDV, la proteína VP2 de IBDV, la proteína gB de ILTV, la proteína 40K de *Mycoplasma galisepticum* y la proteína de superficie hemaglutinina (HA) del virus de la gripe aviar, o fragmentos inmunogénicos de estas.

En el contexto de la invención, el término "fragmento" de una proteína designa preferiblemente un fragmento que comprende al menos 5 residuos de aminoácido consecutivos de dicha proteína, incluso más preferiblemente de entre 5 a 100. En una realización preferida, un fragmento de este tipo comprende al menos un epítipo y/o es inmunogénico *in vivo*, es decir, puede provocar una producción de anticuerpos que se unan a la proteína de longitud completa.

Los ejemplos específicos de péptidos inmunogénicos incluyen, por ejemplo, un péptido que comprende los residuos de aminoácido 1-453 de una VP2 entera.

Construcción del virus

Las personas con experiencia ordinaria en la técnica conocen la clonación de genes y la construcción de plásmidos, y estas se pueden realizar fundamentalmente por medio de técnicas de biología molecular estándar (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU., 2012).

Como se indicó anteriormente, los rMDV de la invención comprenden una secuencia recombinante clonada típicamente en una región no esencial del genoma viral. La clonación se puede conseguir por medio de técnicas conocidas de por sí en la técnica. Típicamente, los virus recombinantes se pueden preparar por medio de recombinación homóloga entre el genoma viral y un constructo (por ejemplo, un plásmido) que comprende el ácido nucleico que se va a insertar, flanqueado por nucleótidos del sitio de inserción para permitir la recombinación. La clonación se puede hacer con o sin delección de secuencias endógenas. En una realización particular, la secuencia recombinante se clona en sustitución de al menos parte de una secuencia del genoma, tal como al menos 50 nucleótidos o más. Una delección de este tipo, por ejemplo, aumenta la capacidad de clonación del vector.

Con este fin, una secuencia que contiene la región diana, típicamente, se clona primero en un vector adecuado. Según la invención, una región diana de este tipo es preferiblemente una región no esencial para la replicación del virus o infección, tal como una región no codificante (o no traducida), o un gen no esencial. Un ejemplo preferido de una región de este tipo es el gen US2. Los ejemplos de vectores incluyen plásmidos, tales como pBR322, pBR325, pBR327, pBR328, pUC18, pUC19, pUC7, pUC8 o pUC9; fagos tales como fago lambda y fago M13; o cósmidos tales como pHCT9.

La secuencia de la región diana se integra en el vector según un método de clonación convencional. La secuencia de la región diana utilizada tiene preferiblemente una longitud suficiente de modo que permita una recombinación homóloga *in vivo* subsecuente con el genoma viral. Preferiblemente, la secuencia de la región diana clonada tendrá al menos aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, típicamente, por encima de 300, tal como entre 1000 y 2000 nucleótidos.

Las secuencias codificantes y promotoras, para inserción en el virus, se insertan en la región diana del genoma viral clonado en el vector. La inserción se hará preferiblemente de manera que deje una porción de la secuencia de la región diana a cada lado del inserto clonado de una longitud suficiente que permita la recombinación homóloga (por ejemplo, de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente, de al menos 100 nucleótidos). Las secuencias codificantes y promotoras se pueden introducir en la región diana clonada por medio de procedimientos de enzimas de restricción y de unión clásicos. Si es apropiado, la(s) mutación (mutaciones) se pueden llevar a cabo en un sitio específico de la región diana para crear un nuevo sitio de escisión para una enzima de restricción. Las técnicas de mutagénesis convencionales conocidas por un experto en la técnica se pueden utilizar con este fin, tales como, por ejemplo,

mutagénesis *in vitro* o PCR.

5 Los vectores en los que la secuencia codificante y promotora se ha insertado en la región diana obtenida como anteriormente se pueden introducir en una célula infectada con MDV o células transfectadas con genoma de MDV utilizando técnicas conocidas tales como electroporación, fosfato de calcio, método basado en lipofectina, o similares. Los virus recombinantes se producen así por medio de recombinación en dichas células entre las regiones homólogas de MDV-ADN y del vector. Cuando la cantidad del vector se encuentra en el intervalo de entre 0,1 a 1000 µg, la eficacia de la generación de virus recombinantes se optimiza particularmente.

10 Los virus recombinantes resultantes se pueden seleccionar genotípica o fenotípicamente utilizando técnicas conocidas de selección, por ejemplo, por medio de hibridación, detección de la actividad de una enzima codificada por un gen integrado junto con las secuencias de ácidos nucleicos recombinantes o detección del péptido antigénico expresado inmunológicamente por medio del virus recombinante. El virus recombinante seleccionado se puede cultivar a gran escala en cultivo celular, después de lo cual, se recolecta el virus recombinante que contiene polipéptidos}.

rMDV preferidos

15 Los rMDV preferidos de la invención comprenden al menos un ácido nucleico recombinante insertado en el gen US2, más preferiblemente, en sustitución de al menos parte del gen US2, incluso más preferiblemente, entre los nucleótidos 248° y 494° del codón de inicio.

Los rMDV de la presente invención se basan en el serotipo 1 de MDV.

20 Asimismo, los rMDV preferidos de la invención codifican un péptido antigénico seleccionado de entre la proteína F de NDV, la proteína VP2 de IBDV, la proteína gB de ILTV, la proteína 40K de *Mycoplasma galisepticum* y la proteína de superficie HA del virus de la gripe aviar, o fragmentos de estas.

Según una realización particular, la descripción se refiere a un MDV1 recombinante que comprende, insertada en el gen US2, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína VP2 de IBDV, o un fragmento de esta, bajo el control de un promotor que comprende una secuencia de núcleo del promotor de beta actina de gallina.

25 Ejemplos específicos de rMDV de este tipo de la invención incluyen RR013, RR030 y RR031.

En RR013, la secuencia peptídica del antígeno se ubica bajo el control de un promotor Bac del SEQ ID NO: 12, insertado en el gen US2 de MDV1.

En RR030 y RR031, la secuencia peptídica del antígeno se ubica bajo el control de un promotor Coa5 del SEQ ID NO: 5, insertado en el gen US2 de MDV1.

30 Cultivos celulares

Los virus recombinantes de la presente invención se pueden propagar en cualquier cultivo celular competente. Después de que se consigue el crecimiento requerido de los virus, las células se pueden separar de los pocillos utilizando una cuchilla o con tripsina, y las células infectadas se pueden separar del sobrenadante por medio de centrifugación.

35 Los ejemplos de células competentes incluyen CEF, huevo embrionado, célula hepática de gallina y similares. Las células y virus se pueden cultivar en un medio de cultivo tal como el medio de cultivo Eagle's MEM, Leibowitz-L-15/McCoy 5A (mezcla 1:1) a aproximadamente 37 °C durante de entre 3 a 6 días. Típicamente, las células infectadas se suspenden en un medio de cultivo que contiene dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 % y se almacenan congeladas con nitrógeno líquido.

40 Composiciones y vacunas

La invención se refiere también a composiciones, tales como vacunas, que comprenden uno o más MDV recombinantes de la invención.

45 Las composiciones de la invención pueden comprender el rMDV en un vehículo o excipiente veterinaria o farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender, además o alternativamente, un adyuvante adecuado.

Los rMDV de la invención se pueden utilizar en forma viva (por ejemplo, para preparar vacunas vivas) o, alternativamente, en forma inactiva, atenuada o muerta. La producción de formas de este tipo se conoce en la técnica.

50 La vacuna según la presente invención puede comprender además un disolvente adecuado, tal como, por ejemplo, un tampón acuoso o un tampón fosfato. Preferiblemente, la vacuna también comprende aditivos. Los aditivos de la presente invención se pueden obtener a partir de cualquiera de un número de fuentes que incluyen varias proteínas

5 y péptidos derivados de animales (por ejemplo, hormonas, citocinas, factores coestimulantes), y ácidos nucleicos innovadores derivados de virus y de otras fuentes (por ejemplo, ARN de doble cadena, CpG), y los similares que se administran con la vacuna en una cantidad suficiente para potenciar la respuesta inmune. Además, cualquier número de combinaciones de las sustancias mencionadas anteriormente puede proporcionar un efecto de inmunopotenciación y, por lo tanto, puede formar un inmunopotenciador de la presente invención.

10 Las vacunas de la presente invención se pueden formular además con uno o más aditivos adicionales para mantener la isotonicidad, el pH fisiológico y la estabilidad, por ejemplo, un tampón tal como una solución salina fisiológica (0,85 %), solución salina tamponada con fosfato (PBS), tampones citrato, tris(hidroximetil) aminometano (TRIS), solución salina tamponada con Tris y similares, o un antibiótico, por ejemplo, neomicina o estreptomina, etc.

15 La vía de administración puede ser cualquier vía incluida administración oral, ocular (por ejemplo, por medio de colirio), oculonasal utilizando aerosol, intranasal, cloacal en alimentos, en agua, por medio de pulverización, *in ovo*, por vía tópica, o por medio vacunación por inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intraocular, intradérmica y/o intraperitoneal). El experto adaptará fácilmente la formulación de la composición de la vacuna para cada tipo de vía de administración.

20 Cada dosis de vacuna puede contener una dosis adecuada suficiente para obtener una respuesta inmune protectora en especies aviares. La optimización de una dosis de este tipo se conoce en la técnica. La cantidad de antígeno por dosis se puede determinar por medio de métodos conocidos utilizando reacciones antígeno/anticuerpo, por ejemplo, por medio del método ELISA.

25 Las vacunas de la invención se pueden administrar como dosis única o en dosis repetidas, dependiendo el protocolo de vacunación.

Las vacunas de la presente invención son ventajosas además en que confieren hasta un 80 % de protección a las especies de pájaros contra los patógenos aviares diana.

30 La presente descripción se refiere además al uso de la vacuna, tal como se describió anteriormente, para inmunizar especies aviares, tales como aves de corral, y al método para inmunizar especies aviares al administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna según la invención. La vacuna se puede administrar de manera ventajosa por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, oral, *in ovo*, por medio de administración mucosal o por medio de administración oculonasal.

35 La presente descripción se refiere además a kits de vacunación para inmunizar especies aviares que comprenden una cantidad eficaz de la vacuna multivalente como se describió anteriormente y un medio para administrar dichos componentes a dicha especie. Por ejemplo, un kit de este tipo comprende un dispositivo de inyección cargado con la vacuna según la invención e instrucciones para inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular o *in ovo*. De manera alternativa, el kit comprende un pulverizador/aerosol o dispositivo de colirio cargado con la vacuna según la invención e instrucciones para administración oculonasal, oral o mucosal.

Otros aspectos y ventajas de la invención se describirán en la siguiente sección de experimentos, que es ilustrativa de la invención reivindicada.

Ejemplos

40 En los experimentos, se han producido y utilizado varios virus recombinantes, que se diseñan como sigue (virus/sitio de inserción/genes insertados):

RR013: Rispens/US2/Bac-VP2stc

RR024: Rispens/US2/RSV-VP2stc

RR025: Rispens/US2/SV40-VP2stc

RR030: Rispens/US2/Coa5-VP2stc

RR031: Rispens/US2/Coa5-VP2stc2

45 FW023 (control HVT/IBD recombinante): HVT/UL45-46/Bac-VP2stc

FW029 (control HVT/ND recombinante): HVT/UL45-46/Pec-F

Ejemplo 1: Construcción de vectores homólogos

50 La construcción del plásmido se realizó fundamentalmente por medio de las técnicas de biología molecular estándar (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU., 2012).

Construcción de pRisUS2Sfi

Un fragmento de ADN 2,2-kb del genoma de Rispens que flanqueaba el sitio de inserción pretendido (en el gen US2) se clonó por medio de reacciones PCR, eliminando una porción (0,2-kb) del gen US2 y añadiendo un sitio de reconocimiento de SfiI en el sitio de inserción (Figura 1). En síntesis, utilizando ADN extraído de Rispens como plantilla, se llevaron a cabo dos reacciones PCR. Los pares de cebadores utilizados son los SEQ. NO. 1 (5'-AAACGAATTCGAAGCTTGCATGCCCGCTAAGGAC -3') y el SEQ. NO. 2 (5'-GCCACCAGATGGAAGTGGGGCCAATAAGGCCGGTATGCCGTGGGCC -3'), y el SEQ. NO. 3 (5'-GGCCACGGCATAACCGCCTTATTGGCCCCAGTTCCA TCTGGTGGC -3') y el SEQ. NO. 4 (5'-GATTACGAATTCGCCCTTTTACATGCTGCCCAA -3'). Se llevó a cabo otra reacción PCR utilizando una mezcla de productos de PCR de las dos reacciones PCR previas como plantilla y el SEQ. NO. 1 y el SEQ. NO. 4 como cebadores. Se clonó un fragmento de PCR obtenido en el vector pUC18 (N.º de acceso GenBank L09136) después de digestión con EcoRI y HindIII, lo que dio lugar a pRisUS2Sfi.

Construcción de los vectores homólogos

Utilizando el plásmido pRisUS2Sfi, se construyeron varios vectores homólogos que contenían un promotor y el gen VP2 de IBDV de una cepa de exposición estándar (VP2-STC). Estos vectores homólogos se utilizaron para construir Rispens/IBD recombinante (RR013, RR024, RR025, RR030 y RR031). Primero, pRisUS2Sfi se escindió con SfiI y se desfosforiló con fosfatasa alcalina *Shewanella* sp. S1B1 recombinante (PAP) (Funakoshi N.º DE110). El casete VP2-STC del promotor Bac se obtuvo por medio de digestión con BglI de p45/46bacVP2-STC#11 (Patente estadounidense n.º 6.764.684) y se insertó en el pRisUS2Sfi digerido con SfiI, lo que dio lugar a pRisUS2bacVP2stc. Este plásmido, pRisUS2bacVP2stc, se utilizó para construir un Rispens/IBD recombinante, RR013. Se construyeron también plásmidos homólogos que contenían una secuencia de núcleo parcial (SEQ No. 5) del promotor Bac (promotor Coa5). El promotor Coa5 se obtuvo del plásmido pGICOA (Patente estadounidense n.º 6.866.852) por medio de digestión con BglI y XbaI, y se ligó con un fragmento XbaI-EcoRI (6.3-kb) y un fragmento EcoRI-BglI (0,1-kb) de p45/46bacVP2-STC#11, lo que dio lugar a p45/46COA5VP2-STC#11. El casete VP2-STC del promotor Coa5 se cortó entonces de p45/46COA5VP2-STC#11 por medio de digestión con BglI y se ligó con el pRisUS2Sfi digerido con SfiI, lo que dio lugar a pRisUS2Coa5VP2stc. Este plásmido, pRisUS2Coa5VP2stc, se utilizó para construir RR030. Otro vector homólogo con el promotor Coa5 se construyó con una secuencia diferente entre el promotor Coa5 y el gen VP2-STC. Después de PCR utilizando pRisUS2Coa5VP2stc como plantilla y el SEQ No. 6 (5'-GTGGGGACCCGAGGATTTG -3') y el SEQ No. 7 (5'-GCGTCTAGA GGATCGATCCACCGTGCACCACCATGACAAACCTGCAAGATCA -3') como cebadores, un fragmento de ADN obtenido se digirió con XbaI y Sall, y se insertó entonces en un fragmento XbaI-Sall (5.2-kb) de pRisUS2Coa5VP2stc. El plásmido resultante, pRisUS2Coa5VP2stc2, se utilizó para hacer RR031. Un casete VP2-STC del promotor RSV y un casete VP2-STC del promotor SV40 se obtuvieron por medio de digestión de p44-45d46RsvVP2 y p44-45d46SV40VP2 (Documento EP 12305390), respectivamente, con BglI. Estos fragmentos se ligaron con el pRisUS2Sfi digerido con SfiI, lo que dio lugar a pRisUS2RSVVP2stc y pRisUS2SV40VP2stc. Estos plásmidos se utilizaron para construir RR024 y RR025, respectivamente.

Ejemplo 2: Construcción de Rispens recombinante

La construcción de Rispens recombinante se llevó a cabo por medio de recombinación homóloga tanto en células cultivadas como en *E. coli*. Para la recombinación homóloga en células cultivadas, se preparó ADN viral del virus de Rispens de tipo salvaje como describieron *Morgan et al.* (Avian Diseases, 34:345-351, 1990). Aproximadamente 2 µg de ADN de Rispens y 1 µg de uno de los vectores homólogos se transfectaron en aproximadamente 10⁷ células CEF por medio de electroporación utilizando Nucleofector II (Lonza, Basilea, Suiza). Se añadieron las células transfectadas a medio Leibovitz's L-15 (Life Technologies Corp., n.º de Cat. 41300-39), McCoy's 5A (Life Technologies Corp., n.º de Cat. 21500-061) (1:1) y suero de ternero al 4 % [LM (+) medio], se fijaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos y, entonces, se incubaron a 37 °C en CO₂ al 4-5 % durante de entre 5 a 7 días hasta que las placas de Rispens fueron visibles. Entonces, se separaron las células de las placas por medio de tripsinización, se transfirieron por igual a dos placas de 96 pocillos con CEF y se incubaron durante de entre 4 a 6 días hasta que se observaron las placas. Se llevó a cabo un cribado por medio de ensayo de placas negras, tiñendo solo las placas que expresan la proteína VP2 de IBDV. En síntesis, una de las dos placas se fijó con la mezcla etanol:acetona (1:2) y se incubó con anticuerpo monoclonal anti-IBDV VP2 R63 (ATCC n.º: HB-9490). Después, se incubó con anticuerpo IgG anti-ratón biotinilado (Vector Laboratories, n.º de Cat. BA-9200) y, entonces, con el kit VECTASTAIN ABC-AP (Vector Laboratories, n.º de Cat. AK-5000), las placas que expresaban proteína VP2 se tiñeron por medio de adición de disolución NBT/BCIP (Roche Applied Science, n.º de Cat 1681451). Los pocillos que contenían las placas recombinantes teñidas se identificaron y las células de los correspondientes pocillos se tripsinizaron en otra placa de 96 pocillos. Entonces, las células se diluyeron en células CEF secundarias frescas y se transfirieron a placas de 96 pocillos para completar la primera ronda de purificación. El procedimiento de purificación se repitió hasta que todas las placas se tiñeron positivamente en el ensayo de placas negras. Para la recombinación homóloga en *E. coli*, la cepa de *E. coli* DH10B que portaba el genoma de Rispens como cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y el plásmido pKD46 (GenBank n.º de acceso AY048746) se transfectaron con 1 µg de uno de los vectores homólogos después de inducción de enzimas de recombinación por medio de adición de 10 mM de L-arabinosa. La transfección se llevó a cabo por medio de electroporación utilizando Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories) a 1,75 kV, 25 µF y

200 ohm. Después de la transfección, la *E. coli* se fijó en placas de agar Luria-Bertani (LB) y se incubó durante la noche a 37 °C. Los clones de *E. coli* que portaban un inserto apropiado que contenía el gen VP2 se identificaron por medio de PCR utilizando un par de cebadores que amplificaban una región entre el gen VP2 y la región del sitio de inserción del genoma de Rispens. Los cebadores eran SEQ. NO. 6 y SEQ NO. 8 (5'- TGAACACTACACAAA ATTGATACTGA -3'). El ADN BAC de Rispens se extrajo de los clones que contenían el inserto y se transfectaron en CEF utilizando Nucleofector II (Lonza). El CEF transfectado se fijó en placas de 96 pocillos y se incubó a 37 °C en CO₂ al 4-5 % durante de entre 5 a 7 días hasta que las placas de Rispens fueron visibles. Las placas que expresaban la proteína VP2 se purificaron como se describió anteriormente.

Ejemplo 3: Verificación de la estructura del genoma

Las estructuras del genoma del Rispens/IBD recombinante se verificaron por medio de dos reacciones PCR que amplificaban las regiones de unión (Unión 1 y Unión 2) en cada extremo de los genes insertados. La Figura 2 muestra dónde se ubican la Unión 1 y Unión 2 en el genoma del virus recombinante. Los pares de cebadores utilizados en las reacciones PCR son SEQ NO. 9 (5'-GAGGCGGACGTAAATGGAGA -3') y SEQ NO. 8 para la Unión 1 y SEQ NO. 10 (5'- GCCAGGGAATCCAGGGAAAAAGAC -3') y SEQ NO. 11 (5'-TATGAGCGGCAGTTATCGTGT -3') para la Unión 2. Los tamaños esperados de los productos de PCR se observaron con todos los Rispens recombinantes, lo que confirma que estos Rispens recombinantes tienen las estructuras del genoma esperadas.

Ejemplo 4: Expresión de un antígeno insertado por medio de Rispens recombinante

La expresión de la proteína VP2 por medio del Rispens/IBD recombinante se confirmó por medio del ensayo de placas negras y el ensayo de Western blot. Los procedimientos para el ensayo de placas negras se describen en el Experimento 2. El Western blot se llevó a cabo utilizando células CEF infectadas con los virus recombinantes y anticuerpo monoclonal anti-IBDV VP2 R63. En síntesis, las células CEF en placas de 6 pocillos se infectaron con uno de los virus recombinantes o con la cepa de Rispens parental a una multiplicidad de infección de aproximadamente 0,1. Tres días después de la inoculación, las células se recolectaron con tripsina y se centrifugaron a 913 x g durante 5 minutos. El granulado se lavó con PBS y se volvió a suspender con 100 µl de PBS. Después de añadir el mismo volumen de 2 x SDS de tampón de muestra (130 mM de Tris-Cl (pH 6,8), SDS al 6 %, glicerol al 20 %, 2-mercaptoetanol al 10 % y azul de bromofenol al 0,01 %), la suspensión celular se hirvió durante 5 minutos. Las muestras se separaron por medio de SDS-PAGE utilizando gel de poliacrilamida al 12 % y se transfirieron a una membrana PVDF (Immobilon-P, Millipore). La membrana se secó por completo y se incubó luego con anticuerpo monoclonal R63. Después, se lavó el anticuerpo R63, anticuerpo IgG anti-ratón biotinilizado (Vector Laboratories, n.º de Cat. BA-9200) y entonces con el kit VECTASTAIN ABC-AP kit (Vector Laboratories, n.º de Cat. AK-5000). La proteína unida con el anticuerpo monoclonal R63 se visualizó por medio de adición de disolución NBT/BCIP (Roche Applied Science, n.º de Cat. 1681451). Como se muestra en la Figura 3, las bandas de proteína de 40 kilodaltons (kDa), que fueron del tamaño esperado de la proteína VP2, se observaron solo en las columnas con las células infectadas con el virus recombinante. Rispens recombinante con un promotor Bac entero o parcial, es decir, RR013, RR030 y RR031, expresó más proteína VP2 que RR024, que tiene un promotor RSV.

Ejemplo 5: Eficacia de Rispens recombinante en gallinas - El promotor de beta actina proporciona una protección sumamente superior

La eficacia de los virus de Rispens recombinantes que expresaban el gen VP2 de IBDV se evaluó contra la exposición a IBDV virulento. Estos tres virus de Rispens/IBD recombinantes (RR013, RR024 y RR025) se utilizaron, cuya expresión del antígeno es dirigida por diferentes promotores. Las gallinas leghorn blancas libres de patógenos específicos (SPF) con un día de edad se dividieron en seis grupos, y los polluelos de los Grupos 3 hasta el 5 se vacunaron por vía subcutánea con aproximadamente 3000 unidades formadoras de placas (ufp)/0,2 ml de uno de los Rispens recombinantes (Grupo 3, RR013: Grupo 4, RR024: Grupo 5, RR025). Los polluelos del Grupo 6 se vacunaron con FW023 (rHVT/IBD-STC#11: patente estadounidense n.º 6.764.684), que era un control HVT/VP2 recombinante. Los polluelos del Grupo 1 (control negativo no expuesto, no inmunizado) y los polluelos del Grupo 2 (control positivo expuesto, no inmunizado) se dejaron sin vacunar. Las gallinas se sangraron cada semana entre las 2 y 7 semanas de edad para evaluar la inmunidad humoral contra IBDV. Los anticuerpos Anti-IBDV se cuantificaron con un kit IBDV ELISA comercial (Idexx Laboratories, FlockChek IBD). A la edad de 7 semanas, todas las gallinas excepto las del Grupo 1 se expusieron con 10³ dosis infectiva de embrión media (EID₅₀) de la cepa de exposición estándar (STC) de IBDV por vía oral. Las gallinas se observaron diariamente para signos clínicos asociados con IBD, tales como depresión y muerte. Siete días después de la exposición, se realizó una autopsia a las gallinas y se observaron para lesiones bursales extremadamente observables tales como edema, decoloración, atrofia, hemorragia y exudados amarillos o gelatinosos. En la autopsia, se midió también el peso de los cuerpos y de las bolsas para calcular el índice C/B, que es la relación entre el peso de la bolsa y el peso corporal de los pájaros expuestos dividida por la misma relación de pájaros no expuestos.

La Tabla 1 resume los resultados.

Tabla 1. La protección de Rispens recombinante contra la exposición a IBDV virulento en gallinas SPF (Ensayo de eficacia 1)

Número de grupo	Grupo	N.º de gallinas	Índice C/B	N.º de muertes tras exposición	N.º con lesiones bursales / n.º total	% de protección
1	NINC	13	1,00	0	0/13	No procede
2	NICC	13	0,47	0	13/13	0 %
3	RR013	15	0,95	0	2/15	87 %
4	RR024	15	0,77	0	7/15	53 %
5	RR025	15	0,59	0	10/15	33 %
6	FW023	13	0,93	0	1/13	92 %

NINC = controles negativos no expuestos no inmunizados

NICC = controles positivos expuestos no inmunizados

RR013: Rispens/US2/Bac-VP2stc

RR024: Rispens/US2/RSV-VP2stc

RR025: Rispens/US2/SV40-VP2stc

FW023 (control HVT/IBD recombinante): HVT/UL45-46/Bac-VP2stc

5

10

15

Todas las gallinas del Grupo 2 (control positivo expuesto) desarrollaron lesiones bursales macroscópicas típicas de IBD, mientras que todas las gallinas del Grupo 1 (control negativo no expuesto) permanecieron libres de lesiones de este tipo. La protección proporcionada por RR013 (Grupo 3) fue de un 87 % (13/15) y fue equivalente a la protección del control HVT/IBD recombinante FW023 (Grupo 6). El índice C/B del Grupo 3 fue 0,95, lo que sugiere ninguna atrofia importante en la bolsa. Sorprendentemente, RR024 (Grupo 4) y RR025 (Grupo 5) solo dieron protección parcial (53 % y 33 %). Todos los grupos vacunados dieron títulos de IBD ELISA superiores que empezaron a la edad de 3 semanas (Figura 4). Los títulos en gallinas vacunadas con RR013 fueron consistentemente mayores que aquellos en las gallinas vacunadas con RR024 y RR025, que es consistente con los resultados de protección después de la exposición.

En conclusión, RR013 con un promotor Bac proporcionó una inmunidad humoral y protectora sustancialmente superior en comparación con RR024 y RR025, los cuales ambos contienen promotores no Bac.

20

Ejemplo 6: Eficacia de Rispens recombinante en gallinas - Actividad de diferentes promotores derivados de beta actina

25

30

La eficacia de RR013, RR030 y RR031, los cuales todos contienen un promotor Bac entero o parcial, se investigó en gallinas (leghorn blancas) ponedoras comerciales con anticuerpos maternos. Las gallinas con un día de edad se dividieron en seis grupos, y los polluelos de los Grupos 3 hasta el 5 se vacunaron por vía subcutánea con aproximadamente 3000 unidades formadoras de placas (ufp)/0,2 ml de uno de los Rispens recombinantes (Grupo 3, RR013: Grupo 4, RR030: Grupo 5, RR031). Los polluelos del Grupo 6 se vacunaron con FW023, que era un control HVT/VP2 recombinante. Los polluelos del Grupo 1 (control negativo no expuesto, no inmunizado) y los polluelos del Grupo 2 (control positivo expuesto, no inmunizado) se dejaron sin vacunar. Las gallinas se sangraron cada semana entre las semanas 1 y 7 de edad y se sometieron a prueba para presencia de anticuerpos anti-IBDV con un kit IBDV ELISA comercial (IDEXX IBD Ab Test: IDEXX Laboratories). La exposición se llevó a cabo dos veces a las 5 semanas de edad y a las 7 semanas de edad. La mitad de las gallinas en cada grupo se expusieron a las 5 semanas de edad y la otra mitad se expusieron a las 7 semanas de edad. Para la exposición, 10^3 EID₅₀ de la cepa IBDV STC virulenta se administraron por vía oral. Se llevó a cabo observación y evaluación después de la exposición de la misma manera que en el Ejemplo 5.

Las Tablas 2 y 3 resumen los resultados.

35

Tabla 2. La protección de Rispens recombinante contra la exposición a IBDV virulento en gallinas ponedoras comerciales con 5 semanas de edad (Ensayo de eficacia 2)

Número de grupo	Grupo	N.º de gallinas	Índice C/B	N.º de muertes tras exposición	N.º con lesiones bursales / n.º total	% de protección
1	NINC	20	1,00	0	0/20	No procede
2	NICC	22	1,08	3	22/22	0 %
3	RR013	20	1,09	0	2/20	90 %
4	RR030	22	1,08	0	1/22	95 %
5	RR031	22	1,21	0	1/22	95 %

Número de grupo	Grupo	N.º de gallinas	Índice C/B	N.º de muertes tras exposición	N.º con lesiones bursales / n.º total	% de protección
6	FW023	21	1,24	1	4/21	81 %

NINC = controles negativos no expuestos no inmunizados

NICC = controles positivos expuestos no inmunizados

RR013: Rispens/US2/Bac-VP2stc

RR030: Rispens/US2/Coa5-VP2stc

RR031: Rispens/US2/Coa5-VP2stc2

FW023 (control HVT/IBD recombinante): HVT/UL45-46/Bac-VP2stc

5

Tabla 3. La protección de Rispens recombinante contra la exposición a IBDV virulento en gallinas ponedoras comerciales con 7 semanas de edad (Ensayo de eficacia 2)

Número de grupo	Grupo	N.º de gallinas	Índice C/B	N.º de muertes tras exposición	N.º con lesiones bursales / n.º total	% de protección
1	NINC	19	1,00	0	0/20	No procede
2	NICC	19	0,55	5	19/19	0 %
3	RR013	19	0,96	0	3/19	84 %
4	RR030	22	0,96	1	2/22	91 %
5	RR031	20	0,91	0	4/20	80 %
6	FW023	21	0,97	1	4/21	81 %

10 Después de la exposición a las 5 semanas de edad, todos los grupos vacunados con Rispens recombinante que
 contenían un promotor BAC dieron una excelente protección (90 % para RR013, 95 % para RR030 y 95 % para
 RR031), mientras que todas las gallinas en el control positivo expuesto no inmunizado (Grupo 2) desarrollaron
 15 lesiones bursales macroscópicas típicas de IBD (Tabla 2). El control HVT/IBD recombinante FW023 dio una
 protección de un 81 %, que fue inferior a la de los grupos de Rispens recombinante. Todas las gallinas del Grupo 1
 (control negativo no expuesto) permanecieron libres de lesiones de este tipo. Un índice C/B alto en control positivo
 expuesto no inmunizado (Grupo 2) mientras exhibe lesiones macroscópicas típicas de IBD en la bolsa puede indicar
 20 implicación de anticuerpos derivados de manera materna remanentes, lo que provoca el retraso en el desarrollo de
 las lesiones bursales. Después de la exposición a las 7 semanas de edad, todos los grupos vacunados con Rispens
 recombinante que contenían de nuevo un promotor BAC dieron una excelente protección (84 % para RR013, 91 %
 para RR030 y 80 % para RR031), mientras que todas las gallinas en el control positivo expuesto no inmunizado
 (Grupo 2) desarrollaron lesiones macroscópicas de IBD (Tabla 3). Los índices C/B de los grupos vacunados fue
 0,91, lo que sugiere ninguna atrofia importante en la bolsa. Los resultados de IBDV ELISA muestran que después de
 25 la descomposición de los anticuerpos derivados de manera materna de entre 1 semana a 4 semanas, todos los
 grupos vacunados tuvieron títulos de IBD ELISA mayores (Figura 5). Los títulos en las gallinas vacunadas con
 RR030 y RR031 fueron mayores que aquellos en las gallinas vacunadas con FW023 entre las semanas 5 y 7 de
 edad.

En resumen, RR013, RR030 y RR031, los cuales contienen un promotor Bac entero o parcial combinado con el gen
 VP2, dieron una protección excelente en gallinas ponedoras leghorn blancas comerciales con anticuerpos maternos
 en la semana 5 y 7 de edad después de vacunación con un día de edad.

30 Ejemplo 7: La estabilidad de Rispens recombinante de la invención

En este ejemplo, se evaluó la estabilidad de RR030 y RR031 en cultivo celular (*in vitro*) y en gallinas (*in vivo*). Para
 la estabilidad *in vitro*, se pasaron los virus en fibroblastos embrionarios de gallina (CEF) 20 veces. Para la estabilidad
in vivo, se inocularon los virus en gallinas (leghorn blancas) ponedoras comerciales con un día de edad y, entonces,
 se volvieron a aislar de las gallinas vacunadas en las semanas 5 y 7 de edad inoculando linfocitos sanguíneos
 35 periféricos de las gallinas en CEF. Los virus después de los pases *in vitro* y los virus aislados de las gallinas
 vacunadas se sometieron a prueba por medio de PCR y al ensayo de placas negras utilizando anticuerpo
 monoclonal anti-IBDV VP2 R63.

El ensayo PCR detectó las bandas esperadas con todas las muestras sometidas a prueba, lo que sugiere que no
 había delección detectable o cambio en el genoma del virus. Después del ensayo con placas negras utilizando el
 40 monoclonal anti-IBDV VP2 R63, todas las placas se tiñeron de negro con todas las muestras sometidas a prueba.

Por lo tanto, RR030 y RR031 eran genética y fenotípicamente estables *in vitro* e *in vivo*.

Ejemplo 8: Duración de la inmunidad de Rispens/IBD

Para investigar la duración de la inmunidad a IBDV conferida por Rispens/IBD, se monitorizaron las gallinas vacunadas con RR030 para títulos de IBDV ELISA hasta las 41 semanas de edad. Más particularmente, las gallinas (leghorn blancas) ponedoras comerciales con un día de edad con anticuerpos maternos se vacunaron por vía subcutánea con aproximadamente 3000 ufp/0,2 ml del Rispens/IBD recombinante (RR030). Las gallinas se sangraron semanalmente entre las semanas 1 y 7 de edad y bisemanalmente a partir de entonces. Los sueros se sometieron a prueba para la presencia de anticuerpos anti-IBDV con un kit IBDV ELISA comercial (IDEXX IBD Ab Test: IDEXX Laboratories). Como se muestra en la Figura 7, después de que los anticuerpos maternos contra IBDV disminuyeron hasta las 3 semanas de edad, los títulos de ELISA empezaron a aumentar. Los títulos continuaron aumentando hasta valores S/P superiores a 2,5 hasta las 25 semanas de edad, y el mayor nivel de títulos de IBDV ELISA se mantuvo hasta las 41 semanas de edad. Este resultado demuestra que Rispens/IBD proporciona una duración excepcionalmente larga de inmunidad contra IBDV.

Ejemplo 9: Eficacia de Rispens recombinante en gallinas - Sin interferencia con un HVT distinto

En este ejemplo, se investigó la compatibilidad entre Rispens/IBD recombinante (RR030) que contenía un promotor BAC y HVT/ND recombinante (FW029) (rHVT/NDV: patente estadounidense n.º 6.866.852). Las gallinas (leghorn blancas) ponedoras comerciales con anticuerpos maternos con un día de edad se dividieron en seis grupos y se vacunaron. El Grupo 1 se vacunó por vía subcutánea con aproximadamente 3000 ufp/0,2 ml del Rispens/IBD recombinante (RR030) solo. El Grupo 2 recibió una mezcla de RR030 y de HVT/ND recombinante (FW029), ambos a 3000 ufp/0,2 ml. Un grupo de polluelos (Grupo 3) se vacunó solo con FW029. Los polluelos del Grupo 4 se vacunaron con FW023, que era un control HVT/VP2 recombinante. Los polluelos del Grupo 5 (control positivo expuesto, no inmunizado) y los del Grupo 6 (control negativo no expuesto, no inmunizado) se dejaron sin vacunar. Las gallinas se sangraron cada semana entre las semanas 2 y 7 de edad y se sometieron a prueba para presencia de anticuerpos anti-IBDV con un kit IBDV ELISA comercial (IDEXX IBD Ab Test: IDEXX Laboratories) y para presencia de anticuerpos anti-NDV con un kit NDV ELISA comercial (IDEXX NDV Ab Test: IDEXX Laboratories). La exposición tanto con IBDV virulento como con NDV virulento se llevó a cabo a las 7 semanas de edad. Todas las gallinas del Grupo 1 (RR030 solo) y del Grupo 4 (FW023 solo), y la mitad de las gallinas del Grupo 2 (RR030 + FW029) y del Grupo 5 (control positivo expuesto, no inmunizado) se expusieron a IBDV con 10³ EID₅₀ de la cepa IBDV STC virulenta por vía oral, mientras que todas las gallinas del Grupo 3 (FW029 solo) y la otra mitad de las Gallinas del Grupo 2 (RR030 + FW029) y del Grupo 5 (control positivo expuesto, no inmunizado) se expusieron a NDV con 10³ EID₅₀ de la cepa NDV Texas GB muy virulenta (neurotrópica, hipervirulenta) por medio de inyección intramuscular en la región femoral. Se llevaron a cabo observación y evaluación después de la exposición a IBDV de la misma manera que en los Ejemplos 5 y 6. Para la exposición a NDV, las gallinas se observaron diariamente durante 14 días en búsqueda de signos clínicos típicos de ND neurotrópico hipervirulento tales como depresión, síntomas neurológicos y muerte.

Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Compatibilidad entre Rispens/IBD recombinante y HVT/NDV recombinante en gallinas ponedoras comerciales (Ensayo de eficacia 3)

Número de grupo	Grupo	N.º de gallinas	Exposición a IBD		Exposición a ND	
			N.º con lesiones bursales / n.º total	% de protección	N.º con signos clínicos de ND / n.º total	% de protección
1	RR030	17	2/17	88 %	N/P	N/P
2	RR030 + FW029	33	1/16	94 %	2/17	88 %
3	FW029	17	N/P	N/P	2/16	88 %
4	FW023	16	1/16	94 %	N/P	N/P
5	NICC	31	15/15	0 %	16/16	0 %
6	NINC	15	N/P	N/P	N/P	N/P

RR030: Rispens/US2/Coa5-VP2stc

FW029 (control HVT/ND recombinante): HVT/UL45-46/Pec-F

FW023 (control HVT/IBD recombinante): HVT/UL45-46/Bac-VP2stc

NICC = controles positivos expuestos no inmunizados

NINC = controles negativos no expuestos no inmunizados

RR030 combinado con FW029 (Grupo 2) proporcionó una protección excelente contra exposiciones tanto a IBD como a ND. Después de la exposición a IBDV, RR030 combinado con FW029 (Grupo 2) proporcionó un 94 % (15/16) de protección, que fue equivalente a la protección por medio de RR030 solo (Grupo 1) con un 88 % (15/17) de protección. En el Grupo 4 vacunado con FW023, se protegió un 94 % de las gallinas. Todas las gallinas del

5 control positivo expuesto no inmunizado (Grupo 5) desarrollaron lesiones bursales macroscópicas. Después de la exposición a NDV, se observó un 88 % (15/17) de protección con el Grupo 2 (RR030 combinado con FW029), mientras que FW029 solo (14/16) proporcionó un 88 % de protección. Todas las gallinas en el grupo de control expuesto (Grupo 5) mostraron signos clínicos de ND. Los resultados de ELISA también demostraron que la inmunidad humoral desarrollada por RR030 o FW029 no aumentó cuando estos dos virus se combinaron (Figuras 6A y 6B).

En conclusión, este ejemplo demuestra una ausencia de interferencia entre Rispens/IBD recombinante que contienen un constructo Bac y HVT/ND recombinante.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CEVA SANTE ANIMALE
- 5 <120> VIRUS RECOMBINANTES Y USOS DE LOS MISMOS
<130> B1676PC00
- <160> 12
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 35
15 <212> ADN
<213> Artificial
- <220>
<223> cebador
- 20 <400> 1
aaacgaattc gaagcttgca tgccccgcta aggac 35
- <210> 2
25 <211> 46
<212> ADN
<213> Artificial
- <220>
30 <223> cebador
- <400> 2
gccaccagat ggaactgggg ccaataaggc cggatgccg tgggcc 46
- 35 <210> 3
<211> 46
<212> ADN
<213> Artificial
- <220>
40 <223> cebador
- <400> 3
45 ggcccacggc ataccggcct tattggcccc agttccatct ggtggc 46
- <210> 4
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial
- 50 <220>
<223> cebador
- <400> 4
55 gattacgaat tcgccctttt acatgctgcc ccaa 34
- <210> 5
<211> 274
<212> ADN
60 <213> Artificial
- <220>
<223> Secuencia básica del promotor de la beta-actina de gallina

<400> 5
 tattttgtgc agcgatgggg gcgggggggg ggggggcgcg cgccaggcgg ggcggggcgg 60
 ggcgaggggc ggggccccgc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcggc 120
 ctccgaaagt ttccttttat ggcgagggcg cggcggcggc ggccctataa aaagcgaagc 180
 gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc cgccgcccgc 240
 tcgcgcggcc cgccccggct ctgactgacc gcgt 274

5 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 6
 gtggggaccc gaggatttg 20

15 <210> 7
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 7
 25 gcgtctagag gatcgatcca ccggtcgcca ccatgacaaa cctgcaagat ca 52

<210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

35 <400> 8
 tgaactacac aaaattgata ctga 24

<210> 9
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

45 <400> 9
 gaggcggacg taaatggaga 20

<210> 10
 <211> 24
 50 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 55 <223> cebador

<400> 10
 gccagggaat ccaggaaaa agac 24

<210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 10 <400> 11
 tatgagcggc agttatcgtg t 21

 <210> 12
 <211> 1506
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> promotor de la beta-actina de gallina
 20
 <400> 12
 tgcagctcag tgcattgcacg ctcatctgcc atcgtatacc ctgcctctcc tgctggcget 60
 cccggggagg tgacttcaag gggaccgcag gaccacctcg ggggtggggg gagggctgca 120
 cacgcggacc ccgctcccc tcccccaaca agcactgtgg aatcaaaaag gggggagggg 180
 ggatggaggg gcgcgtcaca cccccgcccc acacctcac ctcgaggtga gccccacgtt 240
 ctgcttcaact ctccccatct cccccccctc cccaccccca attttgtatt tattttattt 300
 ttaattattt tgtgcagcga tgggggcggg gggggggggg gcgcgcgcca ggcggggcgg 360
 ggcggggcca ggggcggggc ggggcgaggc ggagaggtgc ggcggcagcc aatcagagcg 420
 gcgcgctccg aaagtttctt tttatggcga ggcggcggcg gcggcggccc tataaaaagc 480
 gaagcgcgcg gcgggcggga gtcgctgcgc gctgccttcg ccccgctgcc cgctccgccc 540
 ccgctcgcg ccgcccgcc cggctctgac tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc 600
 gggacggccc ttctcctccg ggctgtaatt agcgttggg ttaatgacgg ctcgtttctt 660
 ttctgtggct gcgtgaaagc cttaaaggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc 720
 ggctcggggg gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgctgcgg ctccgcgctg 780
 cccggcggct gtgagcgtg cgggcgcggc gcggggcttt gtgcgctccg cagtgtgcgc 840

ES 2 732 828 T3

gaggggagcg cggccggggg cggtgccccg cggtgcgggg ggggctgcga ggggaacaaa	900
ggctgcgtgc ggggtgtgtg cgtggggggg tgagcagggg gtgtgggcgc ggcggtcggg	960
ctgtaacccc cccctgcacc cccctccccg aagttgctga gcacggcccc gcttcgggtg	1020
cggggctccg tgcggggcgt ggcgcggggc tcgccgtgcc gggcgggggg tggcggcagg	1080
tgggggtgcc gggcggggcg gggccgcctc gggccgggga gggctcgggg gaggggcgcg	1140
gcggcccccg gagcgccggc ggctgtcgag gcgcggcgag ccgcagccat tgccttttat	1200
ggtaatcgtg cgagagggcg cagggacttc ctttgtccca aatctgtgcg gagccgaaat	1260
ctgggaggcg ccgccgcacc ccctctagcg ggcgcggggc gaagcgggtgc ggcgccggca	1320
ggaaggaaat gggcggggag ggccttcgtg cgtcgcgcg ccgccgtccc cttctccatc	1380
tccagcctcg gggctgtccg cagggggacg gctgccttcg ggggggacgg ggcagggcgg	1440
ggttcggctt ctggcgtgtg accggcgggg tttatatctt cccttctctg ttcctccgca	1500
gcccc	1506

REIVINDICACIONES

1. Un virus de la enfermedad de Marek recombinante del serotipo 1 (MDV1) que comprende (1) un promotor que consiste en el SEQ ID NO: 5 y (2) bajo el control de dicho promotor, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un polipéptido.
- 5 2. El MDV1 recombinante de la reivindicación 1, en donde dicho promotor y dicha secuencia de nucleótidos recombinante se insertan en una región no esencial del virus.
3. El MDV1 recombinante de la reivindicación 2, en donde la región no esencial del virus es el gen US2 de dicho virus.
- 10 4. El MDV1 recombinante de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la secuencia de nucleótidos recombinante codifica un péptido antigénico.
5. El MDV1 recombinante de la reivindicación 4, en donde el péptido antigénico es un péptido antigénico de un patógeno aviar.
- 15 6. El MDV1 recombinante de la reivindicación 5, en donde el péptido antigénico se elige de entre un péptido antigénico del paramixovirus aviar tipo 1, preferiblemente, la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) o un fragmento de esta, un péptido antigénico del virus de la enfermedad de Gumboro, preferiblemente, la proteína VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV) o un fragmento de esta, un péptido antigénico del virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV), preferiblemente, la proteína gB o un fragmento de la misma, un péptido antigénico de *Mycoplasma galisepticum*, preferiblemente, la proteína 40K o un fragmento de la misma, y un péptido antigénico del virus de la gripe aviar, preferiblemente, una proteína de superficie hemaglutinina (HA) o un fragmento de la misma.
- 20 7. El MDV1 recombinante de la reivindicación 6, en donde el péptido antigénico es una proteína VP2 de IBDV o un fragmento inmunogénico de la misma.
8. El MDV1 recombinante de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el virus comprende una secuencia de nucleótidos recombinante adicional que codifica un polipéptido distinto.
- 25 9. El MDV1 recombinante de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho MDV1 comprende, insertada en una región no esencial, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un péptido antigénico bajo el control de un promotor que consiste en el SEQ ID NO: 5.
- 30 10. Una composición que comprende un virus de la enfermedad de Marek recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y, opcionalmente, un excipiente o vehículo veterinaria o farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante adecuado.
11. Un MDV1 recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una composición de la reivindicación 10, para su uso en la vacunación de un ave, preferiblemente, una gallina.
- 35 12. Un MDV1 recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que expresa un primer antígeno, en combinación con un virus aviar recombinante distinto que expresa un segundo antígeno distinto, para su uso en la vacunación de un ave, preferiblemente, una gallina, por medio de administración simultánea, secuencial separada o alternada.
13. El MDV1 recombinante para su uso según la reivindicación 12, en donde el MDV1 expresa un antígeno de VP2, y el virus aviar distinto es un HVT que expresa un antígeno distinto.
- 40 14. Un método para producir MDV1 recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende (I) la introducción de una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un polipéptido bajo el control de un promotor que consiste en el SEQ ID NO: 5 en una región no esencial del genoma de un virus MDV1, (II) opcionalmente replicar el virus y (III) opcionalmente recolectar el virus.
- 45 15. Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende el genoma de un MDV1 o un fragmento del mismo, en donde dicho genoma o fragmento comprende un gen US2 modificado por medio de inserción de una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende una secuencia que codifica un polipéptido bajo el control de un promotor que consiste en el SEQ ID NO: 5.
16. Un plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 15.
17. Una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 15 o un plásmido de la reivindicación 16.

Figura 1

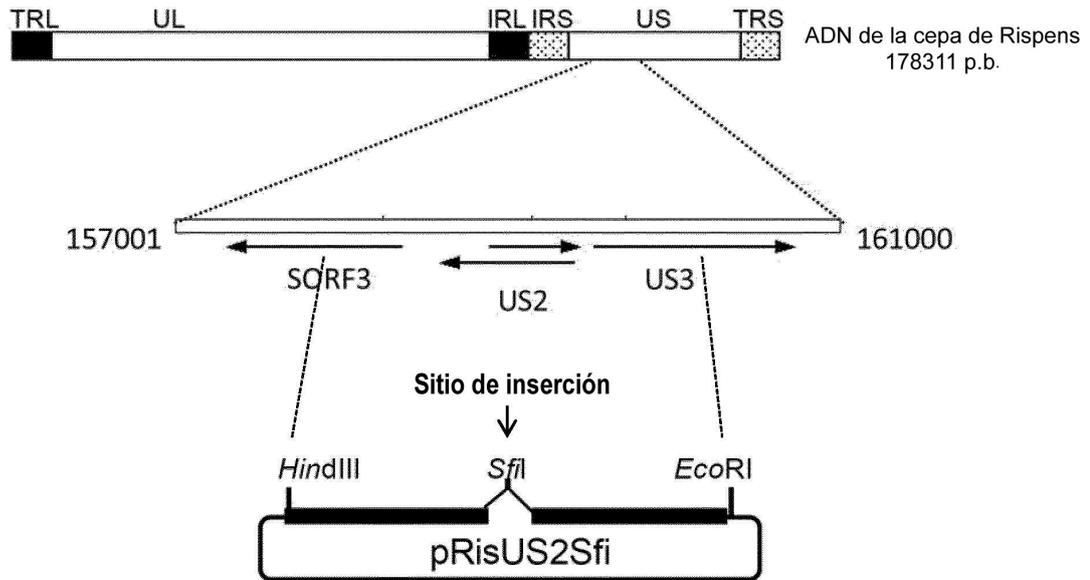


Figura 2

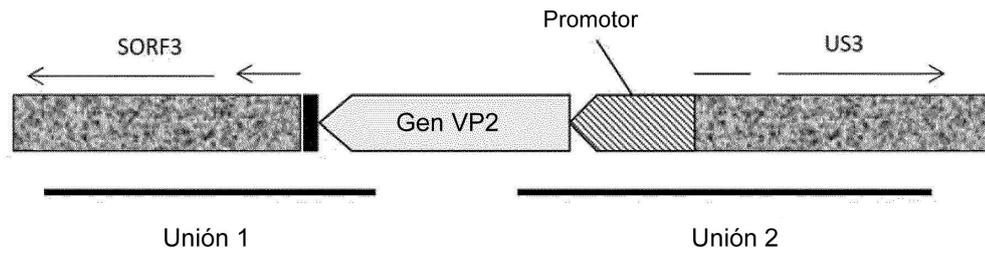
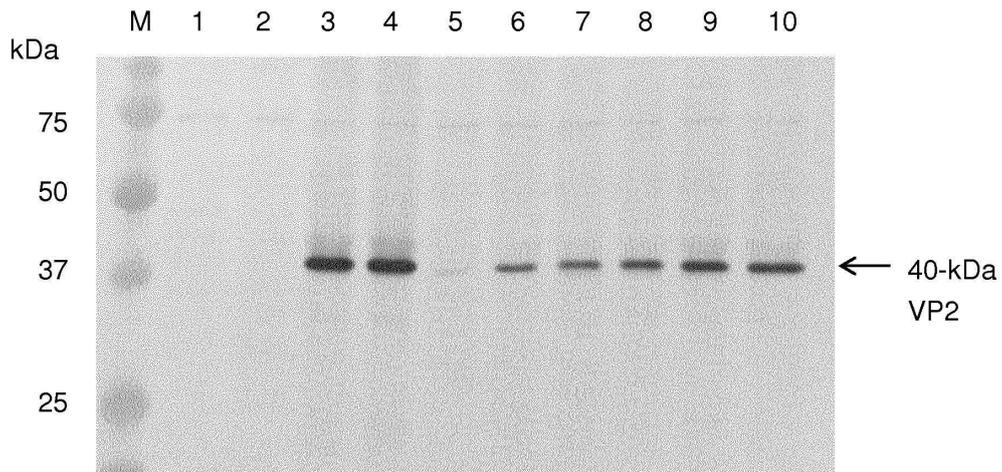


Figura 3



M: Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad, n.º de Cat. 161-0373)

1: Control CEF

2: Rispens de tipo salvaje

3: Clon 1 de RR013

4: Clon 2 de RR013

5: RR024

6: Clon 1 de RR030

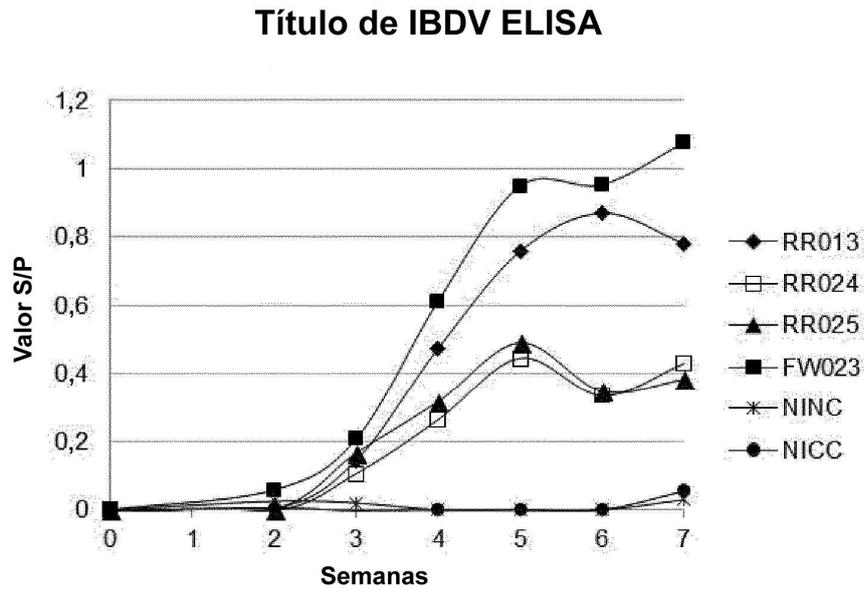
7: Clon 2 de RR030

8: Clon 3 de RR030

9: Clon 1 de RR031

10: Clon 2 de RR031

Figura 4



IDEXX IBD Ab Test: IDEXX Laboratories

RR013: Rispens/US2/Bac-VP2stc

RR024: Rispens/US2/RSV-VP2stc

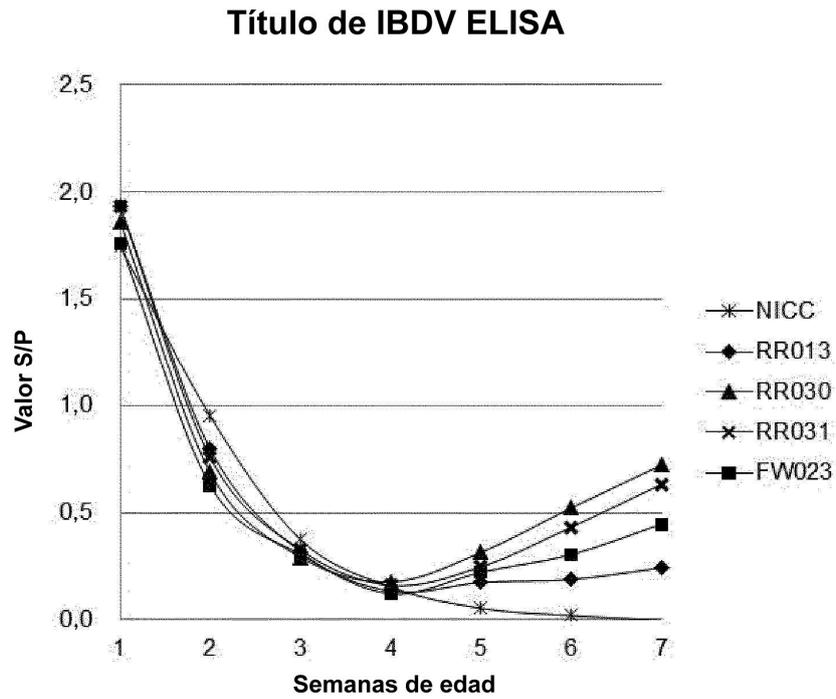
RR025: Rispens/US2/SV40-VP2stc

FW023 (control HVT/IBD recombinante): HTV/UL45-46/Bac-VP2stc

NINC = controles negativos no expuestos, no inmunizados

NICC = controles positivos expuestos, no inmunizados

Figura 5



IDEXX IBD Ab Test: IDEXX Laboratories

NICC = controles positivos expuestos, no inmunizados

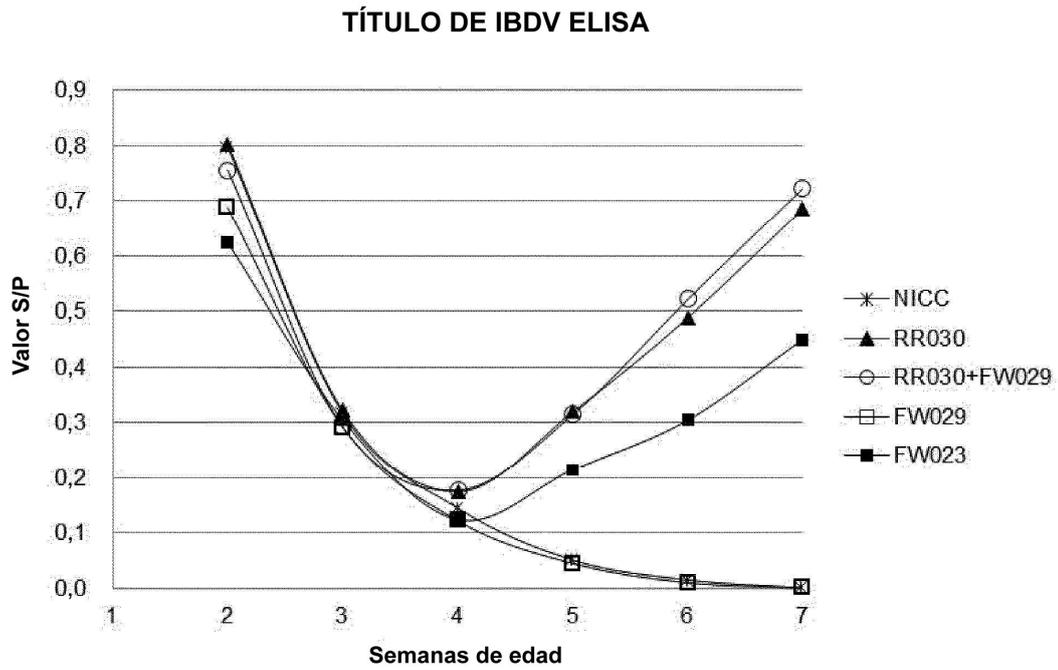
RR013: Rispens/US2/Bac-VP2stc

RR030: Rispens/US2/Coa5-VP2stc

RR031: Rispens/US2/Coa5-VP2stc2

FW023 (control HVT/IBD recombinante): HTV/UL45-46/Bac-VP2stc

Figura 6A



IDEXX IBD Ab Test: IDEXX Laboratories

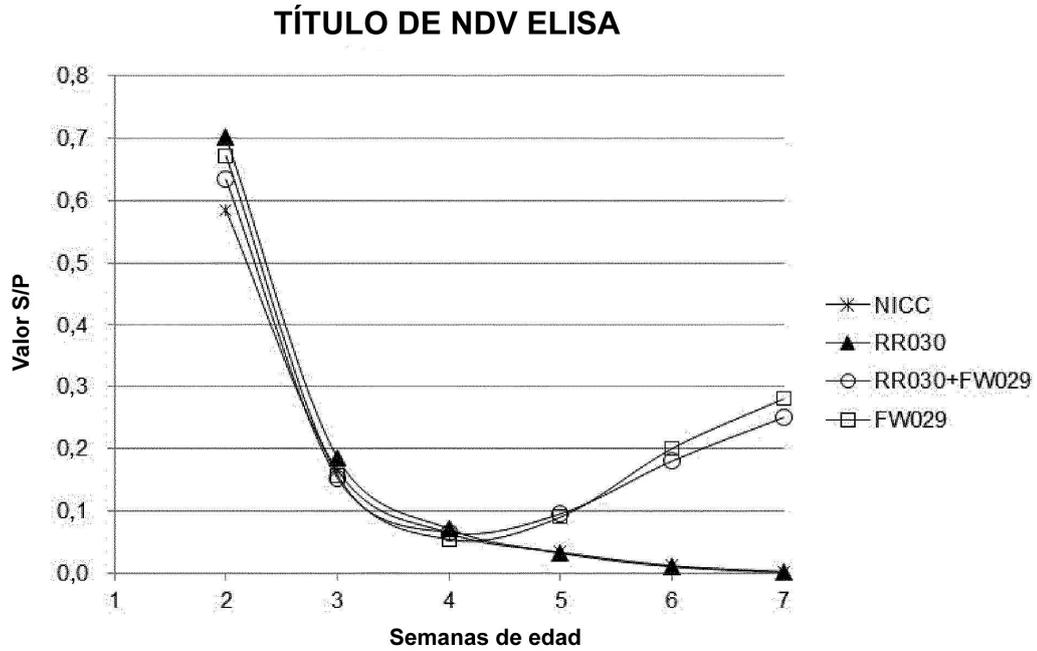
NICC = controles positivos expuestos, no inmunizados

RR030: Rispens/US2/Coa5-VP2stc

FW029 (control HVT/ND recombinante): HTV/UL45-46/Pec-F

FW023 (control HVT/IBD recombinante): HTV/UL45-46/Bac-VP2stc

Figura 6B



IDEXX NDV Ab Test: IDEXX Laboratories

NICC = controles positivos expuestos, no inmunizados

RR030: Rispens/US2/Coa5-VP2stc

FW029 (control HVT/ND recombinante): HTV/UL45-46/Pec-F

Figura 7

