

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 275**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2014 PCT/EP2014/066023**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15011261**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2014 E 14742541 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3024935**

54 Título: **Aceleración de la respuesta inmunitaria en aves inducida por vectores virales**

30 Prioridad:

26.07.2013 EP 13178137

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

28.02.2020

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**SCHRIER, CARLA CHRISTINA y
DEGEN, WILHELMUS GERARDUS JOHANNES**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 745 275 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

Aceleración de la respuesta inmunitaria en aves inducida por vectores virales

5 La presente invención se refiere al campo de la inmunología de vacunas veterinarias, y en particular a una vacuna que comprende un vector de virus del herpes aviar, un oligodesoxinucleótido, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También, la invención se refiere a métodos para y usos de la vacuna y el oligodesoxinucleótido.

10 Ha sido bien establecido que los oligodesoxinucleótidos pueden estimular el sistema inmunológico innato presente en la mayoría de los vertebrados. Esto fue descrito, en primer lugar, para los motivos CpG no metilados presentes en el ADN bacteriano por Krieg et al. (1995, Nature, vol. 374, p. 546). En las dos décadas posteriores este proceso ha sido revelado como una parte de la respuesta inmediata a la invasión de un microorganismo, mediante el reconocimiento de estructuras conservadas (denominadas patrones moleculares asociados con patógenos) existentes, por ej. en el material genómico de los virus y las bacterias. Con este propósito, el sistema inmunológico innato emplea receptores de reconocimiento de patrones específicos tales como los receptores del tipo Toll (TLR).

20 Los TLR son glicoproteínas de transmembrana tipo I, y la unión de un ligando agonista induce la dimerización de los TLR lo cual conduce, para la mayoría de los TLR, a la unión de MyD88. Esto inicia una cascada de señalamiento celular dando como resultado la activación del factor de transcripción NFkappaB. Esto, a su vez, conduce a la expresión de interferones tipo 1 (IFN1 α e IFN1 β), y de citocinas proinflamatorias (interleucina (IL)1 beta, IL6, IL8, IL10, IL12, y factor alfa de necrosis tumoral). Además, esto es la base para la estimulación de la respuesta inmunitaria, adquirida, secundaria (Kawai & Akira, 2010, Nature Immunol., vol. 11, p. 373).

25 En los mamíferos, el TLR dedicado a la detección de los motivos CpG no metilados es TLR9. Sin embargo, en el genoma de las aves, no hay gen de TLR9 5 presente; en su lugar se encontró un TLR21 que actúa como un homólogo funcional del TLR9 de los mamíferos (Brownlie et al., 2009, Mol. Immunol., vol. 46, p. 3163; Keestra et al., 2010, J. of Immunol., vol. 185, p. 460). TLR21 no ha sido estudiado tan extensamente como el TLR9, aunque los dos comparten una cantidad de similitudes funcionales: especificidad para los motivos CpG no metilados, y una localización intracelular.

30 El uso de un oligodesoxinucleótido que contiene CpG no metilados inmunoestimulador (INO), como adyuvante de la vacuna también ha sido descrito (Krieg, A.M., 2007, Proc. Am. Thorac. Soc., vol. 4, p. 289), para aplicaciones veterinarias. Esto fue aplicado, por ejemplo, a las aves de corral, en una vacuna para proteger a los pollos contra la enfermedad de Newcastle (Linghua et al., 2007, Vet. Immun. and Immunopath., vol. 115, p. 216); contra la enfermedad de la bursitis infecciosa (Mahmood et al., 2006, Vaccine vol. 24, p. 4838); o la gripe aviar (Hung et al., 2011, Vaccine, vol. 29, p. 29). Para una revisión, ver Dar et al. (2009, Japan Poultry Science, vol. 46, p. 69).

40 Recientemente se han divulgado diversas familias de INO, véase el documento WO 2012/089.800 (familia X4), WO 2012/160.183 (familia X43), y WO 2012/160.184 (familia X23). Estos INO son particularmente eficaces como agonistas para el TLR21 aviar, provocando un efecto inmunomodulador elevado en bajas concentraciones. Su adición a una vacuna aumenta la inmunogenicidad del componente antigénico en esa vacuna. Por consiguiente, la cantidad de un antígeno en una vacuna con ese tipo de agonista de TLR21 podría reducirse logrando al mismo tiempo el mismo nivel de inmunoprotección que sin el agonista.

45 En los mamíferos, el TLR9 es abundantemente expresado en células dendríticas plasmocitoides. Estas células son productores profesionales de interferones tipo I, el cual es un agente antiviral fuerte. Por consiguiente, una actividad importante de un agonista del TLR9 es como agente antiviral, en particular contra los virus ADN, tales como el adenovirus o el herpesvirus; véase Tang et al. (2010, Sci. China Life Sci., vol. 53, p. 172). Esto es muy eficaz en la práctica, por ejemplo, el adenovirus que debía servir como vector para la administración de genes fue rápidamente eliminado de un hospedador inoculado mediante el efecto antiviral de la activación del TLR9 que fue inducida (Nayak & Herzog, 2010, Gene Ther., vol. 17, p. 295). De manera similar, diversos tipos de virus del herpes son eficazmente atacados por el sistema inmunitario innato, tales como HSV1, HSV2, VZV, y citomegalovirus (Yu et al., 2011, Cell. Mol. Immunol., vol. 8, p. 181; Gaajetaan et al., 2012, Antiviral Res., vol. 93, p. 39; Ong et al., Mayo 2013, Blood, DOI 10.1182; Zhang et al., 2013, Plos One, vol. 8, e52003; y una revisión por Martinez-Martin, 2010, Frontiers in Biosc. S2, p. 718). Este efecto antiviral también fue detectado para un herpesvirus veterinario: infección de virus seudorrabia en lechones (Linghua et al., 2008, Vaccine, vol. 26, p. 224).

60 Como conclusión: se sabe que los agonistas del TLR9 son fuertes inmunoestimuladores, que inducen la eliminación eficaz de una infección viral, en particular de virus ADN tales como el herpesvirus.

Una manera muy conocida de vacunación activa de un organismo objetivo es por inoculación con un vector; generalmente este es un microorganismo recombinante vivo de baja patogenicidad que se replica en el organismo objetivo, y expresa un antígeno de un microorganismo patógeno, contra el cual debe vacunarse organismo objetivo. Esta es una alternativa conveniente a una vacunación inactivada clásica la cual habitualmente emplea grandes cantidades de antígeno, en dosis repetidas, y un adyuvante para reforzar el sistema inmunológico del organismo objetivo.

5 Es característico de una vacuna con vector, siendo un microorganismo vivo e infeccioso, su capacidad de replicarse. Esta replicación proporciona una serie de ventajas, por ejemplo: la vacuna con vector puede ser administrada en cantidades relativamente bajas, y el vector proporciona una presentación duradera del antígeno expresado al sistema inmunológico del organismo objetivo.

10 De alguna manera, la inoculación de un organismo objetivo con una vacuna con vector recombinante viva no es, por lo tanto, muy diferente a una infección 'normal', e implica el establecimiento de una infección productiva por el vector, y la inducción de una respuesta inmunitaria en el organismo objetivo. El desarrollo de la inmunidad contra el propio vector mismo (si lo hay) puede no ser tan relevante como aquella contra el antígeno que el vector proporciona, mediante la expresión de un gen que es heterólogo al vector. Este gen es generalmente derivado de un microorganismo que es patógeno para el organismo objetivo, y codifica un antígeno proteico (o su parte relevante) que induce una inmunidad protectora contra el microorganismo donante patógeno.

15 Se conocen diversos tipos de vacunas con vector, basadas en diversos microorganismos tales como virus, bacterias, o parásitos. Una cantidad de estas vacunas están siendo empleadas comercialmente, especialmente en el campo de la veterinaria, donde la economía de una vacuna de vector vivo es lo más relevante: una vacuna relativamente económica que puede ser administrada a sus organismos objetivos mediante métodos de vacunación en masa. Un ejemplo sorprendente de un mercado veterinario de bajo margen, volumen alto, es la cría de aves de corral.

20 Las vacunas de vectores virales más utilizadas para las aves de corral se basan en herpesvirus aviares tales como el virus de la enteritis del pato (DEV), el virus de laringotraqueítis infecciosa (ILTV), o el herpes virus de los pavos (HVT).

25 DEV es un alfaherpesvirus que infecta a aves de todas las edades del orden Anseriformes (patos, gansos y cisnes). También es denominado herpesvirus-1 de las anátidas, o herpesvirus de la plaga de los patos. Se ha utilizado como vacuna con vector contra la gripe aviar (Liu et al., 2011, J. of Virol., vol. 85, p. 10989).

30 ILTV es también conocido como herpesvirus 1 aviar, y provoca una infección respiratoria severa en gallinas y faisanes. En una forma atenuada, se ha utilizado también como vector contra la gripe aviar (Pavlova et al., 2009, Vaccine, vol. 27, p. 773).

35 El HVT es un virus de la familia de los virus de la enfermedad de Marek (MDV), los cuales son alphaherpesviridae que infectan especies aviares. El HVT es un MDV de serotipo 3, y es también conocido como: Meleagrid herpesvirus 1, o herpesvirus del pavo. Se descubrió que el HVT es completamente apatógeno para las gallinas, y es una vacuna común, por ej. las cepas de HVT FC-126, y PB1.

40 MDV serotipo 2 (MDV2, también conocido como herpesvirus 3 aviar), es prácticamente apatógeno para las gallinas. Se ha utilizado como un vector y como una vacuna, por ej. la cepa SB1. (Petherbridge et al., 2009, J. Virol. Meth., vol. 158, p. 11).

45 MDV serotipo 1 (MDV1, herpesvirus 2 aviar) es originariamente patógeno para las aves de corral, pero se conocen cepas atenuadas tales como: RB1B, 814, y CVI-988 Rispens, las cuales se utilizan como vacuna o como vector vivo (Cui et al., 2013, PLoS One, 2013; 8(1): e53340)

50 MDV1, MDV2 y HVT son virus sistémicos que pueden ser aplicados como vacunas a los pollos en una edad temprana: en el día de la eclosión (día uno), o incluso antes de la eclosión, cuando aún se encuentra en el huevo. Este último método, denominado 'vacunación in ovo', es una forma de vacunación embrionaria, la cual es comúnmente aplicada aproximadamente el día 18 del desarrollo embrionario (ED), aproximadamente 3 días antes de la eclosión.

55 HVT se ha utilizado como una vacuna con vector viral durante mucho tiempo (véase WO 87/04463), y para la expresión y administración de varios antígenos de patógenos de aves de corral, tales como: la proteína de Fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) (Sondermeijer et al., 1993, Vaccine, vol. 11, p. 349); la proteína viral 2 (VP2) del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) (Darteil et al., 1995, Virology, vol. 211, p. 481); la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la gripe aviar (AIV) (WO 2012/052.384); y las proteínas gD y gI del virus de laringotraqueítis infecciosa (ILTV) (Hein et al., 2008, 43rd Natl, meeting Poultry Health & Processing, Ocean City, MD, p. 73-74). Pero además se ha descrito la expresión de un antígeno parasitario (Cronenberg et al., 1999, Acta Virol., vol. 43, p. 192). En un desarrollo más reciente, se han descrito construcciones de vectores HVT que expresan más de un gen heterólogo, por ejemplo: los genes NDV F e IBDV VP2 en el documento WO 2013/057.235, y el NDV F y los genes gD/gI del ILTV en el documento WO 2013/057.236.

65 Por consiguiente, están comercializadas diferentes vacunas de vectores de HVT para aves de corral, por ejemplo que expresan la proteína NDV F: Innovax™-ND (MSD Animal Health), y Vectormune™ HVT-NDV (Ceva); la IBDV VP2: Vaxxitek™ HVT+IBD (Merial; denominada previamente: Gallivac™ HVT-IBD), y Vectormune™ HVT-IBD

(Ceva); y los gD/gl del ILTV: Innovax™-LT (MSD Animal Health).

5 Un problema en cuanto al uso de un herpesvirus vivo como vacuna con vector es el retraso en el comienzo de la
 inmunidad que requieren. Debido a su naturaleza, un vector vivo, tal como un herpesvirus (aviar), necesita, en
 primer lugar, establecer una infección productiva en el organismo objetivo vacunado y replicarse. Generalmente esto
 llevará aproximadamente de 3 a 7 días. Sólo entonces se producirá algún nivel sustancial de expresión del gen
 10 heterólogo, después de lo cual el sistema inmunitario del objetivo tiene que ser activado contra el antígeno
 expresado; esto dura de 2 a 3 semanas. Por lo tanto, en total, pueden pasar hasta 4 semanas hasta que un
 organismo objetivo desarrolla una respuesta inmunitaria que puede proteger en forma eficaz contra la exposición al
 patógeno que es el donante del gen heterólogo. Esto no es una desventaja importante cuando el organismo objetivo
 vive bastantes años y tiene mucho tiempo para desarrollar y fortalecer su inmunidad. Sin embargo, en el caso de la
 cría de aves de corral el ciclo de vida del objetivo es generalmente corto, y la presión de infección del campo es alta.

15 Se han descubierto modos de aumentar el nivel de inmunidad en aves a partir de las vacunas con vector,
 aumentando el nivel de expresión del gen heterólogo insertado, por ej. optimizando la resistencia de su promotor
 (véase el documento WO 2012/052.384). Sin embargo, esto no ha conducido a un comienzo más temprano de la
 inmunidad. Por lo tanto, existe una necesidad continua en el campo de mejorar la inmunización de aves con vacunas
 de vectores vivos, a fin de proporcionar una inmunidad protectora lo más tempranamente posible.

20 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención consiste en superar una desventaja y resolver un problema del
 estado de la técnica, proporcionando un comienzo temprano de la inmunidad en aves contra un antígeno que es
 expresado y administrado por una vacuna de vector de virus del herpes aviar.

25 Sorprendentemente, se ha descubierto que este objetivo puede ser logrado mediante el uso de un
 oligodesoxinucleótido que es un agonista del receptor tipo Toll (TLR) 21 aviar. Esto proporciona una aceleración de
 la respuesta inmunitaria en aves contra un antígeno expresado por una vacuna con vector de virus del herpes aviar.

30 Por ejemplo, se descubrió que mientras que una respuesta inmunitaria protectora en pollos jóvenes contra NDV de
 un vector HVT que lleva el gen NDV-F 5 normalmente tarda 3 - 4 semanas en desarrollarse después de la
 vacunación, con la adición de un agonista de TLR21 aviar, se logró una protección eficaz contra una infección por
 exposición a NDV severa ya a las dos semanas p.v. Cuando se considera en relación con el ciclo de vida de 6
 semanas de una gallina de engorde, este comienzo más temprano de 1-2 semanas de la inmunidad es una
 aceleración mayor de la eficacia de la vacunación del vector, y es de gran importancia para el resultado de una
 35 operación comercial con aves de corral.

Esta aceleración de la inmunidad inducida por vector no pudo anticiparse como resultado de la activación de TLR21
 aviar, porque éste era conocido por su inducción de un efecto antiviral potente, similar a la actividad de su homólogo
 funcional en mamíferos: TLR9. Por lo tanto, los inventores se sorprendieron al descubrir que después de la adición
 de un agonista de TLR21 aviar, un vector de virus del herpes aviar no era eliminado rápidamente, sino que por el
 40 contrario podría proliferar y podría expresar su gen heterólogo. En particular, el vector de virus del herpes aviar
 puede hacer esto de una manera que dio como resultado una inmunidad que era eficaz contra el antígeno
 expresado mucho antes después de la vacunación, cuando se comparaba con la inmunización sin un agonista de
 TLR21.

45 Actualmente no se sabe cómo o por qué se produce este fenómeno, y debido a que se sabe poco del
 funcionamiento del sistema inmunitario (innato) aviar, no hay explicación alguna disponible del estado de la técnica.
 Por lo tanto, no se sabe si el efecto observado del agonista de TLR21 es el resultado de una respuesta inmunitaria
 que es más rápida, más fuerte y/o más eficaz de algún modo.

50 Sin estar limitados por teoría o modelo alguno que explicaría estas observaciones, los inventores especulan que la
 activación del sistema inmunitario innato aviar por un agonista del TLR21 aviar, induce un entorno inmunológico en
 el ave objetivo que inesperadamente apoya, más que perjudica, la replicación de, y la expresión por, un vector de
 virus del herpes aviar.

55 Por lo tanto en un aspecto la invención se refiere a una vacuna que comprende un vector de virus del herpes aviar,
 un oligodesoxinucleótido, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el vector de virus del herpes aviar
 comprende una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica un antígeno de un microorganismo que es patógeno
 para las aves, y en la que el oligodesoxinucleótido es un agonista del receptor tipo Toll (TLR) 21 aviar.

60 La vacuna de acuerdo con la invención proporciona una aceleración de la respuesta inmunitaria en aves contra un
 antígeno heterólogo expresado por un vector de virus del herpes aviar.

Una "vacuna" se sabe bien que es una composición que comprende un compuesto inmunológicamente activo, en un
 65 vehículo farmacéuticamente aceptable. El 'compuesto inmunológicamente activo', o 'antígeno' es una molécula que
 es reconocida por el sistema inmunitario del organismo objetivo e induce una respuesta inmunológica. La respuesta
 puede proceder del sistema inmunitario innato o del sistema inmunitario adquirido, y puede ser del tipo celular y/o

humoral.

Esta respuesta inmunitaria ayuda al animal objetivo vacunado a prevenir, mejorar, reducir la sensibilidad para, o el tratamiento de una enfermedad o trastorno que es el resultado de la infección con un microorganismo. La protección se logra como resultado de la administración de por lo menos un antígeno derivado de ese microorganismo. Esto hará que el animal objetivo muestre una reducción en el número, o en la intensidad, de los signos clínicos causados por el microorganismo. Este puede ser el resultado de una reducción de la invasión, colonización, o índice de infección por el microorganismo, lo cual conduce a una reducción en el número o en la gravedad de las lesiones y de los efectos que son causados por el microorganismo, o por la respuesta del organismo objetivo.

La determinación de la eficacia de una vacuna de acuerdo con la invención contra un patógeno aviar se encuentra dentro de los conocimientos del técnico de rutina, por ejemplo controlando la respuesta inmunológica después de la vacunación, o después de una infección por exposición, por ej. controlando los signos clínicos de la enfermedad, puntuación clínica, parámetros serológicos, o por el re-aislamiento del patógeno, y comparando estos resultados con las respuestas observadas en animales vacunados de forma simulada.

Diversas realizaciones y preferencias de una vacuna de acuerdo con la invención serán expuestas a continuación.

La expresión “que comprende” (así como variaciones tales como “comprenden”, “comprende”, y “comprendido”) como se usa en la presente memoria, se refiere(n) a todos los elementos, y en cualquier combinación posible concebible para la invención, que están cubiertos por o incluidos en la sección de texto, párrafo, reivindicación, etc., en donde se utiliza este término, incluso si dichos elementos o combinaciones no son explícitamente mencionados; y no se refiere a la exclusión de ninguno de esos elemento(s) o combinaciones. Por lo tanto, cualquier sección de texto de ese tipo, párrafo, reivindicación, etc., también puede relacionarse con una o más realización(es) en el que el término “que comprende” (o sus variaciones) es reemplazado por términos tales como “consiste en”, “consistiendo en”, o “consiste esencialmente en”.

El término “aviar” se refiere a un organismo de la clase taxonómica Aves; los organismos aviares preferidos son las aves de importancia para los seres humanos o para la ciencia veterinaria, tales como: pollo, pavo, pato, ganso, perdiz, pavo real, codorniz, paloma, faisán, gallina de Guinea, fringílido, cuervo, periquito, loro, guacamayo, maracaná, cacatúa, pinzón, halcón, águilas, emú, casuario, y avestruz. Los más preferidos son los organismos aviares seleccionados del grupo que consiste en: pollo, pavo, pato y ganso. El más preferido es el pollo. Para la invención, un ave puede ser de cualquier raza, tipo o variedad, tal como: ponedoras, reproductoras, aves de engorde, combinación de razas, o líneas parentales de cualquiera de dichas razas. Los tipos preferidos son: de engorde, reproductora, y ponedora. Los más preferidos son los pollos de engorde.

Para la invención no es necesario tener la misma especie aviar que el organismo objetivo para la vacunación, como el origen del vector de virus del herpes aviar, y como el origen del microorganismo que es patógeno para las aves. Uno, dos o todos estos pueden ser de diferente origen aviar. Por ejemplo: una vacuna para gallinas, basada en un vector de virus del herpes de los pavos (HVT), que expresa un antígeno HA del virus de la gripe aviar aislado de una gaviota.

Un “herpesvirus” es bien conocido en la técnica, y es un virus que pertenece a la familia taxonómica Herpesviridae. Se prefieren los herpesvirus de la subfamilia Alphaherpesviridae. Los más preferidos son DEV, ILTV, HVT, MDV2 y MDV1. Aún más preferidos son HVT, MDV2 y MDV1; el más preferido es HVT.

Por lo tanto, en una realización preferida de una vacuna de acuerdo con la invención, el vector de virus del herpes aviar es uno o más seleccionados entre: virus de la enteritis del pato, virus de la laringotraqueítis infecciosa, herpesvirus de los pavos, virus de la enfermedad de Marek serotipo 2, y virus de la enfermedad de Marek serotipo 1.

Un “vector” para la invención es muy conocido en la técnica, como un microorganismo vehículo recombinante vivo que sobrevive en un objetivo aviar inoculado sin daño aparente al objetivo, y expresa y administra al sistema inmunitario del objetivo un antígeno expresado de una secuencia nucleotídica heteróloga que comprende. Como será evidente para un experto en la materia, un vector en principio puede expresar y administrar más de un antígeno, codificado por uno o más gen(es) heterólogo(s).

Preferiblemente, el vector de virus del herpes para la vacuna de acuerdo con la invención es derivado de una vacuna con vector de virus del herpes establecida, con un registro probado de replicación estable y eficaz y expresión del antígeno heterólogo.

Para la construcción de un vector de virus del herpes aviar de acuerdo con lo descrito para la invención, el material de partida es el virión del herpes, el cual es una partícula de los virus envueltos, que contiene un genoma relativamente grande de ADN de doble hebra lineal. Los herpesvirus aviares tienen una organización genómica común y conservada con regiones largas únicas, y cortas únicas, flanqueadas por repeticiones. Diversas secuencias genómicas de virus del herpes se encuentran disponibles al público, por ejemplo de GenBank™: DEV: EU082088, ILTV: NC_006623, HVT: AF291866, MDV2: HQ840738, y MDV1: AF147806.

Se pueden utilizar diferentes técnicas biológicas moleculares para la inserción de una secuencia nucleotídica heteróloga en vectores de virus del herpes (aviar). Por ejemplo para HVT, mediante el uso de recombinación homóloga (Sondermeijer et al., 1993, *supra*), regeneración de cósmidos (Patente US-5.961.982), o bácmidos (cromosomas artificiales bacterianos) (Baigent et al., 2006, J. of Gen. Virol., vol. 87, p. 769). Las técnicas de inserción preferidas son mediante regeneración de cósmidos, por ej. como se describe en el documento WO 93/25.665, o mediante el uso de bácmidos, como se describe en la patente EP 996.738. Ésta esencialmente emplea un conjunto de fragmentos subgenómicos superpuestos grandes del genoma del vector de virus del herpes aviar para reconstruir un genoma completo por cotransfección en células hospedadores. Como uno de los cósmidos porta un casete de expresión, éste queda integrado de manera estable en el genoma del vector de virus del herpes aviar.

Asimismo, se han descrito diversos sitios no esenciales, adecuados para la inserción de una construcción génica heteróloga en un genoma de virus del herpes aviar; por ej. para HVT: en la región corta única (EP 431.668), o en la región genómica larga única (WO 87/04463). Los sitios de inserción preferidos son los sitios Us2 y Us10.

Además, se han descrito diferentes promotores para impulsar la expresión de una secuencia nucleotídica heteróloga en vectores de virus del herpes aviar, tales como: el promotor gpX del PRV (WO 87/04.463), el promotor LTR del virus de sarcoma de Rous, el promotor génico temprano de SV40, el promotor génico temprano inmediato del citomegalovirus humano (hCMV IE1) (EP 719.864), y el promotor génico de la beta-actina de pollo (EP 1.298.139).

El término "heterólogo" para la invención, indica que la secuencia nucleotídica no está presente en el microorganismo de vector parental que se utilizó para generar el vector para la invención.

La expresión "secuencia nucleotídica" es conocida en la técnica como una cadena molecular de nucleótidos, con la capacidad de 'codificar' un antígeno proteico. Este concepto es bien conocido en la biología molecular y se refiere al dogma central de la biología molecular en el que una secuencia de ADN es transcrita en ARNm, y el ARNm se traduce en la secuencia de aminoácidos de (una parte de) una proteína. De este modo una secuencia nucleotídica está "codificando" una proteína.

Para dar como resultado la expresión real de un antígeno proteico, la secuencia nucleotídica es preferiblemente un marco abierto de lectura (ORF), lo que indica que no contiene codones de detención no deseados que terminarían en forma prematura la transcripción en ARNm. La secuencia nucleotídica puede ser un 'gen' (es decir, un ORF que codifica una proteína completa), o puede ser un fragmento génico. Puede ser de origen natural o sintético. También, la secuencia nucleotídica necesita estar bajo el control de una secuencia promotora, la cual inicia el proceso de transcripción. A esto se hace referencia comúnmente como el promotor que está "ligado operativamente" a la secuencia nucleotídica, donde ambos están conectados en el mismo ADN, en proximidad efectiva, y sin señal o secuencia alguna entre ellos que intervendría con una transcripción eficaz.

Para la invención, la secuencia promotora utilizada, puede en principio ser cualquier promotor siempre y cuando se proporcione una expresión eficaz y sostenida de la secuencia nucleotídica heteróloga.

La combinación de secuencia nucleotídica y promotor es a menudo llamada un 'casete de expresión'; ese tipo de casete puede ser construido, manipulado, y clonado de manera conveniente usando un ácido nucleico vehículo, tal como un plásmido de clonación. Todo esto es bien conocido en la técnica.

Para la invención, la inserción estable de la secuencia nucleotídica heteróloga en el genoma de un herpesvirus aviar puede realizarse mediante cualquier técnica adecuada, siempre y cuando el vector de virus del herpes recombinante resultante sea capaz de exhibir sus efectos favorables de expresión segura, estable y eficaz del antígeno heterólogo.

La secuencia nucleotídica para la invención preferiblemente codifica una proteína completa, pero también puede codificar una sección de una proteína, por ejemplo la forma madura de una proteína, es decir, sin un 'líder', 'ancla', o 'secuencia señal'. La secuencia nucleotídica puede incluso codificar solamente una sección específica de una proteína, tal como la sección que comprende un epítipo inmunoprotector.

En este sentido, una "proteína" para la invención es una cadena molecular de aminoácidos. La proteína puede ser una proteína nativa o una proteína madura, una pre- o pro-proteína, o un fragmento inmunógeno de una proteína. Dentro de la definición de proteína se incluyen, entre otros, péptidos, oligopéptidos y polipéptidos.

Generalmente, la célula hospedadora en la cual el vector de virus del herpes aviar recombinante se replica proporciona la maquinaria biomolecular que impulsa el proceso de expresión. Modificando los elementos relevantes, la expresión de un antígeno puede ser optimizada en por ej. tiempo, nivel, y calidad; todo esto está dentro de las habilidades de rutina del experto en la materia.

Un "oligodesoxinucleótido" es bien sabido que significa una cadena molecular de desoxinucleótidos, un ADN que es relativamente corto, aproximadamente entre aproximadamente y aproximadamente 500 nucleótidos. Ese tipo de molécula polimérica comprende desoxirribosas que están ligadas por enlaces fosfodiéster, y cada una lleva una

base orgánica: citosina, timina, adenina o guanina.

Un oligodesoxinucleótido según lo descrito para la invención puede comprender modificaciones, por ejemplo, una modificación de un enlace fosfodiéster con un fosfortioato, un fosforoditioato, o un puente defosfo. Los ejemplos de puentes defosfo son grupos metilhidroxilamina, formacetal y dimetilsulfona.

Como alternativa, un oligodesoxinucleótido según lo descrito para la invención puede comprender una modificación relacionada con el reemplazo de una base nucleosídica natural por una base nucleosídica no natural tal como: 5-fluorocitosina, guanina 7-desaza-7-sustituida, guanina 7-desaza-8-sustituida, uracilo, 2-tiouracilo, dihidrouracilo, uracilo 5-sustituido, 5-bromo-citosina, adenina 6-sustituida, citosina 6-sustituida, o citosina N4-sustituida.

Nuevamente, otras modificaciones posibles se refieren a la sustitución de la unidad de azúcar desoxirribosa por una unidad de azúcar modificada, por ej. una L-2'-desoxirribosa o 2'-L-arabinosa.

Dichas modificaciones pueden ser aplicadas para modificar u optimizar las características farmacológicas del oligodesoxinucleótido, tal como su disponibilidad biológica o semivida. Por ejemplo, el oligodesoxinucleótido puede ser formulado como una sal farmacéuticamente aceptable, o puede ser convertido en un éster o éter farmacéuticamente aceptable, por ej. en el grupo hidroxilo del extremo 5' o 3'.

Todas estas modificaciones son bien conocidas por un experto en la materia, y pueden ser aplicadas sin usar nada excepto métodos y materiales de rutina.

En los oligodesoxinucleótidos empleados como agonistas de TLR9 de mamífero, el uso de enlaces de fosforo(di)tioato demostró ser beneficioso, mejorando tanto la estabilidad como la actividad inmunoestimuladora. Sin embargo para la presente invención la estabilidad no parece ser crítica, y sorprendentemente se descubrió que en la interacción con TLR21 aviar, un oligodesoxinucleótido que estaba basado enteramente en enlaces fosfodiéster tenía una actividad inmunoestimuladora más alta que uno similar, que comprende enlaces fosforo(di)tioato.

Por lo tanto, en una realización preferida, el oligodesoxinucleótido para utilizar en la invención como un agonista del TLR21 aviar, está en forma de fosfodiéster.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" es un auxiliar en la administración eficaz del compuesto inmunoactivo de una vacuna, sin causar efectos adversos (severos) a la salud del animal objetivo al cual se administra. Ese tipo de vehículo puede ser, por ejemplo, agua estéril, sal fisiológica, o soluciones salinas tamponadas con fosfato. En una forma más compleja, el vehículo puede ser, por ej., un tampón, el cual puede comprender aditivos adicionales, tales como estabilizadores o conservantes. Los detalles y ejemplos son por ejemplo descritos en manuales muy conocidos tales como: "Remington: the science and practice of pharmacy" (2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472), y: "Veterinary vaccinology" (P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Ámsterdam, ISBN 0444819681).

Por ejemplo, el estabilizador convencional para las vacunas de virus (vector) vivo basadas en HVT es: Nobilis™ Diluyente CA, donde CA representa: asociado a célula; y el cual comprende en agua para inyectables: sacarosa, digestivo de caseína pancreática, un tampón de fosfato sódico, y un colorante de fenoltaleína. Este estabilizador de HVT puede ser convenientemente utilizado para la dilución, almacenamiento y administración de un agonista del TLR21 aviar según lo descrito para la invención. Otros ejemplos son:

Un "antígeno" para la invención es una proteína (o una parte inmunógena de la misma) que puede inducir una respuesta inmunitaria. Preferiblemente el antígeno es de una longitud, secuencia de aminoácido, estructura, forma, o calidad tal que la respuesta inmunitaria que induce en el organismo objetivo vacunado es de suficiente fuerza para ser protectora contra un microorganismo patógeno.

Un antígeno preferido para utilizar en la invención es una proteína que es capaz de inducir en un organismo objetivo una inmunidad protectora contra los microorganismos de los cuales ese antígeno fue derivado. Generalmente, estos son antígenos de proteína que son expresados o presentados en la parte exterior del microorganismo o de su célula hospedadora; a menudo, dichas proteínas están implicadas en procesos que implican la infectividad, o virulencia de los microorganismos, tales como proteínas implicadas en la interacción, unión, y/o entrada de células hospedadoras, invasión, captación de nutrientes, movilidad, endo- o exo-toxicidad, etc.

En el caso en que el microorganismo patógeno para las aves sea un virus, ese tipo de antígeno proteico es por ejemplo: una envoltura viral, cápside, o proteína de matriz, o una proteína viral que da lugar a la formación de partículas de tipo virus.

Los antígenos virales preferidos para utilizar en la invención son: NDV-F o -HN(hemaglutinina-neuraminidasa), ILTV-gD y -gI, IBDV-VP2, IBV-S (espicular) o -M (matriz), y AIV-HA, -NA, o -M (neuraminidasa).

En el caso de un microorganismo bacteriano, un antígeno de proteína preferido es una proteína de membrana tal como una proteína de membrana externa, peptidoglucano, glicoproteína, lipoproteína, proteína de membrana

periplásmica, o proteína de capa S, o una proteína de un pilus, porina, fimbria o flagelo.

5 Un antígeno que es “de un microorganismo” se refiere a la entidad biológica que es el origen de la secuencia nucleotídica que codifica al antígeno, y contra el cual la vacuna con vector de virus del herpes según lo descrito para la invención tiene el propósito de proteger. La secuencia nucleotídica que codifica al antígeno puede ser derivada de dicho microorganismo, ya sea directa o indirectamente. Por ejemplo, mediante aislamiento directo del microorganismo, o puede generarse sintéticamente, usando información del microorganismo. La secuencia nucleotídica codificante obtenida puede ser una molécula de ADN o una molécula de ARN, dependiendo del material fuente empleado para su aislamiento. Para la expresión por un vector de virus del herpes aviar, la secuencia nucleotídica necesita estar en forma de ADN. Un experto en la materia conocerá los métodos para aislar uno o el otro tipo de ácido nucleico de varios materiales de partida, y de métodos para convertir un tipo en el otro cuando sea necesario.

15 Los microorganismos que son “patógenos para las aves” para la invención, son muy conocidos en la técnica. Estos incluyen todos los tipos de microorganismos: virus, bacterias, parásitos, hongos, rickettsia, protozoos, etc. Un microorganismo preferido para servir como origen de la secuencia nucleotídica que codifica el uno o más antígeno(s) expresado(s) por el vector de virus del herpes según lo descrito para la invención, se selecciona entre: un virus, una bacteria, un parásito, y un hongo, todos ellos son patógenos para las aves.

20 En una realización preferida el virus patógeno para las aves se selecciona entre: el virus de la bronquitis infecciosa, NDV, Adenovirus aviar, Astrovirus aviar, paramixovirus aviar, virus del síndrome de reducción de la puesta de huevos, adenovirus de aves de corral, IBDV, virus de anemia aviar, virus de la encefalomiélitis aviar, virus de la viruela aviar, virus de rinotraqueítis del pavo, virus de plaga del pato, virus de la hepatitis viral de los patos, virus de viruela de la paloma, MDV, virus de leucosis aviar, ILTV, metapneumovirus aviar, virus de la gripe aviar, parvovirus del ganso, y Reovirus.

25 En una realización preferida la bacteria patógena para las aves se selecciona entre los géneros bacterianos: Escherichia, Salmonella, Ornithobacterium, Haemophilus, Pasteurella, Bordetella, Erysipelothrix, Mycoplasma, Campylobacter, Borrelia, Enterococcus, Avibacterium, Riemerella, Listeria, Shigella, Streptococcus, Staphylococcus, Mycobacterium, Chlamydia y Clostridium.

30 En una realización preferida el parásito patógeno para las aves se selecciona entre los géneros de parásitos: Eimeria y Cryptosporidium.

35 En una realización preferida el hongo patógeno para las aves se selecciona entre los géneros de hongos: Aspergillus y Candida.

40 En una realización preferida de la vacuna de acuerdo con la invención, el vector de virus del herpes aviar es HVT y el agonista del TLR21 aviar es X4-I-minG (SEQ ID NO: 1).

45 En una realización preferida de la vacuna de acuerdo con la invención, el vector de virus del herpes aviar es HVT y el agonista del TLR21 aviar es X4-pent (SEQ ID NO: 4).

50 Estos microorganismos y sus enfermedades son muy conocidos en la técnica, y se describen por ejemplo en manuales muy conocidos, tales como: “The Merck veterinary manual” (10^a ed., 2010, C.M. Kahn ed., ISBN: 091191093X), y: “Diseases of Poultry” (12^a ed. 2008, Y.M. Saif ed., ISBN-10: 0813807182).

55 Para la invención, los nombres de los microorganismos empleados en esta invención, tal como el del vector de virus del herpes, y de los microorganismos patógenos para las aves, son presentados aquí como son utilizados actualmente en la bibliografía científica. Por consiguiente, estos nombres se refieren a los microorganismos que son actualmente clasificados dentro de los grupos taxonómicos con esos nombres. La invención incluye también microorganismos que son subclasificados a partir de los mismos de cualquier manera, por ejemplo como una subespecie, cepa, aislado, genotipo, variante o subtipo y similares. Estos microorganismos comparten los rasgos característicos de sus miembros de grupos taxonómicos tales como en sus características morfológicas, genómicas y bioquímicas, así como también sus características biológicas tales como comportamiento fisiológico, inmunológico o parasitario. Como es conocido en el campo, la clasificación de microorganismos se basa en una combinación de dichas características.

60 Será evidente para un experto en la materia que si bien los microorganismos que son el objeto de la presente invención están actualmente clasificados en estos grupos por ejemplo por género o especie, esta es una clasificación taxonómica que podría cambiar a medida que nuevos conocimientos conducen a la reclasificación en un grupo taxonómico nuevo o diferente. Sin embargo, como esto no cambia a los microorganismos en sí mismos, o a su repertorio antigénico, sino solamente cambia su nombre científico o clasificación, dichos microorganismos reclasificados permanecen dentro del alcance de la invención.

65 Un “receptor tipo Toll 21 aviar” es muy conocido en la técnica, y las secuencias de ADN y de aminoácidos de varios

de esos receptores están disponibles en bases de datos públicas; ya sea como un gen o proteína individual, como parte de una secuencia genómica, o como una sección del gen, indicando diferencias con las secuencias de TLR21 conocidas. Por ejemplo de GenBank: para pollo: NM_001030558 y NW_003763865. Otras secuencias de TLR21 aviar también han sido descritas, por ej. para pinzón, halcón y zorzal petirrojo, respectivamente: GU904859, GU904941, y JX502652. También se han divulgado TLR21 de diferentes tipos y razas de pollos. Como referencia, véase: Ciraci & Lamont, 2011, Dev. & Comp. Immunol., vol. 35, p. 392; Alcaide & Edwards, 2011, Mol. Biol. Evol., vol. 28, p. 1703; y: Ruan et al., 2012, Poultry Sci., vol. 91, p. 2512.

Además, los inventores han descubierto que secuencias de TLR21 aviar adicionales están disponibles para el público, si bien no indicadas o indicadas incorrectamente; por ejemplo el gen para un TLR21 de Pavo está disponible con el número de registro XM_003209691, donde está registrado como del "tipo TLR13". Véase también Ramasamy et al. (2012, Mol. Biol. Rep., vol. 39, p. 8539). Sin embargo, este gen mostraba una homología significativa a un gen de TLR21 del pollo, y cuando se clonó en el sistema de células HEK293/indicador pNifTy2, este TLR de pavo era altamente respondedor a los motivos CpG no metilados. El TLR21 de Pavo subclonado fue ensayado con un agonista de TLR9 de mamífero '2006' y con algunos de los agonistas de TLR21 aviar descritos en la presente memoria. Se descubrió que '2006' tenía una EC50 en este receptor de 6,6 nM, lo cual era comparable con la de 'X4-l-minG', pero 'X4-pent' era más activo, y tenía una EC50 de 1,6 nM.

El sistema célula HEK293/indicador pNifTy2 puede ser utilizado para seleccionar y calificar agonistas de TLR21, así como también receptores TLR21. Se basa en detectar la activación de NFkappaB resultante de la activación de un receptor - aquí TLR21 aviar- que las células exhiben, a través de la detección de una expresión de gen marcador mediante reacción de color. Este se describe, por ejemplo, en el documento WO 2012/089.800, y permite la comparación conveniente, rápida, y paralela de grandes cantidades de moléculas de agonistas candidatas, en un rango de concentraciones. Otros sistemas detectores para la activación de TLR21 aviar también han sido descritos, por ejemplo usando la línea celular de macrófagos de pollo HD11 (Ciraci & Lamont, *supra*), que excreta monóxido de nitrógeno tras la estimulación con CpG. Otros sistemas celulares pueden emplear células transitoriamente transfectadas, siendo igualmente posibles ensayos *in vivo*.

Por consiguiente, un experto en la materia es perfectamente capaz de identificar secuencias de genes y proteínas de TLR21 aviar, así como también confirmar que la proteína codificada es de hecho un receptor para los motivos CpG no metilados.

De manera similar, si un oligodesoxinucleótido es un "agonista" de TLR21 aviar la detección en la invención puede realizarse convenientemente, por ej. usando un TLR21 aviar establecido. Un agonista es definido en la técnica como un compuesto que puede unirse a un receptor biológico y desencadena su activación o respuesta. Para la invención, un agonista para un TLR21 aviar comprende un motivo CpG no metilado. Usando un sistema celular detector, o un modelo *in vivo*, dicho agonista estimulará un nivel de actividad del TLR21 que está por encima de su estado en reposo, inactivado. Preferiblemente, la actividad del agonista es elevada a muy elevada; esto puede ser establecido usando concentraciones bajas a muy bajas del agonista. Por ejemplo, un oligodesoxinucleótido de CpG convencional bien conocido tal como 'ODN 2006' (Krug et al., 2001, Eur. J. Immunol., vol. 31, p. 2154) activará un TLR21 aviar cuando está en el rango micromolar o nanomolar alto; un oligodesoxinucleótido preferido para la invención es activo en un rango de concentración nanomolar bajo, o incluso en un rango de concentración picomolar.

Una manera conveniente de establecer y comparar la actividad agonista de un agonista de TLR21 aviar para la invención, es determinando su valor de EC50, por ejemplo en el sistema de célula HEK293/indicador pNifTy2 que expresa un TLR21 aviar, como se describe en el documento WO 2012/089.800. El valor de EC50 es la concentración semi-máxima eficaz, y representa la concentración de oligodesoxinucleótido que es necesaria para inducir una cantidad de la enzima indicadora SEAP en el sistema celular indicador empleado, que proporciona una absorción semi-máxima. Los agonistas de TLR21 preferidos para utilizar en la invención tienen un valor de EC50 en el rango nanomolar, o incluso en el rango picomolar.

Por lo tanto, para la invención, un agonista de TLR21 aviar preferido tiene un valor de EC50 por debajo de 1 mM, más preferiblemente por debajo de 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, o incluso por debajo de 50 pM, en orden de preferencia en aumento.

Dichos agonistas de TLR21 aviar altamente activos han sido descritos en el estado de la técnica, por ejemplo las familias X4 (WO 2012/089.800), X43 (WO 25 2012/160.183), y X23 (WO 2012/160.184) de compuestos. Estos compuestos son agonistas potentes de TLR21, que activan un TLR21 aviar incluso cuando se encuentran en muy bajas concentraciones.

Por lo tanto, en una realización preferida de una vacuna de acuerdo con la invención, el agonista de TLR21 aviar se selecciona entre la familia X4, X43, o X23.

No hace falta decir que la vacuna de acuerdo con la invención también puede comprender más de un agonista de TLR21, y éstos pueden ser seleccionados entre una, dos o de la totalidad de las tres de estas familias de

compuestos.

La familia X4 de agonistas de TLR21 se divulga en el documento WO 2012/089.800.

5 Por consiguiente, en una realización preferida de una vacuna de acuerdo con la invención, el agonista de TLR21 aviar tiene la fórmula general: 5'- [N1]x [N7]r {N3 [N4]p C G [N5]q N6)n [N8]s [N2]z -3', en la que: N1 = C o G; N2 = C o G; N3 = T, C o G; N4 = C o T, siempre que cuando N3 = C, entonces N4 = T

10 N5 = C o T; N6 = A, T, G o C; N7 = A, T, C o G; N8 = A, T, C o G; x = 3-10;
15 n = 2-100; z = 0-10; r = 0-8, siempre y cuando N7 = T, entonces r = 1-25; p = 1-6, siempre y cuando N4 = T, entonces p = 1-25; q = 1-6, siempre y cuando N5 = T, entonces q = 1-25; y s = 0-8, siempre y cuando N8 = T, entonces s = 1-25.

La familia X43 de agonistas de TLR21 se divulga en el documento WO 2012/160.183.

15 Por consiguiente en una realización preferida de una vacuna de acuerdo con la invención, el agonista de TLR21 aviar tiene la fórmula general: 5'- [G]x {[T]p T T C G T C [T]q }n [G]z -3', en la que: p = 1-15; q = 1-15; n = 2-100; x = 3-10; y z = 0-10

20 La familia X23 de agonistas del TLR21 está divulgada en el documento WO 2012/160.184.

Por consiguiente en una realización preferida de una vacuna de acuerdo con la invención, el agonista de TLR21 aviar tiene la fórmula general: 5'- [G]x { T C G T C G }n T C G [G]z -3', en la que: x = 3-20; z = 0-10; y n = 2-100.

25 Los agonistas de TLR21 según lo descrito para la invención pueden ser producidos de diferentes maneras, todas conocidas en la técnica. (Ellington & Pollard, 2001, en: Synthesis and purification of oligonucleotides. Current Protocols in Molecular Biology, unidad 2.11, p. 1-25; J. Wiley & sons Inc.). Además, muchos proveedores comerciales ofrecen la síntesis personalizada de un oligodesoxinucleótido, con modificaciones según lo deseado, a cualquier escala. Por ejemplo: BioSpring (Frankfurt a. M., Alemania), y Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania).

30 Mientras se exploraba la presente invención, se descubrió que los agonistas de TLR21 según lo descrito para la invención en general tienen una actividad agonista más potente cuando son más largos; especialmente los oligonucleótidos de más de 100 nucleótidos de largo son muy activos. Sin embargo, dichos oligodesoxinucleótidos largos se vuelven cada vez más difíciles de sintetizar de manera confiable, y de purificar. También para aplicaciones veterinarias, los oligodesoxinucleótidos más largos se convierten rápidamente en demasiado costosos. Por consiguiente un agonista de TLR21 para utilizar en una vacuna de acuerdo con la invención tiene, preferiblemente, un largo de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 70 nucleótidos, más preferiblemente entre 22 y 60, entre 25 y 50, entre 30 y 45, o incluso entre aproximadamente 30 y aproximadamente 40 nucleótidos, en orden de preferencia en aumento.

40 De manera similar, se descubrió que los agonistas de TLR21 según lo descrito para la invención son más activos como agonistas de TLR21 aviar cuando el tramo de nucleótidos G hasta el extremo 3' (es decir, en dirección 3') del motivo CpG es más corto, o incluso está ausente, y el tramo de nucleótidos G hasta el extremo 5' (es decir, en dirección 5') del motivo CpG es más largo.

45 Esto fue inesperado, y una diferencia entre TLR21 aviar y TLR9 de mamífero, ya que los inventores observaron que para los agonistas de TLR9 de mamífero la actividad es más elevada con un tramo G 5' corto/ ausente, y un tramo G 3' largo.

50 Por consiguiente en una realización preferida de un agonista de TLR21 de la familia X4: s = 0, y z = 0.

ES 2 745 275 T3

En una realización preferida de un agonista de TLR21 de la familia X43: $z = 0$

Y, en una realización preferida de un agonista de TLR21 de la familia X23:
 $z = 0$.

5 Otras realizaciones preferidas de un agonista de TLR21 de la familia X4 son donde: N1 = G; N7 = G; r = 3-8 (preferiblemente r=5); N3 =T; N4 = T; p = 2-6; N5 = T; N6 = T; q = 2-6; y n = 3-10 (preferiblemente n= 3-5).

10 Un agonista de TLR21 más preferido de la familia X4 es donde: {N3 [N4]p C G [N5]q N6} = TTCGTT, o TTTCGTTT, por ejemplo los oligonucleótidos X4- 10 pent y X4-I-minG, respectivamente, ya que éstos proporcionan una buena relación entre actividad frente a tamaño y costes.

15 Los agonistas de TLR21 preferidos adicionales de las tres familias de compuestos descritas, para utilizar en una vacuna de acuerdo con la invención se presentan en la Tabla 1. El valor de EC50 indicado se determinó usando el sistema de célula HEK293 /indicador pNifTy2 que expresa un TLR21 de pollo.

20 La vacuna de acuerdo con la invención puede, en principio, ser de una constitución más bien simple: el oligodesoxinucleótido, dependiendo de su formulación, puede ser simplemente disuelto en un tampón acuoso, y el vector 20 herpesvirus aviar puede estar contenido en una solución que comprende el virus y un tampón que estabiliza su viabilidad. Cuando se mezcla con el vehículo farmacéuticamente aceptable para la invención, esto da como resultado la vacuna de acuerdo con la invención.

25 Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la preparación de una vacuna de acuerdo con la invención, que comprende la combinación de un vector de virus del herpes aviar, un agonista de TLR21 aviar, ambos según lo descrito para la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 El producto resultante de este método es la vacuna de acuerdo con la invención, la cual acelera la respuesta inmunitaria en las aves contra un antígeno expresado por un vector de virus del herpes aviar.

35 El vector de virus del herpes para utilizar en la vacuna de acuerdo con la invención se prepara usando procedimientos convencionales de cultivo de virus. Además de la producción en animales hospedadores, se prefiere la proliferación en cultivo *in vitro* en células hospedadores adecuadas, por ej.: en células primarias tales como fibroblastos de embriones de pollo (CEF) (para HVT y MDV), o en una línea celular establecida tal como las células de hepatoma masculino de Leghorn (LMH) (para ILTV). Dichos métodos son bien conocidos, y son fácilmente aplicables por un experto en la materia. Por ejemplo, el vector de virus del herpes para la invención es construido por transfección y recombinación y se selecciona el virus recombinante deseado. A continuación, se producen los virus vectores industrialmente en volúmenes más grandes. A partir de dichos cultivos se recolecta una suspensión que comprende el virus, ya sea como células enteras infectadas o como un producto de la sonicación celular, esta suspensión es formulada en una vacuna y el producto del vector viral es envasado y almacenado hasta su posterior uso.

45 Para preparar la vacuna de acuerdo con la invención, la combinación de oligodesoxinucleótido, vector, y vehículo puede realizarse de diferentes maneras, y en un orden diferente; por ejemplo, dos de estos tres constituyentes pueden ser mezclados previamente entre sí, antes de agregar el tercer constituyente. Esto puede ser beneficioso por diversos motivos económicos o prácticos, por ej. por motivos de control de calidad, reducción de costes y de trabajo, o almacenamiento y por motivos logísticos. De este modo, se puede preparar y almacenar un producto intermedio, y la vacuna completa final solo se prepara poco tiempo antes del transporte, o incluso poco tiempo antes del uso.

50 Tras exhaustivas pruebas de calidad, cantidad y esterilidad, la vacuna puede luego ser liberada para la venta.

55 Las técnicas y consideraciones generales que son aplicables a la preparación de las vacunas son bien conocidas en la técnica y se encuentran descritas, por ejemplo, en las reglamentaciones gubernamentales (Farmacopea) y en manuales tales como: "Veterinary vaccinology" y: "Remington" (ambos *supra*).

60 En una realización preferida, el vector de virus del herpes para la invención es un producto de vacuna comercial existente, por lo tanto, se tiene que mezclar solamente el oligonucleótido según lo descrito para la invención, para preparar la vacuna de acuerdo con la invención. Esto puede ser realizado por el productor, bajo condiciones controladas, o simplemente por una persona capacitada en el momento de la vacunación. En este último caso, la vacuna de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la invención puede ser preparada como un kit de partes, que comprende el vector de virus del herpes aviar y el oligodesoxinucleótido en envases separados.

65 Como alternativa, el vector de virus del herpes y el oligodesoxinucleótido, ambos según lo descrito para la invención, pueden ser mezclados en una composición que es un producto intermedio para la vacuna de acuerdo con la invención, tal como una mezcla en un estabilizador o diluyente. De manera similar a otros productos intermedios

concebibles, esto puede ser ventajoso en términos de calidad o economía, al preparar una composición de esa manera.

Por consiguiente en aspectos adicionales, la invención se refiere a:

- 5
- una composición que comprende un vector de virus del herpes aviar y un oligodesoxinucleótido, ambos según lo descrito para la invención.
 - una vacuna para aves que comprende una composición de acuerdo con la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
 - 10 - un método para la preparación de una vacuna de acuerdo con la invención, que comprende la combinación de una composición de acuerdo con la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
 - el uso de una composición de acuerdo con la invención, para la fabricación de una vacuna para aves.

15 La vacuna de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la invención puede comprender un estabilizador, por ej. para proteger a los componentes sensibles contra su degradación, para aumentar la vida útil de la vacuna, y/o para mejorar la eficacia durante el almacenamiento tal como para congelación, o liofilización. En general, los estabilizadores son moléculas grandes de peso molecular elevado, tales como los lípidos, los carbohidratos, o las proteínas; por ejemplo leche en polvo, gelatina, albúmina sérica, sorbitol, trehalosa, espermidina, dextrano o polivinilpirrolidona, y tampones, tales como los fosfatos de metales alcalinos.

20 Preferiblemente el estabilizador se encuentra libre de compuestos de origen animal, o incluso: definido químicamente, como se divulga en el documento WO 2006/094.974.

25 También pueden agregarse conservantes, por ejemplo: timerosal, mercurocromo, compuestos fenólicos, y/o gentamicina.

No hace falta decir que la combinación de otros compuestos, tales como vehículos, diluyentes, emulsiones, y compuestos similares en una vacuna de acuerdo con la invención se encuentra también dentro del alcance de la invención. Dichos aditivos son descritos en manuales bien conocidos tales como: "Remington", y "Veterinary Vaccinology" (ambos *supra*). Sin embargo, ninguno de los constituyentes de la vacuna debería interferir con la viabilidad o con el establecimiento de una infección productiva por el vector de virus del herpes aviar, o con la aceleración de la respuesta inmunitaria aviar por el agonista de TLR21 aviar.

35 Esto también es aplicable a la formulación de la vacuna de acuerdo con la invención como un producto liofilizado, el cual puede dar lugar al almacenamiento prolongado a temperaturas por encima de los cero grados centígrados, a 4 °C. Sin embargo, el que esto sea ventajoso en un caso específico, depende de las características del vector de virus del herpes aviar utilizado para la invención, ya que algunos herpesvirus, por ej. MDV1, no sobreviven bien a la liofilización.

40 La vacuna de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente un llamado "vehículo"; éste puede proporcionar un respaldo para los constituyentes de la vacuna, para que se unan sin estar covalentemente unidos al mismo. Dichos vehículos son, entre otros, bio-microcápsulas, micro-alginatos, liposomas, macrosoles, hidróxido de aluminio, fosfato, sulfato u óxido, sílice, Kaolín™, y Bentonite™, todos conocidos en la técnica.

45 Un ejemplo es un vehículo en el cual el antígeno está incrustado parcialmente en un complejo inmunoestimulador, el llamado ISCOM™ (véase EP 109.942).

50 Además, la vacuna de acuerdo con la invención puede comprender uno o más compuestos tensioactivos o emulsionantes adecuados, por ej. un componente de la familia Span™ o Tween™.

El experto apreciará que todo y cada uno de los aditivos debe ser verificado y ensayado para determinar su compatibilidad con el vector de virus del herpes aviar y con el oligodesoxinucleótido para la invención.

55 La cantidad del vector de virus del herpes aviar por cada dosis aviar de la vacuna de acuerdo con la invención, no es tan crítico como lo sería para una vacuna del tipo inactivada. Esto se debe a que el vector de virus del herpes aviar se replica y por lo tanto se multiplica en el ave objetivo hasta un nivel de viremia que es biológicamente sostenible. No obstante, debe administrarse una dosis mínima para lograr una "toma" eficaz de la vacuna con vector. A este respecto, existen diferentes maneras de medir la cantidad de un herpesvirus vivo; un método apropiado es aquel que cuenta las partículas de virus viables reales, tal como un ensayo en placa sobre una capa celular susceptible.

60 Las cantidades del vector de virus del herpes aviar para la invención pueden ser a continuación expresadas como una cantidad de unidades formadoras de placa (ufp). La dosis que constituye una dosis de inculo eficaz depende de la viabilidad y fuerza de replicación de virus del herpes en particular que se utiliza como vector para la invención.

65 Una cantidad preferida del vector de virus del herpes aviar para la invención, en la vacuna de acuerdo con la invención, es entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1×10^7 ufp del vector de virus del herpes aviar por dosis, más preferiblemente entre 1×10^2 y 1×10^6 , entre 1×10^3 y 1×10^5 , entre 1×10^3 y 1×10^4 , e incluso entre 1000 y

5000 ufp/dosis, en orden creciente de preferencia.

5 En el caso de que el vector de virus del herpes aviar para la invención sea un virus unido a célula, tal como puede aplicarse al HVT o MDV, el vector puede ser administrado en forma asociada a la célula. En ese caso, una dosis para ave comprende entre 100 y 10.000 células hospedadoras infectadas por dosis, preferiblemente entre 100 - 5000 células infectadas, más preferiblemente entre 200-2000 células hospedadoras infectadas por dosis.

10 Además de la protección inmunitaria acelerada que la vacuna de acuerdo con la invención ya proporciona, puede ser ventajoso agregar uno o más componente(s) inactivo(s) adicional(es). Ese tipo de componente puede ser un antígeno, un INO adicional, una sustancia que aumenta la inmunidad, una citocina, y/o una vacuna, para crear una vacuna combinada. Esto proporciona ventajas en términos de coste, eficacia y bienestar del animal. Como alternativa, la vacuna de acuerdo con la invención, puede ser agregada por sí misma a una vacuna.

15 La vacuna de acuerdo con la invención, en principio, puede ser administrada a aves objetivo por diferentes vías de administración, y en diferentes momentos en su ciclo de vida, siempre y cuando el vector de virus del herpes aviar recombinante inoculado pueda establecer una infección protectora contra el antígeno heterólogo. En principio, esto es independiente de la edad del ave objetivo, el sexo, estatus inmunológico, etc., si bien es evidentemente favorable el vacunar organismos objetivos sanos, y vacunar lo antes posible para soportar la presión de infección de campo de por ej. el MDV, NDV o IBVD. Por consiguiente es ventajoso aplicar la vacuna de acuerdo con la invención lo antes posible, preferiblemente en el día del nacimiento (día 1), o incluso dentro del huevo, por ej. a los 18 días ED. Se encuentra disponibles en el mercado equipos adecuados para la inyección automática en el huevo a escala industrial. Esto proporciona la protección más temprana posible, minimizando al mismo tiempo el coste del trabajo.

25 Por consiguiente, en una realización preferida, la vacuna de acuerdo con la invención es administrada *in ovo*.

Se conocen diferentes vías de inoculación *in ovo*, tales como en el saco vitelino, el embrión, o la cavidad de fluido alantoideo; estas vías pueden ser optimizadas según lo requerido.

30 Como alternativa, puede aplicarse una inoculación parenteral de aves individuales. Esta inoculación es aplicada preferiblemente intramuscular o subcutáneamente. Otras vías de inmunización beneficiosas son la vía alimentaria, intestinal, o de la mucosa; por ejemplo la vía oral, nasal, oro- nasal, u ocular. Esto puede lograrse mediante cualquier método de vacunación por goteo o pulverización. Un ejemplo adicional de estas vías de administración es la conveniencia y economía de la aplicación en masa.

35 Las formulaciones de la vacuna, de acuerdo con la invención, adecuadas para inyección, son por ej. una suspensión, solución, dispersión, o emulsión.

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

45 Por ejemplo, para que sea adecuada para la aplicación *in ovo*, se requiere que la composición de la vacuna sea muy suave, para no reducir la incubabilidad de los huevos. Sin embargo, aún en ese caso puede producirse todavía cierta reducción en la incubabilidad, por ej. como resultado del daño mecánico al embrión por la propia inoculación, una infección, etc..

50 Los inventores han establecido que un oligodesoxinucleótido según lo descrito para la invención, puede ser aplicado a los pollos *in ovo*, hasta por lo menos 10 µg por dosis, sin inducir una reacción patológica manifiesta. Sin embargo, dicha cantidad puede no ser económicamente viable. Asimismo, los inventores han observado que un agonista de TLR21 específico puede tener una dosis eficaz óptima, de modo que una cantidad más alta o más baja proporciona un efecto más bajo de inuno-aceleración; por ej. en un experimento con animales, una dosis del agonista de TLR21 aviar de 0,1 µg por cada pollo fue mejor que las dosis de 0,01 µg o 1 µg por pollo. El experto en la materia puede apreciar que esto puede depender de diversos parámetros tales como la actividad específica del oligodesoxinucleótido utilizado, la especie de objetivo aviar, la formulación, la vía de administración, etc., y podrá optimizar dichas condiciones por experimentación de rutina.

60 La cuantificación de un oligodesoxinucleótido para utilizar en la invención puede efectuarse convenientemente de diversas maneras, por ej. por cromatografía en columna con detección por medio de espectrofotometría de absorción de UV en el coeficiente de extinción calculado del oligodesoxinucleótido específico a ensayar, en general dentro del rango de aproximadamente 250-280 nm.

65 Por consiguiente, para la invención, la cantidad preferida del oligodesoxinucleótido según lo descrito para la invención por cada dosis para ave está entre 0,1 ng y 1 mg, más preferiblemente entre 1 ng y 100 µg, aún más preferiblemente entre aproximadamente 10 ng y aproximadamente 10 µg por dosis para aves, y lo más preferido

entre aproximadamente 30 ng y 3 µg por dosis para aves.

La vacuna de acuerdo con la invención puede ser igualmente utilizada como tratamiento profiláctico y terapéutico, e interfiere tanto con el establecimiento y/o como con el progreso de un patógeno para aves, la infección, o sus signos clínicos de enfermedad.

Además, la vacuna de acuerdo con la invención puede servir eficazmente como una vacunación primaria, la cual puede ser seguida más tarde y ampliada por una vacunación de refuerzo, con una vacuna de acuerdo con la invención, o con una vacuna inactivada para aves.

El esquema de dosificación para la administración de la vacuna de acuerdo con la invención al ave objetivo puede ser en una sola dosis o en múltiples dosis, las cuales pueden ser administradas al mismo tiempo o consecutivamente, de un modo compatible con la dosificación requerida y la formulación de la vacuna, y en una cantidad que resulte inmunológicamente eficaz para el ave objetivo.

El protocolo para la administración de la vacuna de acuerdo con la invención idealmente está integrado en planes de vacunación existentes de otras vacunas para ese ave objetivo.

Preferiblemente la vacuna de acuerdo con la invención es aplicada solamente una vez, ya sea en el día del nacimiento, o *in ovo* en el día 18 ED. Sin embargo, dependiendo del tipo de ave que será vacunado, y su programación de cría, el ave puede necesitar ser vacunado nuevamente, una vez, varias veces, o incluso en forma periódica.

El volumen por cada dosis para aves de la vacuna de acuerdo con la invención puede ser optimizado de acuerdo con la vía pretendida de aplicación: la inoculación *in ovo* se aplica comúnmente con un volumen entre aproximadamente 0,05 y 0,5 ml/huevo, y la inyección parenteral se realiza comúnmente con un volumen entre aproximadamente 0,1 y 1 ml/ave. La optimización del volumen de la dosis de la vacuna está dentro de las habilidades del experto en la materia.

La vacuna de acuerdo con la invención en efecto es una 'vacuna marcador' para el microorganismo contra el cual protege el gen heterólogo expresado en el vector, debido a que la inmunidad que genera está solamente dirigida contra una (o una pocas) proteína(s) de este microorganismo. Esto permite la "diferenciación de animales infectados y vacunados", el llamado método 'DIVA'. Esto puede ser realizado convenientemente por un ensayo serológico tal como un ELISA o ensayo de inmunofluorescencia.

El efecto ventajoso de la invención: la aceleración de la respuesta inmunitaria en aves contra un antígeno expresado y administrado por un vector de virus del herpes aviar, se logra después de la administración del vector de virus del herpes aviar y el oligodesoxinucleótido, ambos según lo descrito para la invención, a las aves. Existen diversas maneras de efectuar esta administración, y se obtiene el efecto ventajoso. Estas conducen a diferentes aspectos y realizaciones de la invención. En particular: las aves pueden ser inmunizadas con una vacuna de acuerdo con una de las realizaciones de la invención, o con los constituyentes separados de ese tipo de vacuna. Los detalles de estas diversas realizaciones son descritos e ilustrados en esta invención.

Por ejemplo el vector de virus del herpes aviar y el oligodesoxinucleótido, ambos según lo descrito para la invención, pueden combinarse en una vacuna, ya sea a partir de componentes separados, o a partir de una composición intermedia según lo descrito. Como alternativa, las aves pueden ser inoculadas con el vector y el oligodesoxinucleótido por separado, por ejemplo cuando el vector ya está formulado como una vacuna, se puede añadir después el oligodesoxinucleótido a esa vacuna, o se puede administrar por separado. Cuando se administran como inoculaciones separadas, entonces preferiblemente la inoculación del vector de virus del herpes aviar, y del oligodesoxinucleótido, ambos según lo descrito para la invención, a un ave objetivo, no están separadas por más de 3 días. Esto se ilustra más adelante, cuando se describe que la administración por separado de un oligodesoxinucleótido según lo descrito para la invención, hasta tres días después de la administración de un vector de virus del herpes aviar, era aún eficaz para acelerar la respuesta inmunitaria.

Por consiguiente, para la invención, el vector de virus del herpes aviar y el oligodesoxinucleótido, ambos según lo descrito para la invención, pueden ser administrados a aves en una única administración o en una administración doble; la administración única es cuando ambos se combinan en una sola formulación; la administración doble puede ser administración en diferentes momentos, o en forma simultánea, pero después en diferentes sitios del cuerpo, por diferentes vías, o por diferentes métodos. Cuando se administran por separado, el vector y el oligodesoxinucleótido son administrados al ave objetivo con una diferencia de no más de 3 días, de modo que cualquiera de los dos puede ser administrado en primer lugar.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la vacunación de aves, que comprende la administración a las aves de un vector de virus del herpes aviar según lo descrito para la invención, y de un oligodesoxinucleótido según lo descrito para la invención.

La administración puede ser combinada, o separada por sitio, vía o método. Un experto en la materia es capaz de ensayar variaciones de estas maneras posibles de administración, para llegar a un protocolo que es óptimo para una cierta especie de ave, o a una inmunoprotección deseada.

5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un agonista de TLR21 según lo descrito para la invención para su uso en la aceleración de la respuesta inmunitaria en aves, contra un antígeno expresado por un vector de virus del herpes aviar según lo descrito para la invención.

10 En un aspecto adicional la invención se refiere a un agonista de TLR21 según lo descrito para la invención, para su uso en un método de vacunación de aves, para acelerar la respuesta inmunitaria en aves contra un antígeno expresado por un vector de virus del herpes aviar según lo descrito para la invención.

15 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un agonista de TLR21 según lo descrito para la invención, para la fabricación de una vacuna para aves, para acelerar la respuesta inmunitaria en aves contra un antígeno expresado por un vector de virus del herpes aviar según lo descrito para la invención.

20 En un aspecto adicional la invención se refiere a un método para acelerar la respuesta inmunitaria en aves contra un antígeno expresado por un vector de virus del herpes aviar según lo descrito para la invención, que comprende la administración a las aves de un agonista de TLR21 según lo descrito para la invención.

La invención se describirá ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

25 Ejemplo 1: Síntesis y purificación de agonistas de TLR21:

Los oligodesoxinucleótidos para su uso en los experimentos para la presente invención, fueron pedidos a BioSpring (Frankfurt a. M., Alemania), y fueron recibidos purificados y liofilizados en la cantidad indicada. Estos fueron diluidos en un tampón adecuado, dependiendo del uso experimental. La concentración fue controlada ocasionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño combinada con monitorización UV, pero se descubrió que era correcta en todos los casos.

Ejemplo 2: Vector de virus del herpes aviar:

35 El vector de virus del herpes aviar utilizado para algunos de los experimentos, HVT-F-VP2, estaba basado en HVT, y comprendía el gen F del NDV, así como también el gen VP2 del IBVD, ambos insertados en la región Us2. La construcción del vector, la producción en células, la cuantificación, etc., eran todas como se describe en el documento WO 2013/057.235.

40 Ejemplo 3: Ensayos in vitro de la actividad del agonista de TLR21 aviar:

El uso de la línea de células HEK293 transformada con un receptor TLR21 de pollo, para los ensayos y cualificación de los agonistas de TLR21 aviares candidatos ha sido descrito por ej. en el documento WO 2012/089.800. Sin embargo brevemente: las células HEK293 fueron transfectadas con un plásmido indicador de la activación de NFkappaB: pNiFty2-SEAP (InvivoGen, San Diego, CA, E.E.U.U.). Las líneas celulares clonales fueron seleccionadas, y utilizadas para la transfección con un gen de TLR21 de pollo. Nuevamente se seleccionaron las líneas de células clonales. Estas líneas se utilizaron para la detección de la activación de NFkappaB después de la incubación con diferentes concentraciones de oligodesoxinucleótidos agonistas de TLR21 aviar. La lectura fue por detección colorimétrica de la actividad de SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase (fosfatasa alcalina embrionaria secretada) secretada, mediante espectrofotometría que mide la DO (densidad óptica) a 405 nm. Esta se representó gráficamente como mDO405nm/min, en función de un gradiente de la concentración de agonista. Los resultados relevantes fueron aquellos con un alto índice de formación de color, a una concentración de agonista relativamente baja.

55 Ejemplo 4: Ensayo in vivo de la actividad del agonista de TLR21 aviar sobre la inmunidad inducida por el vector de virus del herpes aviar:

4.1. Introducción

60 Este experimento fue diseñado para ensayar el efecto *in vivo* de un agonista de TLR21: X4-I-minG (EC50 = 1,9 nM) sobre la inmunidad inducida por el vector de virus del herpes aviar en pollos. Se ensayaron en diferentes puntos temporales la administración del agonista de TLR21 a aves vacunadas con el vector, para una cantidad del agonista.

4.2. Materiales y métodos

65

4.2.1. Diseño experimental

Siete (7) grupos de pollos SPF White Leghorn de 1 día de edad (n=25/grupo) fueron vacunados una vez s.c. en la base del cuello con el vector HVT-F-VP2 (que expresa los antígenos NDV-F y IBDV-VP2): grupos 3-9. El grupo 2 fue solamente inyectado s.c. con el agonista de TLR21 en T=0, y el grupo 1 fue el control de prueba no vacunado.

En diversos puntos temporales tras la vacunación se inyectó s.c. un agonista de TLR21 en la base del cuello de acuerdo con el programa de tratamiento para el agrupamiento y la dosificación. Se extrajeron muestras de sangre antes de la vacunación (T=0) de 20 compañeros de incubación por medio de sangrado, y a T=2 semanas post-vacunación de 5 aves escogidas al azar vacunadas/inyectadas de los grupos 2-9 después de lo cual estos 40 animales fueron retirados del experimento, y se formó un nuevo grupo n=20. Los sueros se utilizaron para determinar los títulos de anticuerpos anti-NDV y anti-IBDV. Después de la extracción de sangre, los 25 animales controles no vacunados (grupo 1) fueron divididos al azar en los 8 grupos vacunados/inyectados, es decir 2 animales controles fueron colocados en cada grupo (n=23/grupo; 1 grupo con n=24). Posteriormente todos los animales recibieron por vía intramuscular (i.m.) 0,2 ml (6,0 log₁₀ EID₅₀) de la cepa de NDV Herts 33/56.

4.2.2. Bioseguridad

Los pollos se mantuvieron en aisladores, bajo presión negativa, y con aire filtrado Hepa adentro/afuera, para contener los vectores genéticamente modificados y el virus de prueba virulento.

4.2.3. Materiales del ensayo

agonista de TLR21 aviar: X4-I-minG
 Vacuna con vector: HVT-F-VP2, pasaje 6.
 Material de estimulación: NDV Herts 33/56 vivo, a un título de: 9,6 log₁₀ EID₅₀ por cada ml.
 Dosificación: 1 dosis equivale a 0,2 ml. El agonista de TLR21 fue inyectado a 0,1 µg por dosis

4.2.4. Animales de ensayo:

Gallinas White Leghorn, libres de patógeno específico, de sexo mixto, de 1 día de edad al comienzo del experimento. Los pollos fueron numerados individualmente por etiqueta de ala. Los pollos controles del grupo 1, fueron numerados con una etiqueta de color diferente.

4.2.5. Alimento y Agua

El alimento y el agua estaban disponibles para los animales *ad libitum*.

4.2.6. Agrupamiento y dosificación

Grupo	N.º	Vacuna de vector (0,2 ml s.c. en T=0)	Inyección s.c. de 0,1 ml de X4-I-minG (0,1 µg/dosis) en diferentes puntos temporales post vacunación (p.v.)
1	25	ninguna	ninguna
2	25	ninguna	T=0
3	25	HVT-F-VP2	ninguna
4	25	HVT-F-VP2	T=0 (incorporada en la vacuna)
5	25	HVT-F-VP2	T=1 día p.v.
6	25	HVT-F-VP2	T=3 días p.v.
7	25	HVT-F-VP2	T=6 días p.v.
8	25	HVT-F-VP2	T=8 días p.v.
9	25	HVT-F-VP2	T=10 días p.v.
20 compañeros de incubación fueron sangrados a T=0			

4.2.7. Vacunación

Los animales de los grupos 3-9, fueron vacunados s.c. con 0,2 ml de vacuna de vector en la base del cuello a la edad de 1 día. El grupo 2 fue inyectado solo con 0,1 ml de agonista de TLR21 en T=0.

En diversos puntos temporales post vacunación se inyectó s.c. 0,1 ml de agonista de TLR21 en la base del cuello en los animales de los grupos 5 - 9 de acuerdo con la Tabla de "Agrupamiento y dosificación". Los 25 animales control del grupo 1, los cuales tenían una etiqueta con número de color diferente no fueron vacunados.

4.2.8. Exposición

5 A las 2 semanas post vacunación todos los animales restantes de cada grupo fueron infectados por exposición mediante la inyección de 0,2 ml de NDV Herts 33/56 vivo (6,0 log₁₀ EID₅₀ por pollo) por vía i.m. en el músculo de la pata derecha.

4.2.9. Recogida de muestras de sangre

10 Se tomaron muestras de sangre para serología antes de la vacunación (T=0) de compañeros de incubación por medio de sangrado, y a T=2 semanas pos-vacunación de 5 aves vacunadas/inyectadas escogidas al azar de todos los grupos vacunados/inyectados. Después de la recogida de las muestras de sangre, estos 40 animales (8 grupos de 5 animales) se retiraron del experimento. Todas las muestras de sangre fueron transportadas a un laboratorio para el procesamiento y análisis.

15 Después de la extracción de muestras de sangre, pero antes de la exposición, los 25 animales control no vacunados fueron divididos al azar en los 8 grupos vacunados/inyectados, es decir en cada grupo se colocaron 3 animales control (n=23/grupo, dejando un grupo con n=24) para servir como centinelas.

4.2.10. Observación de signos clínicos.

20 *Pre-exposición:*

25 Los pollos fueron observados diariamente para determinar la presencia de signos clínicos de enfermedad o de otras anomalías, por una persona calificada. Los pollos que mostraban dolor o incomodidad, lo cual fue considerado como de naturaleza no transitoria o con probabilidad de volverse más severo, fueron sacrificados por cuestiones de bienestar de los animales. Los pollos que murieron o que fueron sacrificados antes de la exposición no fueron enviados para el examen post mortem, ya que no se produjeron mortalidades elevadas o inesperadas.

30 *Post-exposición:*

Durante 14 días post-exposición a todos los pollos de todos los grupos se les puntuó diariamente en función de la aparición de evidencia clínica de infección o mortalidad por NDV. La información fue registrada por cada animal en formularios especiales. Se utilizó el siguiente sistema de puntuación:

- 35 0. Sin aparición de evidencia clínica de enfermedad de Newcastle.
- 1. Aparición de evidencia clínica de enfermedad de Newcastle, con signos del sistema nervioso central tales como espasmo clónico, temblores musculares, tortícolis, opistotonos, o parálisis de patas o alas.
- 40 2. Mortalidad causada por la exposición a NDV. En caso de que los animales fueran sacrificados por cuestiones de bienestar de los animales, esto era indicado en el formulario.

4.3. Resultados

Gr.	N.º	Vacuna de vector (0,2 ml s.c. en T=0)	Inyección s.c. de 0,1 ml de X4-I-minG (0,1 µg/dosis) en diferentes puntos temporales post vacunación (p.v.)	% supervivencia a las 2 s.p.v.
1	20	--	ninguna	ninguna
2	20	--	T=0	ninguna
3	20	HVT-F-VP2	ninguna	20
4	20	HVT-F-VP2	T=0 (incorporada en la vacuna)	35
5	20	HVT-F-VP2	T=1 día p.v.	20
6	20	HVT-F-VP2	T=3 días p.v.	45
7	20	HVT-F-VP2	T=6 días p.v.	30
8	20	HVT-F-VP2	T=8 días p.v.	25
9	20	HVT-F-VP2	T=10 días p.v.	10

45 4.4. Conclusiones:

50 La administración de un agonista de TLR21 aviar, en forma simultánea con, o poco después de la administración de un vector de virus del herpes aviar proporcionó una aceleración significativa de la respuesta inmunitaria contra el antígeno heterólogo que fue expresado y administrado por el vector. Esto queda demostrado por el porcentaje de

supervivientes de una infección severa por exposición al NDV, que se administró en forma bastante temprana, es decir a las dos semanas, después de la vacunación con vectores.

5 Si bien ninguno de los pollos que sobrevivieron que no fueron vacunados (grupo 1) o que recibieron solamente el agonista (grupo 2), y solamente 20 % de los vacunados con vector (grupo 3) sobrevivió, la supervivencia de los vacunados que recibieron tanto el vector como el agonista era mucho mayor, proporcionando 30, 35 e incluso 45 % de supervivientes a la exposición (grupos 4, 6, y 7). El 15 % de supervivencia en el grupo que recibió el agonista a los 2 días p.v. (grupo 5) es probablemente el resultado de una variabilidad en el ensayo. Después de 8 días p.v. el agonista ya no pudo acelerar la respuesta inmunitaria al antígeno heterólogo expresado por el vector (grupo 9).

10 Por lo tanto, el agonista solo no pudo inducir una inmunoprotección. Asimismo, en este momento temprano después de la vacunación, la vacuna de vector sola había establecido solamente una inmunidad modesta contra el antígeno de NDV-F. Sin embargo, con la administración combinada del vector y el agonista, se pudo lograr un comienzo temprano de la inmunidad, dando como resultado un índice de supervivencia a la exposición de más del doble.

15 Ejemplo 5: Ensayo in vivo adicional de la actividad agonista de TLR21 aviar sobre la inmunidad inducida por vector de virus del herpes aviar:

20 Se llevó a cabo un ensayo en animales adicional en pollos, esencialmente de la misma manera como se describe en el Ejemplo 4, pero con algunas modificaciones: la diferencia principal fue que todas las vacunaciones comprendían tanto el vector de virus del herpes aviar como el oligodesoxinucleótido en la misma inoculación y, por lo tanto, se administraron al mismo tiempo (día 0).

25 Otras variaciones del protocolo del Ejemplo 4 fueron que se utilizó otro agonista de TLR21 aviar: X4-pent (SEQ ID NO: 4) (EC50 = 430 pM), y que este agonista fue ensayado en tres cantidades/dosis diferentes.

5.1. Resultados:

Gr.	No.	Vacuna de vector	Cantidad de X4-pent	% de supervivencia a 2 s.p.v.
1	20	ninguna	ninguna	Ninguno
2	20	HVT-F-VP2	ninguna	10
3	20	HVT-F-VP2	0,1 µg	45
4	20	HVT-F-VP2	1,0 µg	20
5	20	HVT-F-VP2	20 µg	20

30 5.2. Conclusiones:

Nuevamente, la adición de un agonista de TLR21 aviar demostró una aceleración significativa de la respuesta inmunitaria contra el antígeno heterólogo expresado y administrado por el vector de virus del herpes aviar: a las dos semanas posteriores a la vacunación, hasta un 45 % de los animales vacunados que recibieron tanto la vacuna de vector como el agonista (grupo 3) fueron protegidos contra una infección por exposición a NDV severa. Aunque ninguno de los pollos no vacunados estaba protegido (grupo 1), y solamente 10 % de los animales vacunados recibieron solamente la vacuna de vector (grupo 2).

40 Hay que destacar que las cantidades más elevadas del agonista por cada dosis (1 o 20 µg - grupos 4 y 5) no mejoraron la aceleración de la inmunidad, ya que ambas proporcionaron menos aceleración de la inmunidad que la cantidad más baja de 0,1 µg por cada dosis de animal (grupo 3).

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> Intervet International BV

<120> Aceleración de la respuesta inmunitaria inducida por virus de vector en aves

50 <130> 23553

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

55 <210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 745 275 T3

	<220> <223> X4-I-minG	
5	<400> 1 gggggggtttc gtttttttctg tttttctgtt	30
10	<210> 2 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> X4-Li8	
	<400> 2 gggggggttcg tttttttctg tttttttctg ttggggg	37
20	<210> 3 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> X4-Bo9	
	<400> 3 gggggggtttt tttttctgtt tctttttctg ttttttttgg ggg	43
30	<210> 4 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> X4-pent	
40	<400> 4 gggggggttcg ttttctgttt cgttttctgtt ttcggtgggg g	41
45	<210> 5 <211> 47 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> X4-III-trip	
	<400> 5 gggggggtttt tctgtttttt tttctgtttt tttttctgtt ttggggg	47
55	<210> 6 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> X4-IIq3-5	
	<400> 6 gggggggtttt cgtttttttt cgtttttttt cgtttttttt cgtttt	46
	<210> 7 <211> 36	

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> X4-pent-3min5G	
	<400> 7 gggggggttcg ttttcgtttt cgttttcggtt ttcggt	36
10	<210> 8 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> X4-II-minG	
20	<400> 8 gggggggtttt cgtttttttt cgtttttttt cgtttt	36
25	<210> 9 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> X43-tri3g	
	<400> 9 gggggggttcg tcttcgtctt cgtcggg	27
35	<210> 10 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> X43-quad	
	<400> 10 gggggggttcg tcttcgtctt cgtcttcgta ggggg	35
45	<210> 11 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> X43-pent	
	<400> 11 gggggggttcg tcttcgtctt cgtcttcgta ttcgtcgggg g	41
55	<210> 12 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> X43-II-5732	
	<400> 12 gggggggtttt tcgtcttttt tcgtcttttt tcgtcttgg	39

ES 2 745 275 T3

5	<210> 13 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> X23N-6	
10	<400> 13 gggggggtcg tcgtcgtcgt cgtcg	25
15	<210> 14 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> X23-quad	
20	<400> 14 gggggggtcg tcgtcgtcgt cgtcgtcgtc ggggg	35
25	<210> 15 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> X23n-8	
30	<400> 15 gggggggtcg tcgtcgtcgt cgtcgtcgtc g	31
35	<210> 16 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> X23N-12	
45	<400> 16 gggggggtcg tcgtcgtcgt cgtcgtcgtc gtcgtcgtcg tcg	43
50	<210> 17 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> X23-pent	
55	<400> 17 gggggggtcg tcgtcgtcgt cgtcgtcgtc gtcgtcgggg g	41

REIVINDICACIONES

1. Vacuna que comprende un vector de virus del herpes aviar, un oligodesoxinucleótido y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el vector de virus del herpes aviar comprende una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica un antígeno de un microorganismo que es patógeno para las aves, en donde el oligodesoxinucleótido es un agonista del receptor tipo Toll (TLR) 21 aviar y en donde el agonista del receptor TLR21 tiene la fórmula general:

5'
10 5'- [N1]x [N7]r {N3 [N4]p C G [N5]q N6}n [N8]s [N2]z -3',
en la que:

- 15 N1 = C o G,
- N2 = C o G,
- N3 = T, C o G,
- N4 = C o T, siempre que cuando N3 = C, entonces N4 = T,
- N5 = C o T,
- N6 = A, T, G o C,
- 20 N7 = A, T, C o G,
- N8 = A, T, C o G,
- x = 3-10,
- n = 2-100,
- z = 0-10,
- r = 0-8, siempre que cuando N7 = T, entonces r = 1-25,
- 25 p = 1-6, siempre que cuando N4 = T, entonces p = 1-25,
- q = 1-6, siempre que cuando N5 = T, entonces q = 1-25, y
- s = 0-8, siempre que cuando N8 = T, entonces s = 1-25.

2. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el vector de virus del herpes aviar es uno o más seleccionados de entre: virus de la enteritis del pato, virus de la laringotraqueítis infecciosa, del herpes de los pavos, virus de la enfermedad de Marek serotipo 2, y virus de la enfermedad de Marek serotipo 1.

3. Método para la preparación de una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende la combinación de un vector del herpes aviar y un agonista de TLR21 como se describe en las reivindicaciones 1 - 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

4. Composición que comprende un vector de virus del herpes aviar y un agonista de TLR21 como se describe en las reivindicaciones 1-2.

5. Vacuna para aves que comprende una composición de acuerdo con la reivindicación 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

6. Método para la preparación de una vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende la combinación de una composición de acuerdo con la reivindicación 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 4, para la fabricación de una vacuna para aves.

8. Un agonista de TLR21 como se describe en la reivindicación 1, para su uso en la aceleración de la respuesta inmunitaria en aves contra un antígeno heterólogo expresado por un vector de virus del herpes aviar como se describe en la reivindicación 2.

9. Un agonista de TLR21 como se describe en la reivindicación 1, para su uso en un método de vacunación de aves, para acelerar la respuesta inmunitaria en aves contra un antígeno heterólogo expresado por un vector de virus del herpes aviar como se describe en la reivindicación 2