(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 784 336**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/255 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2016 PCT/EP2016/051871**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16120421**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2016 E 16702091 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3250234**

(54) Título: **MDV1 recombinante y sus usos**

(30) Prioridad:

29.01.2015 EP 15305102

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

ISHIHARA, YUKARI;
ESAKI, MOTOYUKI y
SAITOH, SHUJI

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 784 336 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

MDV1 recombinante y sus usos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a los virus recombinantes y a sus usos. Más particularmente, la invención se refiere a ciertos nuevos virus recombinantes con serotipo 1 de la enfermedad de Marek, y a su uso para expresar o administrar polipéptidos de interés en animales, particularmente aves de corral. La invención es particularmente adecuada para vacunar a aves de corral contra a ciertos patógenos de aves.

Antecedentes de la invención

La carne y los huevos de las aves de corral son fuentes alimenticias importantes cuyo consumo aumenta continuamente debido al crecimiento de la población humana y a su excelente relación calidad-precio. La reciente epidemia de influenza aviar centró la opinión pública en la salud de las aves de corral, así como en la seguridad alimentaria. La tecnología de vacunas avícolas se volvió entonces una preocupación mundial.

Los virus recombinantes que expresan proteínas patógenas se usan comúnmente como vacunas avícolas contra determinados patógenos específicos. Las vacunas, que incluyen a dichos virus, inducen la expresión de proteínas patógenas extrañas o fragmentos de las mismas dentro de las células infectadas, que posteriormente pueden inducir una inmunidad humoral específica y protectora, así como una cierta inmunidad mediada por células.

Se sabe que diversos virus pueden sobrevivir en el cuerpo de un animal infectado en un estado de infección latente o persistente. En consecuencia, dichos virus, en los que se ha integrado un gen ajeno derivado de un patógeno, se desarrollan de forma que son utilizados como vacunas con vectores virales que aumentan la duración de la inmunidad en los animales inmunizados. Estos vectores virales (o virus recombinantes) se basan típicamente en el virus de la varicela aviar, tales como la viruela aviar (documento EP-A-0.517.292), el virus del herpes, particularmente el HVT (p. ej., documentos WO-A-87/04463, 5.980.906, 5.853.733), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) o los adenovirus aviares. Estos virus aviarios recombinantes muestran niveles variables de protección. En particular, debido a que los virus de la varicela aviar, el NDV y los adenovirus no perviven en los pollos, no se espera que la inmunidad sea de larga duración. Un HVT recombinante que expresa IBDV VP2 ha mostrado ventajas respecto a las vacunas de IBD clásicas (Vectormune® IBD). Otros vectores HVT de interés expresan antígenos NDV (Vectormune® ND) o ILTV (Vectormune® LT).

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

Se han desarrollado vectores HVT multivalentes que pueden expresar dos péptidos antigénicos distintos (véase el documento PCT / EP2013 / 056839) y, potencialmente, superar las limitaciones de la técnica anterior. Además, se están explorando nuevos serotipos virales con el objetivo de encontrar vectores virales compatibles alternativos. A este respecto, el MDV1 se ha utilizado experimentalmente, pero los virus recombinantes generados hasta el momento no han proporcionado resultados satisfactorios.

Por consiguiente, todavía existe la necesidad de nuevos enfoques alternativos para mejorar la vacunación en animales, particularmente en aves de corral, que permitan una expresión estable de proteínas y, preferiblemente, la protección concomitante contra varias enfermedades.

Compendio de la invención

La presente invención describe nuevos virus recombinantes adecuados para inducir una fuerte protección inmune en animales y que, además, pueden usarse en combinación con otras vacunas virales para obtener una cierta inmunidad ampliada. La presente invención se refiere más específicamente a nuevos virus recombinantes de la enfermedad de Marek del serotipo 1 ("rMDV1"). La invención describe nuevas regiones genéticas dentro del genoma MDV1 que permiten la clonación efectiva y la expresión estable de genes ajenos.

Un objeto de la invención se basa entonces en un serotipo 1 del virus recombinante de la enfermedad de Marek (rMDV1) que comprende un gen ajeno en su genoma, como se define en las reivindicaciones.

Como se describe en la sección experimental, tales construcciones permiten una expresión muy superior y la inducción de una fuerte inmunidad protectora. Además, los virus de la invención pueden usarse en combinación con otros virus tales como el HVT sin interferencia cruzada, causando así una inmunidad prolongada.

Un objeto más de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende el genoma de un rMDV1 como se definió anteriormente.

La invención también se refiere 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 tales células, que comprende una molécula de ácido nucleico o un plásmido o un virus como se definió anteriormente.

Un objeto adicional de la invención es un método para producir o replicar un rMDV1 que comprende infectar una célula competente con una molécula de ácido nucleico o con un rMDV1 como se definió anteriormente y recuperar el rMDV1.

Un objeto adicional de la invención es un método para producir un rMDV1 que expresa un gen ajeno, comprendiendo el método insertar el gen ajeno en una región genética no traducida del genoma, preferiblemente ubicada entre MDV010 y MDV016, entre MDV033 y MDV034, entre MDV071 y MDV072, o entre MDV096 y MDV097.6.

Otro objeto de la invención se basa en una composición que comprende un rMDV1 o un ácido nucleico como se definió anteriormente y un excipiente o vehículo farmacéuticamente o veterinario aceptable.

Un objeto adicional de la invención se refiere a una composición de vacuna que comprende un rMDV1 o un ácido nucleico como se definió anteriormente, un excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable y, opcionalmente, un adyuvante adecuado. Dicha vacuna se puede usar, por ejemplo, para inmunizar a animales aviares, como las aves de corral.

Otro objeto de la invención reside en un rMDV1 o composición o vacuna como se definió anteriormente para su uso para vacunar un ave, preferiblemente un pollo.

Otro objeto de la invención se basa en un rMDV1 o una composición o vacuna como se definió anteriormente para su uso para inducir o estimular una respuesta inmune en un ave, preferiblemente un pollo.

Un objeto adicional de la invención es un MDV1 recombinante como se definió anteriormente para usar en combinación con otro virus herpes recombinante de un serotipo distinto y que exprese un antígeno distinto para vacunar un ave, preferiblemente un pollo, por administración simultánea, separada, secuencial o alternada.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para vacunar a un animal que comprende administrar a dicho animal una composición, vacuna o virus como se definió anteriormente.

En otro aspecto, la invención describe un método para inducir una respuesta inmunogénica o protectora en un animal contra uno o más patógenos aviarios que comprende administrar a dicho animal una composición, vacuna o virus como se definió anteriormente.

La invención proporciona además un kit de vacunación para inmunizar una aviar que comprende una cantidad eficaz de una vacuna de la invención y medios para administrar dicha vacuna a dicha aviar.

La invención puede usarse para expresar un polipéptido en cualquier animal, preferiblemente para la vacunación de un ave, y es adecuada para expresar uno o varios polipéptidos o péptidos, particularmente péptidos inmunogénicos de patógenos aviarios. El MDV1 recombinante de la invención es preferiblemente una cepa de Rispens.

Leyenda de las figuras

La Figura 1 ilustra un diagrama esquemático del genoma de Rispens y la ubicación de la región clonada de Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinante, incluido el sitio de inserción.

La Figura 2 muestra un diagrama del genoma recombinante Rispens / rpsLneo-DsRed2 que indica las ubicaciones de la unión 1, la unión 2 y la unión 3 amplificadas en reacciones de PCR para confirmar las estructuras genómicas de los virus.

La Figura 3 es un ensayo de transferencia Western que detecta la expresión de la proteína DsRed2 por los virus Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinantes.

La Figura 4 ilustra la cinética de crecimiento de Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinante o Rispens parental.

La Figura 5 ilustra el tamaño de placa promedio de Rispens recombinante / rpsLneo-DsRed2 o Rispens parental.

La Figura 6 ilustra un diagrama esquemático del genoma de Rispens y la ubicación de la región clonada de Rispens / IBD recombinante, incluido el sitio de inserción.

La Figura 7 muestra un diagrama del genoma recombinante de Rispens / IBD que indica las ubicaciones de la unión 4 y la unión 5 amplificadas en reacciones de PCR para confirmar las estructuras genómicas de los virus.

La Figura 8 es un ensayo de transferencia Western que detecta la expresión de la proteína VP2 de IBDV por los virus Rispens / IBD recombinantes.

La Figura 9 ilustra los títulos de ELISA de IBDV en pollos blancos de Leghorn comerciales vacunados con Rispens / IBD recombinante utilizando un kit de ELISA de IBD comercial.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere de forma general a un rMDV1 que comprende una o varias secuencias de genes ajenos ubicados en sitios de inserción particulares dentro del genoma. La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden dicho rMDV1, así como al uso de las mismas para la vacunación de animales, particularmente aves de corral.

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

Definiciones

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

El término "recombinante" designa a una molécula que ha sido creada, diseñada o modificada utilizando tecnologías genéticas. En relación con un virus, el término "recombinante" designa, más específicamente, a un virus cuyo genoma (o genoma de antepasado) se ha modificado mediante la inserción de, al menos, un ácido nucleico ajeno, es decir, un ácido nucleico (p. ej., ADN) que no se encuentra de forma natural en el genoma del virus, o que se encuentra de forma natural en dicho genoma pero en una forma diferente o en una posición diferente.

En la presente descripción, la expresión "ácido nucleico" o "ácidos nucleicos" designa a cualquier molécula de ácido nucleico, tal como el ácido desoxirribonucleótido (ADN) o ribonucleótido (ARN), que puede ser, por ejemplo, monocatenario o bicatenario. Los ácidos nucleicos pueden comprender un ORF, o no. Las moléculas de ácido nucleico pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como síntesis artificial, tecnología recombinante, tecnología enzimática, replicación en células huésped o combinaciones de las mismas.

"Gen" designa a una molécula o secuencia de ácido nucleico que comprende un marco de lectura abierto que codifica un producto, tal como un polipéptido (por ejemplo, un péptido, una proteína, etc.) o un ARN.

La expresión "región genética no traducida", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una región en una secuencia o molécula de ácido nucleico que no es parte de una secuencia codificante. La expresión "región genética no traducida", tal y como se usa en el presente documento, abarca regiones no codificantes en el genoma viral, pero no abarca las ORF.

El término "aviar" pretende abarcar todo tipo de aves, tales como los pájaros de la clase Aves, es decir, animales vertebrados que tienen plumas, alas, bípedos, endotérmicos y huevos. En el contexto de la invención, las aves y las especies aviares se refieren, más particularmente, a aves que proporcionan intereses económicos y / o agronómicos, como las aves de corral (tales como los pollos y los pavos), aves acuáticas (como los patos y los gansos) y aves ornamentales (tales como los cisnes y las psitacinas).

El término "vacuna", tal como se usa en el presente documento, designa a un agente que puede usarse para causar, estimular o amplificar una respuesta inmune en un organismo.

Una "respuesta inmune" designa al desarrollo en un huésped de una respuesta inmune celular y / o mediada por anticuerpos frente a una composición o vacuna de interés. Normalmente, la "respuesta inmune" incluye la producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares y / o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, la respuesta inmune es protectora de manera que se mejorará la resistencia frente a la nueva infección y / o se reducirá la gravedad clínica de la enfermedad.

Virus de la enfermedad de Marek con Serotipo 1

Los virus de la enfermedad de Marek con serotipo 1 son virus del herpes aviar. Pertenecen a un grupo más grande de virus de la enfermedad de Marek, entre los que destacan el serotipo 2 y el serotipo 3, HVT. Aunque los HVT se han estudiado ampliamente, el MDV1 está menos caracterizado. En particular, se ha hecho mucho menos uso de este virus y hay pocos informes de recombinantes adecuados del mismo. A este respecto, los intentos anteriores de usar este virus esencialmente intentaron clonar una secuencia ajena dentro de un gen (por ejemplo, UL43) o dentro de un dominio regulador (por ejemplo, IR larga) del genoma. Sin embargo, tales recombinantes no dieron como resultado la generación de una expresión estable o potente. Por ese motivo, MDV1 ha atraído menos atención que otros virus como, por ejemplo, el HVT.

Los presentes inventores han realizado otras investigaciones con el MDV1 y han conseguido generar recombinantes estables. Más particularmente, los inventores han descubierto que se pueden generar recombinantes estables cuando una secuencia ajena se clona en una región genética no traducida del genoma. Con tales recombinantes, se puede lograr una fuerte expresión de genes ajenos in vitro, y se puede obtener una respuesta inmune protectora muy potente (hasta 100% de protección) in vivo. Tales nuevos recombinantes representan, por lo tanto, vectores muy valiosos para la transferencia y expresión de genes in vivo, particularmente en aves de corral, lo más preferiblemente para propósitos de vacunación.

La presente invención se refiere así a MDV1 recombinante que comprende un ácido nucleico ajeno clonado en una región genética no traducida, como se define en las reivindicaciones.

El rMDV1 de la invención puede prepararse a partir de cualquier MDV1, preferiblemente a partir de serotipos o cepas que no son patogénicas para las especies de animales diana (por ejemplo, aves). Se han dado a conocer varias cepas del MDV1, que están disponibles en colecciones públicas, como la cepa CVI988 / Rispens, la cepa C2 y la cepa R2 / 23.

En una realización preferida, el rMDV1 es una cepa Rispens MDV1, más preferiblemente una cepa CVI988 (ver genoma completo; GenBank: DQ530348.1; Spatz et al, Journal of General Virology (2007), 88, 1080-1096), o cualquier MDV1 que tenga al menos un 90% de identidad de secuencia con la cepa CVI988, más preferiblemente al menos un 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%.

El ácido nucleico ajeno puede clonarse en cualquier región genética no traducida del genoma MDV1 seleccionado a partir de alguna región genética no traducida ubicada entre MDV010 y MDV011, entre MDV015.5 y MDV016, MDV033 y MDV034, entre MDV071 y MDV072, o entre MDV096 y MDV097.6 del genoma. De hecho, la invención muestra que estas regiones particulares no traducidas representan sitios potentes para la inserción de ácidos nucleicos sin impedir la replicación viral y la infección efectivas, y permitiendo la expresión efectiva in vivo de productos de interés.

Más preferiblemente, el ácido nucleico ajeno se encuentra en una región genética no traducida ubicada entre MDV010 y MDV011, entre MDV015.5 y MDV016, o entre MDV071 y MDV072.

La región genética no traducida ubicada entre MDV010 y MDV011 corresponde típicamente a los nucleótidos nt17324 a nt17878 del genoma de MDV1. La clonación puede realizarse en cualquier posición dentro de dicho dominio, más preferiblemente entre nt17500 y nt17850, más preferiblemente entre nt17700 y nt17800. En una realización específica, la clonación se realiza entre nt17745 y nt17746 (por ejemplo, RR043 y rRispens / MDV010 / rpsLneo-DsRed2).

La región genética no traducida ubicada entre MDV015.5 y MDV016 corresponde típicamente de nt21940 a nt22256 del genoma de MDV1. La clonación puede realizarse en cualquier posición dentro de dicho dominio, más preferiblemente entre nt22000 y nt22200, más preferiblemente entre nt22050 y nt22150. En una realización específica, la clonación se realiza entre nt22097 y nt22098 (por ejemplo, RR044 y rRispens / MDV015 / rpsLneo-DsRed2).

La región genética no traducida ubicada entre MDV033 y MDV034 corresponde típicamente de nt52797 a nt52942 del genoma de MDV1. La clonación puede realizarse en cualquier posición dentro de dicho dominio, más preferiblemente entre nt52800 y nt52950, más preferiblemente entre nt52850 y nt52950. En una realización específica, la clonación se realiza entre nt52897 y nt52898 (por ejemplo, RR045 y rRispens / MDV033 / rpsLneo-DsRed2).

La región genética no traducida ubicada entre MDV071 y MDV072 corresponde típicamente de nt123273 a nt123904 del genoma de MDV1. La clonación puede realizarse en cualquier posición dentro de dicho dominio, más preferiblemente entre nt123400 y nt123800, más preferiblemente entre nt123500 y nt123700. En una realización específica, la clonación se realiza entre nt123621 y nt123622 (por ejemplo, RR046 y rRispens / MDV071 / rpsLneo-DsRed2).

La región genética no traducida ubicada entre MDV096 y MDV097.6 corresponde típicamente de nt165464 a nt166202 del genoma de MDV1. La clonación puede realizarse en cualquier posición dentro de dicho dominio, más preferiblemente entre nt165500 y nt166000, más preferiblemente entre nt165700 y nt165800. En una realización específica, la clonación se realiza entre nt165753 y nt165754 (por ejemplo, RR047 y rRispens / MDV096 / rpsLneo-DsRed2).

Debe observarse que todo experto en la técnica puede identificar, a partir de cualquier cepa MDV1, las posiciones correspondientes del sitio de clonación por mera alineación de secuencias.

El ácido nucleico ajeno puede clonarse en el MDV1 en reemplazo de toda o una porción (por ejemplo, de 1 a 500nt) de la región genética no traducida, o sin deleción de dicha región genética no traducida.

Además, los rMDV1 de la invención pueden comprender varios genes ajenos.

En los rMDV1 de la invención, el gen ajeno generalmente está bajo el control de un promotor transcripcional. Preferiblemente, el promotor se clona con el gen ajeno. El promotor puede ser cualquier promotor natural o sintético, derivado de genes celulares o virales. Los ejemplos de promotores adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor de beta-actina (Bac) de pollo o un derivado del mismo como Coa5, el promotor de Pec, el promotor 1 del citomegalovirus murino (Mcmv) inmediato-temprano (ie), el promotor de citomegalovirus humano (Hcmv), el promotor del virus 40 Simian (SV) y el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), o cualquier fragmento de estos que retenga actividad promotora.

La construcción y clonación de virus se puede lograr mediante técnicas conocidas per se en la técnica. La clonación génica y la construcción de plásmidos son bastante conocidas por las persona con habilidad ordinaria en la técnica y pueden realizarse esencialmente mediante técnicas estándar de biología molecular (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, Estados Unidos, 2012). Típicamente, los virus recombinantes pueden prepararse por recombinación homóloga entre el genoma viral y una construcción (por ejemplo, un plásmido de homología) que comprenda el ácido nucleico a insertar, flanqueado por nucleótidos del sitio de inserción para permitir su recombinación. La clonación puede hacerse con o sin la deleción de las 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. Dicha eliminación aumenta la capacidad de clonación del virus.

Para la construcción, la secuencia que contiene la región de inserción dirigida se clona, típicamente, primero en un vector adecuado para producir un vector de homología. 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 pHC79. La secuencia de la región diana se integra en el vector mediante métodos de clonación convencionales. La secuencia de la región diana utilizada tiene preferiblemente una longitud suficiente para permitir la recombinación homóloga in vivo posterior 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 500 y 2000 nucleótidos. El ácido nucleico ajeno (que típicamente contiene un gen y un promotor) se inserta en la región diana clonada en el vector. La inserción se realizará preferiblemente de una manera que deje una porción de la secuencia de la región diana en cada lado del inserto clonado de una longitud suficiente para permitir la recombinación homóloga (por ejemplo, de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de al menos 100 nucleótidos). El ácido nucleico ajeno puede introducirse en la región diana clonada mediante técnicas clásicas tales como enzimas de restricción y procedimientos de ligadura. Si es apropiado, se pueden introducir una o varias mutaciones en un sitio específico de la región diana para crear un nuevo sitio de escisión para alguna enzima de restricción. Pueden usarse técnicas de mutagénesis convencionales reconocidas por los expertos en la técnica para ese propósito, tales como, por ejemplo, mutagénesis in vitro o PCR. Los vectores de homología en los que se ha insertado el ácido nucleico ajeno en la región diana se pueden introducir luego en la célula infectada con MDV1 o en las células transfectadas con el genoma de MDV1 usando técnicas conocidas tales como la electroporación, el método basado en el fosfato de calcio, la lipofectina o similares. Los virus recombinantes se producen por recombinación en dichas células entre el virus y el vector. El virus recombinante resultante puede seleccionarse genotípica o fenotípicamente usando técnicas conocidas, por ejemplo, por hibridación, secuenciación, PCR o un ensayo funcional para detectar cualquier producto codificado por el ácido nucleico ajeno. El virus recombinante seleccionado se puede cultivar a gran escala en un cultivo celular, después del cual, se pueden recuperar los virus recombinantes.

Genes ajenos

El rMDV1 de la invención puede contener cualquier ácido nucleico ajeno, preferiblemente cualquier gen ajeno. El gen ajeno puede codificar cualquier producto de interés, como ARN o proteínas, polipéptidos o péptidos biológicamente activos y / o inmunogénicos (por ejemplo, antigénicos). En una realización preferida, el gen ajeno codifica un antígeno, incluso más preferiblemente un péptido o polipéptido derivado de un antígeno de un organismo patógeno capaz de causar una infección en un animal, particularmente en un ave. Los ejemplos de patógenos que causan infecciones en las aves incluyen los virus, las bacterias, los hongos, los protozoos, etc. El (poli)péptido inmunogénico puede ser (derivado) preferiblemente de una proteína de superficie, una proteína secretada, o una proteína estructural de dicho patógeno, o sus fragmentos. El polipéptido puede derivarse de cualquier fuente, por ejemplo, viral, procariota, eucariota o sintética.

En una realización preferida, el gen ajeno codifica un péptido antigénico de un agente patogénico de ave.

Los ejemplos específicos de agentes patógenos incluyen, entre otros, al virus de influenza aviar, paramixovirus aviar tipo 1, también llamado virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), metapneumovirus aviar, virus de la enfermedad de Marek, virus de la enfermedad de Gumboro, también llamado virus infeccioso de la enfermedad de la bolsa (IBDV), virus infeccioso de la laringotraqueitis (ILVT), virus de la bronquitis infecciosa (IBV), los microorganismos Escherichia coli, especies de Salmonella, Pasteurella multocida, Riemerella anatipestifer, Ornithobacterium rhinotracheale, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, Mycoplasmas que infectan a las especies aviarias.

Preferentemente, el gen ajeno codifica un antígeno seleccionado de la proteína F de NDV, la proteína HN de NDV, la proteína VP2 de IBDV, la proteína gB de ILTV, la proteína 40K de Mycoplasma galisepticum o la proteína de superficie hemaglutinina (HA) del virus de la gripe aviar, o sus fragmentos inmunogénicos. Dentro del contexto de la invención, el término "fragmento" de una proteína designa preferiblemente a un fragmento que comprende al menos 5 residuos de aminoácidos consecutivos de dicha proteína, incluso más preferiblemente de 5-100. En una realización preferida, dicho fragmento comprende al menos un epítopo y / o es inmunogénico in vivo, es decir, puede causar la 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 aminoácidos 1-453 del VP2 completo.

rMDV1 preferidos

Un rMDV1 preferido de la invención comprende al menos un gen ajeno que codifica un antígeno aviar clonado en una región genética no traducida ubicada entre MDV010 y MDV011. Preferiblemente, el antígeno aviar es una proteína VP2, HN o F o un fragmento inmunogénico de la misma.

Otro rMDV1 preferido de la invención comprende al menos un gen ajeno que codifica un antígeno aviar clonado en una región genética no traducida ubicada entre MDV015.5 y MDV016. Preferiblemente, el antígeno aviar es una proteína VP2, HN o F o un fragmento inmunogénico de la misma.

Un rMDV1 preferido de la invención comprende al menos un gen ajeno que codifica un antígeno aviar clonado en una región genética no traducida ubicada entre MDV033 y MDV034. Preferiblemente, el antígeno aviar es una proteína VP2, HN o F o un fragmento inmunogénico de la misma.

Un rMDV1 preferido de la invención comprende al menos un gen ajeno que codifica un antígeno aviar clonado en una región genética no traducida ubicada entre MDV071 y MDV072. Preferiblemente, el antígeno aviar es una proteína VP2, HN o F o un fragmento inmunogénico de la misma.

Un rMDV1 preferido de la invención comprende al menos un gen ajeno que codifica un antígeno aviar clonado en una región genética no traducida ubicada entre MDV096 y MDV097.6. Preferiblemente, el antígeno aviar es una proteína VP2, HN o F o un fragmento inmunogénico de la misma.

Culturas celulares

Los virus recombinantes de la presente invención pueden propagarse en cualquier cultivo celular competente. Después de lograr el crecimiento requerido de los virus, las células pueden separarse de los pocillos usando un raspador o con tripsina y las células infectadas pueden separarse del sobrenadante por centrifugación.

Los ejemplos de células competentes incluyen CEF, huevo embrionado, célula de riñón de pollo y similares. Las células o virus pueden cultivarse en un medio de cultivo tal como MEM de Eagle, medio de cultivo Leibowitz-L-15 / McCoy 5A (mezcla 1:1) a aproximadamente 37ºC durante 3 a 6 días. Las células infectadas se suspenden típicamente en un medio de cultivo que contiene 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) y se almacenan congeladas en nitrógeno líquido.

Composiciones y vacunas

La invención también se refiere a composiciones, tales como vacunas, que comprenden uno o más MDV1 recombinantes de la invención.

Las composiciones de la invención pueden comprender el rMDV1 en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable o veterinario. La composición puede, además o alternativamente, comprender un adyuvante adecuado.

Los rMDV1 de la invención pueden usarse en forma viva (por ejemplo, para preparar vacunas vivas) o, alternativamente, en forma inactivada, atenuada o muerta. La producción de tales formas es conocida en la técnica.

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 pueden obtenerse de cualquiera de una serie de fuentes que incluyen diversas proteínas y péptidos derivados de animales (por ejemplo, hormonas, citocinas, factores coestimuladores) y nuevos ácidos nucleicos derivados de virus y otras fuentes (por ejemplo, ARN bicatenario, CpG) y similares, que se administran con la vacuna en una cantidad suficiente para mejorar 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.

Las vacunas de la presente invención pueden formularse 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 de citrato, Tris (hidroximetil aminometano) (TRIS), solución salina tamponada con Tris y similares, o un antibiótico, por ejemplo, neomicina o estreptomicina, etc.

La vía de administración puede ser cualquier vía, incluida la administración oral, ocular (p. ej., por gotas para los ojos), oculo-nasal usando aerosol, intranasal, cloacal en la alimentación, en agua, o por pulverización, en ovo, tópica o mediante vacunación con inyección (p. ej., intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intraocular, intradérmica y / o intraperitoneal). Los expertos adaptarán fácilmente la formulación de la composición de la vacuna para cada tipo de vía de administración.

Cada dosis de vacuna puede contener una dosis adecuada suficiente para provocar una respuesta inmune protectora en especies de aves. La optimización de dicha dosis es bastante conocida en la técnica. La cantidad de antígeno por dosis puede determinarse mediante métodos conocidos que utilizan reacciones antígeno / anticuerpo, por ejemplo, mediante el método ELISA.

Las vacunas de la invención pueden administrarse como dosis únicas o en dosis repetidas, dependiendo del protocolo de vacunación.

Las vacunas de la presente invención son más ventajosas porque confieren a las especies de aves hasta un 80% de protección contra los patógenos aviarios diana.

La presente invención se refiere además al uso de la vacuna como se describe anteriormente para inmunizar especies de aves, como aves de corral, y al método de inmunización de especies de aves mediante la administración de una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna de acuerdo con la invención. La vacuna puede administrarse ventajosamente por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, oral, in ovo, por administración de la mucosa o por administración oculo-nasal.

La presente invención se refiere además a kits de vacunación para inmunizar especies de aves que comprenden una cantidad eficaz de la vacuna multivalente como se describió anteriormente y un medio para administrar dichos componentes a dichas especies. Por ejemplo, dicho kit comprende un dispositivo de inyección lleno de la vacuna según la invención e instrucciones para la inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular u in ovo. Alternativamente, el kit comprende un dispositivo de pulverización / aerosol o gotas oculares rellenas de la vacuna de acuerdo con la invención e instrucciones para la administración oculo-nasal, la administración oral o la mucosa.

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

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción del casete de expresión rpsLneo-DsRed2

Se construyó un fragmento de ADN de 2,8 kb del casete rpsLneo-DsRed2 mediante reacciones de PCR (Figura 1). Brevemente, se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción de PCR se realizó usando el par de cebadores de SEQ ID NO: 1 (5'-GGCCTGGTGATGATGGCGGGATCGTTGTAT-3') y SEQ ID NO: 2 (5'-CCATGGTGCTGCGCTCAGAAGAACTCGTCA-3') con la plantilla del fragmento sintetizado de rpsLneo (SEQ ID NO: 3). La segunda reacción de PCR se realizó usando un par de cebadores de SEQ ID NO: 4 (5'-ACGAGTTCTTCTGAGCGCAGCACCATGGCC-3') y SEQ ID NO: 5 (5'-TCGGAGGAGGCCATCCTTAAGAGCTGTAAT-3') con el plásmido de plantilla de vectores de expresión de mamíferos pSI (Promega, Nº. Cat E1721). La tercera reacción de PCR se realizó usando un par de cebadores de SEQ ID NO: 6 (5'-TACAGCTCTTAAGGATGGCCTCCTCCGAGA-3') y SEQ ID NO: 7 (5'-GCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAAT-3') con el plásmido de plantilla de pIRES2-DsRed2 (Clontech, Nº. Cat. 632420). Se realizó otra reacción de PCR usando una mezcla de productos de PCR de la primera y segunda reacción de PCR como plantilla y SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5 como cebadores. Este producto de PCR y el producto de PCR de la tercera reacción de PCR se mezclaron y se usaron para la reacción de PCR final con el par de cebadores de SEQ NO.1 y SEQ NO.7, dando como resultado un casete rpsLneo-DsRed2.

Ejemplo 2: Construcción de casetes de inserción

Cinco fragmentos de ADN de casetes rpsLneo-DsRed2 a los que se agregaron secuencias homólogas de regiones intergénicas Rispens MDV010 / 011, MDV015.5 / 016, MDV033 / 034, MDV071 / 072 o MDV096 / 097.6 (50 pb cada una) en ambos extremos 5' y 3' se estas, fueron construidos por reacciones de PCR (Figura 1). Se realizaron cinco reacciones de PCR usando el casete rpsLneo-DsRed2 como plantilla. Los pares de cebadores son SEQ ID NO: 8 (5'-CATCTTCGTATTCGTCACTTGCGAAATGGCCTGGTAATTATAACATTGGGGGCCTGGTGATGATGGCGGG-3') y SEQ ID NO: 9 (5'-CACAATCTCTCACTCCTCAAATTGCATTTTCAGTGCTGTTAAATACATTCGC AGTGAAAAAAATGCTTTA-3') para el sitio de inserción MDV010/011, SEQ ID NO: 10 (5'-ATGAATAAAGTGAGACTTATAATACTTATTGCATAGATGTGTTTTATTACGG CCTGGTGATGATGGCGGG-3') y SEQ ID NO: 11 (5'-TATTATAACATACTTGTAGGTAATAAACAAACTACCCCTGTAAAAGGCAAG CAGTGAAAAAAATGCTTTA-3') para el sitio de inserción MDV015/016, SEQ ID NO: 12 (5'-TACCTGAAATGTGATCGGACTTGGGAAAAATCTTCACGCGAAATAAATTCG GCCTGGTGATGATGGCGGG-3') y SEQ ID NO: 13 (5'-TTTAATGCAAAAATAAATAAAGAACCTTTGGGAATAACAAGCTATGTATAG CAGTGAAAAAAATGCTTTA-3') para el sitio de inserción MDV033/034, SEQ ID NO: 14 (5'-AAAAGTTATTAGTCATGCAAGCATCTGTCAAATAGCAATCACATAATGGAGGCCTGGTGATGATGGCGGG-3') y

SEQ ID NO: 15 (5'-TTTCAATGAGGAGAAGGTTCCCCTCATTATGCAGCTTTGAGGCCTTTGATGC AGTGAAAAAAATGCTTTA-3') para el sitio de inserción MDV071/072, o SEQ ID NO: 16 (5'-GATCCGAAAATATATCATGCAAATAAGCATGTTCTAGCACCACTGCAACAGGCCTGGTGATGATGGCGGG-3') y SEQ ID NO: 17 (5'-TGCTCGGAGGCAATGGTTCAACTATTCTTTCCGGAAATCGATAAACCACAGCAGTGAAAAAAATGCTTTA-3') para el sitio de inserción MDV096/097.6. Los fragmentos de PCR obtenidos se sometieron a electroforesis y se purificaron.

Ejemplo 3: Construcción de Rispens recombinantes que llevan el gen rpsLneo-DsRed2

La construcción de Rispens recombinantes que llevan el gen rpsLneo-DsRed2 se realizó por recombinación homóloga en E. coli. La cepa DH10BE de E. coli que portaba el genoma de Rispens como cromosomas artificiales bacterianos (BAC) se transfectó con 0,1 µg de uno de los casetes de inserción. La transfección se realizó por electroporación usando Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories) a 1,75 kV, 25 µF y 200 ohmios. Después de la transfección, se colocó E. coli en placas de agar Luria-Bertani (LB) y se incubó durante la noche a 30ºC. Los clones de E. coli que llevaban un inserto apropiado con el gen rpsLneo-DsRed2 se identificaron mediante PCR usando cada par de cebadores que amplificaba una región entre el gen rpsLneo-DsRed2 y la región del sitio de inserción del genoma de Rispens (Figura 2). Los cebadores son SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 18 (5'-GTGCGAGATTATTCCTTTTAAGGAATACTC-3') para el sitio de inserción MDV010 / 011, SEQ ID NO: 19 (5'-GGACAAATTTCCTCATATAAGTGGAGAAG-3') para el sitio de inserción MDV015 / 016 , SEQ ID NO: 20 (5'-CGAGAACTGATTGCAGGAGGGAATTCATCC-3') para el sitio de inserción MDV033 / 034, SEQ ID NO: 21 (5'-CATGTAGACATAGACACACAGAATATATCC-3') para el sitio de inserción MDV071 / 072, o SEQ ID NO: 22 (5'-CATCATAGTTGTATGTTCGACGAATTAAGC-3') para el sitio de inserción MDV096 / 097.6, respectivamente. El ADN de Rispens BAC modificado se extrajo de clones de E. coli que llevaban un inserto apropiado y se transfectaron en células CEF usando Nucleofector II (Lonza, Basilea, Suiza). Las células transfectadas se agregaron a L-15 de Leibovitz (Life Technologies Corp., Nº. Cat. 41300-39), Medio de McCoy 5A (Life Technologies Corp., Nº. Cat. 21500-061) (1:1) y suero de ternera al 4% [medio LM (+)], plantado en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos, y luego incubado a 37ºC en 4-5% de CO_2 durante 5-7 días hasta que las placas de Rispens se volvieron visibles.

Ejemplo 4: Verificación de la estructura del genoma

Las estructuras del genoma de Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinantes se verificaron mediante tres regiones de unión amplificadoras de PCR (Unión 1, Unión 2 y Unión 3; Figura 2) en cada extremo de los genes insertados. Los pares de cebadores utilizados en las reacciones de PCR para la Unión 1 se describen en el Experimento 3. Los pares de cebadores utilizados en las reacciones de PCR para la unión 2 son SEQ ID NO: 23 (5'-TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC-3') y SEQ ID NO: 24 (5'-AAATCAGATCGGTTGTCTACTTCGAGTATG-3') para rRiepens / MDV010 / rpsLneo-DsRed2, SEQ ID NO: 25 (5'-AGACTATATGCTTTTCTTGAATACGACTAG-3') para rRiepens / MDV015 / rpsLneo-DsRed2, SEQ ID NO: 26 (5'-TAAAGACATTGATCCCATAGACGTCGCG-3') para rRiepens / MDV033 / rpsLneo-DsRed2 , SEQ ID NO: 27 (5'-AGACATGTAAAATGGTTGTACTGAAATTCG-3') para rRiepens / MDV071 / rpsLneo-DsRed2, o SEQ ID NO: 28 (5'-ACTGATATGTACATATTTAAACTTAATGGG-3') para rRispens / MDV096 / rpsLneo-DsRed2, respectivamente. Para la unión 3, se utilizan SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 24 (rRispens / MDV010 / rpsLneo-DsRed2), SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 25 (rRispens / MDV015 / rpsLneo-DsRed2), SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 26 (rRispens / MDV033 / rpsLneo-DsRed2), SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 27 (rRispens / MDV071 / rpsLneo-DsRed2), o SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 28 (rRispens / MDV096 / rpsLneo-DsRed2), respectivamente. Los tamaños esperados de los productos de PCR se observaron con todos los Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinantes, lo que confirma que estos Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinantes tienen las estructuras genómicas esperadas.

Ejemplo 5: Expresión de DsRed2 por Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinante

La expresión de la proteína DsRed2 por el Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinante se confirmó por excitación para DsRed2 o ensayo de transferencia Western. La excitación para DsRed2 se realizó usando células CEF infectadas con Rispens recombinante. Brevemente, las células CEF en placas de 6 pocillos se infectaron con uno de los virus recombinantes o la cepa Rispens original a una multiplicidad de infección de aproximadamente 0,001. Cinco días después de la inoculación, las células se excitaron a 563 nm. La fluorescencia roja solo se observó en las placas de Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinante. Estas células infectadas con el Rispens original o uno de los virus recombinantes también se usaron para el ensayo de transferencia Western. Brevemente, las células se cultivaron con tripsina y se centrifugaron a 913 x g durante 5 minutos. El sedimento se lavó con PBS y se resuspendió con 50 µl de PBS. Después de agregar el mismo volumen de 2 x tampón de muestra SDS (Tris-Cl 130 mM (pH 6,8), SDS al 6%, glicerol al 20%, 2-mercaptoetanol al 10% y azul de bromo fenol al 0,01%), la suspensión celular se hirvió durante 5 minutos. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE usando gel de poliacrilamida al 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore). La membrana se secó completamente y luego se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-DsRed (Anticuerpo monoclonal DsRed de Living Colors®, TaKaRa). Después de lavar el anticuerpo monoclonal anti-DsRed, la membrana se incubó con anticuerpo IgG biotinilado anti-ratón (Vector Laboratories, Nº. Cat. BA-9200) y luego con el kit VECTASTAIN ABC-AP (Vector Laboratories, Nº. Cat.

AK-5000). La proteína unida con el anticuerpo monoclonal anti-DsRed se visualizó mediante la adición de una solución de NBT / BCIP (Roche Applied Science, Nº. Cat. 1681451).

Como se muestra en la Figura 3, las bandas de proteínas de 26 kilodaltons (kDa), que era el tamaño esperado de la proteína DsRed2, solo se observaron en los carriles con las células infectadas con el virus recombinante.

Ejemplo 6: Cinética de crecimiento y morfología de placa de Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinante

Se compararon la cinética de crecimiento y la morfología de la placa de Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinante y Rispens parental. Brevemente, 9,5 x 10^5 células de CEF y 950 unidades formadoras de placa de alguno de los virus Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinantes o la cepa Rispens original se sembraron en placas de 6 pocillos. Las células se cultivaron durante 0, 24, 48, 72, 96, 120 o 144 horas. Las células se tripsinizaron y se resuspendieron en 1 ml de medio LM, y se valoraron inmediatamente por ensayo en placa. Para el ensayo en placa, las células CEF se infectaron con diluciones en serie de diez veces de células tripsinizadas. Cuatro días después, las placas se visualizaron mediante un ensayo de placa negra. Brevemente, las células se fijaron con mezcla de metanol:acetona (1:2) y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-Rispens 2BN90 (AVIAN DISEASES 37: 561-567, 1993). A continuación, se incubaron con el anticuerpo IgG anti-ratón biotinilado y luego con el kit VECTASTAIN ABC-AP, las placas de Rispens se tiñeron mediante la adición de una solución de NBT / BCIP. Los números de las placas se contaron macroscópicamente y el tamaño promedio de cincuenta placas se calculó utilizando el programa cellSens standard (OLYMPUS) para determinar la morfología de la placa.

Como se muestra en las Figuras 4 y 5, todos los virus Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinantes de la invención crecieron de manera comparable a los Rispens parentales.

Ejemplo 7: Análisis de estabilidad in vitro de Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinante

La estabilidad in vitro de Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinante se analizó utilizando células CEF. Brevemente, las células CEF en placas de 6 pocillos se infectaron con uno de los virus recombinantes Rispens / rpsLneo-DsRed2 en una multiplicidad de infecciones de aproximadamente 0,001. De tres a cuatro días después de la infección, las células infectadas se tripsinizaron y se transfirieron a nuevas placas de 6 pocillos con células CEF. Las células infectadas se pasaron quince veces, y las estructuras del genoma y la expresión de DsRed2 se confirmaron cada cinco pases. Las estructuras del genoma se analizaron mediante regiones de unión amplificadoras de PCR (unión 1, unión 2 y unión 3; figura 2). Los pares de cebadores utilizados se muestran en el ejemplo 4. Los tamaños esperados de los productos de PCR se observaron con todos los Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinantes en todos los pases. De acuerdo con este resultado, la expresión de DsRed2 de todas las placas de Rispens / rpsLneo-DsRed2 recombinante en todos los pases se confirmó por microscopía de fluorescencia.

Ejemplo 8: Construcción del MDV1 recombinante RR043

El RR043 es un virus MDV1 recombinante de la invención en el que un antígeno VP2 bajo el control de un promotor sintético Coa5 se clona entre MDV010 y MDV011 (RR043: Rispens / MDV010 / Coa5-VP2stc).

Para la construcción del virus, primero se construyó un vector de homología y luego se usó para generar el virus mediante recombinación homóloga. Las construcciones de plásmidos y la manipulación de ADN se realizaron esencialmente de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU., 2012).

Construcción de pUC18-MDV010-SfiI

Un fragmento de ADN de 1,2 kb del genoma de Rispens que flanqueaba el sitio de inserción deseado (región intergénica de MDV010 / 011 que contiene las regiones MDV010 y MDV011) se clonó mediante reacciones de PCR añadiendo un sitio de reconocimiento SfiI en el sitio de inserción (Figura 6). Brevemente, usando ADN extraído de Rispens como plantilla, se realizaron dos reacciones de PCR. Los pares de cebadores utilizados son SEQ ID NO: 29 (5'-GCGCATGCGCACGCATATAGATCGAAC-3') y SEQ ID NO: 30 (5'-CGGCCAATAAGGCCCCCAATGTTATAATTA-3'), y SEQ ID NO: 31 (5'-GCGAATTCATAACAGAATGTCACGATAAAG-3'), y SEQ ID NO: 32 (5'-GGGCCTTATTGGCCGAATGTATTTAACAGC-3'). Se realizó otra reacción de PCR usando una mezcla de productos de PCR de las dos reacciones de PCR anteriores como plantilla y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 31 como cebadores. Un fragmento de PCR obtenido se clonó en el vector pUC18 (GenBank Acc. No. L09136) después de la digestión con EcoRI y SphI, dando como resultado pUC18-MDV010-SfiI.

Construcción del vector de homología.

Utilizando el plásmido pUC18-MDV010-SfiI, se construyó un vector de homología que contenía un promotor y un gen IBDV VP2 de la cepa de exposición estándar (VP2-STC). En este experimento, se construyó un plásmido de homología que contenía una secuencia de núcleo parcial (SEQ ID NO: 33) del promotor Bac (promotor Coa5). Primero, pUC18-MDV010-SfiI se escindió con SfiI y se desfosforiló con fosfatasa alcalina Shewanella sp. S1B1 recombinante (PAP) (Funakoshi Nº. DE110). El promotor Coa5 se obtuvo del plásmido pGICOA (Patente de los

Estados Unidos Núm. 6.866.852) mediante 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 Nº. 11 (Patente de los Estados Unidos Núm. 6.764.684), dando como resultado p45 / 46COA5VP2-STC Nº. 11. El casete promotor Coa5-VP2-STC se cortó de p45 / 46COA5VP2-STC Nº. 11 por digestión con BglI y se ligó con pUC18-MDV010-SfiI digerido con SfiI, dando como resultado pUC18-MDV010-Coa5VP2stc. Este plásmido se usó para construir RR043.

Construcción de RR043 recombinante

La construcción de RR043 se realizó por recombinación homóloga. En un primer experimento de producción, se preparó ADN viral del virus Rispens de tipo salvaje como lo describen Morgan et al. (Avian Diseases, 34: 345-351, 1990). Aproximadamente 2 µg del ADN de Rispens y 1 µg del plásmido de homología se transfectaron en aproximadamente 10^7 células CEF por electroporación usando Nucleofector II (Lonza, Basilea, Suiza). Las células transfectadas se añadieron al medio LM (+), se plantaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y luego se incubaron a 37ºC en 4-5% de CO_2 durante 5-7 días hasta que las placas de Rispens se volvieron visibles. Luego, las células se separaron de las placas por tripsinización, se transfirieron por igual a dos placas de 96 pocillos con CEF, y se incubaron durante 4 a 6 días hasta que se observaron las placas. El cribado se realizó mediante el ensayo de placa negra, que tiñe solo las placas que expresan la proteína VP2 de IBDV. En resumen, una de las dos placas se fijó con una mezcla de metanol:acetona (1:2) y se incubó con el anticuerpo monoclonal R63 anti-IBDV VP2 (ATCC Nº.: HB-9490). A continuación, se incubó con el anticuerpo IgG biotinilado anti-ratón (Vector Laboratories, Nº. Cat. BA-9200) y luego con el kit VECTASTAIN ABC-AP (Vector Laboratories, Nº. Cat. AK-5000), las placas que expresaban la proteína VP2 se tiñeron mediante la adición de la Solución NBT / BCIP (Roche Applied Science, Nº. Cat. 1681451). Se identificaron los pocillos que contenían las placas recombinantes teñidas y se tripsinizaron las células de los pocillos correspondientes en la otra placa de 96 pocillos. Las células se diluyeron luego en células CEF secundarias recién preparadas 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 placa negra.

En otro experimento de producción, la cepa DH10BE de E. coli que portaba el genoma de Rispens como BAC se transfectó con 1 µg del vector de homología. La transfección se llevó a cabo mediante electroporación utilizando Gene Pulser Xcell a 1,75 kV, 25 µF y 200 ohmios. Después de la transfección, la E. coli se colocó en placas de agar LB, y se incubó durante la noche a 37ºC. Los clones de E. coli que llevaban el inserto apropiado con el gen VP2 se identificaron por PCR usando un par de cebadores que amplificaba una región entre el gen VP2 y la región del sitio de inserción del genoma de Rispens. Los cebadores son SEQ ID NO: 34 (5'-GAGCAACTTCGAGCTGATCC-3') y SEQ ID NO: 24. Se extrajo el ADN de Rispens BAC de los clones que contenían el inserto y se transfectaron en CEF usando Nucleofector II. Los CEF transfectados se plantaron en placas de 96 pocillos y se incubaron a 37ºC en 4-5% de CO_2 durante 5-7 días hasta que las placas de Rispens se volvieron visibles. Las placas que expresaban la proteína VP2 se purificaron como se describe anteriormente.

Ejemplo 9: Construcción del MDV1 recombinante RR044

El RR044 es un virus MDV1 recombinante de la invención en el que un antígeno VP2 bajo el control de un promotor sintético Coa5 se clona entre MDV015 y MDV016 (RR044: Rispens / MDV015 / Coa5-VP2stc).

Para la construcción del virus, primero se construyó un vector de homología y luego se usó para generar el virus mediante recombinación homóloga. Las construcciones de plásmidos y la manipulación de ADN se realizaron esencialmente de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU., 2012).

Construcción de pUC18-MDV015-SfiI

Se clonó un fragmento de ADN de 1,2 kb del genoma de Rispens que flanqueaba el sitio de inserción deseado (región intergénica de MDV015 / 016 que contiene las regiones MDV015 y MDV016) mediante reacciones de PCR que añaden el sitio de reconocimiento SfiI en el sitio de inserción (Figura 6). Brevemente, usando ADN extraído de Rispens como plantilla, se realizaron dos reacciones de PCR. Los pares de cebadores utilizados son SEQ ID NO: 35 (5'-GCGGTACCGCCCTAGAACTCAGCCGAGT-3') y SEQ ID NO: 36 (5'-AGGCCAATAAGGCCGTAATAAAACACATCT-3'), y SEQ ID NO: 37 (5'-GCGAGCTCCGTCTTAACTATTATGTGGATG-3'), SEQ ID NO: 38 (5'-CGGCCTTATTGGCCTTGCCTTTTACAGGGG-3'). Se realizó otra reacción de PCR usando una mezcla de productos de PCR de las dos reacciones de PCR anteriores como plantilla y SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 37 como cebadores. Un fragmento de PCR obtenido se clonó en el vector pUC18 (GenBank Acc. No. L09136) después de la digestión con KpnI y SacI, dando como resultado pUC18-MDV015-SfiI.

Construcción del vector de homología

Utilizando el plásmido pUC18-MDV015-SfiI, se construyó un vector de homología que contenía un promotor y un gen IBDV VP2 de la cepa de exposición estándar (VP2-STC). En este experimento, se construyó un plásmido de homología que contenía una secuencia de núcleo parcial (SEQ ID NO: 33) del promotor Bac (promotor Coa5). Primero, pUC18-MDV015-SfiI se escindió con SfiI y se desfosforiló con fosfatasa alcalina Shewanella sp. S1B1

recombinante (PAP) (Funakoshi Nº. DE110). Luego, el casete del promotor Coa5-VP2-STC se cortó de p45 / 46COA5VP2-STC Nº. 11 mediante digestión con BglI y se ligó con el pUC18-MDV015-SfiI digerido con SfiI, dando como resultado pUC18-MDV015-Coa5VP2stc. Este plásmido se usó para construir RR044.

Construcción de RR044 recombinante

La construcción del RR044 recombinante se realiza mediante recombinación homóloga, como se describe en el Ejemplo 8. Los clones RR044 que llevan un inserto apropiado que contiene el gen VP2 pueden identificarse mediante PCR usando un par de cebadores que amplifica una región entre el gen VP2 y la región del sitio de inserción del genoma de Rispens, por ejemplo, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 25.

Ejemplo 10: Construcción del MDV1 recombinante RR045

El RR045 es un virus MDV1 recombinante de la invención en el que el antígeno VP2 bajo el control de un promotor sintético Coa5 se clona entre MDV033 y MDV034 (RR045: Rispens / MDV033 / Coa5-VP2stc).

Para la construcción del virus, primero se construyó un vector de homología y luego se usó para generar el virus mediante recombinación homóloga. Las construcciones de plásmidos y la manipulación de ADN se realizaron esencialmente de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU., 2012).

Construcción de pUC18-MDV033-SfiI

Un fragmento de ADN de 1,2 kb del genoma de Rispens que flanqueaba el sitio de inserción deseado (región intergénica de MDV033 / 034 que contiene las regiones MDV033 y MDV034) se clonó mediante reacciones de PCR añadiendo un sitio de reconocimiento SfiI en el sitio de inserción (Figura 6). Brevemente, usando ADN extraído de Rispens como plantilla, se realizaron dos reacciones de PCR. Los pares de cebadores utilizados son la SEQ ID NO: 39 (5'-GCGGTACCTTCGCGAGTTGTGCGATCATC-3') y la SEQ ID NO: 40 (5'-AGGCCAATAAGGCCGAATTTATTTCGCGTG-3'), y la SEQ ID NO: 41 (5'-GCGAGCTCTTTGCCCATTTCTGGACTAGG-3') y la SEQ ID NO: 42 (5'-CGGCCTTATTGGCCTATACATAGCTTGTTA-3'). Se realizó otra reacción de PCR usando una mezcla de productos de PCR de las dos reacciones de PCR anteriores como plantilla y SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 41 como cebadores. Un fragmento de PCR obtenido se clonó en el vector pUC18 (GenBank Acc. No. L09136) después de la digestión con KpnI y SacI, dando como resultado pUC18-MDV033-SfiI.

Construcción del vector de homología.

Utilizando el plásmido pUC18-MDV033-SfiI, se construyó un vector de homología que contenía un promotor y un gen IBDV VP2 de la cepa de exposición estándar (VP2-STC). En este experimento, se construyó un plásmido de homología que contenía una secuencia de núcleo parcial (SEQ ID NO: 33) del promotor Bac (promotor Coa5). Primero, pUC18-MDV033-SfiI se escindió con SfiI y se desfosforiló con fosfatasa alcalina Shewanella sp. S1B1 recombinante (PAP) (Funakoshi Nº. DE110). Luego, el casete del promotor Coa5-VP2-STC se cortó de p45 / 46COA5VP2-STC Nº. 11 por digestión con BglI y se ligó con el pUC18-MDV033-SfiI digerido con SfiI, dando como resultado pUC18-MDV033-Coa5VP2stc. Este plásmido se usó para construir RR045.

Construcción del RR045 recombinante

La construcción del RR045 recombinante se realiza mediante recombinación homóloga, como se describe en el Ejemplo 8. Los clones RR045 que llevan un inserto apropiado que contiene el gen VP2 pueden identificarse mediante PCR usando un par de cebadores que amplifica una región entre el gen VP2 y la región del sitio de inserción del genoma de Rispens, por ejemplo, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 26.

Ejemplo 11: Construcción del MDV1 recombinante RR046

El RR046 es un virus MDV1 recombinante de la invención en el que un antígeno VP2 bajo el control de un promotor sintético Coa5 se clona entre MDV071 y MDV072 (RR046: Rispens / MDV071 / Coa5-VP2stc).

Para la construcción del virus, primero se construyó un vector de homología y luego se usó para generar el virus mediante recombinación homóloga. Las construcciones de plásmidos y la manipulación de ADN se realizaron esencialmente de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU., 2012).

Construcción de pUC18-MDV071-SfiI

Un fragmento de ADN de 1,2 kb del genoma de Rispens que flanqueaba el sitio de inserción deseado (región intergénica de MDV071 / 072 que contiene las regiones MDV071 y MDV072) se clonó mediante reacciones de PCR añadiendo un sitio de reconocimiento SfiI en el sitio de inserción (Figura 6). Brevemente, usando ADN extraído de Rispens como plantilla, se realizaron dos reacciones de PCR. Los pares de cebadores usados son SEQ ID NO: 43 (5'-GCGGTACCTCCATATATGTTTCCGTCCTG-3') y SEQ ID NO: 44 (5'-

TGGCCAATAAGGCCTCCATTATGTGATTGC-3'), y SEQ ID NO: 45 (5'-GCGAGCTCATAACTGCAGAAACCAAACG-3') y SEQ ID NO: 46 (5'-AGGCCTTATTGGCCATCAAAGGCCTCAAAG-3'). Se realizó otra reacción de PCR usando una mezcla de productos de PCR de las dos reacciones de PCR anteriores como plantilla y SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 45 como cebadores. Un fragmento de PCR obtenido se clonó en el vector pUC18 (GenBank Acc. No. L09136) después de la digestión con KpnI y SacI, dando como resultado pUC18-MDV071-SfiI.

Construcción del vector de homología

Utilizando el plásmido pUC18-MDV071-SfiI, se construyó un vector de homología que contenía un promotor y el gen VP2 de IBDV de la cepa de exposición estándar (VP2-STC). En este experimento, se construyó un plásmido de homología que contenía una secuencia de núcleo parcial (SEQ ID NO: 33) del promotor Bac (promotor Coa5). Primero, pUC18-MDV071-SfiI se escindió con SfiI y se desfosforiló con fosfatasa alcalina Shewanella sp. S1B1 recombinante (PAP) (Funakoshi Nº. DE110). Luego, el casete del promotor Coa5-VP2-STC se cortó de p45 / 46COA5VP2-STC Nº. 11 por digestión con BglI y se ligó con el pUC18-MDV071-SfiI digerido con SfiI, dando como resultado pUC18-MDV071-Coa5VP2stc. Este plásmido se usó para construir RR046.

Construcción del RR046 recombinante

La construcción del RR046 recombinante se realiza por recombinación homóloga, como se describe en el Ejemplo 8. Los clones RR046 que llevan un inserto apropiado que contiene el gen VP2 pueden identificarse mediante PCR usando un par de cebadores que amplifica una región entre el gen VP2 y la región del sitio de inserción del genoma de Rispens, por ejemplo, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 27.

Ejemplo 12: Construcción de MDV1 recombinante RR047

El RR047 es un virus MDV1 recombinante de la invención en el que un antígeno VP2 bajo el control de un promotor sintético Coa5 se clona entre MDV096 y MDV097.6 (RR047: Rispens / MDV096 / Coa5-VP2stc).

Para la construcción del virus, primero se construyó un vector de homología y luego se usó para generar el virus mediante recombinación homóloga. Las construcciones de plásmidos y la manipulación de ADN se realizaron esencialmente de acuerdo con técnicas estándar de biología molecular (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU., 2012).

Construcción de pUC18-MDV096-SfiI

Un fragmento de ADN de 1,1 kb del genoma de Rispens que flanqueaba el sitio de inserción deseado (región intergénica de MDV096 / 097.6 que contenía las regiones MDV096 y MDV097.6) se clonó mediante reacciones de PCR agregando un sitio de reconocimiento SfiI en el sitio de inserción (Figura 6). Brevemente, usando el ADN extraído de Rispens como plantilla, se realizaron dos reacciones de PCR. Los pares de cebadores utilizados son SEQ ID NO: 47 (5'-GCGGTACCTTTTACTCACATCGCTATC-3') y SEQ ID NO: 48 (5'-AGGCCAATAAGGCCTGTTGCAGTGGTGCTA-3'), y SEQ ID NO: 49 (5'-GCGAGCTCGCTGCATATTGCATCACTATA-3') y SEQ ID NO: 50 (5'-AGGCCTTATTGGCCTGTGGTTTATCGATTT-3'). Se llevó a cabo otra reacción de PCR usando una mezcla de productos de PCR de las dos reacciones de PCR anteriores como plantilla y SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 49 como cebadores. Un fragmento de PCR obtenido se clonó en el vector pUC18 (GenBank Acc. No. L09136) después de la digestión con KpnI y SacI, dando como resultado pUC18-MDV096-SfiI.

Construcción del vector de homología.

Utilizando el plásmido pUC18-MDV096-SfiI, se construyó un vector de homología que contenía un promotor y el gen VP2 de IBDV de la cepa de exposición estándar (VP2-STC). En este experimento, se construyó un plásmido de homología que contenía una secuencia de núcleo parcial (SEQ ID NO: 33) del promotor Bac (promotor Coa5). Primero, pUC18-MDV096-SfiI se escindió con SfiI y se desfosforiló con fosfatasa alcalina Shewanella sp. S1B1 recombinante (PAP) (Funakoshi Nº. DE110). Luego, el casete del promotor Coa5-VP2-STC se cortó de p45 / 46COA5VP2-STC Nº. 11 mediante digestión con BglI y se ligó con el pUC18-MDV096-SfiI digerido con SfiI, dando como resultado pUC18-MDV096-Coa5VP2stc. Este plásmido se usó para construir RR047.

Construcción del RR047 recombinante

La construcción del RR047 recombinante se realiza mediante recombinación homóloga, como se describe en el Ejemplo 8. Los clones RR047 que llevan un inserto apropiado que contiene el gen VP2 pueden identificarse mediante PCR usando un par de cebadores que amplifican una región entre el gen VP2 y la región del sitio de inserción del genoma de Rispens, por ejemplo, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 28.

Ejemplo 13: Verificación de la estructura del genoma

Las estructuras del genoma de Rispens / IBD recombinante se verificaron mediante dos reacciones de PCR que amplificaron las regiones de unión (Unión 4 y Unión 5) en cada extremo de los genes insertados. La figura 7 muestra dónde se encuentran la unión 4 y la unión 5 en el genoma del virus recombinante. Para la unión 4, los pares de

cebadores utilizados en las reacciones de PCR son SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 24 para RR043, SEQ ID NO: 25 para RR044, SEQ ID NO: 26 para RR045, SEQ ID NO: 27 para RR046, o SEQ ID NO: 28 para RR047, respectivamente. Para la unión 2, se utilizaron SEQ ID NO: 51 (5'-GCCAGGGAATCCAGGGAAAAAGAC-3') y SEQ ID NO: 18 para RR043, SEQ ID NO: 19 para RR044, SEQ ID NO: 20 para RR045, SEQ ID NO: 21 para RR046 , o SEQ ID NO: 22 para RR047, respectivamente.

Los tamaños esperados de los productos de la PCR se observaron con todos los Rispens recombinantes, lo que confirma que estos Rispens recombinantes tenían las estructuras genómicas esperadas.

Ejemplo 14: Expresión de un antígeno insertado por Rispens recombinante

La expresión de la proteína VP2 por RR043, RR044, RR046 y RR047 se confirmó mediante el ensayo de placa negra y el ensayo de transferencia Western. Los procedimientos para el ensayo de la placa negra se describen en el Ejemplo 8. La transferencia Western se realizó usando células CEF infectadas con los virus recombinantes y el anticuerpo monoclonal R63 anti-IBDV VP2. Brevemente, las células CEF en placas de 6 pocillos se infectaron con uno de los virus recombinantes o la cepa Rispens original a una multiplicidad de infección de aproximadamente 0,1. Tres días después de la inoculación, las células se cultivaron con tripsina y se centrifugaron a 913 x g durante 5 minutos. El sedimento se lavó con PBS y se resuspendió con 100 µl de PBS. Después de agregar el mismo volumen de 2 x tampón de muestra SDS, la suspensión celular se hirvió durante 5 minutos. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE usando gel de poliacrilamida al 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore). La membrana se secó por completo y luego se incubó con el anticuerpo monoclonal R63. Después se lavó el anticuerpo R63, el anticuerpo biotinilado IgG anti-ratón (Vector Laboratories, Nº. Cat. BA-9200) y luego se usó el kit VECTASTAIN ABC-AP (Vector Laboratories, Nº. Cat. AK-5000). La proteína unida con el anticuerpo monoclonal R63 se visualizó mediante la adición de una solución NBT / BCIP (Roche Applied Science, Nº. Cat. 1681451).

Los resultados se representan en la Figura 8. Muestran que se observaron bandas de proteínas de 40 kilodaltons (kDa), que es el tamaño esperado de la proteína VP2, en todos los carriles con las células infectadas con el virus recombinante. La expresión de la proteína VP2 con los recombinantes RR043 y RR044 es particularmente fuerte, como lo demuestran las bandas altamente marcadas.

Ejemplo 15: Eficacia in vivo de Rispens recombinante en pollos

La eficacia de los virus Rispens recombinantes de la invención que expresan el gen VP2 de IBDV se evaluó frente la exposición de IBDV virulento. En este estudio, se utilizaron tres virus Rispens / IBD recombinantes (RR043, RR044 y RR046). Los pollos de capa comercial (leghorn blanco) con anticuerpos maternos al día de la edad se dividieron en cinco grupos y los pollos de los grupos 3 a 5 se vacunaron por vía subcutánea con aproximadamente 3000 unidades formadoras de placa (pfu) / 0,2 ml de uno de los Rispens recombinantes (Grupo 3: RR043; Grupo 4: RR044; Grupo 5: RR046). Los pollitos en el Grupo 1 (control negativo no inmunizado, no expuesto) y los pollitos en el Grupo 2 (control positivo no inmunizado, expuesto) se dejaron sin vacunar. A los pollos se les extrajo sangre cada semana con entre 1 y 6 semanas de edad para evaluar la inmunidad humoral contra el IBDV. Los anticuerpos anti-IBDV se cuantificaron con un kit comercial ELISA de IBDV (Idexx Laboratories, FlockChek IBD). A las 5 semanas de edad, todos los pollos, excepto el Grupo 1, fueron expuestos a 10^3 dosis infecciosas embrionarias medias (EID50) de cepa virulenta de exposición estándar de IBDV (STC) por vía oral. Se observaron a los pollos diariamente para detectar posibles signos clínicos asociados con el IBD, como crisis y muerte. Siete días después de la exposición, los pollos se sometieron a una autopsia y se observaron lesiones bursales muy observables como edemas, decoloración, atrofia, hemorragias y exudados amarillos o gelatinosos. Los pesos corporales y la bolsa también se midieron en la necropsia para calcular el índice B / B, que es la relación entre el peso de la bolsa y el peso corporal de las aves de exposición dividido por la misma proporción de las aves no expuestas.

La tabla 1 resume los resultados. Todos los pollos en el Grupo 2 (control positivo expuesto) desarrollaron lesiones bursales macroscópicas típicas de la IBD, mientras que todos los pollos en el Grupo 1 (control negativo no expuesto) permanecieron sin tales lesiones. Los pollos en todos los grupos vacunados mostraron una inmunidad protectora muy fuerte, evitando la aparición de enfermedades. Sorprendentemente, la protección proporcionada por RR043 (Grupo 3) fue del 100% (22/22), lo cual es muy notable. RR044 y RR046 también mostraron un nivel de protección muy alto de 90% (Grupo 4) y 95% (Grupo 5), respectivamente. Además, el índice B / B de estos grupos fue 1,03 (RR043), 1,10 (RR044) y 1,01 (RR046), respectivamente, lo que sugiere que no había una atrofia significativa en la bolsa.

En conclusión, el rMDV1 de la invención proporcionó una inmunidad humoral y protectora muy fuerte.

Tabla 1. Protección de Rispens recombinantes contra la exposición virulenta del IBDV en pollos SPF (ensayo de eficacia)

Nº. Grupo	Grupo	Nº de pollos	Índice B/B	Nº de muertos después de la exposición	Nº de lesiones con bolsas/ Nº total	% de protección
1	NINC	20	1,00	0	0/22	No aplicable
2	NICC	22	0,83	6	22/22	0%
3	RR043	22	1,03	0	0/22	100%
4	RR044	21	1,10	0	2/21	90%
5	RR046	22	1,01	1	1/22	95%

NINC = controles negativos no inmunizados, no expuestos

NICC = controles positivos no inmunizados, expuestos

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CEVA SANTE ANIMALE

<120> MDV1 recombinante y sus usos

<130> B1962

<160> 51

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 1
ggcctggtga tgatggcggg atcgttgtat 30

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 2
ccatggtgct gcgctcagaa gaactcgtca 30

<210> 3
<211> 1319
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> rpsLneo

<400> 3
ggcctggtga tgatggcggg atcgttgtat atttcttgac acctttcgg catcgcccta 60

aaattcggcg tcctcatatt gtgtgaggac gttttattac gtgtttacga agcaaaagct 120

aaaaccagga gctatttaat ggcaacagtt aaccagctgg tacgcaaacc acgtgctcgc 180

aaagttgcga aaagcaacgt gcctgcgctg gaagcatgcc cgcaaaaacg tggcgtatgt 240

actcgtgtat atactaccac tcctaaaaaa ccgaactccg cgctgcgtaa agtatgccgt 300

gttcgtctga ctaacggttt cgaagtgact tcctacatcg gtggtgaagg tcacaacctg 360

caggagcact ccgtgatcct gatccgtggc ggtcgtgtta aagacctccc gggtgttcgt 420

taccacaccg tacgtggtgc gcttgactgc tccggcgtta aagaccgtaa gcaggctcgt 480

tccaagtatg gcgtgaagcg tcctaaggct taaggaggac aatcatgatt gaacaagatg 540

gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat gactgggcac 600

aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg 660

ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc 720

ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg 780

aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc 840

accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc 900

ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta 960

ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg 1020

cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg 1080

tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat 1140

tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg ttggctaccc 1200

gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta 1260

tcgccgctcc cgattcgcag cgcatcgcct tctatcgcct tcttgacgag ttcttctga 1319

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 4
acgagttctt ctgagcgcag caccatggcc 30

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 5
tcggaggagg ccatccttaa gagctgtaat 30

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 6
tacagctctt aaggatggcc tcctccgaga 30

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 7

gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat 30

<210> 8
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 8
catcttcgta ttcgtcactt gcgaaatggc ctggtaatta taacattggg ggcctggtga 60

tgatggcggg 70

<210> 9
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 9
cacaatctct cactcctcaa attgcatttt cagtgctgtt aaatacattc gcagtgaaaa 60

aaatgcttta 70

<210> 10
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 10
atgaataaag tgagacttat aatacttatt gcatagatgt gttttattac ggcctggtga 60

tgatggcggg 70

<210> 11
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 11
tattataaca tacttgtagg taataaacaa actacccctg taaaaggcaa gcagtgaaaa 60

aaatgcttta 70

<210> 12
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 12
tacctgaaat gtgatcggac ttgggaaaaa tcttcacgcg aaataaattc ggcctggtga 60

tgatggcggg 70

<210> 13
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 13
tttaatgcaa aaataaataa agaacctttg ggaataacaa gctatgtata gcagtgaaaa 60

aaatgcttta 70

<210> 14
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 14
aaaagttatt agtcatgcaa gcatctgtca aatagcaatc acataatgga ggcctggtga 60

tgatggcggg 70

<210> 15
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 15
tttcaatgag gagaaggttc ccctcattat gcagctttga ggcctttgat gcagtgaaaa 60

aaatgcttta 70

<210> 16
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 16
gatccgaaaa tatatcatgc aaataagcat gttctagcac cactgcaaca ggcctggtga 60

tgatggcggg 70

<210> 17
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 17
tgctcggagg caatggttca actattcttt ccggaaatcg ataaaccaca gcagtgaaaa 60

aaatgcttta 70

<210> 18

<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 18
gtgcgagatt attcctttta aggaatactc 30

<210> 19
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 19
ggacaaattt cctcatataa gtggagaag 29

<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 20
cgagaactga ttgcaggagg gaattcatcc 30

<210> 21
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 21
catgtagaca tagacacaca gaatatatcc 30

<210> 22
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 22
catcatagtt gtatgttcga cgaattaagc 30

<210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 23
tcagaagaac tcgtcaagaa ggc 23

<210> 24

<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 24
aaatcagatc ggttgtctac ttcgagtatg 30

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 25
agactatatg cttttcttga atacgactag 30

<210> 26
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 26
taaagacatt gatcccatag acgtcgcg 28

<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 27
agacatgtaa aatggttgta ctgaaattcg 30

<210> 28
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 28
actgatatgt acatatttaa acttaatggg 30

<210> 29
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 29
gcgcatgcgc acgcatatag atcgaac 27

<210> 30

<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 30
cggccaataa ggcccccaat gttataatta 30

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 31
gcgaattcat aacagaatgt cacgataaag 30

<210> 32
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 32
gggccttatt ggccgaatgt atttaacagc 30

<210> 33
<211> 274
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de núcleo del promotor de beta-actina de pollo

<400> 33
tattttgtgc agcgatgggg gcgggggggg gggggcgcg cgccaggcgg ggcggggcgg 60

ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcgcg 120

ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa aaagcgaagc 180

gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc cgccgccgcc 240

tcgcgccgcc cgccccggct ctgactgacc gcgt 274

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 34
gagcaacttc gagctgatcc 20

<210> 35
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 35
gcggtaccgc cctagaactc agccgagt 28

<210> 36
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 36
aggccaataa ggccgtaata aaacacatct 30

<210> 37
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 37
gcgagctccg tcttaactat tatgtggatg 30

<210> 38
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 38
cggccttatt ggccttgcct tttacagggg 30

<210> 39
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 39
gcggtacctt cgcgagttgt gcgatcatc 29

<210> 40
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 40
aggccaataa ggccgaattt atttcgcgtg 30

<210> 41
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 41
gcgagctctt tgcccatttc tggactagg 29

<210> 42
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 42
cggccttatt ggcctataca tagcttgtta 30

<210> 43
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 43
gcggtacctc catatatgtt tccgtcctg 29

<210> 44
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 44
tggccaataa ggcctccatt atgtgattgc 30

<210> 45
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 45
gcgagctcat aactgcagaa accaaacg 28

<210> 46
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 46
aggccttatt ggccatcaaa ggcctcaaag 30

<210> 47
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 47
gcggtacctt ttactcacat cgctatc 27

<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 48
aggccaataa ggcctgttgc agtggtgcta 30

<210> 49
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 49
gcgagctcgc tgcatattgc atcactata 29

<210> 50
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 50
aggccttatt ggcctgtggt ttatcgattt 30

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 51
gccagggaat ccagggaaaa agac 24

REIVINDICACIONES

1. Un virus de la enfermedad de Marek recombinante serotipo 1 (rMDV1) que comprende un gen ajeno en su genoma, en el que dicho gen ajeno se encuentra en una región genética no traducida del genoma, y en el que dicha región genética no traducida se encuentra entre MDV010 y MDV011, entre MDV015.5 y MDV016, entre MDV033 y MDV034, entre MDV071 y MDV072, o entre MDV096 y MDV097.6 del genoma.

2. El rMDV1 de la reivindicación 1, en el que el gen ajeno está ubicado en una región genética no traducida ubicada entre MDV010 y MDV011, entre MDV015.5 y MDV016, o entre MDV071 y MDV072.

3. El rMDV1 de la reivindicación 1 o 2, en el que la secuencia génica ajena se inserta en sustitución de toda o alguna parte de la región genética no traducida.

4. El rMDV1 de la reivindicación 1 o 2, en el que la secuencia génica ajena se inserta en la región genética no traducida sin deleción de dicha región genética no traducida.

5. El rMDV1 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho MDV1 es una cepa Rispens de MDV1.

6. El rMDV1 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho gen ajeno codifica un antígeno, preferiblemente un antígeno de un patógeno aviar, más preferiblemente seleccionado de un patógeno viral, un patógeno bacteriano, un patógeno fúngico y un patógeno de protozoos.

7. El rMDV1 de la reivindicación 6, en el que dicho patógeno se selecciona del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de la enfermedad de Gumboro (virus de la enfermedad de la bolsa infecciosa, IBDV), virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV), virus de la bronquitis infecciosa (IBV), micoplasma (MG) o coccidia.

8. El rMDV1 de la reivindicación 7, en el que el gen ajeno codifica un antígeno VP2 de IBDV, un antígeno HN de NDV, un antígeno F de NDV o fragmentos inmunogénicos del mismo.

9. El rMDV1 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gen ajeno está bajo el control de un promotor transcripcional en dicho genoma.

10. El rMDV1 de la reivindicación 9, en el que el promotor se selecciona del promotor de beta-actina (Bac) de pollo o un derivado del mismo como Coa5, el promotor de Pec, el promotor 1 del citomegalovirus murino (Mcmv) inmediato-temprano (es decir), el promotor humano del citomegalovirus (Hcmv), el promotor del virus 40 Simian (SV) y el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), o cualquier fragmento del mismo que retenga una cierta actividad promotora.

11. Un rMDV1 de la reivindicación 1, en donde dicho rMDV1 comprende un gen ajeno que codifica VP2 de IBDV colocado en una región no traducida ubicada entre MDV010-MDV011, MDV015.5-MDV016, MDV033-MDV034, MDV071-MDV072, o MDV096-MDV097.6 del genoma.

12. Un rMDV1 de la reivindicación 1, en el que dicho rMDV1 comprende un gen ajeno que codifica HN y / o F de NDV colocado en una región no traducida ubicada entre MDV010-MDV011, MDV015.5-MDV016, MDV033-MDV034, MDV071-MDV072 o MDV096-MDV097.6 del genoma.

13. Una molécula de ácido nucleico que comprende el genoma de un rMDV1 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

14. Una célula huésped que comprende un rMDV1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13.

15. Un método para producir o replicar un rMDV1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende infectar una célula competente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13 o con un rMDV1 de la reivindicación 1, y recuperar el rMDV1.

16. Una composición que comprende un rMDV1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un excipiente.

17. Una vacuna que comprende un rMDV1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, un excipiente y, opcionalmente, un adyuvante.

18. Un rMDV1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para usar en la inmunización de un ave contra un patógeno.

19. Un kit de vacunación para inmunizar un ave que comprende los siguientes componentes:

a. una cantidad efectiva de una vacuna de la reivindicación 17, y

b. un medio para administrar dicha vacuna a dicha especie aviar.

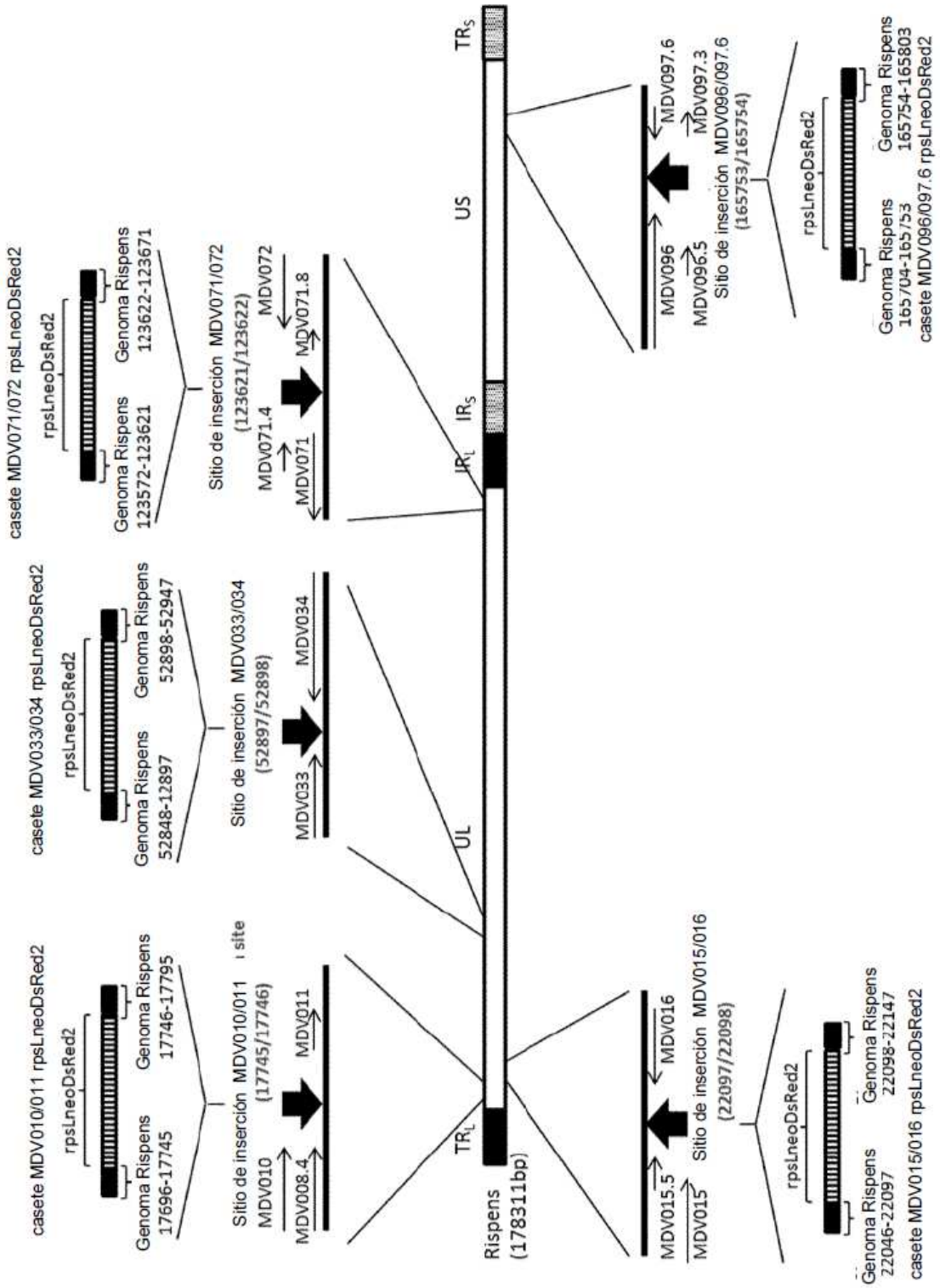

casete MDV071/072 rpsLneoDsRed2
rpsLneoDsRed2
Genoma Rispens
123572-123621
Genoma Rispens
123622-123671
Sitio de inserción MDV071/072
(123621/123622)
MDV071.4
MDV071
MDV072
MDV071.8
casete MDV033/034 rpsLneoDsRed2
rpsLneoDsRed2
Genoma Rispens
52848-12897
Genoma Rispens
52898-52947
Sitio de inserción MDV033/034
(52897/52898)
MDV033
MDV034
casete MDV010/011 rpsLneoDsRed2
rpsLneoDsRed2
Genoma Rispens
17696-17745
Genoma Rispens
17746-17795
Sitio de inserción MDV010/011
(17745/17746)
MDV010
MDV008.4
MDV011
Rispens
(178311bp)
TRL
UL
IRL
IRS
US
TRS
MDV097.6
MDV097.3
MDV096
MDV096.5
Sitio de inserción MDV096/097.6
(165753/165754)
rpsLneoDsRed2
Genoma Rispens
165704-165753
Genoma Rispens
165754-165803
casete MDV096/097.6 rpsLneoDsRed2
MDV015.5
MDV015
MDV016
Sitio de inserción MDV015/016
(22097/22098)
rpsLneoDsRed2
Genoma Rispens
22046-22097
Genoma Rispens
22098-22147
casete MDV015/016 rpsLneoDsRed2

Figura 1

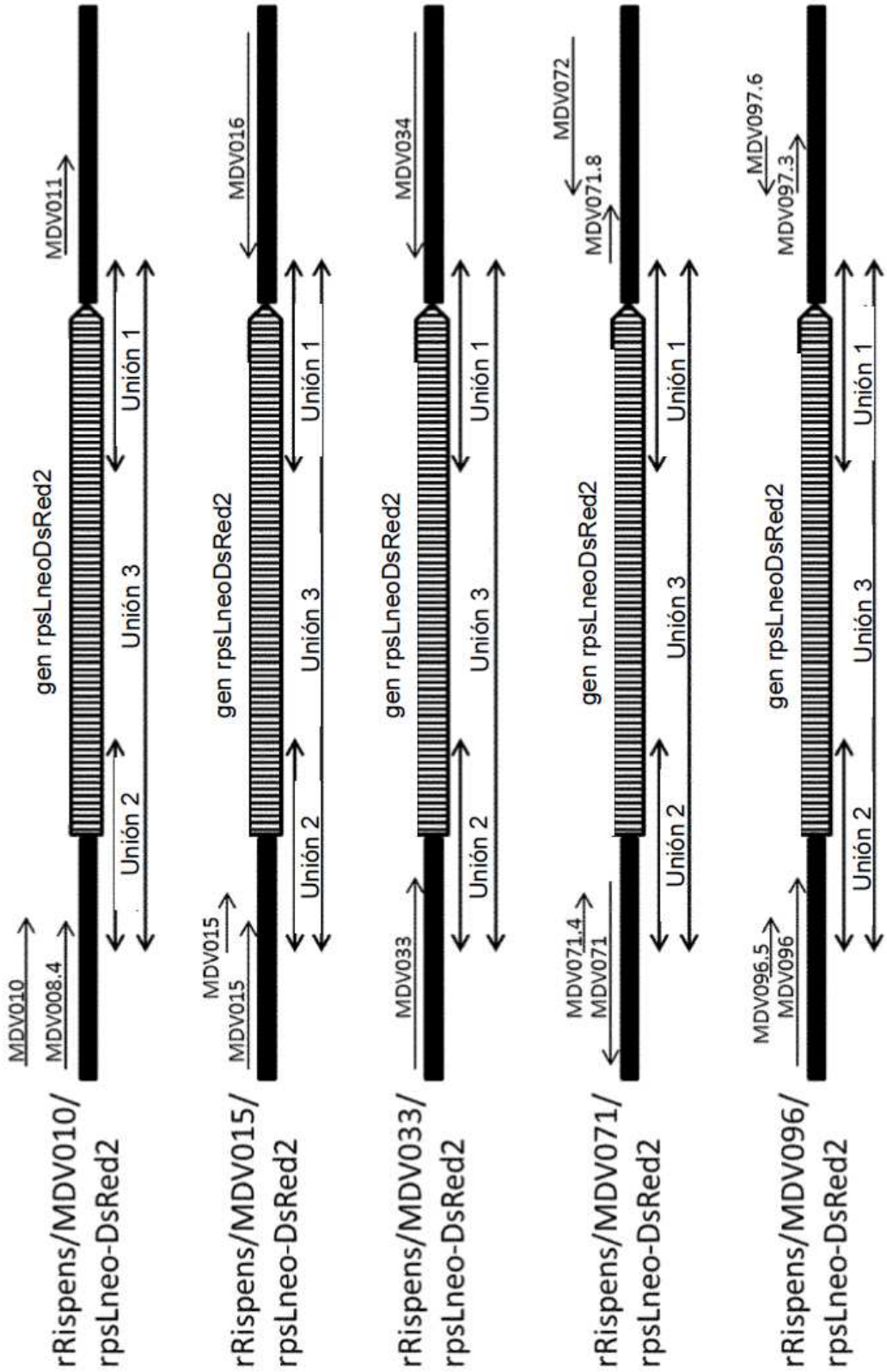
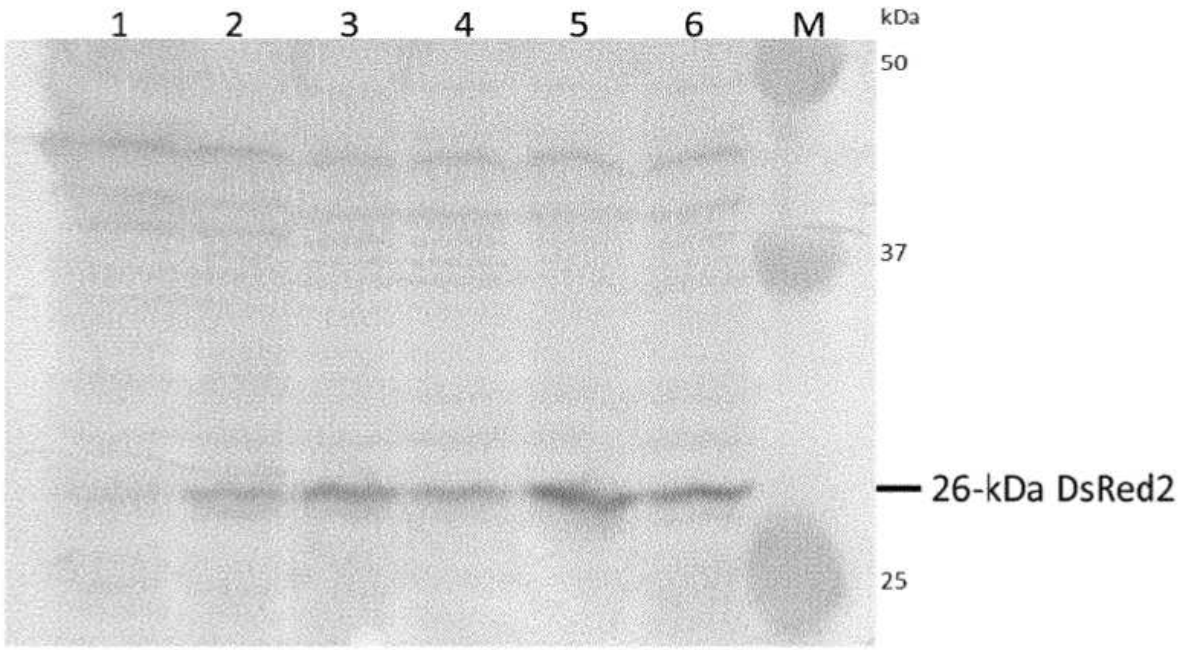
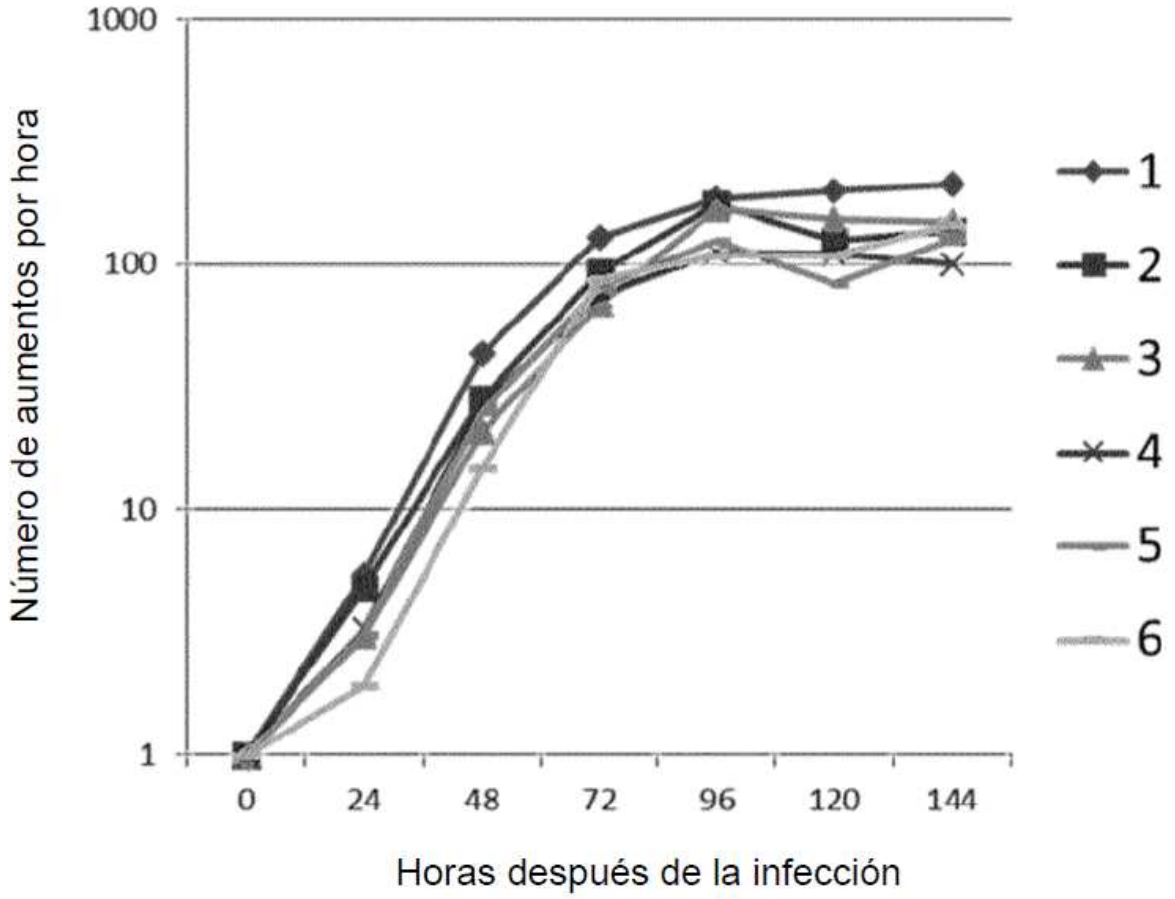

rRispens/MDV010/
rpsLneo-DsRed2
MDV010
MDV008.4
MDV011
gen rpsLneoDsRed2
Unión 2
Unión 3
Unión 1
rRispens/MDV015/
rpsLneo-DsRed2
MDV015
MDV015
MDV016
gen rpsLneoDsRed2
Unión 2
Unión 3
Unión 1
rRispens/MDV033/
rpsLneo-DsRed2
MDV033
MDV034
gen rpsLneoDsRed2
Unión 2
Unión 3
Unión 1
rRispens/MDV071/
rpsLneo-DsRed2
MDV071.4
MDV071
MDV071.8
MDV072
gen rpsLneoDsRed2
Unión 2
Unión 3
Unión 1
rRispens/MDV096/
rpsLneo-DsRed2
MDV096.5
MDV096
MDV097.3
MDV097.6
gen rpsLneoDsRed2
Unión 2
Unión 3
Unión 1

Figura 2



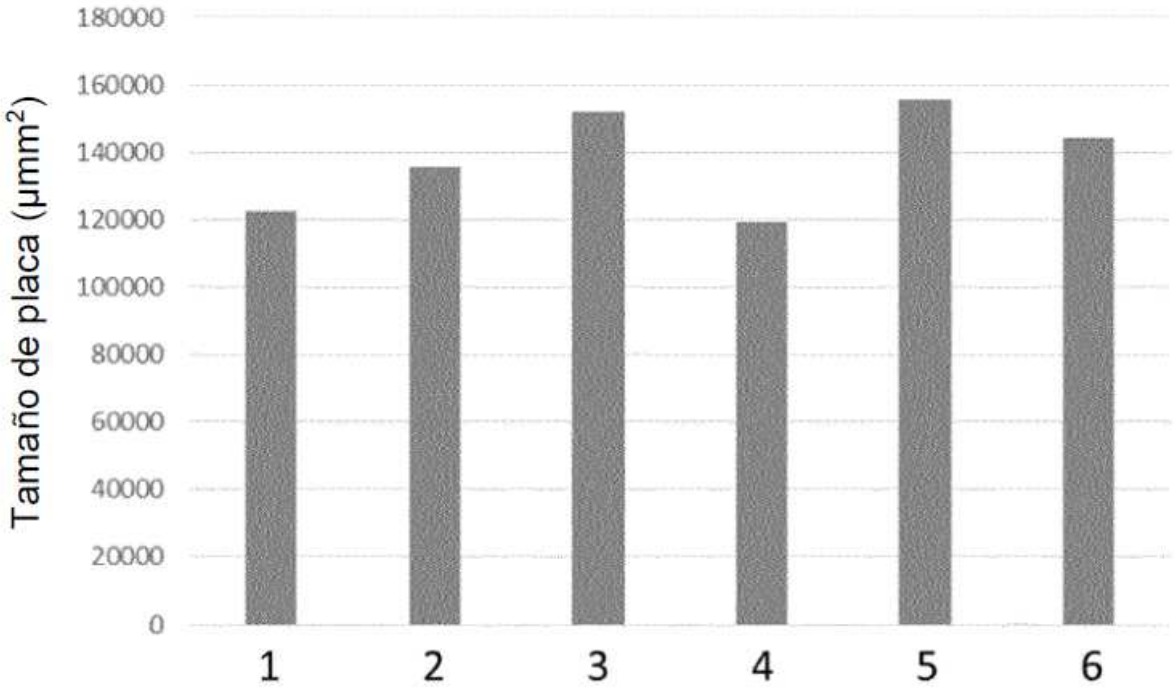
1: Rispens parenteral
2: rRispens/MDV096/rpsLneo-DsRed2
3: rRispens/MDV071/rpsLneo-DsRed2
4: rRispens/MDV033/rpsLneo-DsRed2
5: rRispens/MDV015/rpsLneo-DsRed2
6: rRispens/MDV010/rpsLneo-DsRed2
M: Patrones Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad, Nº de Cat. 161-0373)

Figura 3



1: rRispens/MDV010/rpsLneo-DsRed2
2: rRispens/MDV015/rpsLneo-DsRed2
3: rRispens/MDV033/rpsLneo-DsRed2
4: rRispens/MDV071/rpsLneo-DsRed2
5: rRispens/MDV096/rpsLneo-DsRed2
6: Rispens parenteral

Figura 4



1: rRispens/MDV010/rpsLneo-DsRed2
2: rRispens/MDV015/rpsLneo-DsRed2
3: rRispens/MDV033/rpsLneo-DsRed2
4: rRispens/MDV071/rpsLneo-DsRed2
5: rRispens/MDV096/rpsLneo-DsRed2
6: Rispens parenteral

Figura 5

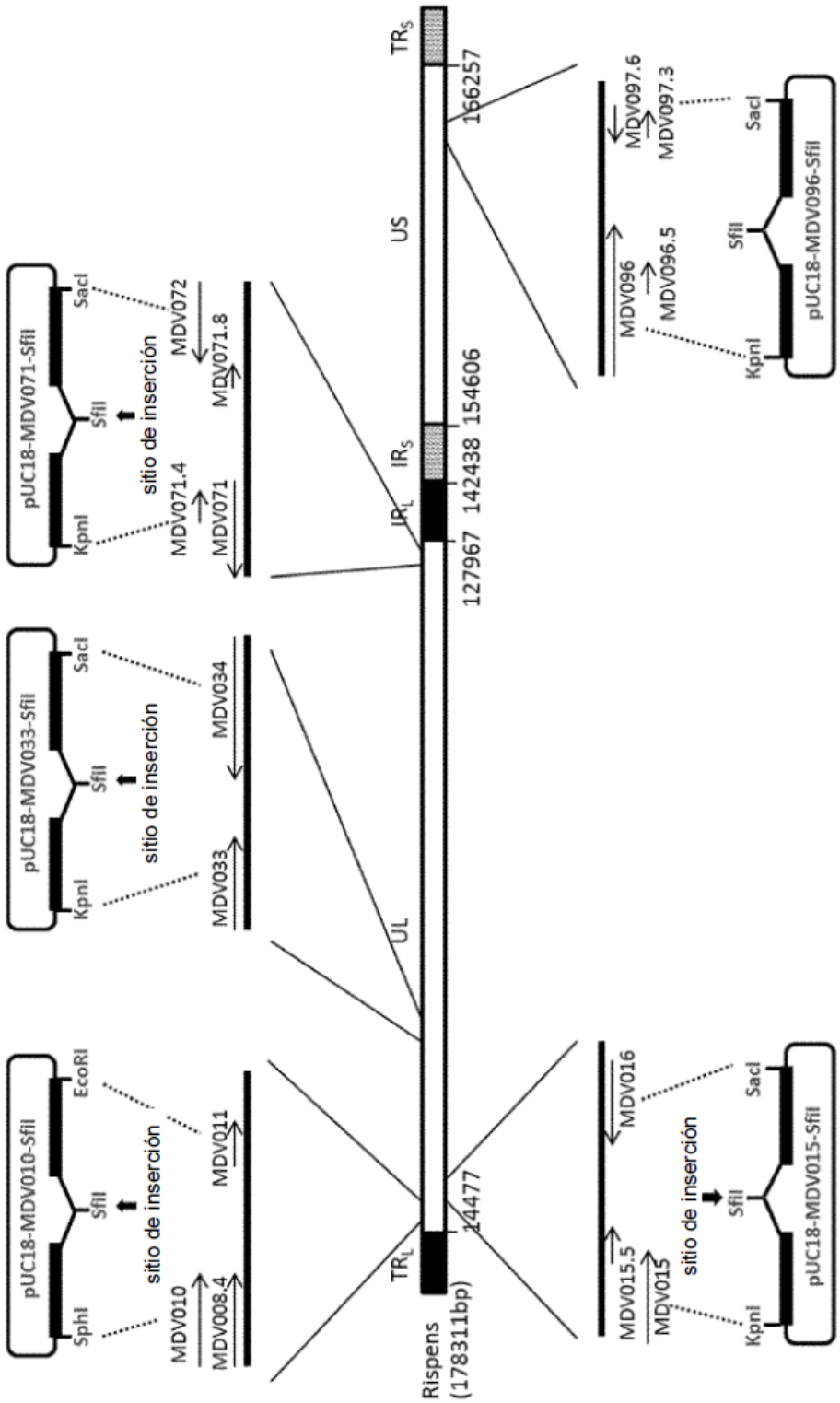

pUC18-MDV071-SfiI
SacI
SfiI
KpnI
sitio de inserción
MDV072
MDV071.8
MDV071.4
MDV071
pUC18-MDV033-SfiI
SacI
SfiI
KpnI
sitio de inserción
MDV034
MDV033
pUC18-MDV010-SfiI
EcoRI
SfiI
SphI
sitio de inserción
MDV011
MDV010
MDV008.4
TRS
166257
US
154606
IRS
142438
IRL
127967
UL
14477
TRL
Rispens
(178311bp)
MDV097.6
MDV097.3
MDV096
MDV096.5
SacI
SfiI
KpnI
pUC18-MDV096-SfiI
MDV016
MDV015.5
MDV015
sitio de inserción
SacI
SfiI
KpnI
pUC18-MDV015-SfiI

Figura 6

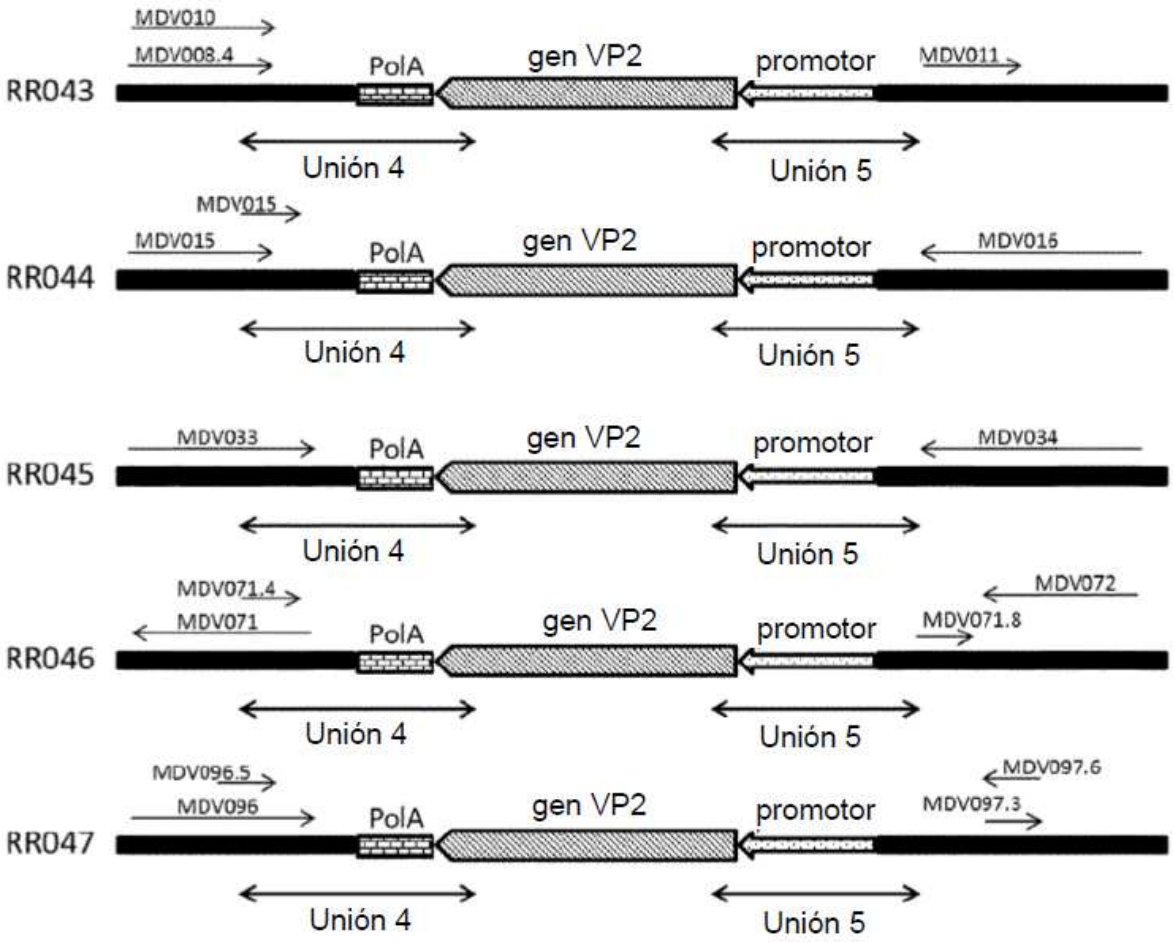
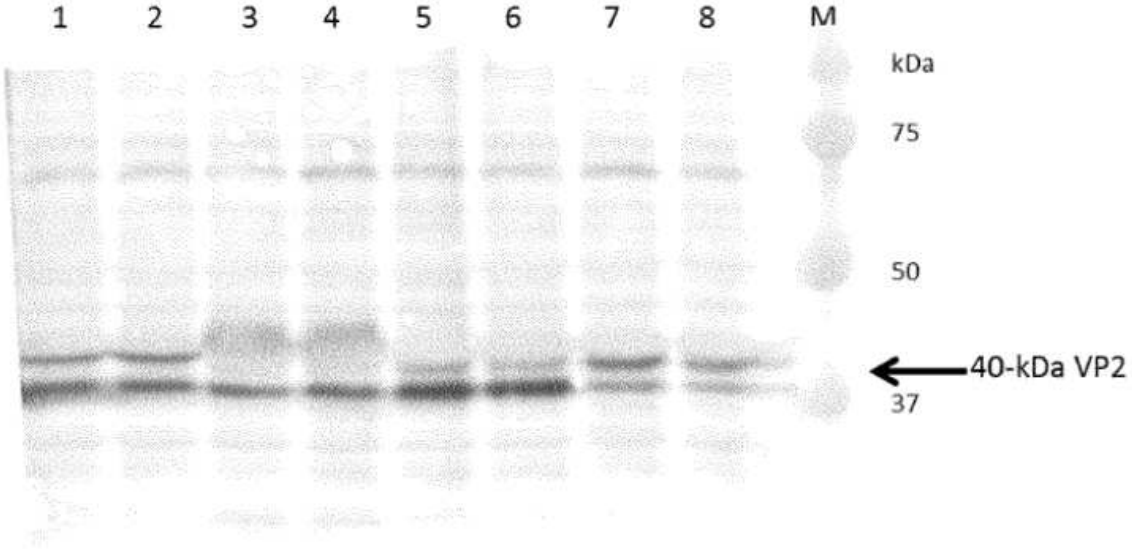
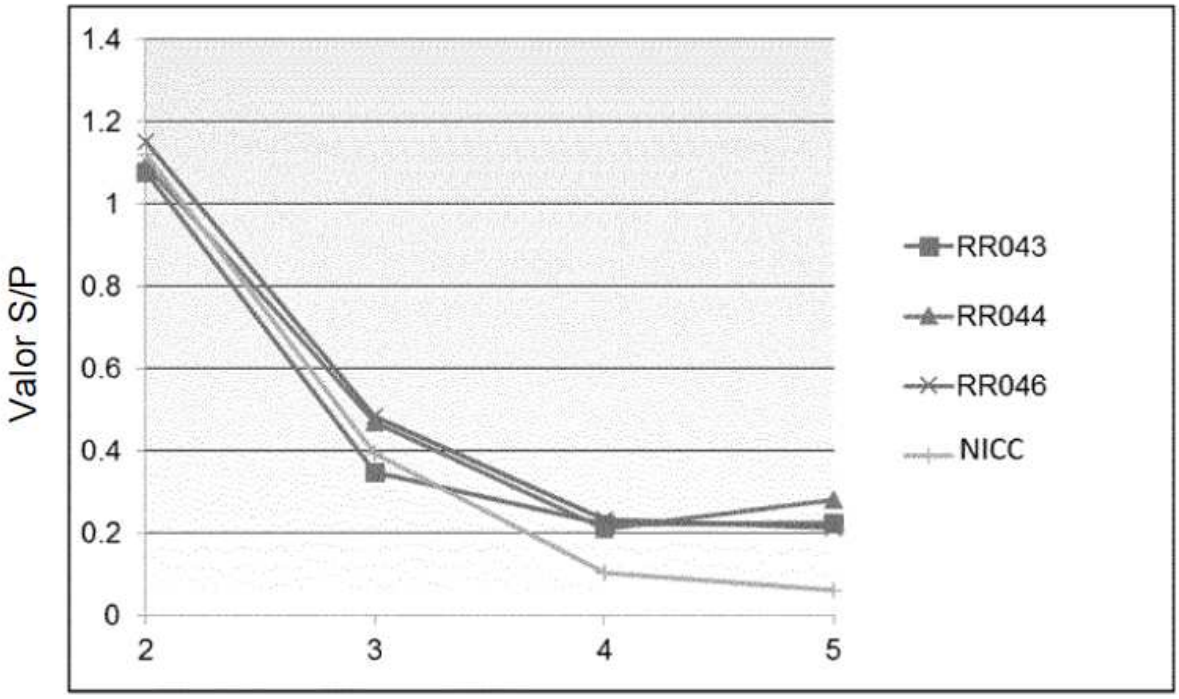

MDV010
MDV008.4
PolA
gen VP2
promotor
MDV011
RR043
Unión 4
Unión 5
MDV015
MDV015
PolA
gen VP2
promotor
MDV016
RR044
Unión 4
Unión 5
MDV033
PolA
gen VP2
promotor
MDV034
RR045
Unión 4
Unión 5
MDV071.4
MDV071
PolA
gen VP2
promotor
MDV072
MDV071.8
RR046
Unión 4
Unión 5
MDV096.5
MDV096
PolA
gen VP2
promotor
MDV097.6
MDV097.3
RR047
Unión 4
Unión 5

Figura 7



M: Patrones Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad, Nº de Cat. 161-0373)
1: Clon 1 RR047
2: Clon 2 RR047
3: Clon 1 RR046
4: Clon 2 RR046
5: Clon 1 RR044
6: Clon 2 RR044
7: Clon 2 RR043
8: Clon 2 RR043

Figura 8



Pruebal anticuerpo IDEXX IBD: Laboratorios IDEXX

NICC = controles positivos expuestos y no inmunizados

Figura 9