



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 270 427**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C07K 14/055 (2006.01)

C12N 15/38 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **95917410 .3**

(86) Fecha de presentación : **18.04.1995**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0757722**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.1997**

(54) Título: **Herpesvirus transformados para la expresión de la gD *in vitro*.**

(30) Prioridad: **20.04.1994 FR 94 04975**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(73) Titular/es: **MERIAL**
29, avenue Tony Garnier
69007 Lyon, FR

(72) Inventor/es: **Audonnet, Jean-Christophe Francis;**
Darteil, Raphael Jean;
Riviere, Michel Albert Emile;
Zelnik, Vladimir y
Ross, Louis Joseph Norman

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Herpesvirus transformados para la expresión de la gD *in vitro*.

5 La presente invención tiene por objeto nuevos herpesvirus recombinantes obtenidos a partir de herpesvirus deficientes de forma natural en gD, especialmente herpesvirus aviarios y herpesvirus alfa, en particular los herpesvirus alfa aviarios, y más particularmente MDV de los serotipos 1, 2 y 3, así como especialmente del VZV. Del mismo modo trata, entre otros, de su utilización como vacunas y de su procedimiento de preparación.

10 El virus responsable de la enfermedad de Marek ("Marek's disease virus" o MDV) en el pollo es un herpesvirus alfa. Se han descrito tres serotipos del virus (Bülow V.V. y Biggs P.M., *Avian Pathology*, 4:133-146 (1975)). Sólo los virus del serotipo 1 oncogénico son patógenos en el pollo. Su replicación en el huésped provoca la formación de linfomas de las células T y una desmielinización de los nervios periféricos motores, la cual se traduce generalmente en síntomas de paresia o de parálisis en los animales afectados (Calnek y Witter, "Marek's Disease," en *Diseases of Poultry*, 9ª edición, pp. 342-390, editores Calnek B.W. *et al.*, 1991, Iowa State Univ. Press). Esta enfermedad, con
15 consecuencias económicas muy importantes para la cría aviar, se previene mediante una vacunación de los polluelos de un día, bien con el herpesvirus del pavo ("herpesvirus of turkey" o HVT, o aún MDV del serotipo 3), un virus antigénicamente próximo al virus MDV pero que no es patógeno en el pollo, bien con cepas vivas del MDV no oncogénicas y no patógenas en el pollo, pertenecientes a los serotipos 1 ó 2.

20 Para las necesidades de la producción de vacunas, estos tres serotipos se cultivan principalmente en células primarias de embriones de pollos (CEP). También pueden usarse las células primarias de embriones de pato para multiplicar los virus MDV del serotipo 2. Desde el momento del cultivo *in vitro*, estos virus están fuertemente asociados a las células. Este fenómeno se conoce desde hace tiempo (Churchill A.E. y Biggs P.M., *Nature*, 215:528-530 (1967)), del mismo modo se ha constatado que los viriones producidos después del cultivo sobre CEP no son infecciosos por vía oral o nasal para los pollos. La vacunación con estos virus necesita por tanto su administración por vía parenteral, en general por transfusión de la membrana alar o por inyección intramuscular, lo que aumenta de forma no despreciable el coste de la vacunación contra la enfermedad de Marek.

30 Por contra, durante el curso de la infección por parte de las cepas patógenas del virus MDV, existe en el pollo una producción de virus MDV infecciosos, es decir, transmisibles por vía aérea o por simple contacto. Esta producción de virus infecciosos se realiza a nivel de los folículos plumosos, y el virus se disemina en el entorno por mediación de las plumas de la muda, de las escamas y de las pulgas (Calnek B.W. *et al.*, *Avian Diseases*, 14:219-233 (1970)). Es mediante este mecanismo que se efectúa la difusión natural de la enfermedad en las ganaderías. Las diferencias
35 observadas entre el cultivo *in vitro* y la replicación *in vivo* del virus MDV no se han explicado hasta la fecha.

El estudio del cultivo *in vitro* de los virus MVT o MDV sobre CEP ha mostrado que estos virus están estrechamente asociados a las membranas celulares. Esto tiene por consecuencia la casi ausencia de viriones libres e infecciosos en los sobrenadantes de los cultivos.

40 Recientemente se ha mostrado que un gen que codifica una glicoproteína homóloga de la gD del HSV-1 está presente en los genomas respectivos de los virus HVT y MDV (Ross L.J.N. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 72:949-954 (1991); Zelnik V. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 74:2151-2162 (1993)). Los productos de la expresión de estos genes en el HVT y MVD se han estudiado e investigado en los lisados de CEP infectadas por estos virus. Sin embargo, estos experimentos no
45 han permitido demostrar la expresión de la glicoproteína gD en estos dos virus.

En efecto, los antígenos MDV gp, expresados en forma de proteínas de fusión con la proteína TrpE en *E. coli*, se han utilizado para inducir la producción de anticuerpos en conejos y, curiosamente, los sueros preparados de este modo no han reconocido la proteína específica en los lisados de CEP infectadas con HVT o MDV, mientras que los anticuerpos preparados a partir de proteínas de fusión que expresan los antígenos MDV gI o MDV gE reconocen las glicoproteínas correspondientes expresadas por los virus MDV o HVT durante el cultivo *in vitro* (Brunovskis P. *et al.*, *Proceedings 19th World's Poultry Congress*, pp. 118-122, Amsterdam, 19-24 de Septiembre de 1992). Esto indica, bien una ausencia de expresión, bien un nivel de expresión de la gD muy débil durante el cultivo *in vitro* de HVT y MDV.

55 Al contrario, los sueros de pollos infectados por las cepas patógenas de MDV reconocieron los antígenos HVT gD o MDV gD expresados en forma de proteínas de fusión con la glutatión transferasa (Zelnik V. *et al.*, *Proceedings 19th World's Poultry Congress*, pp. 114-117, Amsterdam, 19-24 de Septiembre de 1992). Estos resultados muestran que los genes HVT gD y MDV gD se expresan correctamente durante la replicación *in vivo* en el pollo, y que las respectivas glicoproteínas no solamente son inmunogénicas, sino que comparten también ciertos determinantes antigénicos. Debe destacarse que en la mayoría de los herpesvirus alfa estudiados hasta la fecha, la glicoproteína gD es un inmunógeno principal que contribuye de forma significativa a la inducción de la inmunidad protectora antivírica en el animal infectado o inmunizado.

65 X. Tan y L.F. Velicer (*Abstracts of the XVIII International Herpesvirus Workshop*, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA, 1993, p. A145) han declarado también que la gD no se expresaba en cultivos celulares, o por lo menos no a un nivel detectable mediante transferencia Northern, lo que puede explicar la naturaleza asociada a la célula del virus MDV. Estos autores proponen que la MVD gD se expresa en el epitelio de los folículos plumosos

del pollo, o que el MDV se forma en forma de viriones infecciosos recubiertos no asociados con las células. Esto se muestra igualmente en la solicitud internacional WO92/03587.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la puesta en práctica de una expresión constitutiva de la glicoproteína gD por el virus MDV, incluyendo el HVT, permite obtener de forma sorprendente, como consecuencia de la infección en los pollos, unos viriones libres no asociados a las células. Esta particularidad ofrece la posibilidad muy ventajosa de administrar este virus por vía aérea con fines de vacunación, y que permite por tanto la obtención de virus libres en el sobrenadante de los cultivos *in vitro*, lo que facilita la obtención y la fabricación de vacunas contra la enfermedad de Marek.

De forma sorprendente, la presente invención permite, mediante la sustitución del promotor natural del gen gD en los virus HVT e MDV por otro promotor, la expresión *in vitro* de las glicoproteínas HVT gD y MDV gD. La expresión de la gD, obtenida principalmente mediante la colocación de este gen bajo el control de un promotor no regulado por el virus, permite la maduración completa de los viriones que pueden entonces "salir" libremente de las células infectadas. Esta expresión de la gD *in vitro* se realiza sustituyendo el promotor natural del gen gD por otro promotor que puede escogerse principalmente de entre los promotores eucariotas fuertes clásicamente conocidos (por ejemplo, los promotores de la IE del HCMV, del SV40, o los promotores tempranos endógenos de los virus HVT o MDV...), o de entre los promotores tardíos (por ejemplo, los promotores tardíos del MDV o HVT, principalmente del gB de MDV o HVT,...) Esta nueva expresión puede obtenerse utilizando los medios ofrecidos por las técnicas de la recombinación genética, por ejemplo, sustituyendo la región situada más arriba del ATG del gen gD por un promotor exógeno del tipo del promotor de la IE del HCMV, o del promotor del SV40, o transponiendo el gen gD dentro de la región única larga del virus, y colocándolo bajo el control de un promotor endógeno o exógeno. Hay numerosas posibilidades que pueden realizarse de este modo para la expresión del gen gD combinando diferentes promotores y diferentes sitios de inserción potenciales (tales como los sitios RR2, TK, gD, gI, US3, US2, US10...).

Esta expresión tiene consecuencias novedosas e inesperadas sobre las propiedades biológicas del virus recombinante. La expresión de la glicoproteína gD durante la replicación *in vitro* de los virus recombinantes HVT y MDV contruidos de este modo se traduce de forma efectiva por la incorporación de la glicoproteína gD a la cubierta viral y por la obtención de viriones infecciosos con un título elevado en los sobrenadantes del cultivo. Por otra parte, los virus recombinantes obtenidos de este modo, a la vez que guardan las características de atenuación de los virus progenitores, son más infecciosos para los linfocitos *in vivo* y se replican más rápidamente en estas células. Esto tiene por consecuencia directa una mayor y más rápida difusión de estos virus en el seno del organismo del pollo. La protección contra la enfermedad de Marek es, por tanto, mejor, sea cual sea la vía de administración (oronasal o parenteral). A consecuencia de estas modificaciones biológicas sobre la replicación del virus, la protección contra la enfermedad de Marek puede obtenerse más precozmente y con unas dosis de vacunación mucho más reducida que con las vacunas utilizadas clásicamente.

Por otra parte, se ha descubierto que es posible extender estas enseñanzas a otros herpesvirus, puesto que la estructura genómica y las propiedades biológicas *in vitro* e *in vivo* son equivalentes a las de los herpesvirus aviarios mencionados más arriba. Por ejemplo, la presente invención permite la obtención de un virus VZV recombinante que expresa el gen gD de otro virus tal como el HSV-1 o HSV-2, con una consecuencia positiva muy ventajosa para la producción del virus VZV libre mediante cultivo *in vitro* sobre células. Este virus recombinante puede constituir una vacuna contra el VZV y contra el virus de donde procede el gen gD, por ejemplo, el HSV-1 o HSV-2.

De hecho, existen dos grandes tipos de virus a los que se refiere la invención, los cuales a la definición de virus deficientes en gD, a saber, los que no expresan la gD *in vitro* en cultivos celulares, que es el caso de los virus MDV, incluyendo el HVT, y los que están desprovistos de un gen homólogo al gD, que es el caso del virus VZV (virus de la varicela zóster).

La invención se refiere, por tanto, a todos los herpesvirus equivalentes, en el mismo sentido que se acaba de definir, a los virus de los tipos MDV y VZV.

Por tanto, La presente invención tiene por objeto un herpesvirus deficiente de forma natural en gD (en el sentido de la invención definido más arriba), transformado para expresar una glicoproteína gD a lo largo del curso de su replicación *in vitro*. Preferiblemente, se trata de un herpesvirus aviario, principalmente el virus MDV de los serotipos 1, 2 y 3, o bien de un virus de la varicela VZV.

Según un primer modo de realización preferido de la invención, el cual se refiere a los herpesvirus que tienen un gen gD que no se expresa *in vitro*, el herpesvirus tiene su gen gD colocado bajo el control de un promotor distinto del promotor natural de este gen. El promotor natural del gen gD se remplaza con un promotor endógeno (es decir, un promotor de este virus o de los otros serotipos de este virus, principalmente un promotor temprano) o exógeno, que permite la expresión del gen gD *in vitro*.

En un segundo modo de realización preferido de la invención, el herpesvirus comprende un casete de expresión que comporta que el gen gD esté bajo el control de un promotor que permite su expresión en el momento de la replicación del virus *in vitro*.

ES 2 270 427 T3

En el caso de un herpesvirus que no presenta de forma natural el gen gD, el casete comprende el gen gD de otro virus, por ejemplo, del HSV o incluso de un virus tal como el MDV, incluyendo el HVT, y un promotor apropiado que puede ser el promotor natural del gen insertado o ser otro promotor distinto, que será el caso cuando el gen gD provenga de un virus del tipo MDV, siendo la condición que se obtenga la expresión del gen gD *in vitro*.

En el caso de un herpesvirus que solamente es deficiente en la expresión de gD *in vitro*, el casete también puede comprender tanto el gen gD endógeno como otro gen gD, y un promotor apropiado tal y como se ha definido más arriba.

El casete de expresión se inserta en un sitio no esencial para la replicación del virus ni para la eficacia del virus como vacuna. Para los virus MDV de los serotipos 1, 2 y 3, un sitio de inserción se escoge ventajosamente de entre el grupo consistente en: US2, US3, US10, gI, gD, TK, RR2 y UL13. Se sobreentiende que esta enumeración no es limitativa y que puede utilizarse cualquier sitio de inserción potencial. Para el virus VZV, se puede escoger un sitio de inserción de entre el grupo consistente en: TK, US3, gI, gE, gC y la región intergénica US3-gI.

Se entiende que el gen gD, en el seno de un casete tal como el definido más arriba y cualquiera que sea su procedencia, puede insertarse en el MDV, u otro virus del mismo tipo, en el lugar del mismo gen gD o en otro sitio de inserción.

La presente invención tiene preferiblemente por objeto un herpesvirus escogido de entre el grupo consistente en: MDV de los serotipos 1, 2 y 3 y VZV, que expresa una glicoproteína gD durante el curso de su replicación *in vitro*.

La presente invención tiene por objeto la producción *in vitro* de virus, principalmente HVT y MDV, infecciosos, bajo la forma de viriones libres presentes en el sobrenadante del cultivo de células. Las técnicas de cultivos son principalmente las utilizadas habitualmente en la práctica para un virus determinado. Ellas son bien conocidas por el especialista y, por tanto, no se describirán con más detalle en la presente. La utilización de los virus transformado conforme a la invención en la producción de virus facilita la fabricación de vacunas, principalmente de aquellas contra la enfermedad de Marek, y de virus recombinantes, principalmente del HVT y MDV, permitiendo obtener un efecto citopático generalizado más rápido (2 a 3 días según la riqueza del inóculo) y una mejor resistencia del virus en las operaciones de conservación mediante congelación y mediante liofilización. Se obtienen ventajosamente títulos elevados en virus libres en el sobrenadante de los cultivos en comparación con los que se obtienen en ausencia de expresión de la gD. Se trata de un resultado notable.

Por tanto, la invención tiene por objeto un procedimiento de cultivo de herpesvirus deficientes en gD de forma natural, en el cual se cultiva sobre células el virus que se ha transformado mediante recombinación genética para expresar la glicoproteína gD, a continuación se recogen los viriones producidos en el sobrenadante del cultivo. Las técnicas de cultivos son principalmente las utilizadas habitualmente en la práctica. El especialista está perfectamente al tanto de las técnicas apropiadas para cada virus, y por tanto, no se han descrito más detalladamente en la presente.

La invención tiene también por objeto los cultivos de herpesvirus susceptibles de obtenerse por este procedimiento. Estos cultivos se caracterizan principalmente por el hecho de que comprenden el virus, principalmente el MDV, HVT, VZV, en el estado de virión libre, es decir, no asociado a las células, y que presentan las propiedades y cualidades ya descritas.

La presente invención tiene también por objeto la producción *in vitro* de virus, principalmente del HVT o MDV, infecciosos que pueden utilizarse como vectores de expresión para genes ajenos, en particular para los genes o fracciones de genes que codifican los antígenos que inducen una protección contra las enfermedades, en particular una protección de las aves de avicultura contra los virus, bacterias y parásitos patógenos responsables de enfermedades aviarias, y más particularmente de los pollos.

La invención tiene igualmente por objeto los herpesvirus tales como los definidos más arriba, los cuales comprenden al menos un gen heterólogo insertado en su genoma de manera que este gen se puede expresar *in vivo*. Efectivamente, el virus recombinante puede comprender, bien un casete doble que incluye el gen gD, el promotor del mismo, y el gen que codifica el antígeno con un promotor apropiado, pudiendo insertarse el casete en el sitio gD para un virus tal como el MDV, o en otro sitio; bien un casete para cada gen, comprendiendo éste el gen gD, el cual que puede haberse insertado, por ejemplo, en un sitio distinto del sitio gD natural en el caso de un virus tal como el MDV, y pudiendo insertarse el otro casete en el sitio gD natural, o en cualquier otro sitio apropiado; o incluso se reemplaza sólo el promotor natural del gen gD y la casete que comprende el gen heterólogo se inserta en otro sitio apropiado.

Es importante destacar que, cuando el virus tal como el MDV ha sido transformado para expresar un gen gD endógeno o de otro serotipo bajo el control de un promotor eficaz según la invención, este gen insertado se expresa *in vivo* durante el curso de la viremia y no solamente en los folículos plumosos (el caso del gD natural), lo que se traduce principalmente en una respuesta inmunitaria, en concreto celular, más intensa y más temprana.

La presente invención tiene aún por objeto la producción de vacunas ventajosamente utilizables por las vías aéreas (nasal, ocular), oral o parenteral, principalmente para inmunizar los pollos contra la enfermedad de Marek y contra las otras enfermedades correspondientes a los antígenos específicos expresados para los virus HVT o MDV recombinantes.

ES 2 270 427 T3

Las vacunas según la invención se caracterizan por el hecho de que comprenden un virus vivo tal y como se ha definido más arriba, y que pueden presentarse principalmente en forma liofilizada o congelada.

El procedimiento de producción de una vacuna viva según la invención se caracteriza por el hecho de que se cultiva sobre células un herpesvirus deficiente de forma natural en gD, el cual se ha transformado para expresar el gD durante su replicación *in vitro*, y eventualmente transformarse para expresar *in vivo* al menos un gen heterólogo que codifica un antígeno o inmunógeno de vacuna.

La presente invención tiene igualmente por objeto la producción de vacunas que pueden administrarse *in ovo* para vacunar los polluelos contra la enfermedad de Marek, y las vacunas obtenidas.

La presente invención tiene de manera específica por objeto la utilización del gen gD como locus de inserción para construir herpesvirus aviarios recombinantes, principalmente HVT o MDV, que expresan en sí genes ajenos de interés para vacunas.

La presente invención tiene también por objeto la obtención de virus aviarios, principalmente del HVT o MDV, infecciosos, que pueden servir como vectores para la expresión de antígenos ajenos y permiten la vacunación *in ovo*.

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de vacunación, principalmente de pájaros de avicultura, utilizando los virus transformados según la invención, y previendo principalmente su administración por vía aérea, si bien no se excluyen las otras vías.

Por último, la revelación del principio que es la base de la invención permite al especialista buscar, también entre los virus del tipo MDV, mutantes naturales que expresan el gD *in vitro*. Estos mutantes entran por tanto en el ámbito de la invención.

La invención se describirá a continuación más detalladamente con la ayuda de ejemplos de realización que se refieren a las figuras, en las cuales se observa:

- en la figura 1: por digestión del plásmido pRD001, que comprende un fragmento de 29 kpb del ADN de HVT, construcción de los plásmidos pRD006 y pRD007, los cuales comprenden respectivamente un fragmento de 2,8 kb, incluyendo la parte de gD que está en 5' respecto de PstI, y un fragmento de 5,7 kb que incluye la parte de gD en posición 3' respecto PstI;

- en la figura 2: construcción del plásmido pRD015 que comprende la parte flanqueante en 5' del gD, a partir del plásmido pRD001;

- en la figura 3: el plásmido pRD022 obtenido a partir del vector pBS-SK+ y que comprende el gen gD desprovisto de su parte en 5' respecto del sitio SacI;

- en la figura 4: el plásmido pRD030 que comprende la totalidad del gen gD y los sitios de restricción que lo enmarcan;

- en la figura 5: a partir del pCMV β , construcción del plásmido pRD031 que contiene el gen gD bajo el control del promotor de la IE del HCMV, por sustitución del gen LacZ por gD;

- en la figura 6: plásmido pRD040 que comprende una casete que incluye el gen gD y el promotor de la IE del HCMV, en el vector pBS-SK+;

- en la figura 7: construcción del plásmido pRD041, obtenido por la adición, al plásmido pRD040, de la secuencia flanqueante en 5' contenida en el plásmido pRD015;

- en la figura 8: construcción del plásmido pRD043 que comprende el gen gD, el promotor HCMV, y el conjunto promotor del SV40 y gen LacZ, aportado por pSV β , en pRD041 entre el promotor del HCMV y la secuencia 5' flanqueante;

- en la figura 9: construcción del plásmido pRD046 a partir del plásmido pBamB que contiene un fragmento HVT BamHI B que incluye el gen TK;

- en la figura 10: construcción del plásmido pRD051 mediante la introducción de un sitio de restricción múltiple en el sitio único DraIII el plásmido pRD049;

- en la figura 11: construcción del plásmido pRD053 que comprende el casete promotor del HCMV y el gen HVT-gD insertado en el gen TK de HVT.

Ejemplos

Todas las técnicas utilizadas para las construcciones de los plásmidos donantes son las técnicas estándares de biología molecular descritas por Sambrook *et al.*, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989). Se considera que el contenido de esta publicación está incorporado en esta descripción.

Ejemplo 1

Este ejemplo tenía por doble objetivo demostrar, por una parte la expresión de gD en el epitelio de los folículos plumosos del pollo, y por otra parte que, de conformidad con la invención, la no expresión de gD *in vitro* está vinculada al promotor natural y que puede obtenerse mediante la sustitución del promotor natural por otro promotor.

- Plumas y tejidos

Unos polluelos Rhode Island Red (HPRS RIR) de un día de edad recibieron 1000 u.f.p. (unidades formadoras de placas) de una cepa MDV RB1B ó HPRS16, y las plumas, escroto, timos y bazos se extrajeron a las 4 a 6 semanas después de la inoculación. Los mismos tejidos provenientes de pollos SPF no infectados sirvieron como controles.

Las plumas obtenidas a partir de las regiones dorsal y pectoral se cogieron por el extremo proximal, y se cortaron con tijeras las puntas de las plumas, de aproximadamente 0,5 cm longitud, y se colocaron en suspensión en PBS o en un tampón de extracción (ditiotreitol 5 mM, PMSF 50 µg/ml, sarcosil 1,5%). Por regla general, se utilizaron 20 puntas de pluma por ml de tampón. Después de una incubación de 24 a 36 horas a 4°C, se trataron las preparaciones con ultrasonidos (3 × 30 s) y se centrifugaron a 10.000 r.p.m. en un microcentrífuga. Los sobrenadantes, que habitualmente contenían 2 µg de proteína por µl, se utilizaron para un análisis de transferencia Western.

Los antígenos se extrajeron de las bolsas (de Fabricio), timos y bazos con la ayuda de los mismos tampones utilizados para las plumas.

- CEP infectados por un virus de la viruela vacuna-gD recombinante

Se infectaron fibroblastos de embrión de pollo (CEP) con un virus de la viruela vacuna-gD recombinante (virus de la vacuna portando el gen gD insertado en un sitio no esencial para su replicación y bajo el control de un promotor endógeno del virus de la viruela vacuna) con una multiplicidad de infección de aproximadamente 1 u.f.p./célula, y se cosecharon de 3 a 4 días más tarde, cuando los e.c.p. (efectos citopáticos) eran muy pronunciados. Se recolectaron las células, se lavaron rápidamente en PBS, y se trataron con ultrasonidos en PBS a una concentración de 2×10⁷ células/ml.

- Transferencia Western

Las muestras destinadas al análisis mediante transferencia Western se llevaron a ebullición en un tampón desnaturalizante, y se aplicaron 10 µg de plumas o de tejido por pocillo (o carril). En el caso de CEP infectados por el virus de la viruela vacuna-gD, solamente se aplicaron 4 µg por pocillo. Los polipéptidos se separaron mediante electroforesis en gel de acrilamida al 12%, utilizando un aparato mini-gel de Biorad, y se transfirieron sobre nitrocelulosa (Hybond C, Amersham). Después de la transferencia, los polipéptidos se tiñeron con Rojo Ponceau y se fotografiaron para asegurarse de que las cantidades de proteína depositadas en cada pocillo eran comparables.

Las transferencias se aclararon con PBS, se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBST (Tris 25 mM pH 7,6, NaCl 0,14 M, y 0,05% de Tween 20), y se lavaron 4 veces en PBST, cada vez durante 5 minutos. A continuación se trataron con un sobrenadante del hibridoma DA7 (específico de gD) diluido 1/50 en PBS que contenía 1% de BSA, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 4 lavados en PBST, las transferencias se incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugados con peroxidasa (Sigma), diluidos 1/1000 en PBST, y los anticuerpos unidos se detectaron mediante quimioluminiscencia (reactivo quimioluminiscente Dupont para transferencias Western, Dupont). Se expusieron películas sensibles a los rayos X de 30 segundos a 1 minuto según la técnica clásica.

- Ensayo de inmunofluorescencia

Los cortes de piel efectuados con un microtomo (Cryostat) se fijaron con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se secaron al aire, se trataron con 5% de BSA en PBS durante 30 minutos, a temperatura ambiente, para impedir las reacciones no específicas. A continuación se añadió el anticuerpo monoclonal DA7 (dilución al 1/100 en BSA al 1% en PBS) o el anticuerpo monoclonal BD1 (líquido de ascitis de ratón, específico de pp38/24, diluido al 1/1000 en BSA al 1% en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron 3 veces en PBS, cada vez durante 15 minutos. A continuación se añadieron durante 1 hora, a temperatura ambiente, las IgG de cabra anti-ratón conjugadas con la FITC, diluidas 1/100 en BSA al 1% en PBS. Los cortes se lavaron 4 veces en PBS, cada vez durante 15 minutos, se sumergieron en agua, se montaron en glicerol/PBS y se examinaron bajo luz UV con la ayuda de un microscopio de fluorescencia.

- Resultados

El análisis de transferencia Western mostró que las preparaciones de plumas provenientes de 3 pollos diferentes infectados por MDV reaccionaban con el anticuerpo monoclonal DA7. Los anticuerpos reconocieron un polipéptido que aparecía bajo la forma de un banda de 55 kDa, lo que es conforme con el tamaño esperado para la gD y el producto de la traducción *in vitro* del gen gD del MDV (Zelnik *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 75:2747-2753). Los productos de pesos moleculares más bajos (35 kDa e inferiores) se revelaron y podrían corresponder a formas no glicosiladas.

Esto demuestra la expresión del gD en los folículos plumosos de los pollos infectados por MDV.

Los extractos de pollos no infectados, de CEP no infectados, y de CEP infectados por el virus de la viruela vacuna solo, no reaccionaron con el DA7 monoclonal, lo que demuestra la especificidad del ensayo. Los extractos de CEP infectados con el virus de la viruela vacuna-gD recombinante dieron dos bandas, en donde una banda correspondía a la banda de 55 kDa del ensayo con los extractos de plumas.

La especificidad del ensayo se controló además demostrando que el monoclonal dirigido contra pp38/24 no reacciona ni con los CEP infectados por el virus de la viruela vacuna-gD recombinante, ni con los CEP no infectados. Por contra, el monoclonal reacciona bien, como se espera, con los extractos de plumas de pollos infectados y con los CEP infectados por MDV.

Por tanto, se ha demostrado que, a la vez, las preparaciones de plumas infectadas por MDV y los CEP infectados por el virus de la viruela vacuna-gD recombinante reaccionan con el anti-gD monoclonal, y, por tanto, que se había obtenido la expresión *in vitro* de este gen.

La sustitución del promotor natural del gen gD por otro promotor permite por tanto expresar el gD *in vitro*.

Ejemplo 2

Construcción del plásmido pRD043

La cepa FC126 del virus HVT fue aislada en 1968 por el Dr Witter del Regional Poultry Research Laboratory (U.S.D.A., East Lansing, Michigan, EE.UU.) a partir de un grupo de pavos de 23 semanas (R.L. Witter *et al.*, *Am. J. Vet. Res.*, 31:525-538 (1970)). A continuación se pasó 10 veces sobre fibroblastos de pato, a continuación sufrió 9 pasajes suplementarios sobre fibroblastos de embriones de pollos EOPS. El ADN utilizado proviene de virus que han experimentado un total de 23 a 24 pasajes a partir del aislado de origen.

También se podría utilizar, por ejemplo, la cepa HVT registrada en la ATCC con la referencia VR584C.

El ADN genómico del virus HVT se extrajo según la técnica descrita por N. Ross (Ross L.J.N. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 70:1789-1804 (1989) incorporada aquí por referencia). Este ADN se digirió con BamHI, a continuación el fragmento de A de 29 kpb (Igarashi T. *et al.*, *Virology*, 157:351-358 (1987)), que comprendía la región Us del HVT, se clonó en el vector pBR322 previamente digerido con BamHI para proporcionar el plásmido pRD001. pRD001 se digirió con PstI y los fragmentos PstI-PstI 2,8 kpb y 5,7 kpb se clonaron en el plásmido pBR322 digerido con PstI para dar respectivamente los plásmidos pRD006 y pRD007 (Figura 1).

pRD001 se digirió con XhoI y el fragmento XhoI-XhoI de 3,5 kpb se clonó en el vector pBluescript KS+ para proporcionar el plásmido pRD015 (Figura 2). El plásmido pRD006 se digirió con SacI y PstI para aislar el fragmento SacI-PstI de 340 pb (fragmento A). Se realizó una PCR con los oligonucleótidos RD045 (SEC. N° ID.: 1: 5' TGCTGGTACC GTCGACAAGC TTGGATCCGT GCAGATAACA CGTACTGGC 3') y pBR Pst- (SEC. N° ID.: 2: 5' CATGTAATC GCCTTGATC 3') y la matriz pRD007 para amplificar la región 3' del gen gD (posiciones 6491 a 6980 en la secuencia HVT Us (Zelnik V. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 74:2151-2162 (1993) incorporada en la presente invención por referencia). El fragmento de la PCR de 560 pb se digirió a continuación con PstI y KpnI para aislar un fragmento B PstI-KpnI de 520 pb. Los fragmentos A y B se clonaron en el vector pBS-SK+, previamente digerido con SacI y KpnI, para obtener el plásmido pRD022 (Figura 3), que comprende el gen gD desprovisto de una parte 5'.

El plásmido pRD022 se digirió con BamHI y SacI para aislar el fragmento BamHI-SacI de 850 pb (fragmento C). Se realizó una PCR con los oligonucleótidos RD050 (SEC. N° ID.: 3: 5' TGCTGAATTC GCGGCCGCAT GAT TATTGTC ACCACTTCGA AGATGGC 3') y HVT40M1 (SEC. N° ID.: 4: 5' GTCCCCGTTG ACAACTACTA 3') y la matriz pRD006 para amplificar la región 5' del gen gD (posiciones 5747 a 6286 en la secuencia HVT Us (Zelnik V. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 74:2151-2162 (1993))). El fragmento de la PCR de 560 pb se digirió con EcoRI y SacI para aislar un fragmento D EcoRI-SacI de 420 pb. Los fragmentos C y D se clonaron en un vector pBS-SK+ modificado, que ya no comportaba los sitios XbaI y SpeI (pBS-SK+ digerido con XbaI y SpeI, y ligado a continuación), digerido con EcoRI y BamHI para proporcionar el plásmido pRD030 (Figura 4), que comprende el gen gD.

El plásmido pRD030 se digirió con NotI para aislar el fragmento NotI-NotI de 1250 pb. Este fragmento se clonó en el vector pCMV β (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA) digerido con NotI para la inserción del gen gD en el lugar de LacZ, lo que proporciona el plásmido pRD031 (4944 pb) que contiene el gen HVT-gD bajo el control del promotor de la IE del HCMV (Figura 5).

ES 2 270 427 T3

El plásmido pRD031 se digirió por una parte con EcoRI y BstBI, y por otra parte con BstBI y BamHI para aislar respectivamente el fragmento EcoRI-BstBI de 800 pb y el fragmento BstBI-BamHI de 1250 pb. Estos dos fragmentos se clonaron en el vector pBS-SK+ digerido con EcoRI y BamHI para obtener el plásmido pRD040 (Figura 6) que comprendía el promotor del HCMV y gD en el vector SK+.

El plásmido pRD015 se digirió con KpnI y BstBI para aislar un fragmento KpnI-BstBI de 2100 pb. Este fragmento se clonó en el vector pBS-KS+ digerido con KpnI y ClaI para proporcionar el plásmido pRD033 (5024 pb). El plásmido pRD040 se digirió con EcoRI y SpeI para aislar el fragmento EcoRI-SpeI de 2000 pb. Este fragmento se clonó en el plásmido pRD033 digerido con EcoRI y XbaI para proporcionar el plásmido pRD041 (Figura 7) que comprendía gD, el promotor del HCMV y la región 5' flanqueadora.

El plásmido pSV β (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA) se digirió con EcoRI y HindIII para aislar el fragmento EcoRI-HindIII de 4300 pb. Este fragmento se clonó en el plásmido pRD041 digerido con EcoRI e HindIII para proporcionar el plásmido pRD043 (11306 pb) (Figura 8) que comprendía además, en relación al pRD041, el gen LacZ y su promotor del SV40.

El plásmido pRD053 permite remplazar a la vez el promotor natural del gD por el promotor de la IE del HCMV e introducir, mediante recombinación homóloga, utilizando el brazo 5' correspondiente al fragmento que va de la base 2152 a la 4245 (Zelnik 1993, ver más arriba) (fragmento que corresponde a la mayor parte del gen sORF-3, al gen US2, y al inicio del gen US3), y el brazo 3' que va de la posición 5747 (A de la ATG del gen gD) a 6980 (la cual corresponde al gen gD y al poli-A).

Se entiende que, en lugar de aportar el gen LacZ, se podría aportar también con igual facilidad un gen que codificara un antígeno de interés.

Ejemplo 3

Construcción del plásmido pRD053 (casete CMV-gD en TK)

El fragmento HVT BamHI B (Igarashi T. *et al.*, *Virology*, 157:351-358 (1987)) que contenía el gen TK se clonó en el vector pBR322 para proporcionar el plásmido pBamB. El plásmido pBamB se digirió con HindIII para aislar el fragmento HindIII-HindIII de 3200 pb. Este fragmento se clonó en el vector pBS-SK+ digerido con HindIII para proporcionar el plásmido pRD046 (Figura 9). El plásmido pRD046 se digirió con Sall, se reparó con la polimerasa Klenow, y a continuación se digirió con SacI para aislar el fragmento Sall(K)-SacI de 3200 pb. Este fragmento se ligó a continuación con el vector pUC18 previamente digerido con HindII y SacI para proporcionar el plásmido pRD049 (5943 pb). El plásmido pRD049 se digirió entonces con DraIII (sitio único en pRD049), se desfosforiló por la acción de la fosfatasa alcalina, y se ligó con un oligonucleótido sintético de doble hebra obtenido mediante la hibridación de los dos oligonucleótidos siguientes:

RD053 SEC N° ID.: 5' GTGGTACCAT AGTCGACACC CT 3'

RD054 SEC N° ID.: 6' GTGTCGACTA TGGTACCACA GG 3'

El plásmido obtenido de este modo se denominó pRD051 (Figura 9). Este plásmido se digirió con KpnI y Sall para aislar el fragmento KpnI-Sall de 5960 pb (fragmento A). El plásmido pRD040 (ver el Ejemplo 1) se digirió con KpnI y BstBI para aislar el fragmento KpnI-HCMV IE-ATG-BstBI de 800 pb (fragmento B). El plásmido pRD031 se digirió con BstBI y Sall para aislar el fragmento BstBIHVT gD-Sall de 1450 pb (fragmento C). Los fragmentos A, B y C se ligaron a continuación juntos para proporcionar el plásmido pRD053 (Figura 11), que comprende el casete de gD insertado en TK.

Este plásmido permite la introducción de este casete de gD en el gen TK por recombinación homóloga utilizando los brazos flanqueadores 5' y 3' respectivamente homólogos de las regiones hacia arriba respecto del sitio DraIII del gen TK (fragmento HindIII-DraIII de 520 pb) hacia abajo respecto del sitio DraIII del gen TK (fragmento DraIII-HindIII de 2650 pb). Esta inserción conduce a la inactivación de TK.

Este plásmido se linealizó con ScaI antes de la cotransfección con el ADN vírico del HVT.

Ejemplo 4

Aislamiento y purificación del virus recombinante vHVT004

El ADN vírico utilizado en los experimentos de transfección se preparó según la técnica descrita por Robin Morgan (Morgan R. W. *et al.*, *Avian Diseases*, 34:345-351 (1990), incorporada en la presente invención por referencia). El plásmido pRD043 se digirió con KpnI para su linealización, entonces se extrajo con una mezcla de fenol/cloroformo (19:1), se precipitó con etanol absoluto, y se recuperó en agua estéril.

Una células CEP primarias de 24 horas se transfectaron con la mezcla siguiente: 5 μ g de ADN vírico + 1 μ g del plásmido pRD043 linealizado en 300 μ l de medio OptiMEM (Gibco) y 100 μ g de Lipofectamine (Gibco BRL, Ref.

18324-012) en 300 μ l de medio (volumen final de la mezcla = 600 μ l). Estos 600 μ l se diluyeron a continuación en 3 ml (volumen final) de medio y se extendieron sobre 3×10^6 CEP. La mezcla se dejó 5 horas en contacto con las células, a continuación se eliminó y se reemplazó con 5 ml de medio de cultivo. La células se dejaron entonces en cultivo 3 días, a 37°C, a continuación se trataron con pronasa, se mezclaron con CEP secundarias frescas (mezcla 3:1), y se extendieron de nuevo sobre placas de Petri hasta la aparición de un efecto citopático (ECP). La capa de células se trató entonces con pronasa y sirvió de inóculo (a razón de 1 calva por placa) para placas de 60 mm (que contenían 2×10^6 CEP secundarias). Tres días después de la inoculación, se vertió una capa de agar sobre la capa de células. 24 horas más tarde, se vertió una capa adicional de agar que contenía X-Gal (500 μ g por ml final). Tres horas más tarde, se desarrolló una coloración azul intensa a nivel de las calvas que contenían los virus recombinantes. Entonces, cada calva azul se resembró individualmente para su amplificación en un pocillo de una placa de 96 pocillos. En el momento de la aparición de un ECP, se trató el pocillo con pronasa y sirvió de inóculo para una nueva placa de 60 mm. La selección de las calvas recombinantes y la estimación del porcentaje de purificación de estas placas se hizo como anteriormente, mediante la coloración con X-Gal de las calvas bajo agar. En general, son suficientes 4 ciclos de aislamiento sucesivos para obtener virus recombinantes la totalidad de cuya progenie presenta la coloración azul. Cada calva individual purificada al 100% se caracteriza entonces a nivel molecular mediante las técnicas de la PCR y de la transferencia Southern, utilizando los oligonucleótidos y las sondas de ADN apropiadas.

Se aisló un clon puro al 100% y que presentaba las características del recombinante esperado y se denominó vHVT004. Este virus contiene un casete SV40-LacZ insertado entre los genes US2 y gD, así como el promotor de la IE del HCMV ubicado más arriba del gen gD y controlando de ese modo este gen en su sitio de origen. Entonces se suprimió en este virus el US3, que es el sitio de inserción.

Ejemplo 5

Aislamiento y purificación del virus recombinante vHVT005 (TK-)

El ADN genómico del virus HVT utilizado en los experimentos de transfección se preparó como anteriormente (Morgan R. *et al.*, *Avian Diseases*, 14:219-233 (1970)). Las transfecciones se realizaron con el plásmido pRD053 linealizado con ScaI tal y como se describió en el Ejemplo 3. Después de 3 días de cultivo, las células se trataron con pronasa, se mezclaron con CEP secundarias frescas, y se extendieron de nuevo sobre placas de Petri. En el momento de la aparición de un ECP, se trató la capa de células con pronasa, y sirvió de inóculo para placas de Petri de 60 mm. El cultivo se efectuó entonces con un medio de cultivo que contenía 1- β -D-arabinofuranosil-timina (ara T) (Sigma) a una concentración final de 100 μ g/ml de medio de cultivo. La ara T inhibe la replicación de los virus HVT TK+ y sólo los mutantes naturales TK- o los recombinantes TK- pueden replicarse en presencia de ara T. Tres días después de la infección, se vertió una capa de agar sobre la capa de células. 24 horas más tarde, las calvas virales presentes sobre la capa de células se resembraron individualmente en pocillos de una placa de 96 pocillos. El cultivo de las calvas se hizo en presencia de ara T en el medio de cultivo. En el momento de la aparición de un ECP, los pocillos se trataron con pronasa, se depositaron diluciones de los pocillos infectados sobre placas de Petri, y se efectuó un nuevo ciclo de cultivo bajo agar tal y como anteriormente. Después de dos ciclos de cultivo en presencia de ara T, el cultivo pudo efectuarse en medio normal. Son suficientes cuatro ciclos de aislamiento/purificación para obtener clones recombinantes puros al 100% para el carácter TK-. Los clones se caracterizan entonces a nivel molecular con las técnicas habituales de la biología molecular (PCR, transferencia Southern, etc.).

Se aisló un clon puro al 100% y que presentaba las características del recombinante esperado y se denominó vHVT005. Este virus contiene el gen gD bajo el control del promotor de la IE del HCMV en el gen TK, el cual es, por tanto, inactivo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Virus de la enfermedad de Marek (MDV) del serotipo 1, 2 ó 3, recombinante (i) en el cual el gen gD del virus MDV se coloca bajo el control de un promotor distinto del promotor natural de este gen y apto para inducir la expresión del gen gD después de la replicación del virus en cultivo celular *in vitro*, o (ii) que comprende un casete de expresión que incluye un gen gD colocado bajo el control de un promotor distinto del promotor natural de este gen, y que permite su expresión después de la replicación del virus en cultivo celular *in vitro*, insertándose el casete en el genoma del MDV, en un sitio no esencial para la replicación del virus y para la eficacia del virus a título de vacuna.
- 10 2. Virus según la reivindicación 1, en el cual el sitio de inserción se escoge de entre el grupo consistente en: US2, US3, US10, gI, gD, TK, UL13, RR2.
- 15 3. Virus MDV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el cual el promotor integrado para garantizar la expresión *in vitro* de un gen gD es el promotor de la IE del HMCV o el promotor del SV40.
- 20 4. Virus MDV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende entre otros, al menos un gen heterólogo que codifica un antígeno de interés, insertado en el genoma del MDV de forma que este gen puede expresarse *in vivo*.
- 25 5. Virus MDV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual el casete de expresión según la reivindicación 1 comprende, entre otros, al menos un gen heterólogo que codifica un antígeno de interés colocado bajo el control de un promotor apropiado.
6. Vacuna que comprende un virus MDV recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Vacuna según la reivindicación 6, utilizable por las vías parenteral, oral o aérea.
8. Vacuna según la reivindicación 6 ó 7, en forma liofilizada o congelada.
- 30 9. Procedimiento de cultivo de herpesvirus, del virus MDV del serotipo 1, 2 ó 3, en el cual se cultiva sobre células el virus MDV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, a continuación se recogen los viriones producidos en el sobrenadante del cultivo.
- 35 10. Utilización de un virus MDV recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de una vacuna contra la enfermedad de Marek, destinado a ser administrado a un pájaro de avicultura por vía parenteral, aérea u oral.
- 40 11. Utilización según la reivindicación 10, siendo la vía aérea la vía nasal o la vía ocular.

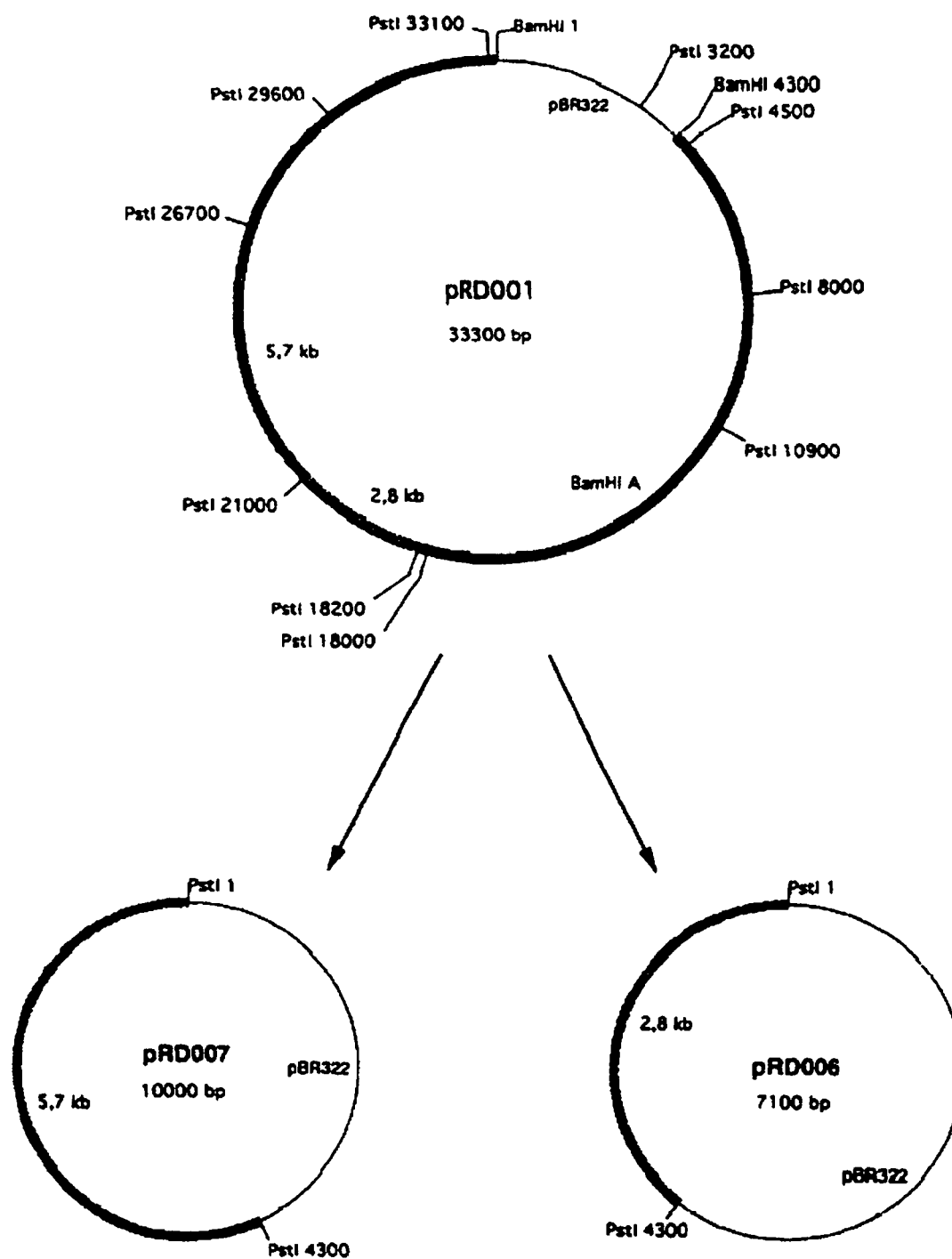


FIGURA 1

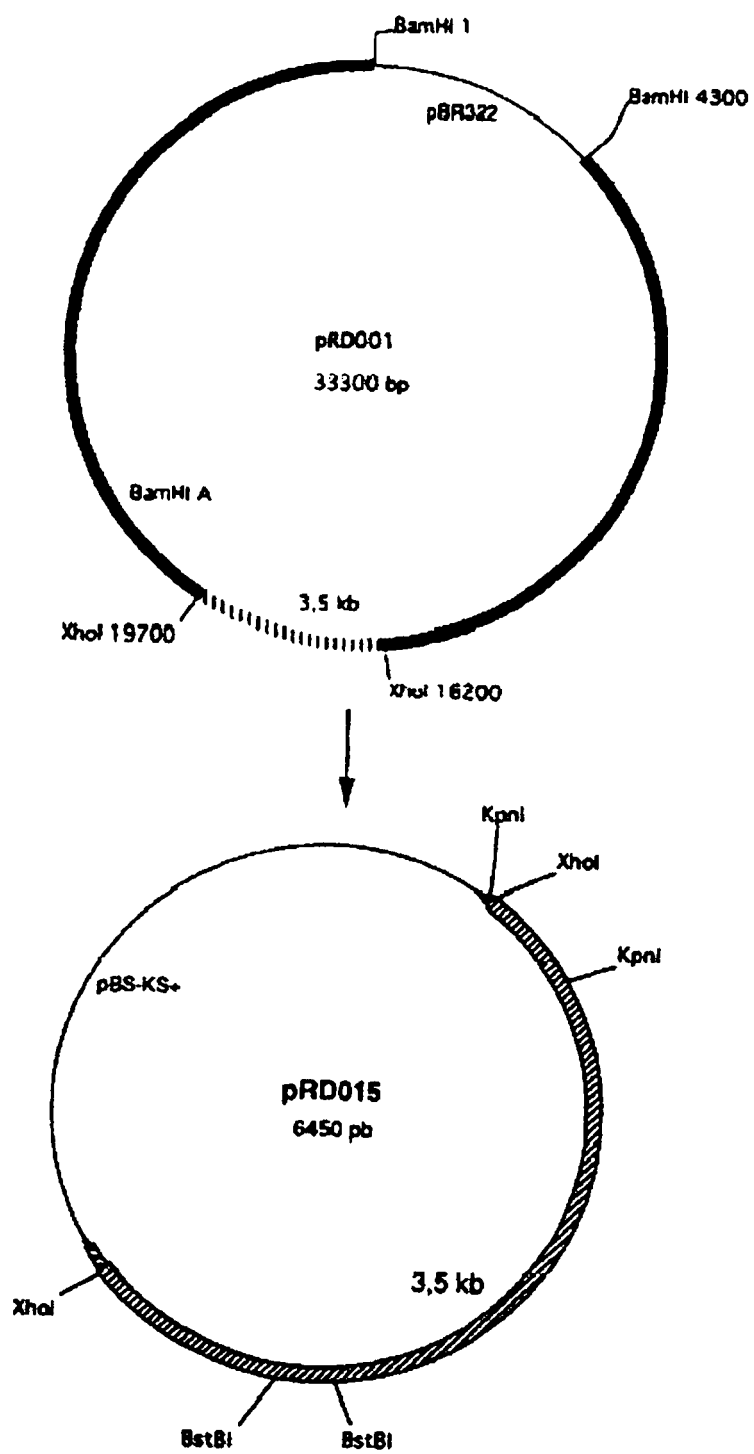


FIGURA 2

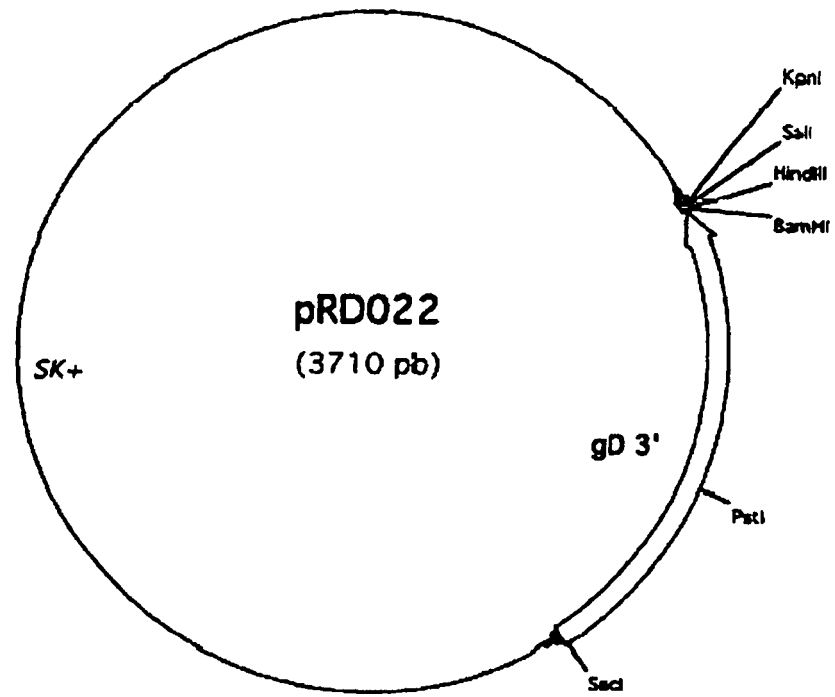


FIGURA 3

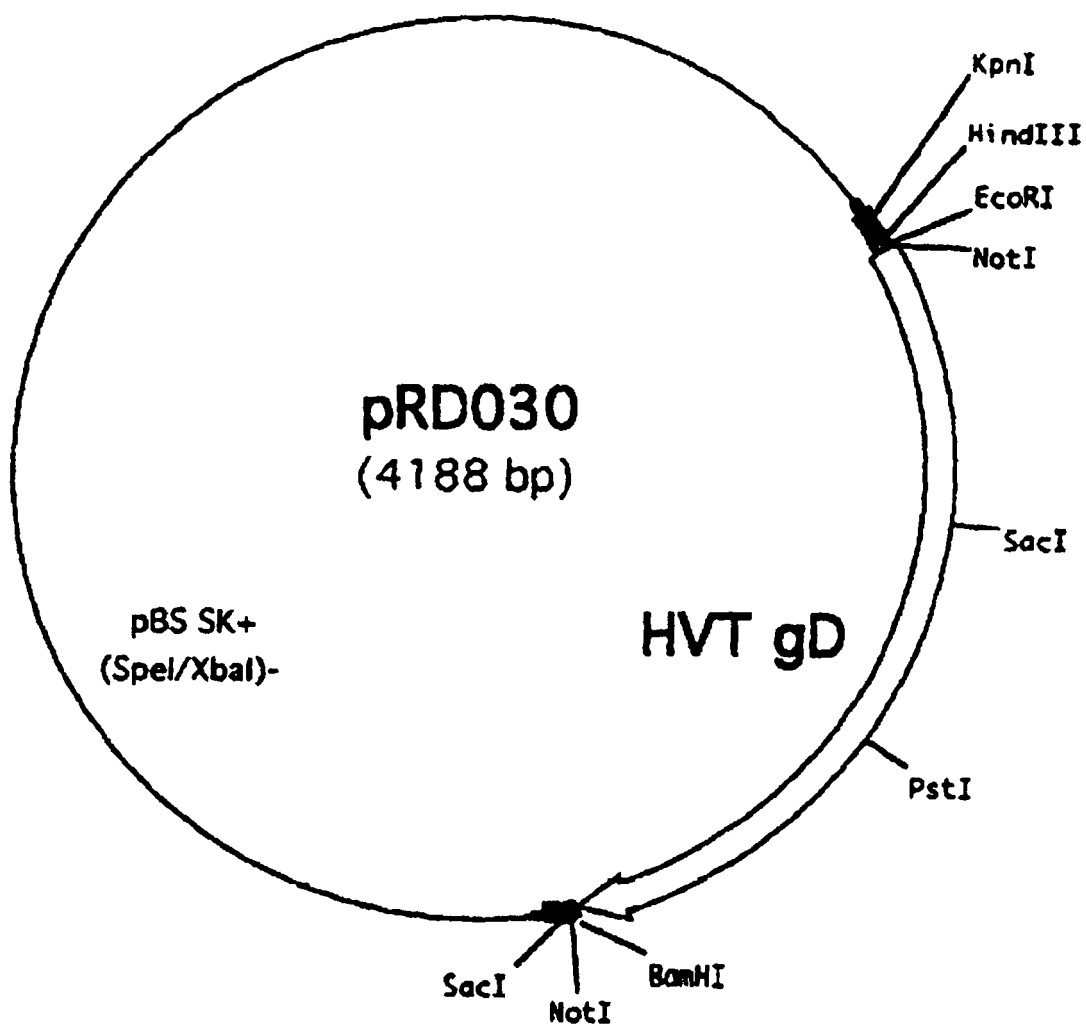


Figura 4

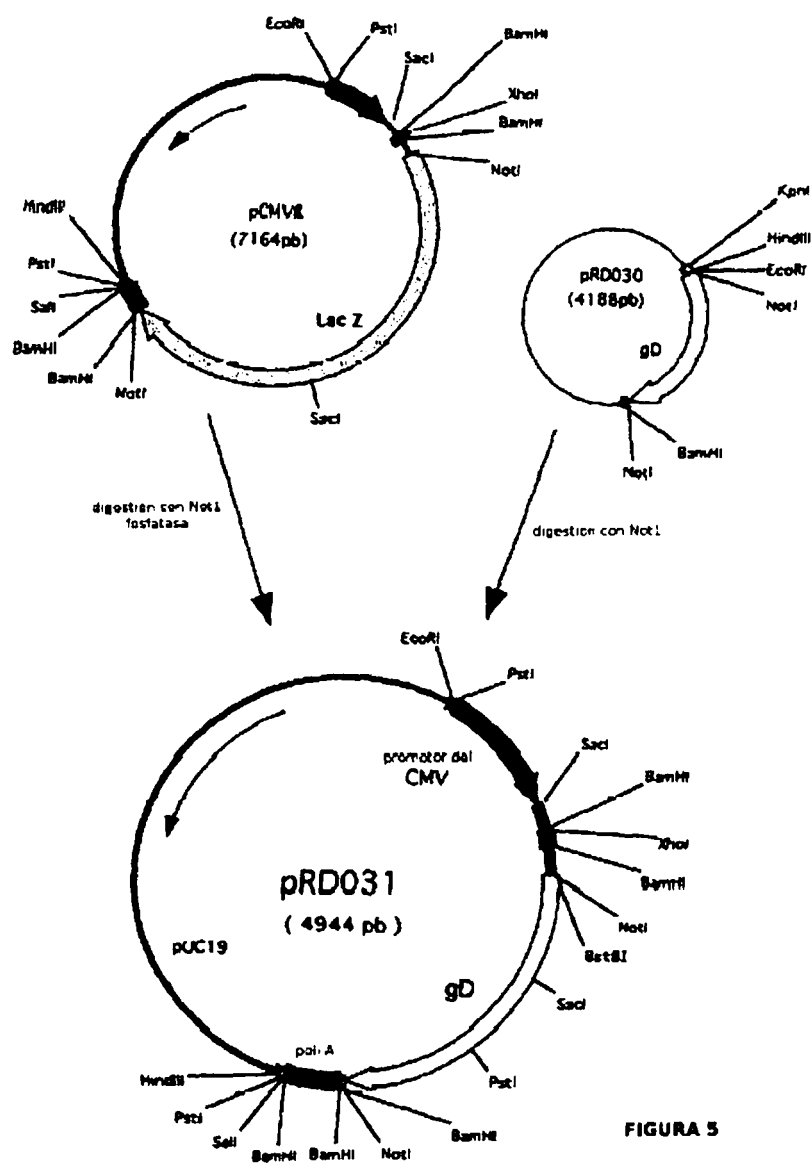


FIGURA 5

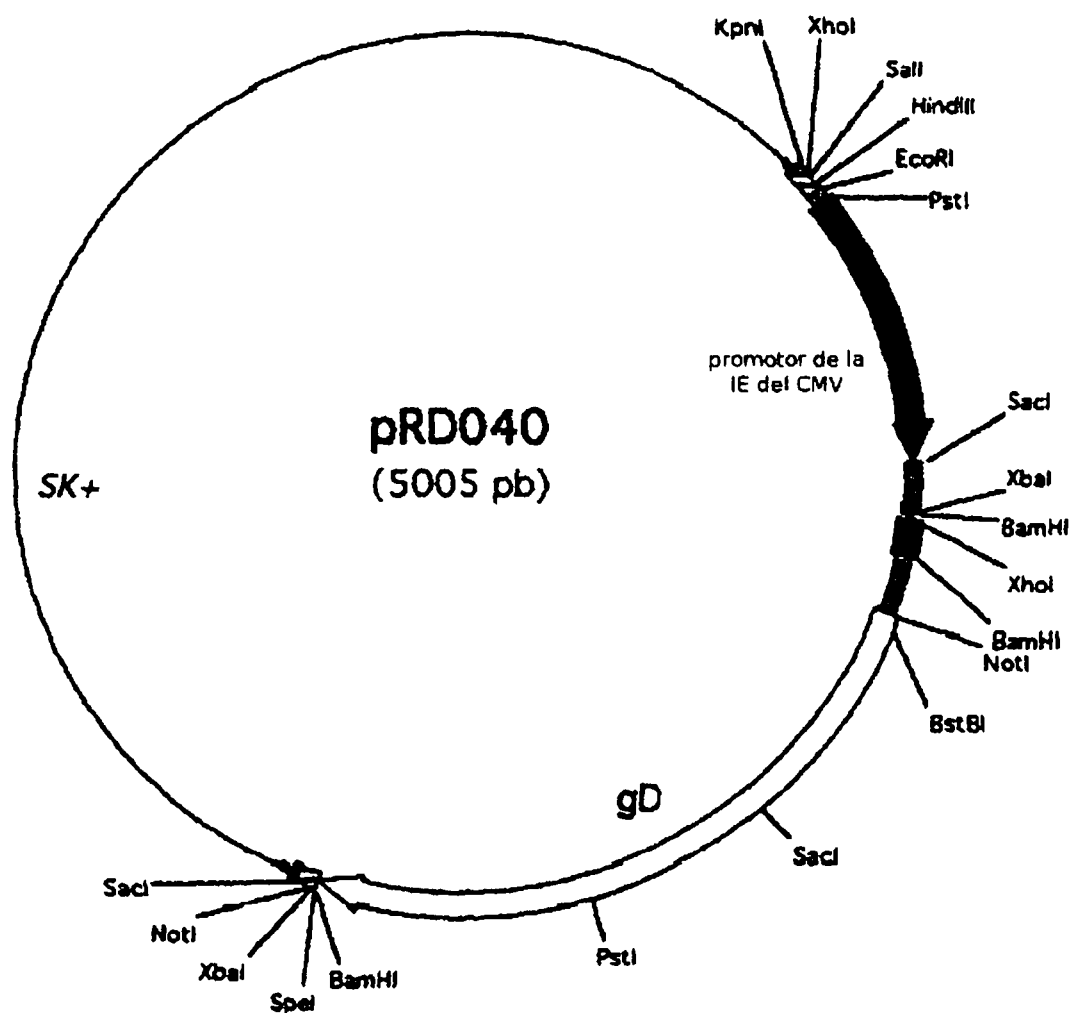


Figura 6

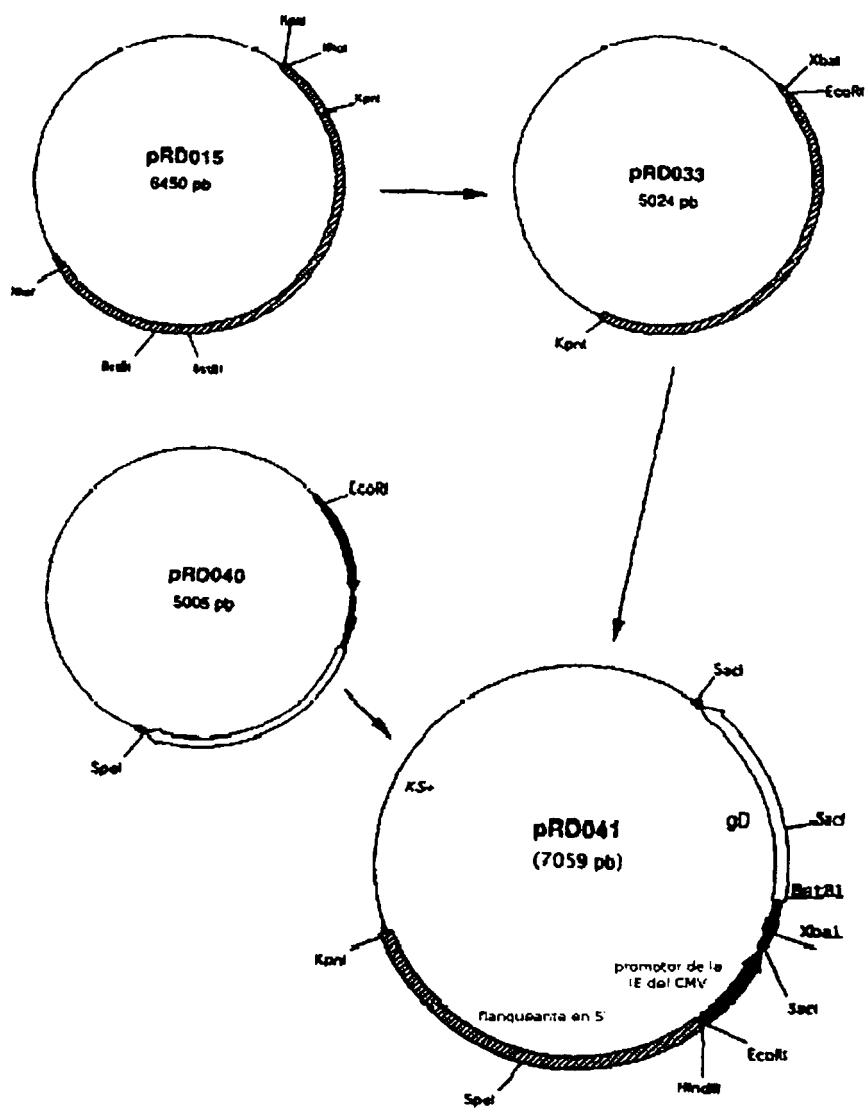


FIGURA 7

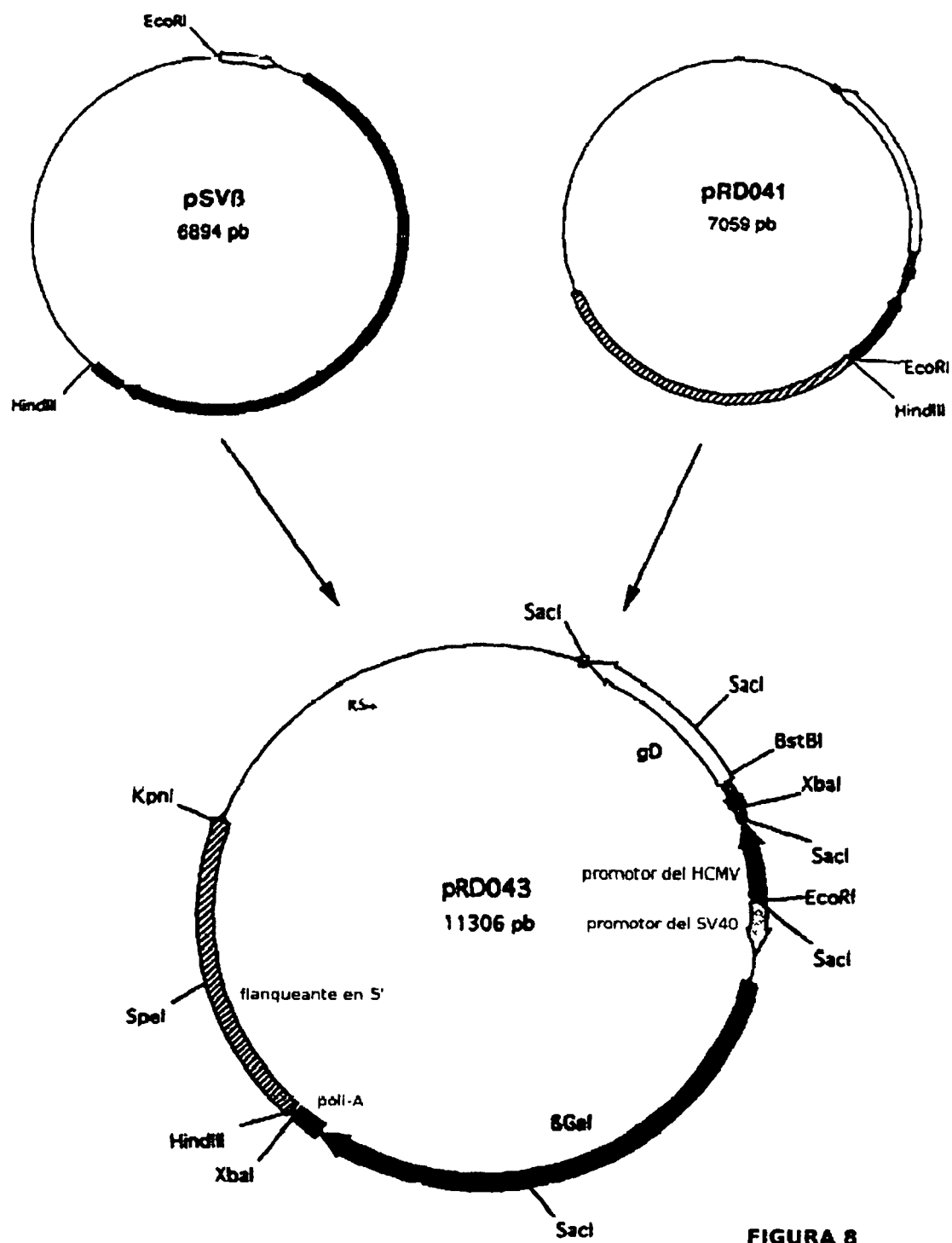


FIGURA 8

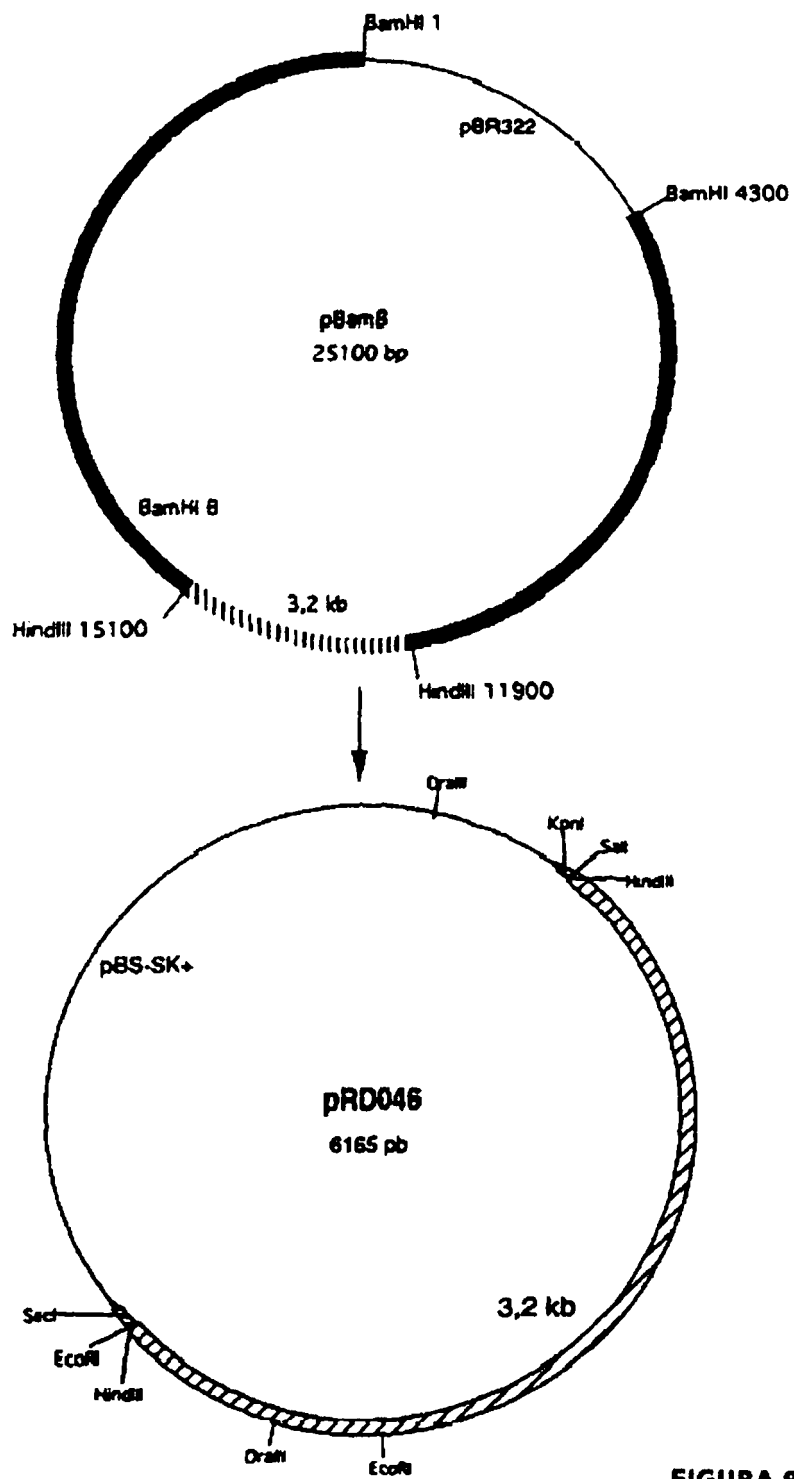


FIGURA 9

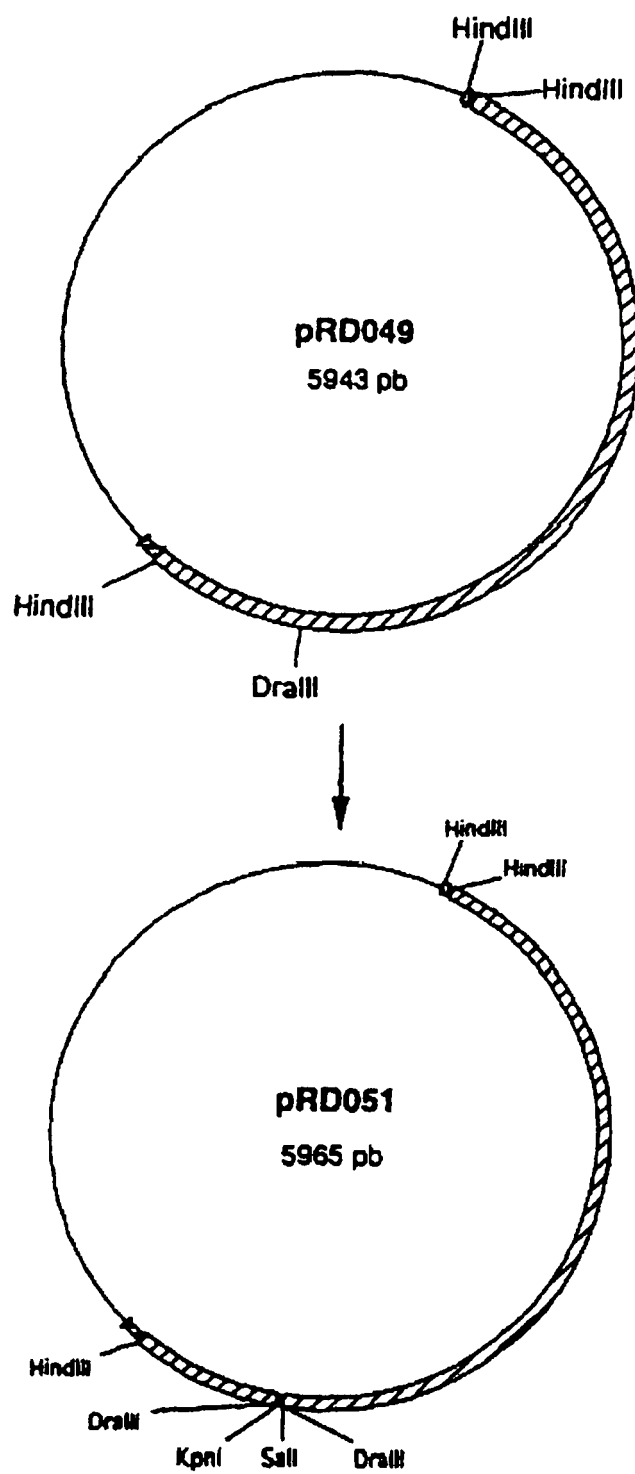


FIGURA 10

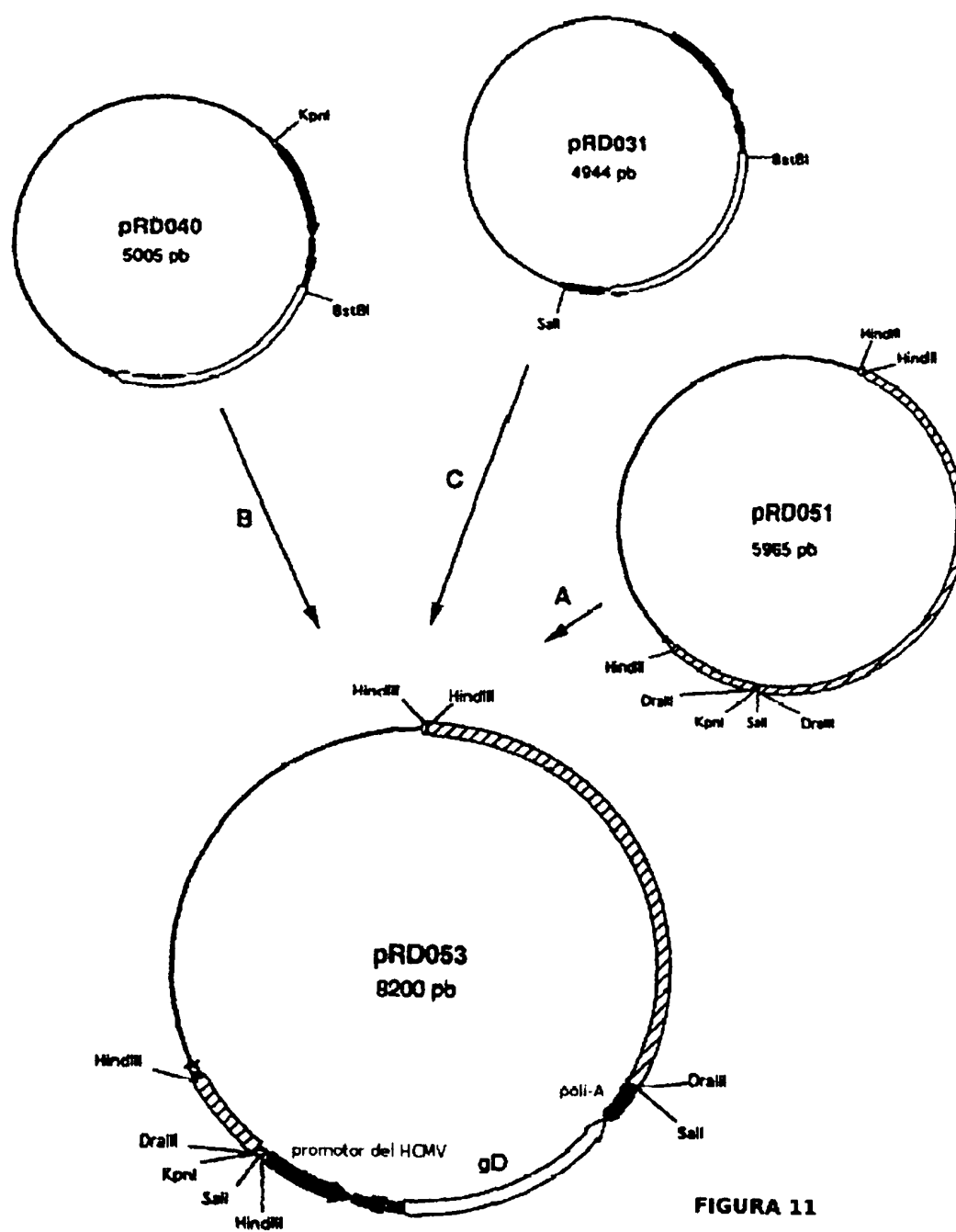


FIGURA 11