VACUNAS RECOMBINANTES FRENTE A ENFERMEDADES VÍRICAS: OPTIMIZACIÓN DE SU USO Y PERSPECTIVAS

Dra. Isabel Gimeno (North Carolina State University
College of Veterinary Medicine)

Introducción a las vacunas recombinantes

La industria avícola depende en gran medida del uso de vacunas para controlar enfermedades y mantener el nivel de producción necesario. Tradicionalmente estas vacunas se basan en organismos vivos atenuados o naturalmente no virulentos o bien en organismos que han sido inactivados mediante diferentes mecanismos. Las vacunas tradicionales han servido, y aun sirven, bien a la empresa avícola. Sin embargo en algunos casos (i.e. laringotraqueitis infecciosa) se han relacionado a la aparición de brotes de enfermedad porque la vacuna revierte en virulencia o a aparición de nuevas cepas debido a recombinaciones con virus de campo. La manipulación genética de los organismos ha permitido desarrollar vacunas recombinantes que evitan algunos de estos efectos negativos. En esta charla voy a hacer una revisión de las vacunas recombinantes frente a enfermedades víricas que existen actualmente en el mercado y pautas para optimizar su uso; de otras vacunas recombinantes que están en fase experimental pero que podrían estar en uso en un futuro próximo; y finalmente daré una serie de consideraciones futuras para el diseño y uso racional de las vacunas recombinantes.

Clasificación de las vacunas recombinantes. La USDA reconoce tres categorías de productos recombinantes que pueden ser usados para animales de producción, incluyendo aves. La categoría I-A incluye bacterinas, virus inactivados, y vacunas de subunidades y las categorías I-B-1 y -2 incluye anticuerpos monoclonales y proteínas recombinantes utilizadas como terapéuticos y para diagnóstico. La categoría II incluye vacunas con delección de genes, y la categoría III incluye las vacunas vectorizadas. Para el tema que tratamos en esta charla nos vamos a enfocar en las vacunas de subunidades (categoría IA), las de delección de genes (categoría II), y las vacunas vectorizadas (categoría III).

- Categoría IA- Vacunas de subunidades: Las vacunas de subunidades consisten en proteínas o en partículas similares a virus (virus-like particles or VLP) que carecen del DNA o RNA viral. Ninguna de las vacunas VLP esta comercializada actualmente para enfermedades víricas en avicultura, pero experimentalmente se han desarrollado para Gumboro, bronquitis, Newcastle, e influenza (12,13,16,21,22).
- Categoría II- Vacunas con delección de genes. Para la construcción de estas vacunas es necesario identificar genes relacionados con la virulencia vírica que puedan ser eliminados sin afectar la replicación y antigenicidad del virus. Varias vacunas con delección de genes se han desarrollado para la laringotraqueitis y para la enfermedad de Marek y se trataran con más detalle en las otras secciones de esta charla. Por el momento ninguna vacuna con delección de genes esta licenciada para su uso en avicultura para la protección frente a enfermedades víricas.

- Categoría III- Vacunas vectorizadas. Estas vacunas utilizan un virus vector (virus de la viruela, herpesvirus de pavo, o el virus de Newcastle cepa La Sota) para introducir uno o dos genes de otros virus (i.e. Gumboro, laringotraqueitis, Newcastle, Marek, o influenza). También se incluye en esta categoría las vacunas que se generan por inserción mutacional [i.e. cepas de Marek que llevan copias del promotor long terminal repeat (LTR) del virus de la reticuloendoteliosis (REV)]. A diferencia de las vacunas en categorías I y II, muchas vacunas vectorizadas están licenciadas y su uso se ha generalizado a nivel mundial.

La selección del vector es fundamental para el éxito de las vacunas vectorizadas. Los principales factores a considerar a la hora de seleccionar un virus vector son la capacidad de replicación del vector una vez que se incluya en él el/los inserto(s) y el mejor lugar para la inserción de los mismos; la interacción entre anticuerpos maternos y el vector; la posibilidad de administrar la vacuna en masa y/o in ovo; la complejidad del patógeno que queremos proteger con la vacuna vectorizada; y el promotor que se va a utilizar para garantizar la expresión del inserto.

Vacunas recombinantes comercializadas actualmente.

En la actualidad todas las vacunas que están licenciadas y comercializadas pertenecen a la categoría III e incluyen las vacunas vectorizadas y las vacunas con inserción mutacional. La tabla 1 incluye las vacunas que están licenciadas y comercializadas.

Vacunas vectorizadas. En la última década han proliferado en el mercado diferentes vacunas vectorizadas frente a varias enfermedades víricas. Las vacunas vectorizadas que se están usando actualmente son en base al virus de viruela (FPV), al del herpesvirus de pavo (HVT) o a la cepa La Sota del virus de Newcastle (NDV). En esta charla nos vamos a enfocar en las vacunas que usan HVT y fowlpox como vector ya que son las que tienen un uso más generalizado (la vacuna en base a La Sota únicamente se emplea en México para controlar el foco de influenza). La tabla 2 incluye las ventajas y desventajas de usar FPV o HVT como vector. En general las vacunas vectorizadas son seguras (no revierten a virus virulentos), se pueden administrar in ovo (rHVT en todos los casos y rFPV en algunos), y proporcionan protección frente a dos enfermedades (vector e inserto). Sin embargo la protección conferida por las vacunas recombinantes no es tan alta en muchos casos a la conferida por las vacunas tradicionales y es fundamental un uso adecuado de las mismas¹. En esta charla se va a hacer especial énfasis en el uso adecuado de las vacunas rHVT.

Vacunas con inserción mutacional. El REV contiene un promotor muy potente en su región long terminal repeat (LTR). El REV tiene la tendencia de insertarse en otros virus de mayor tamaño (i.e. FPV y MDV), y aunque es raro que se mantenga la secuencia del REV completo, es muy común que parte del genoma del REV se quede inserto en los otros virus. En particular se ha demostrado que LTR tiende a quedarse inserto en el genoma del MDV y cuando esto ocurre la biología del MDV cambia. El MDV con el LTR del REV se replica mejor que el MDV inicial y pierde capacidad oncogénica. Aunque hay varias cepas con la inserción del LTR del REV que se han evaluado experimentalmente como vacunas, al día de hoy solo una vacuna en la que se ha insertado el REV LTR en la cepa CVI988 está licenciada y comercializada en algunos países. Las ventajas y desventajas de las vacunas con inserción del LTR del REV están recogidas en la tabla 3.

Vacunas recombinantes experimentales.

Debido a las limitaciones que las vacunas vectorizadas tienen para proteger frente a patógenos complejos que requieran la expresión de varios genes, se han empleado otras estrategias que seguramente lleguen a

utilizarse en la práctica en un futuro cercano. Vacunas vectorizadas usando otros virus (i.e. CVI988), vacunas de delección de genes, vacunas con la inserción del LRT de REV en otras cepas del serotipo 1 de MDV, vacunas en base a VLP, vacunas de DNA, y otras estrategias (expresión de citoquinas, vacunas que activan TLRs, uso de adyuvantes, o combinación de varias estrategias). A continuación voy a dar una visión general de aquellas con mayor potencial.

Vacunas vectorizadas usando otros virus (i.e. CVI988). El uso de CVI988 como vector tiene ventajas similares a HVT (no interacciona con anticuerpos maternos, se puede administrar in ovo, induce inmunidad de por vida y es seguro) y además se puede administrar con rHVTs e induce mejor protección frente a MD en aves de larga vida. Varias vacunas usando CVI988 como vector se han desarrollado y evaluado experimentalmente. La mayor limitación de estas vacunas es que CVI988 no se usa generalmente en pollos de carne y su uso puede estar restringido a aves de larga vida, con lo cual puede no ser rentable para las compañías farmacéuticas. Además, existe el riesgo que los rCVI988 no sean tan eficaces como los CVI988 tradicionales frente a MD.

Vacunas con delección de genes. Estas vacunas son las que ofrecen mejor protección frente a patógenos complejos que requieren una respuesta inmune de tipo celular y es muy probable que se usen en un futuro próximo. Al día de hoy se han desarrollado varias vacunas con delección de genes frente a ILT y frente a MD. En particular la vacuna frente a ILTV con la delección de la glicoproteína G y la vacuna frente a MD con la delección de las dos copias del oncogén meq son las que tienen mayor potencial. En particular esta última se ha utilizado como vector en una vacuna bivalente frente a Marek y ILT que confiere protección muy alta frente a desafío temprano con vv+ MDV y tanta protección como las vacunas vectorizadas de HVT-LT. En la tabla 4 se resumen las ventajas y desventajas de las vacunas con delección de genes.

Vacunas de DNA. Estas vacunas consisten en plásmidos que codifican secuencias específicas del patógeno que confieren inmunidad. Aunque se han hecho varios intentos para desarrollar vacunas de DNA en avicultura, la realidad es que tienen muy poca utilidad desde el punto de vista práctico ya que se tienen que administrar intraparentalmente y en varias dosis para conferir la inmunidad necesaria. El desarrollo de nuevas vacunas de DNA que activen la respuesta inmune innata mediante ligandos de los receptores de tipo toll (TLR) podría evitar este problema en el futuro.

Vacunas en base a VLP. Las vacunas en base a VLP ya están comercializadas para virus en otras especies (i.e. circovirus porcino). Varias vacunas en base a VLP para virus aviares se han desarrollado y parecen tener gran potencial. En particular una vacuna en base a VLP que expresa la proteína VP2 de cepas clásicas y variantes del virus de Gumboro confiere protección frente a ambas y es posible que se registre en USA en un futuro próximo (12).

Otras estrategias. Varios trabajos de vacunas que incorporan genes específicos de varias citoquinas se han llevado a cabo sin demasiado éxito. Esto no es sorprendente si tenemos en cuenta que la expresión de citoquinas tiene que estar perfectamente regulada para evitar efectos adversos. Una estrategia que parece tener mayor éxito es incluir ligandos de los TLR con la vacuna para potenciar la respuesta inmune innata (23,24).

Conclusiones

En los últimos 10 años la utilización de vacunas recombinantes se ha incrementado exponencialmente y en muchos casos casi ha sustituido a las vacunas tradicionales (i.e. HVT). Aunque en la actualidad sólo las vacunas vectorizadas están comercializadas es muy posible que vacunas en base a VLP y con delección de

genes se registren y comercialicen en un futuro próximo. Las vacunas recombinantes ofrecen la posibilidad de diseñar vacunas de forma racional para mejorar ciertas características que no podemos controlar con las vacunas tradicionales; entre otras la reversión a virulencia, la recombinación con cepas de campo, protección frente a diferentes aspectos de la enfermedad o frente a otros virus... etc. Sin embargo, para que las vacunas recombinantes funcionen es fundamental maximizar la bioseguridad y optimizar el uso de estas vacunas. La estrategia de sustituir la vacuna tradicional por la recombinante en los protocolos de vacunación puede no ser la mejor forma de maximizar la replicación de la vacuna y la expresión del inserto.

Referencias

- Bublot, M., A. Hurley-Bacon, T. Hughes, M. Sa e Silva, T. Mebatsion, P. Linz and N. Pritchard. 2016. Development of a new safe and efficacious Marek's disease vaccine containing a REV LTR insert in its genome. In: 11th International Symposium on Marek's disease and avian herpesviruses. C. Desnèvre, M. Bublot and J.F. Vautherot, eds. Tours, France. 51.
- Coppo, M. J., A. H. Noormohammadi, C. A. Hartley, J. R. Gilkerson, G. F. Browning and J. M. Devlin. 2011. Comparative in vivo safety and efficacy of a glycoprotein G-deficient candidate vaccine strain of infectious laryngotracheitis virus delivered via eye drop. *Avian Pathol.* 40:411-417.
- Cui, X., L. F. Lee, H. D. Hunt, W. M. Reed, B. Lupiani and S. M. Reddy. 2005. A Marek's disease virus vIL-8 deletion mutant has attenuated virulence and confers protection against challenge with a very virulent plus strain. *Avian Diseases.* 49:199-206.
- García, M. 2016. Current and future vaccines and vaccination strategies against infectious laryngotracheitis (ILT) respiratory disease of poultry. *Veterinary microbiology.*
- García, M., S. J. Spatz, Y. Cheng, S. M. Riblet, J. D. Volkening and G. H. Schneiders. 2016. Attenuation and protection efficacy of ORF C gene-deleted recombinant of infectious laryngotracheitis virus. *J Gen Virol.* 97:2352-2362.
- Gimeno, I. M., A. L. Cortes, N. M. Faiz, B. A. Hernandez-Ortiz, J. S. Guy, H. D. Hunt and R. F. Silva. 2015. Evaluation of the Protection Efficacy of a Serotype 1 Marek's Disease Virus-Vectored Bivalent Vaccine Against Infectious Laryngotracheitis and Marek's Disease. *Avian Diseases.* 59:255-262.
- Gimeno, I. M., A. L. Cortes, N. M. Faiz, T. Villalobos, H. Badillo and T. Barbosa. 2016. Efficacy of various HVT vaccines (conventional and recombinant) against Marek's disease in broiler chickens: effect of dose and age of vaccination. *Avian Diseases.* 60:662-668.
- Guy, J. S., H. J. Barnes and L. G. Smith. 1991. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. *Avian Dis.* 35:348-355.
- Haq, K., I. Elawadli, P. Parvizi, A. I. Mallick, S. Behboudi and S. Sharif. 2011. Interferon-gamma influences immunity elicited by vaccines against very virulent Marek's disease virus. *Antiviral Res.* 90:218-226.
- Ishihara, Y., M. Esaki, S. Saitoh, T. Sato and A. Yasuda. 2016. Development and Evaluation of the Protective Efficacy of Novel Marek's Disease Virus Rispens Vector Vaccines Against Infectious Bursal Disease. *Avian Dis.* 60:618-627.
- Ishihara, Y., M. Esaki, S. Saitoh and A. Yasuda. 2016. Combination of Two Marek's Disease Virus Vectors Shows Effective Vaccination Against Marek's Disease, Infectious Bursal Disease, and Newcastle Disease. *Avian Dis.* 60:473-479.
- Jackwood, D. J. 2013. Multivalent virus-like-particle vaccine protects against classic and variant infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 57:41-50.

- Kapczynski, D. R., T. M. Tumpey, R. Hidajat, A. Zsak, K. Chrzastek, I. Tretyakova and P. Pushko. 2016. Vaccination with virus-like particles containing H5 antigens from three H5N1 clades protects chickens from H5N1 and H5N8 influenza viruses. *Vaccine*. 34:1575-1581.
- Kim, T., J. Mays, A. Fadly and R. F. Silva. 2011. Artificially inserting a reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into a bacterial artificial chromosome clone of Marek's disease virus (MDV) alters expression of nearby MDV genes. *Virus Genes*.
- Lee, S. W., P. F. Markham, M. J. Coppo, A. R. Legione, J. F. Markham, A. H. Noormohammadi, G. F. Browning, N. Ficorilli, C. A. Hartley and J. M. Devlin. 2012. Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science*. 337:188.
- Liu, G., L. Lv, L. Yin, X. Li, D. Luo, K. Liu, C. Xue and Y. Cao. 2013. Assembly and immunogenicity of coronavirus-like particles carrying infectious bronchitis virus M and S proteins. *Vaccine*. 31:5524-5530.
- Lupiani, B., L. F. Lee, X. Cui, I. M. Gimeno, A. Anderson, R. W. Morgan, R. F. Silva, R. L. Witter, H. J. Kung and S. M. Reddy. 2004. Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:11815-11820.
- Lupiani, B., L. F. Lee, K. S. Kreager, R. L. Witter and S. M. Reddy. 2013. Insertion of reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into the genome of CVI988 strain of Marek's disease virus results in enhanced growth and protection. *Avian Dis*. 57:427-431.
- Mashchenko, A., S. M. Riblet, G. Zavala and M. Garcia. 2013. In ovo vaccination of commercial broilers with a glycoprotein J gene-deleted strain of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis*. 57:523-531.
- Mays, J. K., A. Black-Pyrkosz, S. Spatz, A. M. Fadly and J. R. Dunn. 2016. Protective Efficacy of a Recombinant Bacterial Artificial Chromosome Clone of a Very Virulent Marek's Disease Virus Containing a Reticuloendothelial Virus Long Terminal Repeat. *Avian Pathol*. 1-31.
- Noh, J. Y., J. K. Park, D. H. Lee, S. S. Yuk, J. H. Kwon, S. W. Lee, J. B. Lee, S. Y. Park, I. S. Choi and C. S. Song. 2016. Chimeric Bivalent Virus-Like Particle Vaccine for H5N1 HPAI and ND Confers Protection against a Lethal Challenge in Chickens and Allows a Strategy of Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA). *PloS one*. 11:e0162946.
- Park, J. K., D. H. Lee, S. S. Yuk, E. O. Tseren-Ochir, J. H. Kwon, J. Y. Noh, B. Y. Kim, S. W. Choi, S. M. Kang, J. B. Lee, S. Y. Park, I. S. Choi and C. S. Song. 2014. Virus-like particle vaccine confers protection against a lethal newcastle disease virus challenge in chickens and allows a strategy of differentiating infected from vaccinated animals. *Clin Vaccine Immunol*. 21:360-365.
- Parvizi, P., M. F. Abdul-Careem, A. I. Mallick, K. Haq, H. R. Haghghi, S. Orouji, M. Heidari, S. Behboudi and S. Sharif. 2014. The effects of administration of ligands for Toll-like receptor 4 and 21 against Marek's disease in chickens. *Vaccine*. 32:1932-1938.
- Parvizi, P., A. I. Mallick, K. Haq, H. R. Haghghi, S. Orouji, N. Thantrige-Don, M. St Paul, J. T. Brisbin, L. R. Read, S. Behboudi and S. Sharif. 2012. A toll like receptor 3 ligand enhances protective effects of vaccination against Marek's disease virus and hinders tumor development in chickens. *Viral Immunol*. 25:394-401.
- Reddy, S. M., Y. Izumiya and B. Lupiani. 2016. Marek's disease vaccines: Current status, and strategies for improvement and development of vector vaccines. *Veterinary microbiology*.
- Schat, K. A. and M. A. Skinner. 2008. Avian immunosuppressive diseases and immune evasion. In: *Avian Immunology*, First, F. Davison, B. Kaspers and K.A. Schat, eds. Elsevier, Oxford, UK. 289-298.

Silva, R. F., J. R. Dunn, H. H. Cheng and M. Niikura. 2010. A MEQ-deleted Marek's disease virus cloned as a bacterial artificial chromosome is a highly efficacious vaccine. *Avian Dis.* 54:862-869.

Tarpey, I., P. J. Davis, P. J. A. Sondermeijer, C. van Geffen, I. Versteegen, V. E. Schijns, J. Kolodsick and R. Sundick. 2007. Expression of chicken interleukin 2 by turkey herpesvirus increases the immune response against Marek's disease virus but fails to increase protection against virulent challenge. *Avian Pathology.* 36:69-74.

Tischer, B. K., D. Schumacher, M. Beer, J. Beyer, J. P. Teifke, K. Osterrieder, V. Zelnik, F. Fehler and N. Osterrieder. 2002. Efficacy of a BAC DNA vaccine against Marek's disease. *Workshop on molecular pathogenesis of Marek's disease and Avian Immunology.* 46.

Tsukamoto, K., C. Kojima, Y. Komori, N. Tanimura, M. Mase and S. Yamaguchi. 1999. Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2. *Virology.* 257:352-362.

USDA 2003. Veterinary Service Memorandum No 800.205. General licensing considerations: Biotechnology-derived veterinary biologics categories I, II, and III. Ames, IA.

Vagnozzi, A., G. Zavala, S. M. Riblet, A. Mundt and M. Garcia. 2012. Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. *Avian Pathol.* 41:21-31.

Witter, R. L., D. Li, D. Jones, L. F. Lee and H. J. Kung. 1997. Retroviral insertional mutagenesis of a herpesvirus: A Marek's disease virus mutant attenuated for oncogenicity but not for immunosuppression or in vivo replication. *Avian Dis.* 41:407-421.

LIV

Symposium Científico de Avicultura

Tipo	Vector	Inserto	Compañía
Vectorizadas	FPV	ND	Merial (BI)
	FPV	AI	Merial (BI)
	FPV	ILT	CEVA
	FPV	ND	CEVA
	HVT	ND	Merial (BI)
	HVT	IBDV	Merial (BI)
	HVT	ND	CEVA
	HVT	ILT	CEVA
	HVT	IBDV	CEVA
	HVT	AI	CEVA
	HVT	ND	MSD
	HVT	LT	MSD
	HVT	ND-IBDV	MSD
	NDV	AI	Avimex
Inserción mutacional	CVI988	LTR REV	Merial (BI)

Tabla 1. Vacunas actualmente comercializadas

Vector	Ventajas	Desventajas
FPV	No es asociado a células	Interacción con anticuerpos maternos
	Se replica en las mucosas del sistema respiratorio (respuesta inmune local)	Puede inducir granulomas en los pulmones cuando se administra in ovo a dosis altas
	Si se administra con rHVT frente a la misma enfermedad tiene sinergismo de protección	Puede expresar 1-2 genes de otros virus- adecuado para enfermedades que requieren una respuesta inmune simple pero no para patógenos complejos
HVT		La inmunidad no dura tanto como la obtenida con rHVTs
	La vacuna HVT (o rHVT) es la vacuna de mayor distribución tanto en pollo de carne como en aves de vida larga	La expresión del inserto depende de la replicación del rHVT y esta a su vez de varios factores (dosis, ruta de vacunación, combinación con otras vacunas de MD, viabilidad de la vacuna que es asociada a células)
	No interacciona con anticuerpos maternos	No se puede mezclar con otros rHVTs o con HVT tradicionales
	No se transmite vía horizontal	La protección frente a MD es limitada y en aves de vida larga exige la administración de otras vacunas (i.e. SB-1 y CVI988)
	Una dosis garantiza inmunidad de por vida	Puede expresar 1-2 genes de otros virus- adecuado para enfermedades que requieren una respuesta inmune simple pero no para patógenos complejos
	La administración in ovo es segura	

Tabla 2.
Ventajas y desventajas de las vacunas vectorizadas en base a FPV y a HVT

Tabla 3. Ventajas y desventajas de las vacunas recombinantes por inserción mutacional

Vector	Ventajas	Desventajas
CVI988 con REV-LTR	Buena protección contra desafíos tempranos con vv+MDV	Desconfianza por llevar parte del genoma de REV
		Uso en pollos de carne no esta tan generalizado como las vacunas en base a HVT
	Puede ser usada como vector para vacunas bivalentes	No se han hecho estudios para evaluar la protección frente a la inmunosupresión causada por vv+MDV
	Se replica muy bien en las aves	
La administración in ovo es segura		

Tabla 4. Ventajas y desventajas de las vacunas recombinantes con delección de genes

Vacuna	Ventajas	Desventajas
MDV Δ MEQ (Md5 Δ MEQ)	Confiere la mejor protección frente a desafío temprano con vv+MDV	Atrofia de los órganos linfoides en aves sin anticuerpos maternos- problemas para la licencia pero poca relevancia practica
	Protege frente a tumores y también frente a la inmunosupresión inducida por vv+MDV	
	Puede ser usada como vector como vacuna bivalente (i.e. Md5 Δ MEQ-ILTV gB)	Seguramente no se use en pollo de carne y las compañías farmacéuticas pueden no estar interesadas en su comercialización
	Se replica muy bien en las aves y no interfiere con anticuerpos maternos	
ILT Δ gG	Buena protección frente a ILT	No evita el problema de posibles recombinaciones con virus de campo que tienen las vacunas tradicionales
	Segura no revierte a virulencia	
	Puede ser usada como vector en vacunas bivalentes	
	Se replica muy bien en las aves	
	No está asociada a células	