

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 610**

51 Int. Cl.:

A61K 39/255 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013** **PCT/US2013/032539**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013** **WO13142377**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** **E 13714141 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017** **EP 2827898**

54 Título: **Virus de la enfermedad de Marek modificado y vacunas fabricadas a partir del mismo**

30 Prioridad:

22.03.2012 US 201261614142 P

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

16.04.2018

73 Titular/es:

MERIAL, INC. (100.0%)
3239 Satellite Blvd.
Duluth, GA 30096, US

72 Inventor/es:

PRITCHARD, JOYCE;
MEBATION, TESHOMÉ y
BUBLOT, MICHEL

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 663 610 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Virus de la enfermedad de Marek modificado y vacunas fabricadas a partir del mismo

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] La presente invención se refiere en general a vacunas virales y procedimientos de uso de las mismas. Más particularmente, la presente invención se refiere a nuevas vacunas para proteger a los pollos contra la infección con el virus de la enfermedad de Marek, y que tienen una mejor seguridad y eficacia sobre las vacunas existentes.

10 **ANTECEDENTES**

[0002] La enfermedad de Marek (MD), una enfermedad linfoproliferativa altamente prevalente e importante de los pollos, se controla en pollos comerciales mediante vacunas de virus vivos que consisten en virus de herpes relacionados con MD atenuados o avirulentos de forma natural. A pesar de que los programas de vacunación han sido considerados eficaces en general, la industria avícola continúa experimentando pérdidas debido a la MD. Teniendo en cuenta la tendencia del virus de la MD de ser más virulento con el tiempo (por ejemplo, por reversión a una forma más virulenta), junto con las presiones económicas a las que se enfrenta la industria avícola, sigue habiendo un fuerte incentivo para desarrollar productos más seguros y más eficaces que protejan mejor frente a una estimulación temprana con cepas de campo muy virulentas sin causar efectos secundarios adversos (por ejemplo, distrofia tímica).

[0003] Existen tres serotipos distintos del virus de la MD que se encuentran en pollos: (1) serotipo 1, la forma oncogénica responsable de la enfermedad, incluyendo el virus de la MD de alta y baja virulencia y sus variantes atenuadas; (2) serotipo 2, un virus de la MD no oncogénico; y (3) el serotipo 3, virus del herpes de los pavos (HVT). Una vacuna de la MD temprana consiste en el virus del serotipo 3 aislado originalmente de pavos, tal como se describe en Witter et al. [Am. J. Vet. Res.31: 525-538 (1970)] y Okazaki et al. [Patente de Estados Unidos No. 3.642.574]. Su falta de oncogenicidad, infección autolimitante, buena replicación in vivo e in vitro, disponibilidad como preparaciones libres de células y asociados a células, y de alta eficacia protectora han establecido el HVT como un estándar para las vacunas WID en todo el mundo. Una cepa utilizada comúnmente de HVT es FC126.

[0004] Las vacunas producidas a partir de la cepa SB-1 no virulenta de forma natural [Schat et al., J. Natl. Cancer inst. 60: 1075-1082 (1978) y la patente de Estados Unidos No. 4.160.0241, un aislado de un virus de MD de serotipo 2] han sido autorizadas en los Estados Unidos desde 1984. La cepa SB-1 es poco protectora contra las cepas de MDV muy virulentas. Por lo general se utiliza en combinación con HVT como una vacuna bivalente, ya que los dos virus en conjunto producen una mayor protección que la que hace cualquiera de los dos solos [Schat et al., Avian Pathol. 11: 593-606 (1982); Witter, Avian Pathol. 11: 49-62 (1982)]. Este fenómeno se ha denominado "sinergismo de protección." La vacuna bivalente SB-1 + HVT representa más del 50% del mercado de los Estados Unidos para las vacunas contra MD en la actualidad y está considerada como entre las más eficaces de los diversos productos contra la MD disponibles. Sin embargo, se producen pérdidas esporádicas a pesar de su uso.

[0005] Otra vacuna contra MD producida a partir de una cepa CVI988 clon C (CVI988/C) ha sido autorizada para su uso comercial en los Estados Unidos. Esta vacuna se derivó de un virus de la MD de serotipo 1 de virulencia leve atenuado por el pase en serie en cultivo de tejidos y se ha descrito por De Boer et al. [Avian Dis. 30: 276-283 (1986)]. Un derivado con más pases de CVI988/C, identificado como CVI988/C/R6, también ha sido descrito por De Boer et al. [Advances in Marek's Disease Research, pág. 405-43 (1988)]. Más recientemente, la cepa original de poco pases, designada como CVI988/Rispens, que se ha utilizado comercialmente en otros países durante unos años, se encontró que era muy eficaz contra la estimulación con varias cepas del virus de la MD muy virulentas por Witter et al. [Cuarto Intl. Symp. Marek's Disease, pág. 315-319 (1992)].

[0006] Una vacuna experimental derivada de Md11, un aislado de campo de la MD de serotipo 1 muy virulento, se describió por Witter, supra. Md11 fue atenuada por pases en serie 75 veces en cultivo celular, y la vacuna resultante se designó como Md11/75C. Esta vacuna se ha demostrado que proporciona una buena protección contra la estimulación con MD5 y la mayoría de los otros virus de la MD altamente virulentos probados; pero fue menos eficaz contra la estimulación con la cepa JM/102W, contra un virus prototipo de la MD protegido eficazmente por las vacunas de HVT y SB-1. Además, su eficacia fue consistentemente menor en los polluelos con anticuerpo contra HVT.

[0007] La patente de Estados Unidos No. 4.895.717, Witter, describe un derivado revertiente de Md11/75C que se refirió como Md11/75C/R2. Se observó que Md11/75C/R2 era superior a varias otras vacunas monovalentes y fue igual que una vacuna bivalente (HVT + SB-1) [Witter, Avian Dis. 31: 752-765 (1987)]. Sin embargo, la patogenicidad inherente de los virus del serotipo 1 y el potencial de cepas atenuadas para revertir a una mayor patogenicidad [Witter et al., Avian Pathol. 13: 75-92 (1984)] son factores a considerar en la autorización de tales productos. Witter et al. [Avian Dis., 35: 877-

891 (1991)] encontró que un clon derivado de más pases de la cepa Mdn/75C/R2, designado como Md11/75C/R2/23 (o R2/23) poseía una naturaleza altamente protectora de la cepa parental sin su patogenicidad residual.

5 **[0008]** Witter también describió otra vacuna contra MD derivada de 301 B/1, un aislado de campo de serotipo 2 no patogénico, en la Patente de Estados Unidos Nº 4.895.718. La cepa 301 B/1 poseía una capacidad replicativa superior a SB-1, así como una mayor protectividad contra la estimulación a los virus.

10 **[0009]** También se ha descrito un virus de la enfermedad de Marek recombinante, denominado como RM1, que tiene las repeticiones terminales largas del virus de la reticuloendoteliosis integradas de manera estable en las regiones de repetición corta (RS) de su genoma. Esta cepa se generó en USDA-ARS-ADOL a partir de una cepa JM del virus de la enfermedad de Marek de serotipo 1 patógeno [Witter et al, 1997, Avian Dis., 41: 407-421, y Jones et al, 1996, J. Virology., 70 (4): 2460-2467i. Sin embargo, aunque se ha demostrado que la cepa RM1 proporciona un nivel de protección similar o superior al de c1988, también se ha asociado con la patogenicidad residual, causando atrofia del timo en las aves tratadas.

15 **[0010]** Por lo tanto, aunque las existentes HVT, SB-1, CVI988, CVI988/C, Md11/75C, Md11/75C/R2 y 301 B/1 todos provocan respuestas inmunitarias contra ciertos virus de la MD, ninguna de estas vacunas protegen óptimamente contra todos los virus de la estimulación de MD en todos los pollos. Además, estas vacunas han mostrado una eficacia reducida contra algunas de las cepas de virus de la MD muy virulentas más recientemente aisladas. Para evitar cualquier brote a gran escala de MD en el futuro, existe la necesidad de desarrollar vacunas más seguras que tengan mejor eficacia contra
20 cepas altamente virulentas del virus de la MD.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

25 **[0011]** En un aspecto, la presente invención proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un virus recombinante de la enfermedad de Marek (MDV) transformado de manera estable con un constructo de ADN exógeno, que comprende una secuencia de repetición terminal larga (LTR) de un virus de la reticuloendoteliosis para uso en un procedimiento de provocar en un animal aviar una respuesta inmunitaria segura y protectora contra el virus de la enfermedad de Marek que comprende la administración de dicha composición a dicho animal, provocando de este modo la respuesta inmunitaria protectora, en la que el MDV es un virus clonal, y no una población mixta de virus parental
30 y recombinante, en el que el MDV es un MDV CVI988/X; además en el que la LTR es como se expone en SEQ ID NO: 2, en la que la secuencia LTR comprende un segmento de ADN escindido por Pac I de un MDV que tiene todas las características identificativas de la cepa depositada en la ATCC bajo el número de acceso PTA-4945 y en la que la secuencia LTR está insertada 5' del gen de ICP4 de dicho MDV.

35 **[0012]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de fabricación de un agente viral eficaz para proteger un ave contra la enfermedad de Marek que comprende la transformación de una cepa de MDV CVI988 con un constructo de DNA exógeno que comprende una secuencia LTR de un virus de la reticuloendoteliosis; en el que la LTR es como se expone en SEQ ID NO: 2, en el que la secuencia LTR comprende un segmento de ADN escindido por Pac I de un MDV que tiene todas las características identificativas de la cepa depositada en la ATCC bajo el número de acceso
40 PTA-4945 y en el que la secuencia LTR está insertada 5' del gen de ICP4 de dicho MDV.

45 **[0013]** En otro aspecto, la presente invención proporciona virus de la enfermedad de Marek (MDV) transformado de manera estable con un constructo de ADN exógeno, que comprende una secuencia de repetición terminal larga (LTR) de un virus de la reticuloendoteliosis, en el que el MDV es CVI988/X, en el que además el MDV es un virus clonal, y no una población mixta de virus parental y recombinante; y además en el que el LTR es como se expone en SEQ ID NO: 2, en el que la secuencia LTR comprende un segmento de ADN escindido por Pac I de un MDV que tiene todas las características identificativas de la cepa depositada en la ATCC bajo el número de acceso PTA-4945 y en el que la secuencia LTR está insertada 5' del gen de ICP4 de dicho MDV.

50 **[0014]** En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunológica que comprende el MDV descrito anteriormente.

55 **[0015]** En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona una célula aislada transformada de manera estable con el MDV descrito anteriormente.

[0016] En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona la célula aislada descrita anteriormente, en la que la célula es una célula fibroblasto de embrión de pollo o pato (CEF, DEF).

60 **[0017]** La presente invención se basa, en parte, en la producción y uso de vacunas que comprenden virus de la enfermedad de Marek (MDV) descrito originalmente en la solicitud USSN 10/623.891 (publicada como US2005/0019348A1 de Reddy et al.). Específicamente, la presente invención se deriva del descubrimiento sorprendente e inesperado que el "virus"

CVRM2 (cepa de MDV "CVI988" transformada con un constructo de ADN exógeno; descrito, por ejemplo, en la Tabla 1 de Reddy et al.) **no** era de hecho un virus de la enfermedad de Marek (MDV) único atenuado recombinante, clonalmente distinto. En cambio, los solicitantes determinaron que el CVRM2 era una población heterogénea de MDV recombinante y parental, y cuando se aislaron y se administraron posteriormente a aves una línea clonal pura de CVRM2 (en lo sucesivo denominada "RN1250"), se obtuvieron resultados de seguridad y eficacia muy superiores a aquellos que un experto habría esperado tras la lectura de Reddy et al.

[0018] De acuerdo con este descubrimiento, es un objetivo de la invención proporcionar una vacuna nueva altamente protectora contra MD en las aves, incluyendo pollos. También es un objetivo de la invención proporcionar una vacuna que proporcione una mayor protección contra las cepas altamente virulentas de virus de la enfermedad de Marek que las vacunas actualmente en uso comercial.

[0019] Es otro objetivo de la invención para mejorar la viabilidad y la productividad de los pollos, particularmente pollos de engorde y ponedores, y reducir las pérdidas económicas en la industria de aves de corral causada por la enfermedad de Marek.

[0020] Estas y otras realizaciones se describen o son evidentes a partir de, y abarcadas por, la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021]

La figura 1 muestra una organización esquemática del genoma de MDV, que contiene una única región larga (UL) flanqueada por repetición invertida (IRS), repetición terminal larga (TRL), repetición larga interna (IRL) y una única región corta (US), y está flanqueado por dos repeticiones invertidas, repetición interna corta (IRS) y repetición terminal corta (TRS). También se muestra es una representación esquemática de los clones de cósmidos que se solapan generados para rescatar un virus infeccioso de una cepa altamente virulenta de MDV;

la figura 2 representa la generación del cósmido B40-Pac utilizado para generar la vacuna CVRM;

la figura 3 ilustra un diagnóstico basado en PCR de MDV recombinante; se presentan los cebadores de PCR, tamaños de los productos esperados, y la imagen en gel de agarosa, lo que indica que CVRM2 no era clonal, sino de hecho una población dual de MDV recombinante y parental. Carriles: 1) escalera; 2) negativo; 3) Rispens; 4) GA 22; 5) Rismavac; 6) RB1B; 7) RN1250; 8) positivo (población mixta original);

la figura 4 presenta la confirmación por PCR de RN1250 MSV, RN1250 x + 5, y BP5. Carriles: sin molde (1), RN1250 MSV (2), RN1250 x + 5 (3), RN1250 BP5 (4). Reacciones de PCR con todos los pares de cebadores dieron como resultado el producto y las bandas patrón de PCR esperados, por lo que no había evidencia de la presencia del virus parental Rispens entre los aislados de RN1250 MSV, RN1250 x + 5, y BP5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

[0022] Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos a una composición o vacuna de interés. Por lo general, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares, y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en el composición o vacuna de interés. Preferentemente, el huésped mostrará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora, de manera que la resistencia a una nueva infección se verá reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad reducida. Dicha protección se demostrará por una reducción o falta de los síntomas normalmente mostrados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral rebajado en el huésped infectado.

[0023] Por "animal" se entienden mamíferos, aves, y similares. Animal o huésped tal como se usa en el presente documento incluye mamíferos y humanos. El animal puede seleccionarse del grupo que consiste en equino (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felino (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros gatos grandes, y otros felinos incluyendo guepardos y lince), ovino (por ejemplo, ovejas), bovino (por ejemplo, ganado), porcino (por ejemplo, cerdo), aves (por ejemplo, pollo, pato, ganso, pavo, codorniz, faisán, loro, pinzones, halcón, cuervo, avestruz, emu y casuario), primate (por ejemplo, prosimio, tarsero, mono, gibón, mono), hurones, focas, y pescado. El término "animal" también incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo etapas embrionaria y fetal.

[0024] A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta

descripción. Los términos singulares "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

5 **[0025]** Cabe indicar que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, los términos tales como "comprende" "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que términos tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no citados de manera explícita, pero excluyen
10 elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

[0026] *Clonación*. La selección y propagación de (a) el material genético de un solo individuo, (b) un vector que contiene un gen o fragmento de gen, o (c) un único organismo que contiene uno de dicho gen o fragmento de gen.

15 **[0027]** *Vector de clonación*. Un plásmido, virus, retrovirus, bacteriófagos, cósmidos, cromosoma artificial (bacteriano o de levadura), o secuencia de ácido nucleico que es capaz de replicarse en una célula huésped, caracterizado por uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en los que la secuencia puede cortarse de una forma predeterminada, y que puede contener un marcador opcional adecuado para su uso en la identificación de células transformadas, por ejemplo, resistencia a la tetraciclina o resistencia a ampicilina. Un vector de clonación puede o
20 no poseer las características necesarias para que funcione como un vector de expresión.

[0028] *Expresión*. El proceso sufrido por un gen estructural para producir un polipéptido. La expresión requiere la transcripción de ADN, modificación post-transcripcional del transcrito inicial de ARN, y la traducción de ARN.

25 **[0029]** *Casete de expresión*. Una secuencia de ácido nucleico dentro de un vector que va a ser transcrita y un promotor para dirigir la transcripción. El casete de expresión puede contener una o más secuencias de ADN no relacionadas que codifican uno o más péptidos de interés.

30 **[0030]** *Secuencia de control de la expresión*. Las secuencias de control de la expresión son secuencias de ADN que participan de cualquier manera en el control de la transcripción o traducción y deben incluir un promotor. Las secuencias de control de la expresión adecuadas y procedimientos de fabricación y uso de los mismos son bien conocidos en la técnica.

35 **[0031]** *Vector de expresión*. Un replicón tal como un plásmido, virus, retrovirus, bacteriófago, cósmido, cromosoma artificial (bacteriano o de levadura), o secuencia de ácido nucleico que es capaz de replicarse en una célula huésped, caracterizado por un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción en el que la secuencia puede ser cortada de una forma predeterminada para la inserción de una secuencia de ADN heterólogo. Un vector de expresión tiene un promotor situado en dirección 5' del sitio en que se corta la secuencia para la inserción de la secuencia de ADN heterólogo, siendo el sitio de reconocimiento seleccionado de manera que el promotor estará asociado operativamente con la secuencia de ADN heteróloga. Una secuencia de ADN heteróloga está "asociada operativamente" con el promotor en una célula cuando la
40 ARN polimerasa que se une la secuencia de promotor transcribe la secuencia codificante en ARNm, que a su vez se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificante.

45 **[0032]** El término "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refiere a ARN o ADN que es lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario, o un híbrido de los mismos. El término también abarca híbridos de ARN/ADN. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de
50 unión, tales como fluororibosa y tiolato, y ramas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación, con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluidas en esta definición son los agentes de bloqueo, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, y la introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes de marcaje, otros polinucleótidos o soporte sólido. Los polinucleótidos se pueden obtener por síntesis química o derivados de un microorganismo.

55 **[0033]** El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier segmento de polinucleótido asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen intrones y exones como en la secuencia genómica, o sólo las secuencias de codificación como en ADNc y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Por ejemplo, el gen también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional, o codifica una proteína específica, y que incluye secuencias reguladoras.

[0034] Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o proteína u orgánulo) se refiere a un componente que se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que se produce naturalmente el componente, por ejemplo, otro de ADN y ARN, proteínas y orgánulos cromosómicos y extracromosómicos. Los ácidos nucleicos y proteínas que han sido "aislados" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por tecnología recombinante, así como síntesis química.

[0035] El término "purificado" como se usa en el presente documento no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como un término relativo. Así, por ejemplo, una preparación de polipéptido parcialmente purificado es una en la que el polipéptido está más enriquecido que el polipéptido está en su medio natural. Es decir el polipéptido se separa de los componentes celulares. Por "sustancialmente purificado" se entiende de manera que al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98%, o más de los componentes o materiales celulares se han eliminado. Del mismo modo, un polipéptido puede estar parcialmente purificado. Por "parcialmente purificado" se entiende que se elimina menos del 60% de los componentes o materiales celulares. Lo mismo se aplica a los polinucleótidos. Los polipéptidos descritos en este documento se pueden purificar por cualquiera de los medios conocidos en la técnica.

[0036] Las variantes incluyen variantes alélicas. El término "variante alélica" se refiere a un polinucleótido o un polipéptido que contiene polimorfismos que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de una proteína y que existen dentro de una población natural (por ejemplo, una especie o variedad de virus). Tales variaciones alélicas naturales pueden dar lugar típicamente al 1-5% de la variación en un polinucleótido o un polipéptido. Las variantes alélicas pueden identificarse por secuenciación de la secuencia de ácido nucleico de interés en un conjunto de diferentes especies, que puede llevarse a cabo fácilmente utilizando sondas de hibridación para identificar el locus genético del mismo gen en estas especies. Cualquiera y todas de dichas variaciones de ácido nucleico y los polimorfismos o variaciones de aminoácidos resultantes que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional del gen de interés, se pretende que estén dentro del alcance de la invención.

[0037] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "derivado" o "variante" se refiere a un polipéptido, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una o más variaciones conservativas de aminoácidos u otras modificaciones menores, tales que (1) el polipéptido correspondiente tiene una función sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido de tipo salvaje o (2) un anticuerpo generado contra el polipéptido es inmunorreactivo con el polipéptido de tipo salvaje. Tales modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser espontáneas. El término "variante" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica tal como se define en este documento.

[0038] El término "variación conservativa" indica el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de tal manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, tal como se describe anteriormente.

[0039] Un "vector" se refiere a un ADN recombinante o plásmido de ARN o virus que comprende un polinucleótido heterólogo para liberarse a una célula diana, ya sea in vitro o in vivo. El polinucleótido heterólogo puede comprender una secuencia de interés para los fines de prevención o terapia, y opcionalmente puede estar en forma de un casete de expresión. Tal como se usa en este documento, un vector no necesita ser capaz de replicación en la última célula diana o sujeto. El término incluye vectores de clonación y vectores virales.

[0040] El término "recombinante" significa un polinucleótido de origen semisintético o sintético que, o bien no se produce en la naturaleza o está ligado a otro polinucleótido en una disposición no encontrada en la naturaleza.

[0041] "Heterólogo" significa derivado de una entidad genéticamente distinta del resto de la entidad a la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido puede colocarse mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una fuente diferente, y es un polinucleótido heterólogo. Un promotor eliminado de su secuencia codificante nativa y unido operativamente a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es un promotor heterólogo.

[0042] Los polinucleótidos de la invención pueden comprender secuencias adicionales, tales como secuencias adicionales de codificación dentro de la misma unidad de transcripción, elementos de control, tales como promotores, sitios de unión a ribosomas, 5'UTR, 3'UTR, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, unidades de transcripción adicionales bajo el control del mismo promotor o diferente, secuencias que permiten la clonación, expresión, recombinación homóloga y transformación de una célula huésped, y cualquier constructo, tal como pueda ser deseable para proporcionar realizaciones de esta invención.

[0043] *Codifica o asociado operativamente.* Codifica operativamente o asociado operativamente se refieren cada uno a la unión funcional entre un promotor y la secuencia de ácido nucleico, en el que el promotor inicia la transcripción del ARN correspondiente a la secuencia de ADN. Una secuencia de ADN heteróloga está "asociada operativamente" con el promotor en una célula cuando la ARN polimerasa que se une a la secuencia de promotor transcribe la secuencia codificante en ARNm, que a su vez se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificante.

[0044] *Promotor.* Una secuencia de ADN dentro de una secuencia de ADN mayor que define un sitio al que la ARN polimerasa puede unirse e iniciar la transcripción. Un promotor puede incluir elementos potenciadores o represores distales opcionales. El promotor puede ser homólogo, es decir, de origen natural para dirigir la expresión del ácido nucleico deseado, o heterólogo, es decir, de origen natural para dirigir la expresión de un ácido nucleico derivado de un gen que no es el ácido nucleico deseado. Un promotor puede ser constitutivo o inducible.

[0045] *Vacuna.* Una vacuna se define en el presente documento en su sentido más amplio para referirse a cualquier tipo de agente biológico en una forma administrable capaz de estimular una respuesta inmunitaria protectora en un animal inoculado con la vacuna.

Realizaciones

[0046] La presente invención proporciona un virus de la enfermedad de Marek (MDV) recombinante, en el que se ha insertado a través de recombinación homóloga, una repetición terminal larga (LTR) derivada de un virus de la reticuloendoteliosis (REV). Estos recombinantes son eficaces para provocar una respuesta inmunitaria en un ave contra el virus de la enfermedad de Marek sin causar un importante grado de patogenicidad en el ave. Como se usa en este documento, "sin causar un importante grado de patogenicidad" se define como no hay lesiones macroscópicas específicas de MD observables a simple vista en el ave inoculado/estimulado, incluso en las aves altamente susceptibles. En realizaciones particulares, las aves son gallinas/pollos.

[0047] CVRM-2 fue producido por los autores de Reddy et al., tal como se describe en la misma, y tal como se resume en la las figuras 1 y 2 de esta descripción. Tras la recepción de la muestra de CVRM2, los presentes solicitantes realizaron un análisis cuidadoso basado en la PCR para confirmar la identidad/integridad del aislado de virus (figura 3 presenta una resolución en gel de agarosa de los productos amplificados). Los solicitantes han encontrado, para su sorpresa, que la muestra no era un aislado clonal, sino que era de hecho una población combinada de CVRM2 recombinante y la cepa MDV parental. Los solicitantes realizaron entonces la purificación de la placa necesaria para obtener un aislado puro que consistía solamente en CVRM2 (y no la cepa de MDV Rispens parental). Para mayor claridad, el nuevo aislado clonal se conoce como "RN1250" en toda esta descripción.

[0048] El MDV recombinante de esta invención se puede producir mediante la modificación de MDV serotipo 1 cepa CVI988, o cualquiera de sus clones o cepas de pases en serie, que se denominan colectivamente en este documento como cepas "CVI988/X". Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, CVI988/X incluye, pero no se limita a, la cepa original de pase bajo descrita previamente, CVI988/Rispens (Rispens et al, 1972, Avian Dis., 16: 106-125 y 126-138), cepa CVI988 clon C (CVI988/C) (De Boer, patente de Estados Unidos nº 4.673.572, y De Boer et al, 1986, Avian Dis 30: 276-283), y CVI988/C/R6 (De Boer et al., 1988, Advances in Marek's disease Research, pág. 405-413).

[0049] Se describe en el presente documento es una cepa de MDV atenuada, recombinante, nueva que se produce por sustitución de una porción de la secuencia CVI988/X nativa por ADN exógeno, que comprende una secuencia de repetición terminal larga (LTR) de un virus de la reticuloendoteliosis (REV).

[0050] Tal como se describe en el presente documento, la recombinación de la cepa CVI988 se efectuó utilizando MDV serotipo 1 cepa RM1 como fuente de las LTR exógenas (RM1 es un MDV recombinante en el que las LTR de REV se habían integrado). Tal como se muestra en la figura 2, la LTR de REV se escindió del ADN viral de RM1 purificado mediante digestión con Pac 1 y se insertó en un vector lanzadera, B40, preparado a partir de una cepa muy virulenta del virus de la enfermedad de Marek, Md5. El vector recombinante resultante, B40-Pac, se utilizó para la inserción de las LTR en el virus de la enfermedad de Marek, cepa CVI988. Para generar MDV recombinante con las LTR, el ADN viral purificado de la cepa CVI988 de MDV fue cotransfectado en células fibroblasto embrionarias de pollo o pato (CEF o DEF) con vector recombinante digerido con Not I. Los virus recombinantes que tienen las LTR de RM1 integradas en su genoma se replicaron más rápidamente que la cepa CVI988parental. Sin estar ligado por la teoría, se cree que este aumento de la tasa de replicación es el resultado de la inserción de las LTR del virus de la reticuloendoteliosis en el genoma de MDV en dirección 5' del gen de ICP4.

[0051] Tal como se describe en el presente documento, el MDV CVI988/X puede ser modificado mediante la adición de de LTR de virus de la reticuloendoteliosis aislados de fuentes distintas de la cepa RM1. Por ejemplo, el sitio de inserción

de la LTR en la cepa RM1 de MDV se ha demostrado que está entre IRL e IRS del genoma (Jones et al, 1996, Retroviral insertional activation in a herpesvirus: transcriptional activation of US genes by an integrated long terminal repeat in a MDV clone, J. Virology, 70 (4): 2460-2467). Esto corresponde aproximadamente a la posición 152745 de las cepas Md5 del virus de la enfermedad de Marek. Esta región se encuentra dentro de un fragmento EcoRI largo de 1704 pares de bases (nucleótidos 152, 198-153, 902) de Md5, serotipo 1 (Tuhnan et al., 2000, The genome of a very virulent Marek's diseases virus, J. Virology, 74d7): 7.980-7988). Este fragmento EcoRI de 1.704 pb se puede clonar en un vector de plásmido que carece del sitio de endonucleasa de restricción DraIII y se utiliza como un vector de transferencia para la introducción de cualquier LTR en el genoma del MDV. Este fragmento EcoRX tiene un sitio de restricción DraIII único situado 10 pb en dirección 5' de la ubicación de LTR en RM1. Las LTRs se pueden insertar en el sitio DraIII del fragmento EcoRI de 1.704 pares de bases para generar el vector de transferencia de LTR, a fin de generar MDV recombinante con inserciones de LTR, el vector de transferencia debería linealizarse con EcoRI, extraerse con fenol y cloroformo y precipitarse con etanol. La cotransfección del vector de transferencia linealizado junto con el ADN de cualquier cepa de MDV, serotipo 1, en células permisibles en cultivo dará lugar a la introducción de secuencias de LTR en el genoma de MDV por recombinación homóloga.

[0052] Reddy et al., supra, indicaron que el virus recombinante resultante (es decir MDV con una LTR de reticuloendoteliosis) debería "crecer más rápidamente que su correspondiente cepa de MDV parental, y por lo tanto no hay necesidad de la purificación de placas". Sin embargo, en vista del hallazgo inesperado de los solicitantes de que la muestra de CVRM-2 era de hecho una combinación de MDV recombinante más su correspondiente MDV parental, la persona experta recomienda encarecidamente purificar en placa todo el MDV recombinante previsto por la presente descripción. Esto es particularmente importante debido a que una persona experta podría fomentar erróneamente el descarte de un MDV recombinante potencialmente útil después de la obtención de resultados que indican que la inmunización con el virus no proporciona suficiente protección contra una estimulación posterior con MDV virulento (por favor, véase la Tabla 1 de Reddy et al., donde CVRM-2 parece proporcionar una protección de menos del 80%).

[0053] Tal como se describe en el presente documento, el MDV recombinante que tiene las LTR de RETV se puede preparar a partir de cualquier MDV, incluyendo otras cepas CVI988/X, utilizando el CVRM-2 depositado, siempre que la CVRM-2 se purifique en placa para asegurar que el virus es RN1250, y no una combinación de RN1250 y la cepa de MDV parental.

[0054] Una variedad de LTR de REV son adecuados para usar en el presente documento. Se han aislado y descrito numerosas LTR virales de reticuloendoteliosis adecuadas, e incluyen pero no se limitan a las descritas por Kost et al. (1993, Retrovirus insertion into herpesvirus: characterization of a Marek's disease virus harboring a solo LTR, Virology, 192: 161-169), Ridgway (1992, REV LTR elements are efficient promoters in cells of various species and tissue origin, including human lymphoid cells, Gene, 121:213-218), Boerkoel y Kung [1992, Transcriptional interaction between retroviral long terminal repeats (LTRs): mechanism of 5' LTR suppression and 3' LTR promoter activation of c-myc in avian B-cell lymphomas, J. Virol., 66:4814-4823], Hippenmeyer y Krivi (1991, Gene expression from heterologous promoters in a replication-defective avian retrovirus vector in quail cells, Poult. Sci., 70:982-92), Ridgway et al. (1989, Transient expression analysis of the reticuloendotheliosis virus long terminal repeat element, Nucleic Acids Res., 17:3199-3215), Embretson y Temin (1987, Transcription from a spleen necrosis virus 5' long terminal repeat is suppressed in mouse cells, J. Virol., 61:3454-3462), Notani y Sauerbier (1987, Sequence instability in the long terminal repeats of avian spleen necrosis virus and reticuloendotheliosis virus, J. Mol. Evol., 25:241-247), Robinson y Gagnon (1986, Patterns of proviral insertion and deletion in avian leukosis virus-induced lymphomas, J. Virol., 57:28-36), y Ridgway et al., (1985, In vitro transcription analysis of the viral promoter involved in c-myc activation in chicken B lymphomas: detection and mapping of two RNA initiation sites within the reticuloendotheliosis virus long terminal repeat, J. Virol., 54:161-170). Además, numerosas secuencias de LTR están disponibles en GenBank y otras bases de datos genómicas y se pueden sintetizar mediante PCR utilizando cebadores específicos de LTR. Las secuencias amplificadas por PCR a continuación se pueden insertar en cualquiera de los dos vectores de transferencia descritos como se indicó anteriormente.

[0055] Las secuencias de ácido nucleico de LTR de REV se describen en el presente documento, o sus equivalentes biológicamente funcionales, se pueden utilizar como se describe en el presente documento. La frase "equivalentes biológicamente funcionales" como se utiliza en el presente documento, indica secuencias de ácidos nucleicos que muestran la misma actividad biológica/actividad inmunoprotectora o similar que las secuencias de ácido nucleico de LTR de reticuloendoteliosis viral mencionadas anteriormente (es decir, cuando se introduce en huésped CVI988

[0056] de MDV de una manera funcionalmente operable que provoca una respuesta inmunitaria protectora sin causar un importante grado de patogenicidad en el pollo/gallina).

[0057] Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden alterarse mediante sustituciones de bases, inserciones, adiciones o deleciones para producir ácidos nucleicos biológicamente funcionalmente equivalentes que mantienen la actividad del promotor o potenciador.

[0058] Las variantes de los ADN o ADNc genómicos (si se obtienen mediante RT-PCR a partir de ARN), contemplados en el presente documento, deben poseer más del 75% de homología, preferiblemente más del 85% de homología, y lo más preferiblemente una homología de más del 95%, con respecto a las LTR de REV de origen natural descritas en este documento.

[0059] La vacuna del virus de la enfermedad de Marek recombinante de la invención se puede preparar como una preparación libre de células, o en la realización preferida, como una preparación asociada a las células. Una vacuna asociada a células se puede preparar directamente a partir de cultivo in vitro de los agentes virales vivos en un medio de crecimiento adecuado, tal como fibroblastos de embrión de pollo como se describe por Witter (US4,895,718). Alternativamente, para preparar inóculos de virus libre de células, las células de tejido o cultivo de células de huésped infectado se someten a sonicación o alteran de otra manera como se describe previamente. Los restos celulares se eliminan por centrifugación y el centrifugado se recupera como el inóculo. Además, mientras que la vacuna preferida es un virus viable, también se contempla que la vacuna se puede preparar a partir del virus muerto o de componentes inmunógenos separados del virus, aunque tal procesamiento incurriría significativamente en mayores costes. Por ejemplo, una vacuna subunitaria se puede preparar mediante la separación del virus muerto de una o más proteínas virales purificadas identificadas por tener propiedades inmunogénicas.

[0060] El agente viral se prepara para administración por formulación en una dosis de inmunización eficaz con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina fisiológica o medio de cultivo tisular. La expresión "dosis de inmunización eficaz" se define como aquella cantidad que inducirá inmunidad en un pollo contra la estimulación por una cepa virulenta del virus de la enfermedad de Marek, la inmunidad se considera como habiendo sido inducida en una población de pollos cuando el nivel de protección de la población es significativamente mayor que la de un grupo de control no vacunado (medido a un nivel de confianza de al menos 80%, preferiblemente medido a un nivel de confianza del 95%). Una medida del nivel de protección es el índice de protección (Pi), que se calcula como la incidencia de MD en controles no vacunados, estimulados con MDV menos la incidencia de MD en grupos vacunados, estimulados con MDV, y la diferencia dividida por el porcentaje de enfermedad de Marek en controles no vacunados, estimulados con MDV, con el resultado multiplicado por 100.

[0061] Típicamente, la vacuna contendrá al menos aproximadamente 200 UFP (unidades formadoras de placas) del virus, y preferiblemente entre aproximadamente 2.000 y 5.000 UFP. La vacuna se puede administrar de manera efectiva cualquier momento después de que el pollo/gallina alcance la inmunocompetencia, que es aproximadamente en el día 18 de incubación (3 días antes de la eclosión); pero se administra normalmente por inoculación dentro de 24-48 horas después de la eclosión. Alternativamente, el ADN viral recombinante se puede administrar como una vacuna de ADN como se describe por Tischer et al. (2002, J. Gen. Virology, 83: 2367-2376).

[0062] Los adyuvantes apropiados tal como se conocen en la técnica también pueden incluirse en la formulación de vacuna. En muchos casos, la eficacia vacunal puede ser mejorada mediante la combinación de los virus de la enfermedad de Marek recombinantes de la invención con otros agentes virales en vacunas bivalentes o polivalentes.

[0063] En otra realización, el portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una emulsión de agua-en-aceite. En aún otra realización, la emulsión de agua-en-aceite puede ser una emulsión triple de agua/aceite/agua (W/O/W). En aún otra realización, el portador, excipiente, o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una emulsión aceite-en-agua.

Procedimientos de uso y artículo de fabricación

[0064] Se describe en el presente documento un procedimiento de vacunación de un ave que comprende la administración de una composición que comprende un virus de la enfermedad de Marek (MDV).

[0065] En una realización de la invención, se puede emplear un régimen de sensibilización-refuerzo que se compone de al menos una administración primaria y al menos una administración de refuerzo usando al menos un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno común. Típicamente, la composición inmunológica o vacuna utilizada en la administración primaria es de naturaleza diferente de la utilizada como refuerzo. Sin embargo, se observa que la misma composición se puede utilizar como la administración primaria y la administración de refuerzo. Este protocolo de administración se llama "sensibilización-refuerzo".

[0066] Un régimen de sensibilización-refuerzo comprende al menos una administración de sensibilización y al menos una administración de refuerzo usando al menos un polipéptido común y/o variantes o fragmentos del mismo. La vacuna utilizada en la administración de sensibilización puede ser de naturaleza diferente a la utilizada como vacuna de refuerzo

posterior. La administración de sensibilización puede comprender una o más administraciones. Del mismo modo, la administración de refuerzo puede comprender una o más administraciones.

[0067] El volumen de dosis de las composiciones es generalmente de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 2,0 ml, de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 ml, y de entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 1,0 ml.

[0068] Se debe entender por un experto en la técnica que la presente descripción se proporciona a modo de ejemplo y la presente invención no se limita a ello. A partir de la descripción de este documento y el conocimiento en la técnica, el experto en la materia puede determinar el número de administraciones, la vía de administración, y las dosis a utilizar para cada protocolo de inyección, sin gran experimentación.

[0069] La presente invención contempla al menos una administración a un animal de una cantidad suficiente de la composición terapéutica producida según la invención. El animal puede ser macho, hembra, hembra embarazada y recién nacido. Esta administración puede ser a través de diversas rutas incluyendo, pero no limitado a, inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID), intraperitoneal (IP) o subcutánea (SC) o mediante administración intranasal o por vía oral. La composición terapéutica según la invención también se puede administrar mediante un aparato sin aguja (como, por ejemplo, Pulse Needle Free, Pulse Needlefree, Lenexa, KS, EE.UU., Pigjet, Dermojet, Biojector, Avijet (Merial, GA, EE.UU.), aparato Vetjet o Vitajet (Bioject, Oregon, EE.UU.)). Otro enfoque para la administración de composiciones de plásmidos es usar electroporación (véase, por ejemplo Tollefsen et al, 2002; Tollefsen et al, 2003; Babiuk et al, 2002; solicitud PCT No. WO99/01158). En otra realización, la composición terapéutica se administra al animal mediante pistola de genes o bombardeo de partículas de oro. En una realización ventajosa, el animal es un perro, hurón o foca.

[0070] Se describe en el presente documento un kit para realizar un procedimiento de producir o inducir una respuesta inmunológica o protectora contra rotavirus en un animal que comprende una composición inmunológica o vacuna subunitaria de rotavirus y las instrucciones para realizar el procedimiento de liberación en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmune en el animal.

[0071] Como se describe en este documento, la materia descrita en el presente documento se refiere a un kit para realizar un procedimiento de producir o inducir una respuesta inmune que puede comprender una cualquiera de las composiciones de MDV recombinante o vacunas y las instrucciones para realizar el procedimiento.

[0072] Otras citoquinas que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), interferón α (IFN α), interferón β (IFN- β), interferón γ (IFN- γ), interleuquina-1 α (IL-1 α), interleuquina-1 β (IL-1 β), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-5 (IL-5), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-7 (IL-7), interleuquina-8 (IL-8), interleuquina-9 (IL-9), interleuquina-10 (IL-10), interleuquina-11 (IL-11), interleuquina-12 (IL-12), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor de necrosis tumoral β (TNF- β), y factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Se entiende que las citoquinas se pueden coadministrar y/o administrar secuencialmente con la composición inmunológica o de vacuna de la presente invención. Así, por ejemplo, la vacuna de la presente invención puede también contener una molécula de ácido nucleico exógena que expresa in vivo una citoquina adecuada, por ejemplo, una citoquina emparejada a este huésped a vacunar o en el que debe provocarse una respuesta inmunológica (por ejemplo, una citoquina aviar para las preparaciones a administrar a aves).

[0073] La presente invención se describirá ahora adicionalmente a modo de los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1 - Eficacia del virus de la enfermedad de Marek (MDV), cepas SR-1, CVRM-2 RN1250 y RMI CN32399, y Rispens CN32553

[0074] Un aspecto crítico de la presente invención es que después de haber completado el estudio descrito en este Ejemplo, los inventores determinaron posteriormente que el MDV CVRM-2 no era un MDV recombinante clonal, sino de hecho era una población mixta de MDV recombinante RN1250 y de MDV Rispens parental. Por lo tanto, ahora que los inventores han producido un MDV RN1250 clonal estable, cuya fuerte eficacia contra el virus como vacuna se demuestra en los ejemplos posteriores, un experto en la materia no se verá sorprendido por el amplio (e inaceptable) intervalo de protección (37 a 86%) aparentemente proporcionado por el MDV CVRM-2 en este estudio preliminar.

[0075] *Objetivo.* Evaluar y comparar la eficacia de tres cepas MDV experimentales SR-1 y Rispens con un producto de vacuna comercial (Rismavac®-Intervet, Inc.) en pollos SPF utilizando una estimulación temprana con MDV T. King.

[0076] Materiales/Procedimientos. Se asignaron aleatoriamente ciento cincuenta pollos SPF de un días de vida (SPAFAS grupo W-42) a cinco grupos diferentes de treinta aves cada uno (grupos 1-5). A continuación, cada grupo de tratamiento se asignó aleatoriamente a unidades de aislamiento. Los pollos del grupo 1 utilizados como los controles estimulados no vacunados se colocaron en primeras unidades de aislamiento de presión negativa, quince aves por unidad. Cada grupo restante (Grupos 2-5) fueron entonces vacunados por vía subcutánea (SQ) con 0,2 ml por ave, ya sea con Rispens Rismavac® de Intervet; MDV SR-1 RMI CN32399 P₄; MDV SR-1 CVRM-2 RN1250 P₄; o MDV Rispens CN32553 P₄. Las aves vacunadas SQ en los Grupos 2-5 también se colocaron en unidades de aislamiento de presión negativa, 15 aves por unidad. Cuatro días más tarde en el día de estudio 4, las aves en los Grupos 1-5 fueron estimulados individualmente con MDV T. king, diluido 1:500 (protocolo 02-085 de 2 de enero de 2003). Las aves fueron estimuladas por vía intraperitoneal (IP), con 0,2 ml por ave. Las aves se observaron durante 49 días después de la estimulación. A cualquier ave que murió antes del día de estudio 53 se le hizo la necropsia y se examinaron las lesiones por MDV. En el día 53, todas las aves restantes fueron sacrificadas, se les hizo la necropsia y se examinaron las lesiones por MDV.

[0077] Resultados. Las cepas de MDV experimentales SR-1 y Rispens proporcionaron tasas de protección de 37 a 86% contra la estimulación temprana con MDV T. King. Rismavac® de Intervet proporcionó una protección del 83%. La estimulación se validó con las aves de control estimuladas no vacunadas que muestran una incidencia de MD del 97%.

Ejemplo 2 - Eficacia de vacuna de MDV, SR-1, RN1250 en pollos de engorde comerciales utilizando un modelo de estimulación con portador

[0078] Materiales y Procedimientos: Se distribuyeron aleatoriamente setenta y seis (76) pollos de engorde comerciales de un día de vida obtenidos de una bandada de aves de corral Harrison 1-1 en tres casas de colonias diferentes y cuatro grupos diferentes de la siguiente manera: Grupo 1: 13 aves; Grupo 2: 13 aves; Grupo 3: 25 aves; y Grupo 4: 25 aves (una casa se dividió en dos partes con el fin de crear jaula uno y jaula dos). Después de la aleatorización, las aves fueron anillados en la nuca del cuello para la identificación y a continuación se inocularon con 0,2 ml por ave por vía intraperitoneal (IP) con estimulación vvMDV T. King, diluido 1: 500. Después de la estimulación, las aves fueron colocadas en sus respectivas casas de colonias con 25-26 aves por casa. Estas aves se mantuvieron en las casas de colonias durante 14 días antes de la colocación de aves de control de contacto vacunados y no vacunados con MDV. Catorce días después de la colocación de las aves portadoras, se distribuyeron aleatoriamente 304 pollos de engorde comerciales de un día de vida de la siguiente manera: dos grupos de 75 aves cada uno (grupos 3 y 4) y dos grupos con 38 y 40 aves cada uno (grupos 1 y 2), para servir como animales vacunados; además, se utilizaron dos grupos de 25 aves y dos con 13 aves para servir como aves de control de contacto no vacunados para los Grupos 1-4 (Grupo 1: 13 aves; Grupo 2: 13 aves; Grupo 3: 25 aves; y grupo 4: 25 aves). Estas aves de control de contacto fueron anillados en la nuca del cuello para su identificación y se colocaron en las casas de colonias. Los animales vacunados se inocularon por vía subcutánea (SQ) (0,2 ml por ave) de la siguiente manera: Grupo 1 fue vacunado con RN1250 pre MSV, P6 (aislado I); Grupo 2 fue vacunado con RN1250 pre MSV, P7 (aislado U); Grupo 3 fue vacunado con RN1250 pre MSV, P7 (aislado F); y Grupo 4 fue vacunado con Rismavac® serie 02760010, exp 15 Abril 2012. Después de las inoculaciones, los animales vacunados fueron colocados en las mismas casas de colonias donde se colocaron previamente las aves de control de contacto no vacunadas y portadoras. Se alojaron cincuenta (50) pollos de engorde comerciales no inoculados de un día de vida en unidades de aislamiento, y se mantuvieron durante 49 días con el fin de servir como un segundo grupo de controles de contacto en un día posterior. Todas las aves vacunadas fueron anilladas en la nuca del cuello ocho días más tarde con bandas numeradas con un código de colores. Los portadores se quedaron en las casas de colonias durante cincuenta días, y a continuación todos los supervivientes se sacrificaron y se realizó la necropsia.

[0079] La enfermedad clínica y la mortalidad fueron controladas diariamente durante 49 días después de la vacunación. Los bazos de cualquier ave control de contacto que murió fueron recogidos para aislar el virus. En el día de estudio 53, los cuarenta pollos de engorde comerciales no inoculados que se alojaron en unidades de aislamiento, a fin de servir como el segundo grupo de controles de contacto, se colocaron en las casas de colonias, Grupos 1-4, de acuerdo con un programa de aleatorización, 10 aves por grupo. Estas aves fueron anilladas con bandas numeradas antes de la colocación para su identificación. Los bazos de estas aves también se recogieron para el aislamiento del virus en el caso de que se produjera la muerte. El resto de los animales vacunados y las aves iniciales de control de contacto no vacunadas se sacrificaron y se realizó la necropsia en el periodo de observación 49 días en el estudio día 63. Los bazos y al menos dos folículos de las plumas por ave se recogieron de 10 controles de contacto para el aislamiento del virus. Las aves muestreadas se determinaron mediante un programa de aleatorización. En el día de estudio 83, las aves de control de contactos restantes que se agregaron a los grupos en el día de estudio 53 (segundo grupo), se sacrificaron. Los bazos y al menos dos folículos de las plumas por ave se recogieron de estas aves de control de contacto para el aislamiento del virus.

Tabla 1. Número de aves que sobreviven hasta cinco días de vida

Régimen	Grupo	Nombre	# supervivientes hasta 5 días de vida/total de aves
Vacunado	1	RN 1250 pre MSV(I)	38/38
Vacunado	2	RN 1250 pre MSV(U)	40/40
Vacunado	3	RN 1250 pre MSV(F)	73/75
Vacunado	4	Rismavac®	73/75
Control de contacto	1	RN 1250 pre MSV(I)	12/13
Control de contacto	2	RN 1250 pre MSV(U)	13/13
Control de contacto	3	RN 1250 pre MSV(F)	22/25
Control de contacto	4	Rismavac®	23/25

Tabla 2. Índices de protección contra la estimulación wMDV T. King

Régimen	Gp	Nombre	infectadas/aves totales	Porcentaje infectadas	Índice de protección ⁵ de
Vacunada	1	RN 1250 pre MSV(I) ¹	2/38	5,26%	87,4 (81,2) ⁶
Vacunada	2	RN 1250 pre MSV(U) ²	6/40	15,0%	2,6 (46,4) ⁶
Vacunada	3	RN 1250 pre MSV(F) ³	6/73	8,22%	84,9
Vacunada	4	Rismavac® ⁴	15/73	20,5%	63,7
Portadora	1	RN 1250 pre MSV(I)	9/12	75,0%	N/A
Portadora	2	RN 1250 pre MSV(U)	11/12	91,7%	N/A
Portadora	3	RN 1250 pre MSV(F)	20/25	80,0%	N/A
Portadora	4	Rismavac®	22/24	91,7%	N/A
Control de contacto	1	RN 1250 pre MSV(I)	5/12	41,7%	N/A
Control de contacto	2	RN 1250 pre MSV(U)	2/13	15,45	N/A
Control de contacto	3	RN 1250 pre MSV(F)	12/22	54,5%	N/A
Control de contacto	4	Rismavac®	13/23	56,5%	N/A
2º controles	1	RN 1250 pre MSV(I)	9/10	90,0%	N/A
2º controles	2	RN 1250 pre MSV(U)	8/10	80,0%	N/A
2º controles	3	RN 1250 pre MSV(F)	9/10	90,0%	N/A
2º controles	4	Rismavac®	8/10	80,0%	N/A

¹título de vacuna RN1250 (I): 3.600 ufp/0,2 ml.
²título de vacuna RN1250 (U): 3.144 ufp/0,2 ml.
³título de vacuna RN1250 (F): 3.710 ufp/0,2 ml.
⁴título de vacuna Rismavac®: 2.328 ufp/0,2 ml
⁵Índice protector: Porcentaje de contactos no vacunados con lesiones MD (controles de estimulación) - Porcentaje de pollos vacunados con lesiones MD/ Porcentaje de los contactos no vacunados con lesiones MD (controles de estimulación).
⁶ Índice protector considerando el porcentaje de los controles de contacto no vacunados con lesiones MD en la casa de colonias 10, los grupos 1 y 2, como un solo grupo (28% o 7/25).

- 5 [0080] **Conclusión.** Vacuna contra la enfermedad de Marek, serotipo 1, Vacuna RN1250, pre MSV (I) y (F), fueron más eficaces que Rismavac® de Intervet en pollos de engorde comerciales utilizando MDV T. King en un modelo de estimulación con portador.

Ejemplo 3 - MDV RN1250 (X + 5) de seguridad en pollitos SPF de 1 día de vida

- 10 [0081] Se asignaron aleatoriamente doscientos cincuenta pollitos SPF de un día de vida a cinco grupos de tratamiento, 50 pollitos por grupo, así como, asignados al azar a las unidades de aislamiento de presión negativa utilizados para el alojamiento. Cien pollitos fueron designados como los vacunados y fueron identificados como Grupos 1 y 2. Un centenar de pollitos fueron designados como los controles de contacto vacunados de forma simulada de los Grupos 1 y 2 (grupos 4 y 5, respectivamente); los pollitos vacunados de forma simulada restantes (50) se identificaron como Grupo 3 para servir como los controles negativos. Después de la aleatorización, los controles de contacto vacunados de forma simulada y los controles negativos vacunados de forma simulada se anillaron en las alas con bandas numeradas para la identificación y se colocaron en sus respectivas unidades (7-10 aves por unidad). Las aves vacunados simuladas se inocularon con
- 15

diluyente de la enfermedad de Marek, 0,2 ml por ave. Los pollitos designados como los vacunados fueron inoculados por vía subcutánea (SQ) con: RN1250 (X + 5) (Grupo 1) o Rismavac® (Grupo 2), 0,2 ml por ave (~ 5000-6500 unidades formadoras de placas (ufp) por dosis). Después de las inoculaciones, los vacunados fueron colocados en sus unidades asignadas (7-10 aves por unidad) con sus controles de contacto vacunados de forma simulada que habían sido alojados anteriormente, para un total de 15 a 20 pollitos por unidad.

Tabla 3. Diseño del estudio

GRUPO	VACUNA	ruta de vacunación*	NÚMERO DE AVES
1	MDV SR-1 RN1250	SQ	50
2	MDV SR-1 Rismavac®	SQ	50
3	Vacunado simulado (controles negativos)	SQ	50
4	Controles de contacto vacunados de forma simulada para aves vacunadas con MDV SR-1 RN1250	SQ	50
5	Controles de contacto vacunados de forma simulada para aves vacunadas con MDV SR-1 Rismavac®	SQ	50

[0082] En el día de estudio 7, se eligieron muestras de órganos (bursa, timo y bazo) de cinco aves pertenecientes a cada grupo, Grupos 1-5, para la recogida y fijación en formalina al 10% tamponada para histopatología. Las aves, 2-3 aves por unidad, se seleccionaron de acuerdo con un programa de aleatorización. En el día de estudio 14, los pesos corporales y pesos de los órganos (bursa, timo y bazo), de 15 aves de cada grupo, Grupos 1-5, se recogieron. Las muestras de órganos (bursa, timo y bazo) de cinco aves en cada grupo (Grupos 1-5) se recogieron y se fijaron en formalina al 10% tamponada. De dos a tres aves por unidad se utilizaron para el pesaje y recogida de órganos. Las aves fueron seleccionadas de acuerdo a un programa de aleatorización. El procedimiento descrito en el día de estudio 14 se repitió el día 28 y el día 49 con las aves restantes.

[0083] *Resultados.* Atrofia de órganos con RN1250. Las proporciones de bursa de aves vacunadas con vacuna de MDV RN1250 SR-1 y las proporciones de los, controles de contactos vacunados de forma simulada no fueron significativamente diferentes de la de los aves de control negativo vacunados de forma simulada, excepto que en el día 28, la proporción de bursa de los controles de contacto de MDVSR-1 RN1250 fue significativamente mayor que la de los controles negativos ($p > 0,0111$). Las proporciones de timo de aves vacunadas con la vacuna de MDVSR-1 RN1250 y las proporciones de los controles de contactos vacunados de forma simulada no fueron significativamente diferentes de las de aves de control negativo vacunadas de forma simulada ($p > 0,7265$). Finalmente, las proporciones de bazo de aves vacunadas con vacuna MDVSR-1 RN1250 y las proporciones de los controles de contactos vacunados de forma simulada no fueron significativamente diferentes de las de aves de control negativo vacunadas de forma simulada ($p > 0,5286$).

Atrofia de órganos con Rismavac®

[0084] Las proporciones de bursa de aves vacunadas con vacuna MDVSR-1 Rismavac® y las proporciones de los controles de contacto vacunados de forma simulada no fueron significativamente diferentes de las de las aves de control negativo vacunados de forma simulada ($p \geq 0,0581$). Las proporciones de timo de aves vacunadas con vacuna MDVSR-1 Rismavac® y las proporciones de los controles de contacto vacunados de forma simulada no fueron significativamente diferentes de las de las aves de control negativo vacunadas de forma simulada ($p \geq 0,4004$). La proporción de bazo de aves vacunadas con vacuna MDVSR-1 Rismavac® fue significativamente mayor que la proporción de bazo de los controles negativos vacunados de forma simulada en el Día 14 con un valor de $p = 0,0141$; y las proporciones de bazo de aves de controles de contacto vacunadas de forma simulada fueron significativamente mayores que las de los controles negativos vacunados de forma simulada en el día 28 con un valor de $p < 0,0001$. Las proporciones no fueron significativamente diferentes en cualquier otro día ($p \geq 0,5558$). Los resultados del examen histológico no mostraron evidencias de atrofia en la bursa, timo o el bazo de las aves inoculadas con SR-1 RN1250 o Rismavac® para la enfermedad de Marek.

[0085] *Conclusión.* En las condiciones de este ensayo SR-1 MDV, RN1250, X + 5, era segura cuando se administra SQ, tal como se evaluó mediante atrofia tímica, bursal y/o de bazo.

Ejemplo 4 - Diseminación de MDV, SR-1, RN1250 en pollitos SPF de un día de vida

[0086] Objetivo. Evaluar la diseminación de la vacuna experimental MDV, SR-1, RN1250 (X + 5) en pollitos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de vida cuando se administra SQ y si se diseminaría y extendería a contactos no vacunados.

[0087] Materiales y Procedimientos. Se distribuyeron aleatoriamente ciento veinte (120) pollitos PSF de un día de vida en tres grupos de tratamiento diferentes y seis unidades con cada unidad conteniendo 15 vacunados y cinco contactos. Las aves aleatorizadas como contactos fueron anillados en la nuca del cuello con bandas de colores numerados por el programa de aleatorización y a continuación se colocaron en sus respectivas unidades. Las aves aleatorias como vacunadas fueron vacunadas con cualquiera de MDV RN1250 X + 5 o Rispons. Las vacunas experimentales y comerciales se diluyeron en diluyente de Marek para producir aproximadamente 100.000 ufp por dosis (aproximadamente 17X la dosis de campo esperada) administradas por vía SQ. Después de la vacunación, las aves se colocaron en sus respectivas unidades junto con los contactos que se colocaron previamente. Las aves vacunadas fueron anilladas a los ocho días de vida en la nuca del cuello con bandas de colores numeradas de acuerdo con un programa de aleatorización. El personal implicado en la evaluación clínica durante el estudio no estaba presente en la colocación de bandas de los contactos o los vacunados ni tampoco realizaron observaciones clínicas durante este período de tiempo a fin de mantener el cegamiento.

Tabla 4. Grupos de Estudio

GP	VACUNA	ruta de VACUNACIÓN/VOLUMEN	NÚMERO DE AVES* Vacunadas	Contactos no vacunados
1	MDV SR-1 RN1250	SQ/0,2 ml por ave	30	10
2	Vacuna MDVSR-1 Rispons	SQ/0,2 ml por ave	30	10
3	controles negativos vacunados de forma simulada	SQ/0,2 ml por ave	30	10

[0088] A las dos semanas después de la vacunación, se tomaron hisopos traqueales y cloacales para la recuperación de virus de todas las aves vacunadas. Los hisopos se agruparon por grupo, con cinco hisopos traqueales o cloacales por tubo de hisopo que contenía 5 ml de estabilizador SPGA. Los folículos de las plumas primarias fueron recogidos para la recuperación del virus de dos aves vacunadas en cada grupo, recogiendo dos o tres muestras de plumas por ave. Las dos aves por grupo para el muestreo de folículos de plumas se seleccionaron de acuerdo con un programa de aleatorización y se mantuvieron vivas después del muestreo. Todas las muestras fueron llevadas al departamento de análisis de Meril Select para su procesamiento. El mismo procedimiento de muestreo se repitió dos veces a intervalos de siete días.

[0089] En el día de estudio 21, además del muestreo con hisopos de la tráquea y la cloaca y el muestreo de folículos de plumas, cinco contactos vacunados y no vacunados por grupo (seleccionados de acuerdo con un programa de aleatorización) fueron sacrificados y se realizó la necropsia, con bazos recogidos individualmente. El aislamiento del virus se trató sólo en los bazos recogidos de los contactos no vacunados (se recogieron las aves vacunadas para mantener el ciego). En el último día del estudio (día 49), todas las aves restantes fueron sacrificadas y se realizó la necropsia y se terminó el estudio. Los bazos de los cinco contactos vacunados y no vacunados restantes por grupo se recogieron individualmente. El aislamiento del virus solamente se intentó en los bazos recolectados de los contactos no vacunados (se recogieron las aves vacunadas para mantener el ciego).

[0090] Resultados. El título promedio aritmético del grupo uno MDV SR-1 RN1250 X + 5 (AMT) fue de 94.160 ufp/dosis de 0,2 ml. El grupo dos MDV SR-1 Rispons fue de 51.800 ufp/0,2 ml dosis. Todos los hisopos traqueales y cloacales fueron negativos para la recuperación de virus.

[0091] Grupo 1 MDV SR-1 RN1250: Todas las muestras analizadas para este grupo fueron negativas para la recuperación de virus a partir de folículos de las plumas.

[0092] Grupo 2 MDV SR-1 Rispons: En el día 21, los folículos de las plumas de las aves muestreadas fueron positivos para el efecto citopático de la enfermedad de Marek (MD CPE). En los días 14 y 28, los folículos de las plumas de todas las aves muestreadas fueron negativos.

[0093] Grupo 3 Controles negativos vacunados de forma simulada: Todas las muestras de folículo de plumas ensayadas fueron negativas para la recuperación de virus de pluma.

[0094] No hubo virus recuperado de ninguno de los bazos recogidos de las aves contactos en los días 21 y 49. Las muestras del día 49 estaban contaminadas inicialmente pero se ensayaron de nuevo usando PCR y fueron todas negativas. El material de la capa leucocítica congelada de estas mismas muestras fue también replacado y todas estas muestras se confirmaron negativas.

[0095] *Conclusión.* Bajo las condiciones de este estudio, las aves vacunadas SQ con la vacuna experimental MDV, SR-1, RN1250 mostraron patrones similares de diseminación para las aves vacunadas SQ con la vacuna disponible en el mercado de MDV, Rispens SR-1. No hubo recuperación de virus o evidencia de enfermedad clínica en aves no vacunadas que estuvieron en contacto con aves vacunadas con la vacuna experimental MDV RN1250.

Ejemplo 5 - Evaluación de la eficacia de vacuna de MDV, S1, RN1250 (X + 5) administrada a pollitos de un día contra virus vvMDV, RB1B

[0096] *Materiales y Procedimientos.* Se distribuyeron aleatoriamente doscientos ochenta (280) pollitos SPF de un día de vida en ocho grupos diferentes y 24 unidades de aislamiento diferentes de acuerdo con un programa de aleatorización (11-12 aves por unidad; 35 aves por tratamiento). Después de la aleatorización, las aves en los grupos 6 y 7, los controles negativos vacunados de forma simulada, estimulados y vacunados de forma simulada/estimulados de forma simulada, se vacunaron de forma simulada con diluyente de la vacuna de Marek y se colocaron en sus unidades designadas de acuerdo con el programa de aleatorización. Las aves restantes fueron entonces vacunadas con MDV SR-1 RN1250, a 287, 578, 736, 1085, o 1392 unidades formadoras de placa (ufp) por dosis de ave, o con MDV SR-3 HVT, 1728 ufp por dosis de ave. Las aves se vacunaron subcutáneamente (SQ) con 0,2 ml por pollito. Después de las vacunaciones, cada grupo vacunado fue colocado en su unidad designada de acuerdo con el programa de aleatorización. En el día de estudio 4, las aves en el Grupo 7 se estimularon de forma simulada con diluyente de la vacuna de Marek y Grupos 1-6 y 8 fueron estimulados con vvMDV RB1B, mediante la ruta intraperitoneal, 0,2 ml por ave (IP). Se observaron diariamente las aves durante 45 días después de la estimulación por reacciones desfavorables para la estimulación, en particular la muerte o la depresión. En el día 49 del estudio, las aves se sacrificaron y se realizó la necropsia para examinar las lesiones macroscópicas asociadas con la enfermedad de Marek.

[0097] *Resultados.* Las tasas de fracción de prevención contra la estimulación vvMDV RB1B en los Grupos 1-5 tenían un intervalo de 0,84 a 0,94. La fracción de prevención en el Grupo 8, el grupo HVT vacunado, fue de 0,73. La incidencia de MDV en el Grupo 6 de control de la estimulación vacunado fue de 91,2%. Las aves del grupo de 7, los controles negativos vacunados simuladamente, estimulados simuladamente, se mantuvieron libres de lesiones de MDV a lo largo del estudio.

[0098] *Conclusión.* La vacuna MDV, serotipo 1, Virus vivo, vacuna experimental RN1250 (X + 5) administrada por vía subcutánea (SQ) de pollitos SPF de un día fue eficaz en 287 unidades formadoras de placa por dosis usando el virus RB1B como estimulación.

Tabla 5. Resumen de la eficacia en respuesta a la dosis

Gp	Gp	Nombre del grupo	dosis real	infectadas/total de aves	% protegidas	%infectadas
1	B	Vacuna MDV RN1250 (X + 5) 250 ufp	287,2 ufp/0,2 ml (AMT)	5/34	85,3%	14,7%
2	H	Vacuna MDV RN1250 (X + 5) 500 ufp	578,4 ufp/0,2 ml (AMT)	4/34	88,2%	11,8%
3	C	Vacuna MDV RN1250 (X + 5) 750 ufp	736 ufp/0,2 ml (AMT)	2/34	94,1%	5,9%
4	A	Vacuna MDV RN1250 (X + 5) 1000 ufp	1084,8 ufp/0,2 ml (AMT)	3/35	91,4%	8,6%
5	D	Vacuna MDV RN1250 (X + 5) 1550 ufp	1392 ufp/0,2 ml	4/34	88,2%	11,8%
6	E	Controles vacunados de forma simulada/estimulación		31/34	N/A (8,8*)	91,2%
7	G	Controles negativos vacunados de forma simulada/estimulación simulada		0/35	N/A	0,0%

ES 2 663 610 T3

8	F	Título de liberación MDV HVT	1725 ufp/0,2 ml (AMT)	8/33	75,8%	24,2%
---	---	---------------------------------	--------------------------	------	-------	-------

LISTADO DE SECUENCIAS

[0099]

- 5 <110> Pritchard, Joyce
Mebatsion, Teshome
Bublôt, Michel
- 10 <120> Virus de la enfermedad de Marek modificado y vacunas fabricadas a partir
del mismo
- <130> MER 09-144
- 15 <150> US 61,614,142
<151> 2012-03-22
- <160> 2
- 20 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 585
<212> ADN
- 25 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Genbak S82226.1 Rpt que interviene en la cepa de MDV recombinante RM1
- 30 <400> 1
ttaacctctc tataggcggg ggtgtgggag ggagctccgg gggaatgtgg gagggagctc 60
cggggggaat agcgctggct cgctaactgc catattagct tctgtaatca tgcttgcttg 120
35 ccttagccgc cattgtactt gatataatttc gctgatataca tttctcggaa tcggcatcaa 180
gagcaggctc ataaaccata aaaggaaatg tttgttgaag gcaagcatca gaccacttgc 240
accatccaat cacgaacaaa cacgagatcg aactatcata ctgagccaat ggttgtaaag 300
40 ggcagatgct atcctccaat gagggaaaat gtcattgcaac atcctgtaag cggctatata 360
agccagggtgc atctcttgct cggggtcgcc gtcctacaca ttgttggtgac gtgcggccca 420
45 gattcgaatc tgtaataaaa gctttttctt ctatattctc agattggcag tgagaggaga 480
ttttgttcgt ggtgttggtt ggcctactgg gtggggtagg gatccggact gaatccgtag 540
tatttcggta caacaggggg gaagtccttc ttatattggc gagtg 585
- 50 <210> 2
<211> 533
<212> ADN
- 55 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Repetición terminal larga del virus Reticuloendotelial
- 60 <400> 2
tgtgggaggg agctccgggg gaatgtggga gggagctccg gggggaatag cgctggctcg 60

ES 2 663 610 T3

	ctaactgcc	tattagcttc	tgtaatcatg	cttgcttgcc	ttagccgcc	ttgtacttga	120
5	tatatttcgc	tgatatcatt	tctcggaatc	ggcatcaaga	gcaggctcat	aaaccataaa	180
	aggaaatgtt	tgttgaaggc	aagcatcaga	ccacttgcac	catccaatca	cgaacaaaca	240
	cgagatcgaa	ctatcatact	gagccaatgg	ttgtaaaggg	cagatgctat	cctccaatga	300
10	gggaaaatgt	catgcaacat	cctgtaagcg	gctatataag	ccaggtgcat	ctcttgctcg	360
	gggtcgccgt	cctacacatt	gttgtagcgt	gcggcccaga	ttcgaatctg	taataaaagc	420
	tttttcttct	atatcctcag	attggcagtg	agaggagatt	ttgttcgtgg	tgttggctgg	480
15	cctactgggt	ggggtaggga	tccggactga	atccgtagta	tttcggtaca	aca	533

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un virus de la enfermedad de Marek (MDV) recombinante transformado de manera estable con un constructo de ADN exógeno, que comprende una secuencia de repetición terminal larga (LTR) de un virus de la reticuloendoteliosis para usar en un procedimiento para provocar en un animal aviar una respuesta inmunitaria segura y protectora contra el virus de la enfermedad de Marek que comprende administrar dicha composición a dicho animal, provocando de este modo la respuesta inmunitaria protectora, en la que el MDV es un virus clonal, y no una población mixta de virus parental y recombinante, en la que el MDV es un MDV CVI988/X; además en la que la LTR es como se expone en la SEQ ID NO: 2, en la que la secuencia de LTR comprende un segmento de ADN escindido por Pac I de un MDV que tiene todas las características identificativas de la cepa depositada en la ATCC bajo el número de acceso PTA-4945 y en la que la secuencia de LTR está insertada 5' del gen de ICP4 de dicho MDV.
2. Composición para usar, según la reivindicación 1, en la que la composición comprende además un portador o diluyente veterinaria o farmacéuticamente aceptable.
3. Composición para usar, según la reivindicación 1 o 2, en la que el animal aviar es un pollo.
4. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el MDV recombinante está asociado a células.
5. Procedimiento de fabricación de un agente viral eficaz para proteger un ave contra la enfermedad de Marek que comprende transformar una cepa de MDV CVI988 con un constructo de ADN exógeno que comprende una secuencia de LTR de un virus de la reticuloendoteliosis; en el que la LTR es como se expone en la SEQ ID NO: 2, en el que la secuencia de LTR comprende un segmento de ADN escindido por Pac I de un MDV que tiene todas las características identificativas de la cepa depositada en la ATCC bajo el número de acceso PTA-4945 y en el que la secuencia de LTR está insertada 5' del gen de ICP4 de dicho MDV.
6. Virus de la enfermedad de Marek (MDV) transformada de manera estable con un constructo de ADN exógeno, que comprende una secuencia de repetición terminal larga (LTR) de un virus de la reticuloendoteliosis, en el que el MDV es CVI988/X, en el que además el MDV es un virus clonal, y no una población mixta de virus parental y recombinante; y además en el que la LTR es como se expone en la SEQ ID NO: 2, en el que la secuencia de LTR comprende un segmento de ADN escindido por Pac I de un MDV que tiene todas las características identificativas de la cepa depositada en la ATCC bajo el número de acceso PTA-4945 y en el que la secuencia de LTR está insertada 5' del gen de ICP4 de dicho MDV.
7. Composición inmunológica que comprende el MDV, según la reivindicación 6.
8. Célula aislada transformada de forma estable con el MDV, según la reivindicación 6.
9. Célula aislada, según la reivindicación 8, en la que la célula es una célula fibroblasto de embrión de pollo o pato (CEF, DEF).

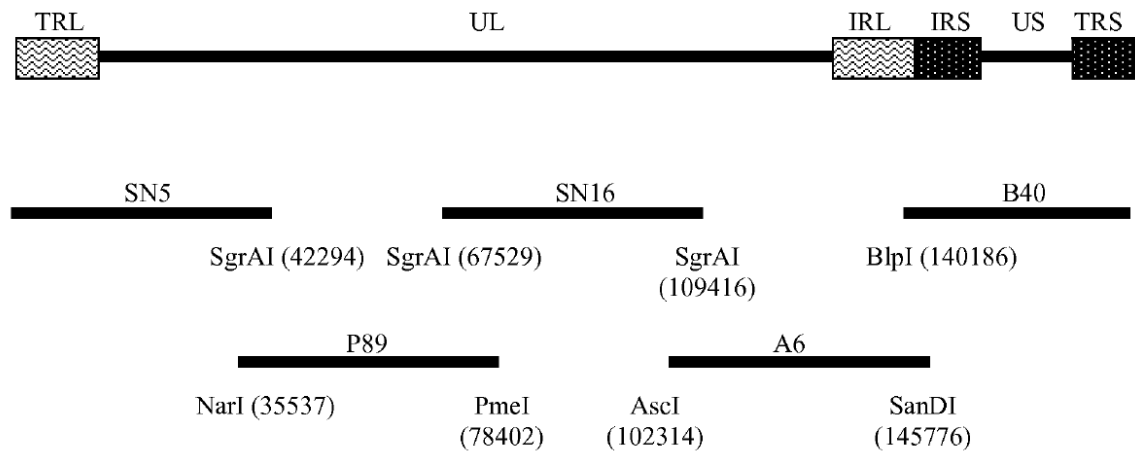


Figura 1

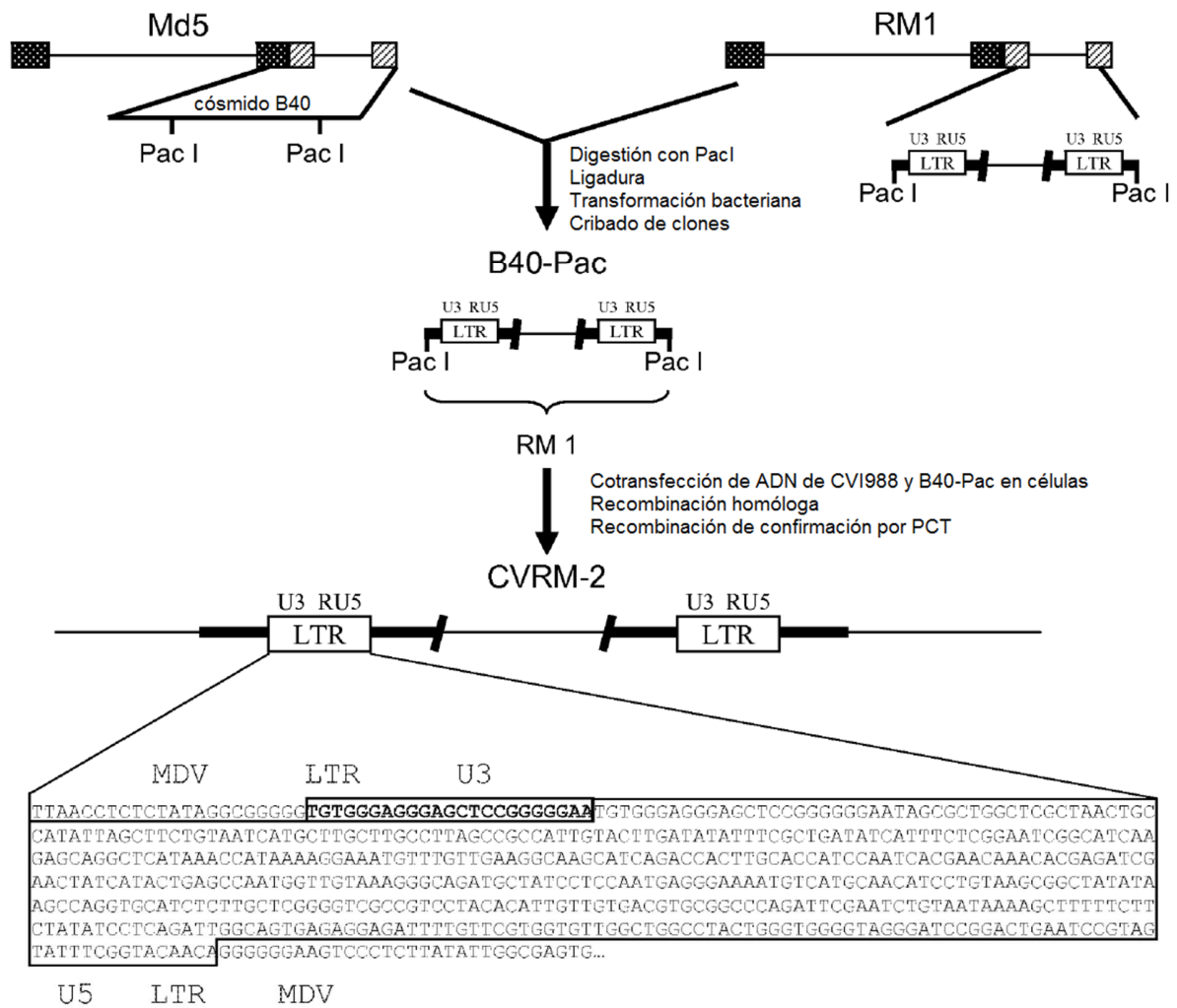


Figura 2

Nombre de cebador	Secuencia (5' → 3')	
1	gccctgtcgaagaggaaata	SEQ ID NO:3
2	tctcactgccaatctgagga	SEQ ID NO:4
3	cactgcacatccaatcac	SEQ ID NO:5
4	ctatttgcgcggaggaag	SEQ ID NO:6
7	cagccttcgaaatatatctca	SEQ ID NO:7
8	cccttatgaaagctggcctc	SEQ ID NO:8
RN1250Nco	gcgctgtccatggtaactgga	SEQ ID NO:9

Par de cebadores	RN1250 (2 LTR)	Rispens (0 LTR)
1 + 2	531	-
2 + 3	242	-
3 + 4	538	-
1 + 4	827	289
RN1250Nco + 7	3510	2977
RN1250Nco + 8	3762	3229

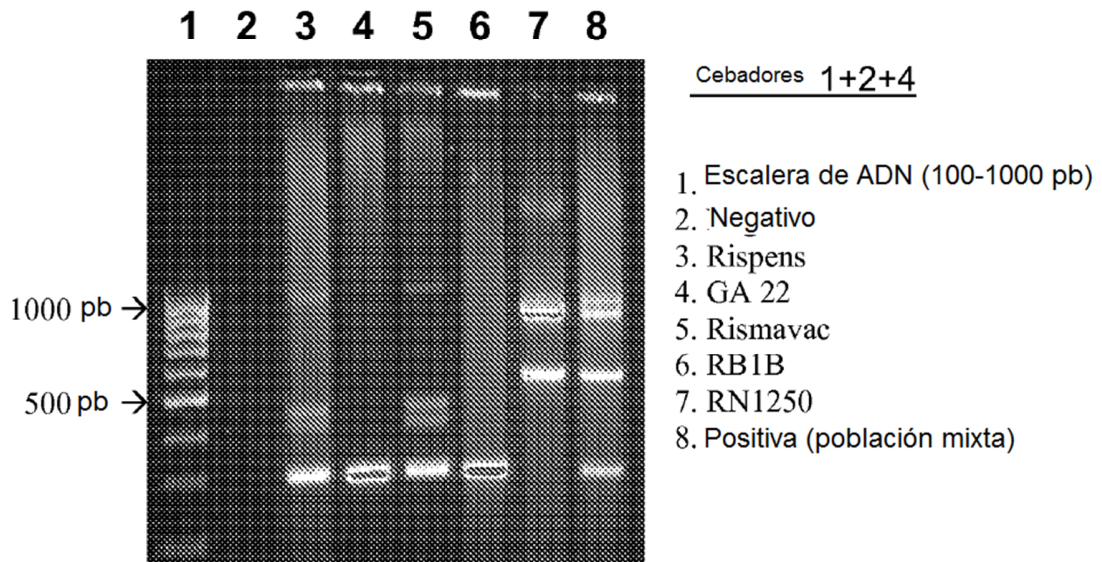


Figura 3

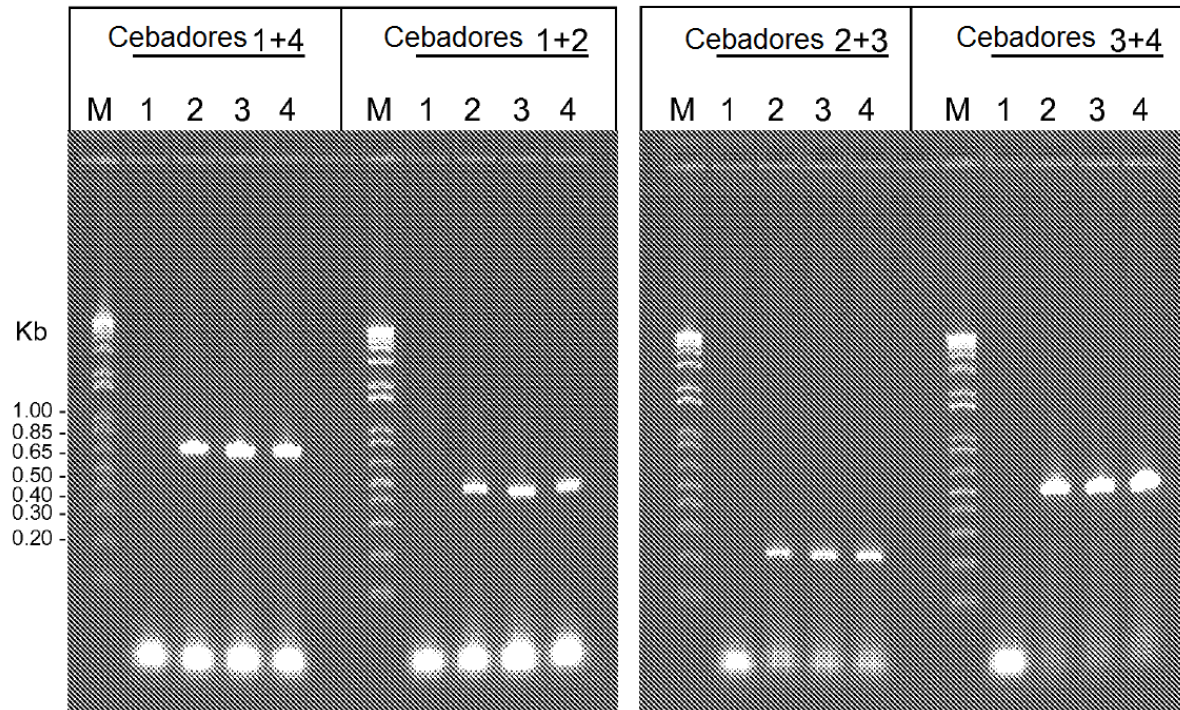


Figura 4