(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 700 243**

(51) Int. CI.:

A61K 39/295 (2006.01)
A61K 39/17 (2006.01)
A61K 39/255 (2006.01)
A61K 39/265 (2006.01)
C12N 15/869 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2012 PCT/EP2012/070728**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057236**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2012 E 12775246 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2768964**

(54) Título: **Construcciones del virus de la enfermedad de Marek recombinantes no patógenas que codifican antígenos del virus de la laringotraqueitis infecciosa y del virus de la enfermedad de Newcastle**

(30) Prioridad:

21.10.2011 US 201161549844 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

COOK, STEPHANIE;
MORSEY, MOHAMAD;
PETERSEN, GARY y
SONDERMEIJER, PAULUS JACOBUS ANTONIUS

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Construcciones del virus de la enfermedad de Marek recombinantes no patógenas que codifican antígenos del virus de la laringotraqueitis infecciosa y del virus de la enfermedad de Newcastle

Campo de la invención

La presente invención se refiere a construcciones novedosas recombinantes multivalentes del virus de la enfermedad de Marek no patógenas que codifican y expresan antígenos de la proteína del virus de la laringotraqueitis infecciosa y del virus de la enfermedad de Newcastle, y su uso en vacunas de aves de corral.

Antecedentes de la invención

Los virus patógenos de las aves de corral no solo debilitan a los pollos, sino que también son costosos para los criadores de pollos porque la mayoría de las enfermedades resultantes son contagiosas y la industria avícola depende en gran medida de las instalaciones de cría confinadas a gran escala. La vacunación de pollos jóvenes es a menudo el único medio viable para combatir estos virus. Aunque las vacunas virales de aves de corral atenuadas o inactivadas siguen siendo importantes en el mercado, en los últimos años se han gastado recursos significativos en el desarrollo de vacunas que contienen construcciones virales recombinantes que expresan antígenos de proteínas virales patógenas. Además, se han realizado esfuerzos sustanciales para construir vectores del virus de la enfermedad de Marek no patógenos recombinantes (rMD_{np}) multivalentes estables y eficaces que expresan genes extraños de múltiples patógenos virales. Dichas vacunas multivalentes servirían para minimizar el número de inyecciones administradas a los pollitos y, reducirían, de ese modo las molestias y el estrés en el pollito vacunado, así como reducir significativamente los costos de mano de obra y materiales. La vacunación con dichas construcciones multivalentes únicas también sería preferente a las vacunas multivalentes $rMDV_{np}$ alternativas que contienen múltiples construcciones recombinantes monovalentes $rMDV_{np}$, ya que estas vacunas alternativas, al menos hasta la fecha, han dado como resultado la protección contra solo un único patógeno viral. El fracaso de dichas vacunas alternativas es presumiblemente debido a una de las construcciones monovalentes $rMDV_{np}$ multiplicando las otras construcciones $rMDV_{np}$ monovalentes, evitando de este modo que estas otras construcciones $rMDV_{np}$ monovalentes induzcan una respuesta inmune significativa. En cualquier caso, a pesar de los esfuerzos sustanciales que se realizaron en el pasado para construir vectores $rMDV_{np}$ recombinantes multivalentes estables y eficaces que expresan genes extraños de múltiples patógenos virales hasta ahora, dichos esfuerzos han resultado insatisfactorios.

Una enfermedad del virus de las aves de corral que se puede controlar mediante la vacunación es la enfermedad de Marek. La enfermedad de Marek es una enfermedad patógena que afecta negativamente a los pollos en todo el mundo.

La enfermedad de Marek se produce predominantemente en pollos jóvenes entre los 2 y 5 meses de edad. Los signos clínicos incluyen: parálisis progresiva de una o más de las extremidades, falta de coordinación debido a la parálisis de las patas, caída de la extremidad debido a la participación del ala y una posición de la cabeza más baja debido a la participación de los músculos del cuello. En casos agudos, puede resultar la depresión severa. También se puede desarrollar atrofia bursal y tímica.

El agente etiológico para la enfermedad de Marek es el virus de la enfermedad de Marek serotipo 1 (MDV1), un virus asociado a las células que tiene un genoma de ADN de doble soporte. MDV1 es un herpesvirus alfa aviar linfotrópico que: (i) infecta a los linfocitos B, que pueden resultar en la citólisis, y (ii) infecta a los linfocitos T latentes, que pueden inducir linfoma de linfocitos T. Relacionado estrechamente con la cepa virulenta de MDV1, el virus de la enfermedad de Marek serotipo 2 (MDV2), anteriormente conocido como virus de herpes de Gallid 3, es una cepa de MDV atenuada de forma natural que ha demostrado tener poca o ninguna patogenicidad en pollos [Petherbridge *et al.,* J Métodos virológicos 158: 11-17 (2009)]. SB-1 es una cepa específica de MDV2 que ha demostrado ser útil en vacunas contra MDV1 [véase, por ejemplo, Murthy y Calnek, Infección e inmunidad 26 (2) 547-553 (1979)].

Otro herpesvirus alfa estrechamente relacionado, el virus de la enfermedad de Marek serotipo 3 (MDV3), más ampliamente conocido como herpesvirus de los pavos (HVT), es un virus no patógeno de los pavos domésticos [véase, por ejemplo, Kingham *et al.,* J. of General Virology 82: 1123- 1135 (2001)]. Dos cepas de HVT comúnmente usadas son la cepa PB1 y la cepa FC126. Considerando que, HVT también es no patógeno en pollos, induce una respuesta inmune protectora de larga duración en pollos contra MDV1. En consecuencia, el HVT se ha usado en vacunas de aves de corral contra el MDV1 virulento durante muchos años, generalmente en combinación con SB-1, que es más virémico que el HVT, pero se considera menos seguro. Como alternativa, cuando las aves son desafiadas con cepas de MDV1 particularmente virulentas, el HVT se puede combinar con la vacuna de Rispen. La vacuna de Rispen es un aislado que se originó a partir de una cepa de MDV1 levemente virulenta que posteriormente se debilitó aún más por el pasaje celular. La cepa de Rispen, sin embargo, conserva cierta virulencia hacia líneas de pollos altamente susceptibles.

La secuencia del genoma completo de HVT ha sido divulgada [Afonso *et al.,* J. Virology 75 (2): 971-978 (2001)], y como la mayoría de los herpesvirus alfa, HVT posee un número significativo de sitios potenciales de inserción no esenciales [véase por ejemplo, el documento US 5.187.087; el documento US 5.830.745; el documento US 5.834.305;

el documento US 5.853.733; el documento US 5.928.648; el documento US 5.961.982; el documento US 6.121.043; el documento US 6.299.882 B1]. También se ha demostrado que el HVT es susceptible de modificación genética y, por lo tanto, se ha usado como un vector recombinante durante muchos años [documento WO 87/04463]. En consecuencia, se ha informado que los vectores HVT recombinantes expresan genes extraños que codifican antígenos de, por ejemplo, el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), [Sondermeijer *et al., Vaccine,* 11: 349-358 (1993); Reddy *et al., Vaccine,* 14: 469-477 (1996)], el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV), [Darteil *et al., Virology,* 211: 481-490 (1995); Tsukamoto *et al,* J. of Virology 76 (11): 5637-5645 (2002)], y el virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV) [Johnson *et al., Avian Disease,* 54(4): 1251-1259 (2010); documento WO 92/03554; documento US 6.875.856]. También se conoce la secuencia genómica completa de MDV2 [véase, GenBank acc. n.º: AB049735.1, y Petherbridge *et al., supra*]. La organización genómica del MDV2 es muy similar a la de HVT, con la región US en particular, siendo idéntica a la de HVT [véase, Kingham *et al., supra*].

Además, se ha construido un virus quimérico recombinante, conocido como el novedoso herpesvirus aviar (NAHV), en el que las regiones específicas del genoma de HVT se reemplazaron por las regiones correspondientes del genoma de MDV1. El NAHV también se ha usado para expresar genes extraños que codifican antígenos de otros virus de aves de corral [documento US 5.965,138; documento US 6.913.751].

Al igual que el MDV, el virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV) es un herpesvirus alfa que afecta negativamente a los pollos en todo el mundo [Fuchs *et al.,* Veterinary Research 38: 261-279 (2007)]. ILTV causa enfermedad respiratoria aguda en pollos, que se caracteriza por depresión respiratoria, jadeo y expectoración de exudado con sangre. La replicación viral se limita a las células del tracto respiratorio, donde en la tráquea la infección da lugar a la erosión y hemorragia del tejido.

La enfermedad de Newcastle es otra enfermedad altamente contagiosa y debilitante de los pollos. El agente etiológico para la enfermedad de Newcastle es el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). NDV pertenece a la orden de los Mononegavirales y está en la familia de *Paramyxoviridae*. Los virus de la enfermedad de Newcastle tienen un genoma de ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado.

NDV se ha agrupado en tres patotipos distintos de acuerdo con su virulencia. La infección de las aves de corral por las cepas lentógenas no patógenas de NDV es esencialmente asintomática. En contraste directo, las cepas NDV mesogénicas (patógenas medias) y velogénicas (altamente patógenas) causan enfermedades exhaustivas que pueden ser fatales. La mayoría de los tipos de NDV infectan el sistema respiratorio y/o el sistema nervioso, y pueden provocar jadeo y tortícolis.

El virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV), también llamado virus de la enfermedad de Gumboro, es el agente causante de la enfermedad infecciosa de la bolsa. El IBDV causa una infección viral aguda y altamente contagiosa del tejido linfoide de un pollo, cuyo objetivo principal es el órgano inmunológico esencial del ave: la bolsa de Fabricio. La tasa de morbilidad en aves susceptibles es alta, con una rápida pérdida de peso y tasas de mortalidad de moderadas a altas. Los pollitos que se recuperan de la enfermedad pueden tener deficiencias inmunes debido a la destrucción de (o partes de) la bolsa de Fabricio. Esto los hace particularmente vulnerables a infecciones secundarias.

BDV es un miembro de la familia *Birnaviridae*. Los virus en esta familia tienen un genoma que consiste en dos segmentos (A y B) de ARN bicatenario. Existen dos serotipos de IBDV, el serotipo 1 y 2, que pueden diferenciarse mediante pruebas de neutralización de virus (NV). Se ha demostrado que los virus del serotipo 1 son patógenos para los pollos, mientras que los virus del serotipo 2 solo causan enfermedades subagudas en los pavos. Históricamente, los virus IBDV del serotipo 1 consistían en un solo tipo que ahora se conoce como virus IBD "clásico". Más recientemente, han surgido las llamadas cepas de IBDV "variante". Las cepas clásicas y variantes de IBDV se pueden identificar y distinguir mediante una prueba de neutralización de virus usando un estudio de panel de anticuerpos monoclonales, o por RT-PCR [Wu *et al.*, *Avian Diseases,* 51: 515-526 (2007)]. Las cepas IBDV clásicas bien conocidas incluyen, D78, Faragher 52/70 y STC, mientras que 89/03 es una cepa variante bien conocida. Muchas vacunas IBDV vivas o inactivadas están disponibles en el mercado, por ejemplo, una vacuna viva como NOBILIS^{R} Gumboro D78 (MSD Animal Health).

Como se ha indicado anteriormente, debido a que el HVT puede actuar como un antígeno que proporciona una protección significativa contra la enfermedad de Marek y como un vector recombinante, actualmente se usa como un vector de plataforma para vacunas multivalentes tales como Innovax®-ILT (comercializada por Merck Animal Health), que protege contra ILTV; e Innovax®-ND-SB (comercializada por Merck Animal Health) y Vectormune® HVT-NDV (comercializada por Ceva), que protegen contra el NDV. Sin embargo, notablemente, hasta ahora, ninguna vacuna multivalente que comprende un HVT recombinante que codifica antígenos de más de un patógeno ha demostrado ser estable y eficaz, incluso aunque dichas vacunas se habían sugerido hace más de quince años [véase, por ejemplo, el documento US 5.965.138]. De hecho, Innovax®-ILT contiene el único HVT recombinante que comprende dos genes extraños, es decir, ILTV gD e ILTV gI, que ha demostrado ser seguro, eficaz y estable. Sin embargo, estos dos genes extraños son del mismo patógeno y, además, se superponen de forma natural y deben expresarse conjuntamente con el fin de permitir una inmunización adecuada contra ILTV.

Los documentos US 5.965.138 y US 5.853.733 son miembros de la misma familia de patentes y describen

construcciones de vectores de MDV no patógenos que comprenden una o más inserciones heterólogas, que incluyen NDV-F e ILTV gI/gD. Las inserciones heterólogas también se insertan en diferentes regiones genómicas. Sin embargo, ninguna de estas patentes de EE. UU. poporciona datos sobre la estabilidad genética, ni demuestra una reducción real a la práctica como una vacuna eficaz. Además, muchas de las construcciones de vectores mencionadas nunca se hicieron realmente. Más importante aún, aunque estas patentes tienen una fecha de prioridad que es anterior a la presente invención por casi 20 años, hasta ahora, nadie pudo colocar genes de más de un patógeno extraño en el mismo vector de MDV y producir con éxito una construcción estable que proporcione protección contra más de uno de esos patógenos extraños.

El documento WO00/61736 describe esencialmente el mismo tema que el documento US 5.965.138 y el documento US 5.853.733, y también tiene las mismas desventajas de no poder proporcionar una divulgación habilitadora para vacunas seguras, estables y eficaces.

El documento US 6.033.670 describe el uso de ILTV como un vector recombinante para inserciones de genes heterólogos, pero no divulga los resultados sobre la estabilidad, la expresión y su uso en una vacuna eficaz. Además, ILTV es un virus de aves de corral completamente diferente al MDV.

En consecuencia, a pesar de las claras ventajas de las construcciones estables, multivalentes y recombinantes de MDV_{np} que pueden expresar eficazmente antígenos extraños de dos o más patógenos diferentes y los esfuerzos sustanciales para diseñarlos, hasta ahora, no se han recibido. Por lo tanto, existe una clara necesidad de superar el fallo colectivo de la industria, mediante la construcción de vectores de MDV_{np} novedosos, estables y recombinantes que se pueden usar en vacunas multivalentes como el único activo para proteger contra dos o más patógenos de virus de aves de corral no MDV1 diferentes.

La cita de cualquier referencia en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que dicha referencia está disponible como "técnica anterior" para la presente solicitud.

Sumario de la invención

En consecuencia, la presente invención proporciona un herpesvirus recombinante multivalente estable y eficaz de pavos (rHVT) para su uso como un vector para expresar la proteína gD y gI del virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV), así como la proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV F), tal como se define en las reivindicaciones.

El rHVT comprende un primer ácido nucleico insertado en un primer sitio no esencial en el genoma de rHVT y un segundo ácido nucleico insertado en un segundo sitio no esencial en el genoma de rHVT. El primer ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica ILTV gD y una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gI.

El segundo ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F de NDV. En realizaciones específicas de este tipo, el primer ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 16 y el segundo ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 15.

En determinadas realizaciones, el primer sitio no esencial del $rMDV_{np}$ es el sitio US2 y el segundo sitio no esencial del $rMDV_{np}$ es el sitio UL7/8. En el contexto de la invención, el $rMDV_{np}$ es un rHVT.

En otros aspectos de la divulgación, el primer sitio no esencial y el segundo sitio no esencial del $rMDV_{np}$ son los mismos. En realizaciones específicas de este tipo, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico se construyen realmente como parte de la misma molécula de ADN, que se inserta en un sitio no esencial del $rMDV_{np}$. Dicha molécula de ADN puede ser un casete de expresión que codifica una proteína gD del virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV), una proteína gI del virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV) y una proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). En realizaciones particulares de este tipo, la molécula de ADN comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17. En el contexto de la invención, el $rMDV_{np}$ es un rHVT.

En consecuencia, en realizaciones particulares, el primer sitio no esencial y el segundo sitio no esencial del $rMDV_{np}$ son el sitio US2. En otras realizaciones, el primer sitio no esencial y el segundo sitio no esencial del $rMDV_{np}$ son el sitio UL54.5. En el contexto de la invención, el $rMDV_{np}$ es un rHVT.

Las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína gD de ILTV, la proteína gI de ILTV y la proteína F de NDV pueden estar operativamente bajo el control de promotores exógenos, es decir, promotores que no se encuentran de forma natural en el MDV_{np}. En determinadas realizaciones, estas tres secuencias de nucleótidos están operativamente bajo el control de diferentes promotores, es decir, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gD de ILTV está operativamente bajo el control de un primer promotor, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gI de ILTV está operativamente bajo el control de un segundo promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F de NDV está operativamente bajo el control de un tercer promotor, siendo diferentes el primer promotor, el segundo promotor y el tercer promotor. En realizaciones particulares, el promotor de la secuencia de nucleótidos que codifica

la proteína gD de ILTV es el promotor ILVL gD endógeno. En determinadas realizaciones, el promotor de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gI de ILTV es el promotor ILTV gI endógeno. En realizaciones particulares de este tipo, el promotor de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gD de ILTV es el promotor ILTV gD endógeno y el promotor para la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gI de ILTV es el promotor ILTV gI endógeno.

En determinados aspectos de la divulgación, al menos uno de los promotores unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gD de ILTV, la proteína gI de ILTV o la proteína F de NDV es el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (hCMV IE). En realizaciones particulares de este tipo, el promotor de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F de NDV es el promotor hCMV IE. En aspectos específicos de la divulgación, al menos uno de los promotores unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gD de ILTV, la proteína gI de ILTV o la proteína F de NDV es el promotor gpX del virus de la pseudorabia (PRV). En aspectos relacionados de la divulgación, al menos uno de los promotores unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gD de ILTV, la proteína gI de ILTV o la proteína F de NDV es el promotor del gen de beta-actina de pollo. En realizaciones específicas, el promotor de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F de NDV es el promotor hCMV IE, el promotor de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gD de ILTV es el promotor ILTV gI endógeno y el promotor de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gI de ILTV es el promotor ILTV gI endógeno.

En determinados aspectos de la divulgación, un $rMDV_{np}$ de la presente invención que incluye inserciones de secuencias de nucleótidos que codifican la proteína gD de ILTV, la proteína gI de ILTV, y la proteína F de NDV también incluye una o más secuencias terminadoras de la transcripción exógenas. En aspectos específicos de este tipo, una secuencia terminadora de la transcripción está corriente abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F de NDV. En aspectos particulares de la divulgación, las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína gD de ILTV y la proteína gI de ILTV comparten una secuencia terminadora de la transcripción y la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F de NDV tiene otra.

En aspectos particulares de la divulgación, al menos una de las secuencias terminadoras de la transcripción comprende una secuencia de poliadenilación sintética. En aspectos relacionados, al menos una de las secuencias terminadoras de la transcripción comprende una secuencia de poliadenilación de la timidina quinasa del virus de herpes simplex (TK de HSV). En el contexto de la invención, el $rMDV_{np}$ es un rHVT.

También se describe un ácido nucleico recombinante que comprende en la dirección 5' a 3' en el siguiente orden (i) un promotor gD del virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV), (ii) una secuencia de codificación para la proteína gD de ILTV, (iii) un promotor ILTV gI, (iv) una secuencia de codificación para la proteína gI de ILTV, (v) un promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (hCMV IE), (vi) una secuencia de codificación para la proteína F de NDV, y (vii) una secuencia terminadora de la transcripción. En un ejemplo particular, el ácido nucleico recombinante comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17.

También se describe un $rMDV_{np}$ en el que un ácido nucleico recombinante de la presente invención se ha insertado en un sitio de inserción no esencial del $rMDV_{np}$. En determinados aspectos de este tipo, el $rMDV_{np}$ incluye una inserción en un sitio no esencial que comprende un ácido nucleico recombinante que comprende en la dirección 5' a 3' en el siguiente orden (i) un promotor gD del virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV), (ii) una secuencia de codificación para la proteína gD de ILTV, (iii) un promotor ILTV gI, (iv) una secuencia de codificación para la proteína gI de ILTV, (v) un promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (hCMV IE), (vi) una secuencia de codificación para la proteína F de NDV, y (vii) una secuencia terminadora de la transcripción. En aspectos específicos, también pueden incluirse secuencias de nucleótidos intermedias, tales como enlazadores, secuencias espaciadoras y/o secuencias de codificación extrañas, véase el Ejemplo 1 a continuación. En un ejemplo particular, el rHVT comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17 insertada en un sitio no esencial. En realizaciones particulares de estos tipos, el sitio no esencial es el sitio US2. En otras realizaciones de este tipo, el sitio no esencial es el sitio UL54.5. En aún otras realizaciones de este tipo, el sitio no esencial es el sitio UL7/8. En otros ejemplos más de este tipo, el sitio no esencial es el sitio US10.

Se describen métodos para fabricar un $rMDV_{np}$ de la presente divulgación. En determinados aspectos, se construye un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína gD de ILTV, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína gI de ILTV, y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F de NDV. El ácido nucleico heterólogo se inserta luego en un sitio no esencial de un $rMDV_{np}$ de la presente divulgación. En determinados aspectos, el ácido nucleico heterólogo es un casete de expresión. En ejemplos particulares de este tipo, el casete de expresión comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17. En otros ejemplos, se construye un primer ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína gD de ILTV y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína gI de ILTV; y se construye un segundo ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína F de NDV. El primer ácido nucleico heterólogo se inserta en un sitio US2 de un $rMDV_{np}$ y el segundo ácido nucleico heterólogo se inserta en un sitio alternativo no esencial del $rMDV_{np}$. En determinados aspectos, dichos ácidos nucleicos heterólogos son casetes de expresión. En ejemplos particulares de este tipo, el primer ácido nucleico heterólogo comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 16 y el segundo ácido nucleico comprende la secuencia de

nucleótidos de la SEQ ID NO: 15. En ejemplos específicos, el método de fabricación de un $rMDV_{np}$ es un método para fabricar un rHVT.

La presente divulgación proporciona además composiciones inmunogénicas y/o vacunas que comprenden cualquier $rMDV_{np}$ como se describe. En el contexto de la invención, el $rMDV_{np}$ es un rHVT. En ejemplos alternativos, el $rMDV_{np}$ es un rMDV2. Además, la presente divulgación describe métodos para ayudar en la protección de las aves de corral contra una enfermedad causada por ILTV y/o NDV y/o MDV1 mediante la administración de dicha vacuna y/o composición inmunogénica como se describe. En ejemplos específicos, dichos métodos ayudan en la protección de un pollo. Una vacuna de la presente invención como se define en las reivindicaciones puede administrarse por vía subcutánea o *in ovo.*

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona composiciones inmunógenas y/o vacunas estables, seguras y eficaces que comprenden un rHVT de la presente invención como se define en las reivindicaciones. La presente divulgación también describe composiciones inmunogénicas y/o vacunas que comprenden cualquier $rMDV_{np}$ de la divulgación que se combina adicionalmente con un antígeno adicional de NDV, ILTV y/o MDV para mejorar y expandir la inmunogenicidad proporcionada. Además, la presente divulgación también describe composiciones inmunogénicas y/o vacunas que comprenden cualquier $rMDV_{np}$ de la presente divulgación que se combina adicionalmente con un antígeno para un patógeno distinto de MDV, ILTV o NDV. En un ejemplo particular de este tipo, el antígeno es un antígeno del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa.(IBDV). En un ejemplo más particular, el antígeno del IBDV es un IBDV vivo moderado. En determinados ejemplos, el IBDV vivo moderado es una variante del IBDV. La presente divulgación también describe métodos para ayudar en la protección de las aves de corral contra una enfermedad causada por ILTV y/o NDV y/o MDV1 y/o IBDV mediante la administración de dicha vacuna y/o composición inmunogénica a las aves de corral (por ejemplo, pollos). En ejemplos particulares de este tipo, una vacuna de la presente divulgación se administra por vía subcutánea. En otros ejemplos, una vacuna de la presente divulgación se administra *in ovo.*

En determinadas realizaciones, las composiciones inmunogénicas y/o vacunas de la presente invención comprenden un rHVT que comprende como una inserción en su sitio US2 de un ácido nucleico recombinante que comprende 5' a 3': (i) un promotor gD del virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV); (ii) una secuencia de codificación para la proteína gD de ILTV; (iii) un promotor ILTV gI; (iv) una secuencia de codificación para la proteína gI de ILTV; (v) un promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (hCMV IE); así como una secuencia de codificación para la proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV F); y (vii) una secuencia terminadora de la transcripción. En realizaciones particulares de este tipo, las composiciones inmunogénicas y/o vacunas comprenden además un virus de la enfermedad de la bolsa infeccioso vivo moderado (IBDV). En determinadas realizaciones, el IBDV vivo moderado es una variante del IBDV. En realizaciones más particulares, el IBDV es 89/03. En realizaciones aún más particulares de este tipo, el ácido nucleico recombinante tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17.

La presente divulgación también describe composiciones inmunogénicas y/o vacunas que comprenden cualquier $rMDV_{np}$ de la presente divulgación combinado con un antígeno adicional de NDV, ILTV o NDV y un patógeno distinto de MDV, ILTV o NDV.

Estos y otros aspectos de la presente invención se comprenderán mejor en referencia a los dibujos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un dibujo esquemático del genoma HVT (FC126), que consiste en una región larga única (UL) y una región corta única (US), cada una indicada por líneas rectas y flanqueada por regiones repetidas, indicadas como recuadros. Debajo del esquema del genoma, hay una barra que indica la ubicación de los fragmentos de digestión de la enzima de restricción BamHI, en relación con la posición del genoma y la nomenclatura de letras asociada con cada fragmento. (Al fragmento más grande se le dio la letra "A", al siguiente más grande se le dio la letra "B", y así sucesivamente). Las posiciones de cada fragmento subgenómico clonado (y su designación) usadas para reconstruir HVT (FC126) o los virus rHVT/NDV/ILT se indican debajo del mapa de restricción de BamHI. El asterisco (*) indica la posición de los sitios de inserción: UL7/UL8 en 1196-05.1; UL54.5 en 1332-29.4; US2 en 1332-47.A2 o 1317-15.1-1.

La Figura 2 es un dibujo esquemático de seis HVT recombinantes diferentes, que representan los genes insertados en la estructura HVT y el sitio de su inserción. Innovax-LT es un rHVT que incluye un casete de expresión que codifica los genes ILTV gD e ILTV gI insertados en el sitio UL54.5 del rHVT. Innovax-ND es un rHVT que incluye un casete de expresión que codifica el gen de fusión de NDV insertado en el sitio US10 del rHVT. 1348-34C es un rHVT que incluye un casete de expresión que codifica los genes ILTV gD e ILTV gI insertados en el sitio UL54.5 del rHVT, y un casete de expresión que codifica el gen de fusión NDV insertado en el sitio US10 del rHVT. 1332-62E es un rHVT que incluye un casete de expresión que codifica los genes ILTV gD, ILTV gI y el NDV de fusión insertados en el sitio US2 del rHVT. 1317-46 es un rHVT que incluye un casete de expresión que codifica los genes ILTV gD e ILTV gI insertados en el sitio US2, y un casete de expresión que codifica el gen de fusión NDV insertado entre UL7 y UL8 (es decir, el sitio UL7/8) del rHVT. 1332-70B es un rHVT que incluye un casete de expresión que

codifica los genes ILTV gD, ILTV gI y el NDV de fusión insertados en el sitio UL54.5 del rHVT.

Descripción detallada de la invención

La presente invención supera el fracaso de la industria anterior para poder construir vectores $rMDV_{np}$ que contienen antígenos extraños y pueden proteger contra dos o más patógenos de virus de aves de corral proporcionando vectores MDV_{np} recombinantes únicos que codifican y expresan antígenos de ILTV y NDV, y que protegen contra la enfermedad de Marek, la enfermedad de Newcastle y el virus de la laringotraceitis infecciosa. En realizaciones particulares, un rHVT de la presente invención codifica y expresa antígenos extraños de ILTV y NDV solamente, y puede ayudar en la protección contra la enfermedad de Marek, la enfermedad de Newcastle y el virus de la laringotraceitis infecciosa.

Antes de la presente invención, ya se había construido un vector HVT que contenía un gen NDV insertado en la región US10. Se demostró que este vector HVT-NDV es estable y que expresa niveles suficientes del producto del gen NDV correspondiente, la proteína F de NDV, para proteger a los pollos vacunados contra un desafío con NDV virulento. Además, ya se había construido un vector HVT que contenía un par de genes ILTV insertados en la región UL54.5 de HVT. Se demostró que este vector HVT-ILTV es estable y que expresa niveles suficientes de los productos génicos de ILTV correspondientes, las proteínas gI y gD de ILTV, para proteger a los pollos vacunados contra un desafío con ILTV virulento.

En consecuencia, se diseñó una construcción HVT multivalente para proteger tanto contra NDV como ILTV basándose en las construcciones exitosas anteriores, *es decir,* insertando el gen NDV-F en el sitio US10 e insertando los genes ILTV gD y gI en el sitio UL54.5 [véase, 1348-34C en la Figura 2]. Inesperadamente, sin embargo, tras efecturar pases de esta construcción en cultivo de tejidos, el virus recombinante perdió su capacidad para expresar las proteínas ILTVgD, ILTVgI y NDV F. Esto demostró ser cierto con una serie de construcciones rHVT recombinantes duplicadas. De hecho, estos virus recombinantes eran inestables e inadecuados para su posterior desarrollo como vacunas. Estos hallazgos demuestran que el diseño de un único vector rHVT multivalente que puede expresar de manera estable tanto la proteína NDV F como las proteínas ILTVgD e ILTVgI no es un proceso simple que pueda extrapolarse de la información existente. De hecho, si dichos vectores rHVT multivalentes estables y eficaces fueran posibles en lo más mínimo, su diseño debía basarse en un conjunto impredecible de interacciones complejas que implicaban mínimamente la relación entre los sitios de inserción usados y los genes extraños a insertar. Hasta ahora, dicho diseño de construcciones de rHVT no era fácilmente predecible a partir de la técnica conocida.

Por lo tanto, la presente invención, proporciona vectores rHVT recombinantes en los que se han insertado dos genes de ILTV y un gen de NDV. En una realización particular de la presente invención, los tres genes se insertaron en la región US2 del genoma de HVT. Tras la vacunación de una gallina o un huevo de gallina con este rHVT, las células del huésped inmunizado expresaron las proteínas codificadas por los genes insertados. Además, las proteínas NDV e ILTV expresadas por el rHVT estimularon una respuesta inmune que protegió a los pollos vacunados contra la enfermedad causada por NDV e ILTV. En consecuencia, dichos vectores rHVT pueden usarse para proporcionar protección contra infecciones tanto por NDV como por ILTV. Anteriormente, se necesitaban dos vectores rHVT separados para protegerse contra estos dos virus, a saber, uno para la protección contra ILTV y el otro para la protección contra NDV.

Por lo tanto, la presente invención es ventajosa con respecto a los métodos actuales porque proporciona protección simultánea contra ILTV y NDV mediante la inoculación de aves de corral y/o huevos de aves de corral con un solo HVT recombinante. En particular, esto permite que se administren vacunas adicionales a través de la vía *in ovo*, porque hay un límite en cuanto a la cantidad de volumen que se puede inyectar en un huevo, y ahorra aún más en los costos de fabricación porque solo se necesita uno en lugar de dos vectores. Además, esto puede permitir que se incluya un antígeno adicional en la vacuna, como un IBDV vivo, por ejemplo, la cepa 89/03.

Con el fin de comprender más completamente la presente invención, se proporcionan las siguientes definiciones.
El uso de términos singulares por conveniencia en la descripción no pretende de ninguna manera ser tan limitante. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a una composición que comprende "un polipéptido" incluye una referencia a uno o más de dichos polipéptidos.
Como se usa en este documento, un "virus de la enfermedad de Marek no patógeno" o "MDV_{np}" o "npMDV" es un virus en la familia del MDV que muestra poca o ninguna patogenicidad en aves de corral. El término "MDV_{np}" incluye MDV de origen natural que han sido pasados o manipulados de otra manera similar, pero no incluye construcciones virales en las que una región específica del genoma de un serotipo de MDV se reemplaza por la región correspondiente de un serotipo de MDV diferente para formar un virus quimérico, tal como el novedoso herpesvirus aviar (NAHV). En el contexto de la presente invención, el MDV_{np} es un HVT. En otros ejemplos, el MDV_{np} es un MDV2. En ejemplos particulares de este tipo, el MDV2 es SB1.
Como se usa en el presente documento, un MDV_{np} que ha sido modificado genéticamente para codificar una secuencia de nucleótidos heteróloga (por ejemplo, un gen extraño) se define como un "MDV_{np}" recombinante" o "$rMDV_{np}$".
Como se usa en el presente documento, un "sitio no esencial" es un sitio en el genoma de MDV_{np} en el que una iserción de una secuencia de nucleótidos heteróloga en ese sitio no evita que el MDV_{np} se replique en un célula huésped. Los sitios no esenciales generalmente se identifican por el gen en el que residen, por ejemplo, el sitio US2, o una región entre dos genes, por ejemplo, el sitio UL7/8.

Como se usa en el presente documento, el término "aves de corral" puede incluir pollos, pavos, patos, gansos, codornices y faisanes.

Como se usa en el presente documento, una "vacuna" es una composición que es adecuada para la aplicación a un animal (incluidos, en determinados ejemplos, seres humanos, mientras que en otros ejemplos no son específicamente para seres humanos) que comprenden uno o más antígenos normalmente combinados con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un líquido que contenga agua, que al administrarse al animal induce una respuesta inmune lo suficientemente fuerte como para ayudar mínimamente en la protección contra una enfermedad clínica que surge de una infección con un microorganismo de tipo silvestre, *es decir,* lo suficientemente fuerte como para ayudar en la prevención de la enfermedad clínica, y/o prevención, mejora o curación de la enfermedad clínica.

Como se usa en el presente documento, una "vacuna multivalente" es una vacuna que comprende dos o más antígenos diferentes. En un ejemplo particular de este tipo, la vacuna multivalente estimula el sistema inmunológico del receptor contra dos o más agentes patógenos diferentes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ayudas en la protección" no requiere una protección completa contra cualquier indicación de infección. Por ejemplo, "ayudas en la protección" puede significar que la protección es suficiente para que, después del desafío, los síntomas de la infección subyacente se reduzcan al menos, y/o que una o más de las causas o mecanismos celulares, fisiológicas, o bioquímicas subyacentes que causan los síntomas se reduzcan y/o eliminen. Se entiende que "reducido", como se usa en este contexto, significa en relación con el estado de la infección, incluido el estado molecular de la infección, no solo el estado fisiológico de la infección.

Como se usa en el presente documento, un "adyuvante" es una sustancia que puede favorecer o amplificar la cascada de eventos inmunológicos, lo que lleva en última instancia a una mejor respuesta inmunológica, *es decir,* la respuesta corporal integrada a un antígeno. En general, no se requiere un adyuvante para que se produzca la respuesta inmunológica, pero favorece o amplifica esta respuesta.

Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se usa adjetivamente para significar que el nombre modificado es apropiado para su uso en un producto farmacéutico. Cuando se usa, por ejemplo, para describir un excipiente en una vacuna farmacéutica, caracteriza al excipiente como compatible con los otros ingredientes de la composición y no desventajosamente perjudicial para el receptor deseado.

Como se usa en el presente documento, "administración sistémica" es la administración en el sistema circulatorio del cuerpo (que comprende el sistema cardiovascular y linfático), afectando así al cuerpo en su totalidad en lugar de a un locus específico como el tracto gastrointestinal (por ejemplo, mediante la administración oral o rectal) y el sistema respiratorio (por ejemplo, mediante la administración intranasal). La administración sistémica se puede realizar, por ejemplo, mediante la administración en el tejido muscular (intramuscular), en la dermis (intradérmica o transdérmica), debajo de la piel (subcutánea), debajo de la mucosa (submucosa), en las venas (intravenosa), etc.

Como se usa en el presente documento, la expresión "administración parenteral" incluye inyecciones subcutáneas, inyecciones submucosas, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, inyecciones intradérmicas e infusión.

El término "aproximadamente" se usa indistintamente con el término "alrededor de" y significa que un valor está dentro del veinticinco por ciento del valor indicado, es decir, un péptido que contiene "aproximadamente" 100 restos de aminoácidos puede contener entre 75 y 125 restos de aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, el término, "polipéptido" se usa indistintamente con los términos "proteína" y "péptido" e indica un polímero que comprende dos o más aminoácidos conectados por enlaces peptídicos. El término "polipéptido" como se usa en el presente documento incluye un fragmento o segmento significativo, y abarca un tramo de restos de aminoácidos de al menos aproximadamente 8 aminoácidos, generalmente al menos aproximadamente 12 aminoácidos, normalmente al menos aproximadamente 16 aminoácidos, preferentemente al menos aproximadamente 20 aminoácidos, y, en aspectos particularmente preferentes, al menos aproximadamente 30 o más aminoácidos, por ejemplo, 35, 40, 45, 50, etc. Dichos fragmentos pueden tener extremos que comienzan y/o terminan en prácticamente todas las posiciones, por ejemplo, que comienzan en los restos 1, 2, 3, etc., y que terminan en, por ejemplo, 155, 154, 153, etc., en todas las combinaciones prácticas.

Opcionalmente, un polipéptido puede carecer de determinados restos de aminoácidos que están codificados por un gen o por un ARNm. Por ejemplo, un gen o una molécula de ARNm puede codificar una secuencia de restos de aminoácidos en el extremo N de un polipéptido (es decir, una secuencia de señal) que se escinde y, por lo tanto, puede no ser parte de la proteína final.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento antigénico" con respecto a una proteína particular (por ejemplo, un antígeno de proteína) es un fragmento de esa proteína (incluidos los fragmentos grandes que faltan de tan solo un único aminoácido de la proteína de longitud completa) que es antigénico, *es decir,* capaz de interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmunológico, como una inmunoglobulina (anticuerpo) o un receptor de antígeno de linfocitos T. Por ejemplo, un fragmento antigénico de una proteína de fusión NDV, es un fragmento de esa proteína de fusión que es antigénico. Preferentemente, un antigénico es inmunodominante para el reconocimiento de anticuerpos y/o receptores de linfocitos T.

Como se usa en el presente documento, una secuencia de aminoácidos es 100 % "homóloga" a una segunda secuencia de aminoácidos si las dos secuencias de aminoácidos son idénticas, y/o difieren solo en sustituciones neutras o conservativas como se define a continuación. En consecuencia, una secuencia de aminoácidos es aproximadamente un 80 % "homóloga" a una segunda secuencia de aminoácidos si aproximadamente el 80 % de las dos secuencias de aminoácidos son idénticas, y/o difieren solo en sustituciones neutras o conservativas.

Los restos de aminoácidos funcionalmente equivalentes a menudo pueden ser sustituidos por restos dentro de la secuencia que resulta en una sustitución de aminoácidos conservativa. Dichas alteraciones definen la expresión "una

sustitución conservativa" como se usa en el presente documento. Por ejemplo, uno o más restos de aminoácidos dentro de la secuencia pueden ser sustituidos por otro aminoácido de polaridad similar, que actúa como un equivalente funcional, lo que resulta en una alteración silenciosa. Las sustituciones de un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse de entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos que contienen estructuras de anillos aromáticos son fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. No se esperará que dichas alteraciones afecten el peso molecular aparente determinado por la electroforesis en gel de poliacrilamida o el punto isoeléctrico.
Las sustituciones conservativas particularmente preferentes son: Lys para Arg y viceversa, de manera que se puede mantener una carga positiva; Glu para Asp y viceversa de manera que se pueda mantener una carga negativa; Ser para Thr de manera que se pueda mantener un --OH libre; y Gln para Asn de manera que se pueda mantener un NH_2 libre. Los aminoácidos también se pueden colocar en lso siguientes grupos de similitud: (1) prolina, alanina, glicina, serina y treonina; (2) glutamina, asparagina, ácido glutámico y ácido aspártico; (3) histidina, lisina y arginina; (4) cisteína; (5) valina, leucina, isoleucina, metionina; y (6) fenilalanina, tirosina y triptófano.

En un aspecto relacionado, dos secuencias de ADN altamente homólogas pueden identificarse por su propia homología, o la homología de los aminoácidos que codifican. Dicha comparación de las secuencias se puede realizar usando el software convencional disponible en los bancos de datos de secuencia. En un ejemplo particular, dos secuencias de ADN altamente homólogas codifican secuencias de aminoácidos que tienen aproximadamente 80 % de identidad, más preferentemente aproximadamente 90 % de identidad e incluso más preferentemente aproximadamente 95 % de identidad. Más particularmente, dos secuencias de aminoácidos altamente homólogas tienen aproximadamente 80 % de identidad, incluso más preferentemente aproximadamente 90 % de identidad e incluso más preferentemente aproximadamente 95 % de identidad.

Como se usa en el presente documento, el porcentaje de identidad de secuencia de ADN y proteína se puede determinar usando un software como MacVector v9, disponible en el mercado en Accelrys (Burlington, Massachusetts) y el algoritmo Clustal W con los parámetros predeterminados de alineación y los parámetros predeterminados para la identidad. Véase, por ejemplo, Thompson, *et al.,* 1994. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680. ClustalW se puede descargar libremente para las plataformas Dos, Macintosh y Unix de, por ejemplo, EMBLI, el Instituto Europeo de Bioinformática. El enlace de descarga actual se encuentra en http://www.ebi.ac.uk/clustalw/. Estos y otros programas disponibles también se pueden usar para determinar la similitud de secuencia usando los mismos parámetros predeterminados o análogos.

Como se usa en el presente documento, los términos "polinucleótido", o un "ácido nucleico" o una "molécula de ácido nucleico" se usan indistintamente e indican una molécula que comprende nucleótidos que incluyen, pero sin limitación, ARN, ADNc, ADN genómico e incluso secuencias de ADN sintético. Los términos también se contemplan para abarcar moléculas de ácido nucleico que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN.

Una "secuencia codificante" de ácido nucleico o una "secuencia que codifica" una proteína o péptido particular, es una secuencia de nucleótidos que se transcribe y traduce a un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de elementos reguladores adecuados.

Los límites de la secuencia de codificación se determinan mediante un codón de inicio en el extremo 5' y un codón de parada de traducción en el extremo 3'. Una secuencia de codificación puede incluir, pero sin limitación, secuencias procarióticas, ADNc de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótico (por ejemplo, aviar) e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción se puede ubicar 3' de la secuencia de codificación.

"Conectado operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes descritos de este modo están configurados para realizar su función habitual. Por lo tanto, los elementos de control unidos operativamente a una secuencia de codificación son capaces de efectuar la expresión de la secuencia de codificación. Los elementos de control no necesitan ser contiguos con la secuencia de codificación, mientras funcionen para dirigir la expresión de los mismos. Por lo tanto, por ejemplo, puede haber secuencias sin traducir aún transcritas entre un promotor y la secuencia de codificación y el promotor todavía puede considerarse "unido operativamente" a la secuencia de codificación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia terminadora de la transcripción" se usa indistintamente con la expresión "elemento regulador de la poliadenilación" y es una secuencia que generalmente se encuentra corriente abajo de una región de codificación de ADN y que puede ser necesaria para la terminación completa de la transcripción de esa secuencia codificante de ADN.

Como se usa en el presente documento, un "casete de expresión" es un ácido nucleico recombinante que comprende mínimamente un promotor y una secuencia de codificación heteróloga unida operativamente a ese promotor. En muchos de estos ejemplos, el casete de expresión comprende además una secuencia terminadora de la transcripción.

En consecuencia, la inserción de un casete de expresión en un sitio no esencial del genoma de $rMDV_{np}$ puede conducir a la expresión de la secuencia de codificación heteróloga por el $rMDV_{np}$. En el contexto de la invención el $rMDV_{np}$ es un rHVT.

Una "secuencia de nucleótidos heteróloga" como se usa en el presente documento es una secuencia de nucleótidos que se añade a una secuencia de nucleótidos mediante métodos recombinantes para formar un ácido nucleico que no se forma naturalmente en la naturaleza. En ejemplos específicos, una "secuencia de nucleótidos heteróloga" puede codificar un antígeno de proteína tal como la proteína F de NDV, la proteína gl de ILTV o la proteína gD de ILTV. Las secuencias de nucleótidos heterólogas también pueden codificar proteínas de fusión (por ejemplo, quiméricas). Además, una secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar péptidos y/o proteínas que contienen propiedades reguladoras y/o estructurales. En otros ejemplos de este tipo, una secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar una proteína o péptido que funciona como un medio para detectar la proteína o péptido codificado por la secuencia de nucleótidos después de que se expresa el ácido nucleico recombinante. En aún otro aspecto, la secuencia de nucleótidos heteróloga puede funcionar como un medio para detectar una secuencia de nucleótidos. Una secuencia de nucleótidos heteróloga puede comprender secuencias no codificantes que incluyen sitios de restricción, sitios reguladores, promotores y similares.

La inserción de un ácido nucleico que codifica un antígeno en un vector $rMDV_{np}$ se logra fácilmente cuando los extremos tanto del ácido nucleico como del vector comprenden sitios de restricción compatibles. Si esto no se puede hacer, puede ser necesario modificar los extremos de la secuencia de nucleótidos y/o el vector mediante la digestión de los salientes de ácido nucleico monocatenario (por ejemplo, salientes de ADN) generados por la escisión de endonucleasas de restricción para producir extremos romos, o para lograr el mismo resultado rellenando los extremos monocatenarios con una polimerasa adecuada. Como alternativa, se pueden producir los sitios deseados, por ejemplo, mediante la ligadura de secuencias de nucleótidos (enlazadores) en los extremos. Dichos enlazadores pueden comprender secuencias de oligonucleótidos específicas que definen los sitios de restricción deseados. Los sitios de restricción también se pueden generar mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). [Véase, por ejemplo, Saiki *et al.,* Science 239: 487-491 (1988)]. El vector escindido y los fragmentos de ADN también pueden modificarse, si es necesario, mediante la eliminación de la colas homopoliméricas.

Antígenos de proteínas y ácidos nucleicos que codifican los antígenos de proteínas

El gen ILTV gD parece codificar una glicoproteína de 434 aminoácidos de longitud que tiene un peso molecular de 48.477 daltons, aunque otros han sugerido que un codón de inicio corriente abajo, que conduce a una proteína ILTV gD que comprende solo 377 restos de aminoácidos, es el verdadero codón de inicio [Wild *et al.,* Virus Genes 12: 104-116 (1996)]. El gen ILTV gl codifica una glicoproteína de 362 aminoácidos de longitud que tiene un peso molecular de 39.753 daltons [documento US 6.875.856]. Los ácidos nucleicos que codifican variantes naturales y/o procedentes de laboratorio de la ILTV gD e ILTV gl pueden sustituirse por los ejemplificados actualmente.

En realizaciones particulares de la presente invención, un rHVT comprende un ácido nucleico recombinante (por ejemplo, un casete de expresión) que codifica una proteína ILTV gD que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento antigénico de la misma. En realizaciones relacionadas, el rHVT comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína ILTV gD que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene más del 90 % y/o más del 95 % y/o más del 98 % y/o más del 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En realizaciones particulares, la proteína ILTV gD está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.

En determinadas realizaciones de la presente invención, un rHVT comprende un ácido nucleico recombinante (por ejemplo, un casete de expresión) que codifica una proteína ILTV gl que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o un fragmento antigénico de la misma. En realizaciones relacionadas, el rHVT comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína ILTV gl que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene más del 90 % y/o más del 95 % y/o más del 98 % y/o más del 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. En realizaciones particulares, la proteína ILTV gl está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3.

El gen de la proteína NDV F codifica la llamada proteína de "fusión". Un gen de la proteína NDV F ejemplificado por la presente invención se obtuvo de NDV Clone 30, una cepa de vacuna lentogénica de NDV común. Los ácidos nucleicos que codifican variantes naturales y/o procedentes de laboratorio del gen de la proteína F serían igualmente aplicables, ya sea para el NDV lentogénico, mesogénico o velogénico, ya que la propia secuencia del gen de la proteína F está altamente conservada en estos diferentes patotipos del NDV. En realizaciones particulares de la presente invención, un rHVT comprende un ácido nucleico recombinante (por ejemplo, un casete de expresión) que codifica una proteína de fusión NDV que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o un fragmento antigénico de la misma. En realizaciones relacionadas, el rHVT comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína NDF F que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene más del 90 % y/o más del 95 % y/o más del 98 % y/o más del 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. En realizaciones específicas, la proteína de fusión NDV está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5. En determinadas realizaciones de la presente invención, un rHVT comprende un ácido nucleico recombinante (por ejemplo, un casete de expresión) que codifica una proteína de fusión NDV que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

NO: 8 o un fragmento antigénico de la misma. En realizaciones relacionadas, un rHVT comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína NDF F que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene más del 90 % y/o más del 95 % y/o más del 98 % y/o más del 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. En realizaciones particulares, la proteína de fusión NDV está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

Promotores y elementos reguladores de la poliadenilación

Se pueden usar muchos promotores alternativos para dirigir la expresión de un gen heterólogo que codifica un antígeno de proteína o un fragmento antigénico del mismo en un $rMDV_{np}$ de la presente divulgación. Ejemplos incluyen el promotor gpx del virus de la pseudorabia (PRV) [véase, el documento WO 87/04463], el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous, el promotor del gen temprano de SV40, el promotor gD ILTV, el promotor gl ILTV [véase, por ejemplo, el documento US 6.183.753 B1], el promotor del gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (hCMV IE1) [documento US 5.830.745; documento US 5.980.906] y el promotor del gen de la beta-actina del pollo [patente EP 1 298 139 B1]. Ejemplos más específicos, como se ejemplifica en el presente documento, incluyen el promotor hCMV IE de la cepa Towne que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 12, un promotor hCMV IE truncado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11, un promotor ILTV gD que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9, y un promotor ILTV gl que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10.

La inclusión de un elemento regulador de poliadenilación corriente abajo de una región de codificación de ADN se requiere a menudo para terminar la transcripción de la secuencia de ADN de codificación. En consecuencia, muchos genes comprenden un elemento regulador de la poliadenilación en el extremo corriente abajo de su secuencia de codificación. Muchos de dichos elementos reguladores se han identificado y se pueden usar en un $rMDV_{np}$ de la presente divulgación. Ejemplos específicos de elementos reguladores de poliadenilación como se ejemplifican en el presente documento, incluyen una señal de poliadenilación sintética que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 13, y la señal de poliadenilación de HSV timidina quinasa que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 14.

Vacunas y composiciones inmunogénicas

La presente divulgación se refiere al uso del MDV_{np} recombinante, las moléculas de ácido nucleico usadas para construir el MDV_{np}, o las células huésped para cultivarlos o cualquier combinación de las mismas, todas de acuerdo con la presente divulgación para la fabricación de una vacuna para aves de corral. En consecuencia, la presente invención proporciona vacunas y/o composiciones inmunogénicas que incluyen un rHVT recombinante multivalente como se define en las reivindicaciones. Dichas vacunas pueden usarse para ayudar en la prevención y/o prevenir la enfermedad de Newcastle y/o la enfermedad de Marek y/o enfermedades asociadas con infecciones por ILTV. Una vacuna de acuerdo con la presente invención puede usarse para tratamiento profiláctico y/o terapéutico, y por lo tanto puede interferir con el establecimiento y/o con la progresión de una infección y/o sus síntomas clínicos de enfermedad.

Un MDV_{np} recombinante de la presente divulgación se puede cultivar por cualquier número de medios actualmente practicados en el campo. Por ejemplo, un MDV_{np} recombinante de la presente divulgación se puede cultivar mediante el uso de cultivos *in vitro* de células de pollo primarias, *véase, por ejemplo,* los ejemplos a continuación en los que se usaron células de fibroblastos de embrión de pollo (CEF). Los CEF se pueden preparar mediante tripsinización de embriones de pollo. Los CEF también pueden colocarse en monocapas y luego infectarse con el MDV_{np}. Este proceso en particular se puede aumentar a escala fácilmente a la producción de tamaño industrial.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método para la preparación de la vacuna de acuerdo con la divulgación que comprende las etapas de infectar células huésped con un MDV_{np} recombinante de la presente divulgación, recoger las células huésped infectadas y luego mezclar las células huésped infectadas recolectadas con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los métodos adecuados para la infección, el cultivo y la recolección son bien conocidos en la técnica y se describen y ejemplifican en el presente documento.
Normalmente, las células huésped infectadas se recolectan mientras están todavía intactas para obtener el MDV_{np} recombinante en su forma asociada a la célula. Estas células se pueden tomar en una composición portadora adecuada para proporcionar estabilización para el almacenamiento y la congelación. Las células infectadas pueden llenarse en ampollas de vidrio, que se sellan, se congelan y se almacenan en nitrógeno líquido. En consecuencia, en determinados ejemplos de la presente divulgación, las vacunas y/o las composiciones inmunogénicas se almacenan congeladas y, en consecuencia, comprenden un criopreservante, tal como dimetilsulfóxido (DMSO), para preservar las células infectadas congeladas.

Como alternativa, cuando el MDV_{np} recombinante es un HVT recombinante, se puede aislar de su célula huésped, por ejemplo, a través del tratamiento con ultrasonidos al final del cultivo, y luego se recoge en un estabilizador, y se seca por congelación (liofiliza) para un almacenamiento estable o se reduce de otra manera el volumen de líquido, para el almacenamiento, y luego se reconstituye en un diluyente líquido antes o en el momento de la administración. Dicha

reconstitución se puede lograr usando, por ejemplo, agua de grado de vacuna. En determinadas realizaciones, una parte liofilizada de una vacuna multivalente puede comprender uno o más antígenos y el diluyente puede comprender uno o más antígenos diferentes.

En ejemplos particulares, una vacuna de la presente invención (o una porción de la misma) puede estar en forma liofilizada, por ejemplo, como comprimidos y/o esferas que se producen mediante un método descrito en el documento WO 2010/125084. En particular, se hace referencia a los ejemplos, de la página 15, línea 28 a la página 27, línea 9 del documento WO 2010/125084, que describen un método para producir dichos comprimidos/esferas de desintegración rápida. Dichas formas liofilizadas se pueden disolver fácilmente en un diluyente, para permitir la administración sistémica de la vacuna.

Las vacunas y las composiciones inmunogénicas pueden, pero no necesariamente incluyen, tampones fisiológicamente compatibles y solución salina y similares, así como adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Los adyuvantes pueden ser útiles para mejorar la respuesta inmune y/o aumentar la estabilidad de las preparaciones de vacunas. Los adyuvantes se describen normalmente como estimuladores no específicos del sistema inmunológico, pero también pueden ser útiles para dirigirse a brazos específicos del sistema inmunitario. Uno o más compuestos que tienen esta actividad pueden añadirse a la vacuna. Por lo tanto, las vacunas particulares de la presente invención pueden comprender además un adyuvante. Ejemplos de compuestos químicos que pueden usarse como adyuvantes incluyen, peros in limitación, compuestos de aluminio (por ejemplo,hidróxido de aluminio), aceites metabolizables y no metabolizables, aceites minerales que incluyen derivados de oleato de manida en solución de aceite mineral (por ejemplo, MONTANIDE ISA 70 de Seppic SA, Francia) y aceites minerales ligeros como DRAKEOL 6VR, polímeros de bloque, ISCOM (complejos inmunoestimulantes), vitaminas y minerales (incluidos, pero sin limitación: vitamina E, vitamina A, selenio y vitamina B12) y CARBOPOL®.

Otros adyuvantes adecuados, que a veces se han denominado estimulantes inmunológicos, incluyen, pero sin limitación: citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas, sobrenadantes de cultivos celulares de linfocitos, monocitos, células de órganos linfoides, preparaciones celulares y/o extractos de plantas, bacterias o parásitos (preparaciones de *Staphylococcus aureus* o lipopolisacáridos) o mitógenos. En general, un adyuvante se administra al mismo tiempo que un rHVT de la presente invención. Sin embargo, los adyuvantes pueden administrarse también o como alternativa dentro de un período de dos semanas antes de la vacunación, y/o durante un período de tiempo después de la vacunación, *es decir,* mientras que el antígeno, por ejemplo, un MDV_{np} recombinante persista en los tejidos.
Las vacunas y/o composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier vía como *in ovo*, mediante administración parenteral, incluyendo inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intradérmica, por escarificación, mediante administración oral o mediante cualquier combinación de las mismas.
Además, el MDV_{np} recombinante multivalente de la presente divulgación se puede usar y/o combinar con antígenos de NDV, ILTV y/o MDV adicionales para mejorar y expandir la inmunogenicidad proporcionada, y/o antígenos para otros patógenos con el fin de proporcionar protección inmunitaria contra otros patógenos. Estos antígenos adicionales pueden ser microorganismos completos vivos o muertos, otros vectores recombinantes, homogenados celulares, extractos, proteínas o cualquier otro derivado similar, siempre que no interfieran negativamente con la seguridad, la estabilidad y la eficacia de la vacuna de acuerdo con la presente invención.
La combinación de un MDV_{np} recombinante multivalente de la presente invención con un antígeno adicional de MDV, NDV y/o ILTV puede ser ventajoso en aquellos casos en los que prevalecen cepas de campo muy virulentas de MDV, NDV o ILTV, por ejemplo, en una región geográfica particular. En este sentido, la combinación de un MDV_{np} recombinante multivalente de la presente invención con un MDV1, MDV2 o HTV incluye la cepa Rispens (MDV1), la cepa SB1 (MDV2), la cepa FC-126 (HTV) y/o la cepa PB1 (HTV). Para mejorar la respuesta contra el NDV, el MDV_{np} recombinante multivalente puede combinarse con una cepa de vacuna NDV, como la cepa C2 de la vacuna del NDV vivo moderado.
Ejemplos de otros microorganismos que pueden usarse como antígenos junto con el MDV_{np} recombinante multivalente de la presente invención incluyen: (i) virus tales como el virus de la bronquitis infecciosa, adenovirus, el virus del síndrome de la caída del huevo, el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, el virus de la anemia de pollo, el virus de la encefalomielitis aviar, el virus de la viruela aviar, el virus de la rinotraqueitis del pavo, el virus de la peste del pato (enteritis viral del pato), el virus de la viruela de la paloma, el virus de la leucosis aviar, el neumovirus aviar y el reovirus, (ii) bacterias, como *Escherichia coli, Salmonella spec., Ornitobacterium rhinotracheale, Haemophilis paragallinarum, Pasteurella multocida, Erysipelothrix rhusiopathiae, Erysipelas spec., Mycoplasma spec. y Clostridium spec.,* (iii) parásitos como *Eimeria spec.*, y (iv) hongos, como *Aspergillus* spec. En ejemplos particulares de la presente divulgación, se puede combinar un MDV_{np} recombinante de la presente divulgación con una cepa de la vacuna del IBDV vivo moderado tal como D78 (cepa intermedia clonada), PBG98, Cu-1, ST-12 (una cepa intermedia), o 89-03 (una cepa de la variante de Delaware viva) en una vacuna multivalente. Muchas de estas cepas se usan en vacunas comerciales.
La vacuna de combinación se puede hacer de varias formas, incluida la combinación del MDV_{np} recombinante de la presente divulgación con preparaciones de virus, o bacterias, u hongos, o parásitos, o células huésped, o una mezcla de cualquiera y/o todas estas. En ejemplos particulares, los componentes para dicha vacuna combinada se producen oportunamente por separado y luego se combinan y rellenan en el mismo recipiente de vacuna.
Como se ha descrito anteriormente, una vacuna de acuerdo con la invención se puede usar ventajosamente para proporcionar protección inmune segura y efectiva en aves de corral a una enfermedad múltiple, mediante una sola

inoculación a muy temprana edad o *in ovo.* Como alternativa, como resultará evidente para cualquier experto en la técnica de las vacunas de aves de corral, las combinaciones descritas anteriormente también podrían incluir programas de vacunación en los que el MDV_{np} recombinante multivalente de la presente divulgación y el antígeno adicional no se apliquen simultáneamente; *por ejemplo,* el MDV_{np} recombinante puede aplicare *in ovo,* y la NDVC2 y/o la cepa de IBDV (por ejemplo, 89/03) podrían aplicarse en una fecha/hora posterior.

En consecuencia, las vacunas de la presente invención pueden administrarse al sujeto aviar en una dosis única o en dosis múltiples. Por ejemplo, una vacuna de la presente invención se puede aplicar el día de la eclosión y/o *in ovo* en el día 16-18 (día de embrión) DE. Cuando se administran dosis múltiples, pueden administrarse al mismo tiempo o secuencialmente, de una manera y tiempo compatibles con la formulación de la vacuna, y en una cantidad que sea inmunológicamente efectiva. Por lo tanto, una vacuna de la presente invención puede servir eficazmente como una vacuna de sensibilización, que luego puede seguirse y amplificarse mediante una vacuna de refuerzo de la vacuna idéntica, o con una preparación de vacuna diferente, por ejemplo, una vacuna de virus completo clásica adyuvada e inactivada.

El volumen por dosis de una vacuna de la presente invención se puede optimizar de acuerdo con la vía de aplicación prevista: la inoculación *in ovo* se aplica comúnmente con un volumen entre 0,05 y 0,5 ml/huevo, y la inyección parenteral se realiza comúnmente con un volumen entre 0,1 y 1 ml/aviar. En cualquier caso, la optimización del volumen de dosis de la vacuna está dentro de las capacidades del experto en la técnica.

Tabla de secuencia

SEQ ID NO:	Descripción	Tipo
1	Glicoproteína ILTV gD	ácido nucleico
2	Glicoproteína ILTV gD	aminoácido
3	Glicoproteína ILTV gI	ácido nucleico
4	Glicoproteína ILTV gI	aminoácido
5	Proteína NDV F (Clone 30)	ácido nucleico
6	Proteína NDV F (Clone 30)	aminoácido
7	Proteína NDV F (B1 Hitchner)	ácido nucleico
8	Proteína NDV F (B1 Hitchner)	aminoácido
9	Promotor ILTV gD	ácido nucleico
10	Promotor ILTV gI	ácido nucleico
11	Promotor hCMV IE (truncado)	ácido nucleico
12	Promotor hCMV IE (cepa Towne)	ácido nucleico
13	Señal de poliadenilación sintética	ácido nucleico
14	Señal de poliadenilación HSV TK	ácido nucleico
15	Inserción IE-NDV F	ácido nucleico
16	Inserción ILTV	ácido nucleico
17	Inserción ILTV/IE-NDV	ácido nucleico

La presente invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que se proporcionan como ejemplos ilustrativos de la presente invención. Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar de manera más completa las realizaciones de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE VIRUS RECOMBINANTES HTV/NDV/ILTV

La capacidad de generar herpesvirus por cotransfección de fragmentos subgenómicos superpuestos clonados se demostró por primera vez para el virus de la pseudorabia [van Zijl *et al.*, J. Virology 62: 2191-2195 (1988)]. Este procedimiento se empleó posteriormente para construir vectores HVT recombinantes [véase, el documento U.S. 5.853.733, con respecto a la metodología divulgada sobre la construcción de vectores HVT recombinantes] y se usó para construir los vectores HVT/NDV/ILTV recombinantes de la presente invención. En este método, todo el genoma de HVT se clona en vectores bacterianos como varios fragmentos subgenómicos grandes superpuestos construidos utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales[Maniatis *et al.,* (1982) *Molecular Cloning,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1982); y Sambrook *et al., Molecular Cloning,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989)]. Se obtuvo una biblioteca de cósmidos de la cepa FC126 de HVT a partir de ADN viral cizallado en el vector cósmido, pWE15 (Stratagene, ahora Agilent Technologies de Santa Clara, CA). Además, se aislaron varios fragmentos grandes de ADN genómico mediante digestión de restricción con la enzima, BamHI , y se clonaron en pWE15 o en el vector plásmido pSP64 (Promega, Madison WI).

Como se describe en el documento US 5.853.733, la cotransfección de estos fragmentos en células de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) da como resultado la regeneración del genoma de HVT mediada por recombinación homóloga a través de las regiones superpuestas de los fragmentos. Si una inserción se obtiene por ingeniería directamente en uno o más de los fragmentos subgenómicos antes de la cotransfección, este procedimiento da como resultado una alta frecuencia de virus que contienen la inserción. Se requieren cinco clones subgenómicos superpuestos para generar FC126 HTV, y sirvieron como base para crear todos los virus recombinantes HVT/NDV/ILTV.

Construcción de HVT/NDV/ILTV 1332-62.E1: La regeneración de cósmidos para HVT/NDV/ILTV 1332-62.E1 se realizó esencialmente como se describe en el documento US 5.853.733 [por ejemplo, la Figura 8 del documento US 5.853.733; redibujado, al menos en parte, en la Figura 1, en el presente documento]. Para permitir integraciones en la región US del genoma FC126 HVT, la región cubierta por el cósmido n.º 378-50 en el documento US 5.853.733, ahora se proporcionó a partir de tres plásmidos más pequeños: pSY640 y 556-60.6, y un plásmido de transferencia (1332-47.A2), superpuesto a estos dos, y que contienen los casetes de expresión ILTV/NDV en el locus del gen US2.

El conjunto de siete construcciones linealizadas: 3 cósmidos y 4 plásmidos se transfectan todos juntos en CEF, usando un protocolo de transfección de $CaCl_2$ convencional y la reserva de virus resultante se purificó en placa una vez.

Construcción de HVT/NDV/ILTV 1332-70.B1: La regeneración de cósmidos para HVT/NDV/ILTV 1332-70.B1 se realizó esencialmente como se describe en el documento US 5.853.733 [por ejemplo, la Figura 8 del documento US 5.853.733; redibujado, al menos en parte, en la Figura 1, en el presente documento]. Para permitir integraciones en la región Ul54.5 del genoma FC126 HVT, la región cubierta por el cósmido n.º 407-32.1C1 en el documento US 5.853.733, ahora se proporcionó a partir de tres plásmidos más pequeños: 672-01.A40 y 672-07.C40, y un plásmido de transferencia (1332-29.4), superpuesto a estos dos, y que contienen los casetes de expresión ILTV/NDV en el locus del gen UL54.5.

El conjunto de siete construcciones linealizadas: 4 cósmidos y 3 plásmidos se transfectan todos juntos en CEF, usando un protocolo de transfección de $CaCl_2$ convencional y la reserva de virus resultante se purificó en placa una vez.

Construcción de HVT/NDV/ILTV 1317-46.A1-1: La regeneración de cósmidos para HVT/NDV/ILTV 1317-46.A1-1 se realizó esencialmente como se describe en el documento US 5.853.733 [por ejemplo, la Figura 8 del documento US 5.853.733; redibujado, al menos en parte, en la Figura 1, en el presente documento]. Para permitir integraciones en la región US del genoma FC126 HVT, la región cubierta por el cósmido n.º 378-50 en el documento US 5.853.733, ahora se proporcionó a partir de tres plásmidos más pequeños: pSY640 y 556-60.6, y un plásmido de transferencia (1317-15.1-1), superpuesto a estos dos, y que contienen los casetes de expresión ILTV insertados en el locus del gen US2. La inserción en un segundo sitio dentro del genoma de FC126 HVT se realizó reemplazando la región UL cósmida n.º 407-32.2C3 en el documento US 5.853.733 con el cósmido de transferencia (1196-05.1), que contiene el casete de expresión NDV insertado entre los genes HVT UL7 y UL8.

El conjunto de siete construcciones: 1 cósmido sin cortar (1196-05.1), los 2 cósmidos linealizados restantes y 4 plásmidos linealizados se transfectaron todos juntos en CEF, usando un protocolo de transfección de $CaCl_2$ convencional y la reserva de virus resultante se purificó en placa una vez.

Descripción de los fragmentos subgenómicos para generar FC126HTV:

CLON SUBGENÓMICO 407-32.2C3. El cósmido 407-32.2C3 contiene una región de aproximadamente 40.170 pares de bases de ADN de HVT genómico [extremo izquierdo-pos. 39.754; Afonso *et al.,* 2001, *supra*; Acc. n.º AF291866]. Esta región incluye fragmentos HVT BamHI F', L, P, N1, E, D y 2.092 pares de bases del fragmento B.

CLON SUBGENÓMICO 172-07.BA2. El plásmido 172-07.BA2 contiene una región de 25.931 pares de bases de ADN de HVT genómico. Se construyó mediante la clonación del fragmento HVT BamHI B [pos. 37.663 a 63.593; Afonso *et al.,* 2001, *supra*; Acc. n.º AF291866] en el plásmido pSP64 (Promega, Madison WI).

CLON SUBGENÓMICO 407-32.5G6. El cósmido 407-32.5G6 contiene una región de 39.404 pares de bases de ADN de HVT genómico [pos. 61.852-101.255; Afonso *et al.,* 2001, *supra*; Acc. n.º AF291866]. Esta región incluye fragmentos HVT BamHI H, C, Q, K1, M, K2, más 1.742 pares de bases del fragmento B y 3.880 pares de bases del fragmento J.

CLON SUBGENÓMICO 407-32.1C1. El cósmido 407-32.1C1 contiene una región de 37.444 pares de bases de ADN de HVT genómico [pos. 96.095-133.538; Afonso *et al.,* 2001, *supra*; Acc. n.º AF291866]. Esta región incluye fragmentos HVT BamHI J, G, I, F, O, más 1.281 pares de bases del fragmento K2 y 6.691 pares de bases del fragmento A.

CLON SUBGENÓMICO 378-50. El cósmido 378-50 contiene una región de 28.897 pares de bases de ADN de HVT genómico [véase la Figura 8 del documento US 5.853.733; redibujado, al menos en parte, en la Figura 1, en el presente documento]. Se construyó mediante la clonación del fragmento HVT BamHI A [pos. 126848-155744; Afonso *et al.,*

2001, *supra;* Acc. n.º AF291866] en el cósmido pWE15.

Fragmentos de inserción adicional para generar HVT/NDV/ILTV 1332-62.E1:

CLON SUBGENÓMICO 1332-47.A2. El plásmido de inserción 1332-47.A2 contiene un fragmento EcoRI de 7311 pares de bases de la región corta única de HVT [pos. 136880-144190; Afonso *et al.,* 2001, *supra*; Acc. n.º AF291866], clonado en el plásmido pSP64 (Promega, Madison WI). Insertado en un sitio StuI único dentro del gen US2 HVT [pos. 140540/140541, Afonso *et al.,* 2001, *supra;* Acc. n.º AF291866, entre los restos de aminoácidos 124 y 125] hay 2 elementos: un fragmento Sa/I-HindIII de 3563 pares de bases de ILTV, cepa de desafío NVSL, lote n.º 83-2 [pos. 10532-14094; Wild *et al.,* Virus Genes 12: 104-116 (1996); Acc. n.º U28832], que codifica los genes de longitud completa para la glucoproteína D (gD) y la glicoproteína I (gI), más las regiones de codificación parcial de la glucoproteína E (aminoácidos 1-101) y ORF5 (aminoácidos 734-985); y un casete de expresión que consiste en el promotor HCMV IE, el NDV, la cepa de clone 30, el gen de fusión (F), seguido de una señal de poliadenilación sintética. Los genes ILTV gD, ILTV gI y NDV F se transcriben en la dirección opuesta en relación con el gen HVT US2.

CLON SUBGENÓMICO pSY640. El plásmido pSY640 contiene una región de aproximadamente 13.600 pares de bases de ADN de HVT genómico [pos. 126848-140540; Afonso *et al.,* 2001, *supra*; Acc. n.º AF291866] procedente del fragmento A de BamHI. Para generar este plásmido, se clonó en la región del ADN ubicada corriente arriba del gen US2, que comienza en el sitio StuI ubicado en el gen US2 y que continúa hasta el final del fragmento BamHI A, en el plásmido pSP64 (Promega, Madison WI).

CLON SUBGENÓMICO 556-60.6. El plásmido 556-60.6 contiene una región de aproximadamente 12.500 pares de bases de ADN HVT genómico procedente del fragmento A de BamHI [pos. 143300 a pos. 155744 aproximado, Afonso *et al.,* 2001, *supra;* Acc. n.º AF291866]. Para generar este plásmido, se clonó la región de ADN ubicada corriente abajo del gen US2 que comienza en el sitio StuI ubicado en el gen US2 y que continúa hasta el final del fragmento BamHI A en el plásmido pSP64 (Promega, Madison WI), y luego se trató con exonucleasa para "masticar" desde el sitio StuI de150 pb, y se volvió a clonar en el vector plásmido pBR322.

Fragmentos de inserción adicional para generar HVT/NDV/ILTV 1332-70.B1:

CLON SUBGENÓMICO 1332-29.4 El plásmido 1332-29.4 contiene una región de 8.636 pares de bases de ADN de HVT genómico procedente de la región única larga [pos. 109489-118124; Afonso *et al.,* 2001, *supra;* Acc. n.º AF291866], clonado en un derivado del plásmido pNEB193 (*Aat*II- *Pvu*II eliminado). Está flanqueado por los sitios AscI e incluye los fragmentos BVHI HVT I, S, más 1337 pares de bases del fragmento G y 1177 pares de bases del fragmento F. Insertado en un sitio XhoI dentro del marco de lectura abierto HVT UL54.5 [pos. 111240/111241, Afonso *et al.,* 2001, *supra;* Acc. n.º AF291866, entre los restos de aminoácidos 21 y 22] hay 2 elementos: un fragmento Sa/I-HindIII de 3563 pares de bases de ILTV, cepa de desafío NVSL, lote n.º 83-2 [pos. 10532-14094; Wild *et al.* 1996, *supra*; Acc. n.º U28832], que codifica los genes de longitud completa para la glucoproteína D (gD) y la glicoproteína I (gI), más las regiones de codificación parcial de la glucoproteína E (aminoácidos 1-101) y ORF5 (aminoácidos 734-985); y un casete de expresión que consiste en el promotor HCMV IE, el NDV, la cepa de clone 30, el gen de fusión (F), seguido de una señal de poliadenilación sintética. Los genes ILTV gD, ILTV gI y NDV F se transcriben en la dirección opuesta en relación con el gen HVT UL54.5.

CLON SUBGENÓMICO 672-01.A40 El plásmido 672-01 A40 contiene una región de 14.731 pares de bases de ADN de HVT genómico procedente de la región única larga [pos. 96095-110825; Afonso *et al.,* 2001, *supra;* Acc. n.º AF291866], clonado en un derivado del plásmido pNEB193. Esta región incluye fragmentos HVT BamHI G, J y 1281 pares de bases de K2.

CLON SUBGENÓMICO 672-07.C40 El plásmido 672-07.C40 contiene una región de 12.520 pares de bases de ADN de HVT genómico procedente de la región única larga [pos. 116948-129467; Afonso *et al.,* 2001, *supra*; Acc. n.º AF291866], clonado en un derivado del plásmido pNEB193. Esta región incluye fragmentos HVT BamHI F, O y 2620 pares de bases de A.

Fragmentos de inserción adicional para generar HVT/NDV/ILTV 1317-46.A1-1:

CLON SUBGENÓMICO 1196-05.1. El cósmido 1196-05.1 contiene una región de aproximadamente 40.170 pares de bases de ADN de HVT genómico [extremo izquierdo-pos. 39.754; Afonso *et al.,* 2001, *supra*; Acc. n.º AF291866] clonado en el cósmido pWE15. Esta región incluye fragmentos HVT BamHI F; L, P, N1, E, D y 2.092 pares de bases del fragmento B. Además, un casete de expresión que codifica el gen de fusión (F) del NDV, incluido el promotor HCMV IE y el HSV TK y elementos reguladores de la poliadenilación se insertó en una región no codificante entre los genes HVT UL7 y UL8 dentro del fragmento E de BamHI [pos. 20030-20035; Afonso *et al.,* 2001, *supra*; Acc. n.º AF291866]. El gen NDV F se transcribe en la misma dirección que el HVT UL7.

CLON SUBGENÓMICO 1317-15.1-1. El plásmido 1317-15.1-1 contiene un fragmento EcoRI de 7311 pares de bases de la región corta única de HVT [pos. 136880-144190; Afonso *et al.,* 2001, *supra*; Acc. n.º AF291866], clonado en el plásmido pSP64 (Promega, Madison WI). Además, un fragmento Sa/I-HindIII de 3563 pares de bases de ILTV, cepa de desafío NVSL, lote n.º 83-2 [pos. 10532-14094; Wild *et al.,* 1996, *supra;* Acc. n.º U28832], que codifica los genes

de longitud completa para la glucoproteína D (gD) y la glicoproteína I (gI), más las regiones de codificación parcial de la glicoproteína E (aminoácidos 1-101) y ORF5 (aminoácidos 734-985) se clonaron en un sitio StuI único dentro del gen US2 HVT [pos. 140540/140541, Afonso *et al.,* 2001, *supra;* Acc. n.º AF291866, entre los restos de aminoácidos 124 y 125]. Los genes ILTV gD y gI y se transcriben en la dirección opuesta en relación con el gen HVT US2.

CLON SUBGENÓMICO pSY640. El plásmido pSY640 contiene una región de aproximadamente 13.600 pares de bases de ADN de HVT genómico [pos. 126848-140540; Afonso *et al.,* 2001, *supra;* Acc. n.º AF291866] procedente del fragmento A de BamHI. Para generar este plásmido, se clonó en la región del ADN ubicada corriente arriba del gen US2, que comienza en el sitio StuI ubicado en el gen US2 y que continúa hasta el final del fragmento BamHI A, en el plásmido pSP64 (Promega, Madison WI).

CLON SUBGENÓMICO 556-60.6. El plásmido 556-60.6 contiene una región de aproximadamente 12.500 pares de bases de ADN HVT genómico procedente del fragmento A de BamHI [pos. 143300 a pos. 155744 aproximado, Afonso *et al.,* 2001, *supra;* Acc. n.º AF291866]. Para generar este plásmido, se clonó la región de ADN ubicada corriente abajo del gen US2 que comienza en el sitio StuI ubicado en el gen US2 y que continúa hasta el final del fragmento BamHI A en el plásmido pSP64 (Promega, Madison WI), y luego se trató con exonucleasa para "masticar" desde el sitio StuI de150 pb, y se volvió a clonar en el vector plásmido pBR322.

Protocolo de transfección de $CaCl_2$ convencional: Los CEF secundarios se siembran en placas de cultivo de 6 pocillos y se incubaron a 38 °C con 5 % de CO2 durante 24 horas y se forman monocapas confluentes. Para cada pocillo se mezclo una cantidad total de 0,25 µg de ADN de cósmidos y plásmidos en tampón Hepes y se añadió $CaCl_2$ 125 mM gota a gota hasta que la precipitación fue inminente. Esta mezcla se añadió a la monocapa de células CEF y se incubó durante 2 a 3 horas. Se eliminó el sobrenadante y se añadió una capa de glicerol al 15 %, y se mantuvo en las células durante 1 minuto. Luego, esto se eliminó, se lavó con PBS y se añadió medio de cultivo fresco y las células se incubaron durante 5 días. A continuación, las células se recogieron mediante tripsinización y las células de las placas individuales se sembraron cada una en monocapas nuevas de células CEF en placas de 10 cm y se incubaron hasta alcanzar un 50-90 % de CPE. A continuación, las células transfectadas amplificadas se recogieron mediante tripsinización y diluciones de 10-2 a 10-4 se colocaron en placas de 10 cm con monocapas de CEF y se incubaron. Al día siguiente, las placas se cubrieron con agar y se aislaron varias placas individuales de HVT/NDV/ILTV y se amplificaron en CEF.

Ejemplo 2

LA VACUNA RECOMBINANTE HVT/ND/ILTV PROTEGE A LOS POLLITOS DE UN DÍA CONTRA EL DESAFÍO DEL VIRUS DE LA LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA

Dos vacunas, una que comprendía HVT/NDV/ILTV-1332-62E1 y la otra, que comprendía 1332-70B1, se evaluaron para determinar su eficacia en la protección de pollos de un desafío del virus de la laringotraqueitis infecciosa. HVT/NDV/ILTV-1332-62E1 es un rHVT en el que la estructura FC126 HVT comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 17 insertada en el sitio de US2 (véase, el Ejemplo 1 anterior). HVT/NDV/ILTV-1332-70B1 es un rHVT en el que la estructura FC126 HVT comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 17 insertada en el sitio de UL54.5 (véase, el Ejemplo 1 anterior).

Las preparaciones de vacuna para ambas reservas de virus se prepararon a partir de reservas que se pasaban a través de células de cultivo de tejido de fibroblastos de embrión de pollo, al menos 8 veces, y se preparó una preparación adicional de 11 pasadas de cultivo de tejido y se probó para 1332-62E1.

Las vacunas se administraron a pollitos recién nacidos, libres de antígeno específico (SPF) por vía subcutánea. Las aves fueron desafiadas a las cuatro semanas de edad con el virus virulento de desafío ILTV por vía intratraqueal y se observaron durante 10 días en busca de signos clínicos de la enfermedad. La incidencia de la enfermedad en estos pollitos se comparó con los controles que recibieron una vacuna comercial recombinante HVT/ILTV (Innovax®-ILT, de Merck Animal Health) o ninguna vacuna. El Código Federal de Registro (9CFR) requiere que al menos el 80 % de las aves de control no vacunadas muestren signos clínicos para que una prueba sea válida, y al menos el 90 % de las aves vacunadas deben permanecer libres de signos clínicos para que se considere que proporcionan protección satisfactoria. Los resultados de este estudio se proporcionan en la Tabla 1 a continuación. Ambas vacunas recombinantes duales proporcionaron protección contra un desafío de ILTV virulento.

Tabla 1

Eficacia de la vacuna multivalente HVT/NDV/ILTV contra un desafío de ILTV virulento						
Grupo	Vacuna	Dosis*	Signos clínicos**	Mortalidad**	Resultados clínicos y de necropsia**	% de protección
1	1332-62. E 8 pasadas	2170	1/36	1/36	1/36 = 2,8 %	97,2 %
2	1332-62. E 11	1409	0/36	0/36	0/36 = 0 %	100 %

	pasadas					
3	1332-70. B 8 pasadas	2483	3/36	2/36	3/36 = 8,3 %	91,7 %
4	Innovax®-ILT	2200	0/24	0/24	0/24 = 0 %	100 %
5a	Controles desafiados	NA	10/10	9/10	10/10 = 100 %	0 %
5b	Controles no desafiados	NA	0/10	0/10	0/10	NA
*La dosis se describe como unidades formadoras de placa (ufp)/volumen de dosis de 0,2 ml. **Los resultados se dan como el número de aves positivas por número total de aves (n.º de positivos/total).						

Ejemplo 3

LA VACUNA RECOMBINANTE HVT/ND/ILTV PROTEGE A LOS POLLITOS DE UN DÍA CONTRA EL DESAFÍO DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Los pollitos libres de antígeno específico (SPF) de un día o los embriones de 19 días se vacunaron con una vacuna recombinante, HVT/NDV/ILTV-1332-62E1, nivel de pasadas de cultivo de tejidos 11, o una vacuna comercial recombinante HVT/NDV (Innovax®-ND, comercializada por Merck Animal Health) y luego se desafiaron a las cuatro semanas de edad con el virus de desafío virulento de la enfermedad de Newcastle (ND), cepa Texas-GB, por vía intramuscular. Después de un período de observación de 14 días, en los que las aves fueron puntuadas por signos clínicos de la enfermedad de Newcastle, la incidencia de la enfermedad en cada grupo de pollitos se comparó con los controles no vacunados. El Código Federal de Registro (9CFR) requiere que al menos el 80 % de las aves de control no vacunadas muestren signos clínicos para que una prueba sea válida, y al menos el 90 % de las aves vacunadas deben permanecer libres de signos clínicos para que se considere que una vacuna proporciona una protección satisfactoria. Los resultados de este estudio indican que la vacuna HVT/NDV/ILTV 1332-62E1 recombinante proporcionó una protección satisfactoria contra ND por ambas vías de administración.

Tabla 2

Eficacia de la vacuna multivalente HVT/NDV/ILTV contra un desafío de NDV virulento							
Grupo	**Vacuna**	**Dosis***	**Vía**	**N.º de aves**	**Signos clínicos**	**Mortalidad****	**% de protección**
1a	1332-62. E 11 pasadas	2160	*in ovo*	31	0/31 = 0 %	0/31 = 0 %	100 %
1b	1332-62. E 11 pasadas	2010	SC	31	0/31 = 0 %	0/31 = 0 %	100 %
2a	Innovax®-ND	2046	*in ovo*	32	3/32 = 9,4 %	2/31 = 6,3 %	90,6 %
2b	Innovax®-ND	1872	SC	32	1/32 = 3 %	1/32 = 3 %	96,9 %
3	Diluyente de Marek	NA	SC	12	12/12 = 100 %	12/12 = 100 %	0 %
*La dosis se describe como unidades formadoras de placa (ufp)/volumen de dosis (dosis de 0,2 ml/SC, dosis de 0,1 ml/*in ovo*). **Los resultados se dan como el número de aves positivas por número total de aves (n.º de positivos/total).							

Ejemplo 4

LA VACUNA RECOMBINANTE HVT/ND/ILTV PROTEGE A LOS POLLITOS DE UN DÍA CONTRA EL DESAFÍO DEL VIRUS DE LA LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA Y EL DESAFÍO DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Una vacuna, HVT/NDV/ILT-1317-46.1-1, se evaluó para determinar su eficacia en la protección de pollos contra el desafío del virus de la laringotraqueitis infecciosa o el desafío del virus de la enfermedad de Newcastle. HVT/NDV/ILTV-1317-46.1-1 es un rHVT en el que la estructura FC126 HVT comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 16 insertada en el sitio de US2 y la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 15 insertada en el sitio UL7/8, *es decir,* entre los genes UL7 y UL8 de HVT, (véase, el Ejemplo 1 a continuación). La preparación de la vacuna se preparó a partir de una reserva que se pasaba a través de células de cultivo de tejido de fibroblastos de embrión de pollito 15 veces.

Las vacunas se administraron a pollitos recién nacidos, libres de antígeno específico (SPF) por vía subcutánea. Las aves fueron luego desafiadas a las cuatro semanas de edad con el virus de desafío virulento de la laringotraqueitis infecciosa por vía intratraqueal y se observaron durante 10 días en busca de signos clínicos de la enfermedad, o se desafiaron con el virus virulento de la enfermedad de Newcastle, cepa Texas-GB, por vía intramuscular y se observaron durante 14 días. La incidencia de la enfermedad en estos pollitos se comparó con los controles que

recibieron una vacuna comercial recombinante HVT/ILTV , una vacuna HVT/ND o ninguna vacuna. El Código Federal de Registro (9CFR) requiere que al menos el 80 % de las aves de control no vacunadas muestren signos clínicos para que una prueba sea válida, y al menos el 90 % de las aves vacunadas deben permanecer libres de signos clínicos para que se considere que proporcionan protección satisfactoria. Los resultados de este estudio se proporcionan en la Tabla 3 a continuación. La vacuna HVT/NDV/ILT proporcionó una protección satisfactoria contra el desafío de NDV. Sin embargo, en este estudio preliminar, la protección proporcionada por esta construcción contra un desafío virulento de ILTV no alcanzó los requisitos federales, sí brindó una protección sustancial.

Tabla 3

Eficacia de la vacuna multivalente HVT/NDV/ILTV contra un desafío de NDV y ILTV virulento						
Grupo de tratamiento	**Dosis***	**N.º de aves**	**Resultados después del desafío**			
			ILT		**NDV**	
			N.º de positivos/total**	**% de protección**	**N.º de positivos/total****	**% de protección**
HVT/NDV/ILT 1317-46 (p15)	1356	20	4/20 = 20 %	80%	0/19 = 0 %	100 %
Innovax®-ILT	1740	20	1/20 = 5 %	95 %	-----	-----
Innovax®-ND	1836	20	-----	-----	0/20 = 0 %	100 %
Placebo	NA	10	10/10 = 100 %	0 %	8/8 = 100 %	0 %
*La dosis se describe como unidades formadoras de placa (ufp)/volumen de dosis de 0,2 ml. **Los resultados se dan como el número de aves positivas (signos clínicos y mortalidad) por número total de aves (n.º de positivos/total).						

Ejemplo 5

HVT/ND/ILTV RECOMBINANTE EN COMBINACIÓN CON LA ENFERMEDAD DE LA BOLSA 89/03 EN UNA VACUNA CONTRA UN VIRUS DE LA ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BOLSA

Los grupos de pollos de un día (SPF Leghorn) se inocularon con HVT/NDV/ILTV-1332-62E1 combinado con la vacuna IBDV 89/03 en el momento de su uso. Un grupo separado de pollitos fueron vacunados con solo la vacuna contra el IBDV a 3,5 log10TCID50 por dosis. Los pollos fueron desafiados a las 4 semanas de edad con la variante de desafío E IBDV. A los 10 días posteriores al desafío, las aves se sometieron a eutanasia y se examinaron para determinar su peso corporal/bolsa y lesiones graves consecuentes con la enfermedad de la bolsa. Los resultados se analizaron para determinar su aceptabilidad según los requisitos aplicables de 9CFR 113.331.

IBDV 89/03 es un producto con licencia que se usa en la industria avícola para proteger las aves contra las cepas clásicas y variantes del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa. La dosis objetivo para la vacuna contra el IBDV 89/03 fue de 3,5 log-io TCID50 por dosis de 0,2 ml. La dosis objetivo para HVT/NDV/ILT fue de 3000 UPF por dosis de 0,2 ml. Para lograr las dosis objetivo en el volumen final del diluyente de la vacuna, la vacuna HVT/NDV/ILTV-1332-62E1 se diluyó para contener 6000 UPF en 0,2 ml, que es el doble de la dosis objetivo. La vacuna 89/03 se diluyó para contener 3,8 $\log_{10}$ $TCID_{50}$, que es el doble de la dosis objetivo. Para el grupo 1, la vacuna combinada se preparó combinando volúmenes iguales de la vacuna HVT/NDV/ILTV-1332-62E1 y la vacuna 89/03. Para el grupo 2, que recibió solo la vacuna 89/03, se añadió un volumen igual de diluyente. Los pollos de un día en cada grupo de tratamiento recibieron 0,2 ml de la vacuna respectiva o placebo por vía subcutánea (SC) (véase la Tabla 4).

Tabla 4

DISEÑO EXPERIMENTAL						
Grupo	**N.º**	**Vacuna**	**Dosis HVT- (89/03)**	**Variante E IBDV**		
				Desafío		**Necropsia**
				Edad	N.º de aves	
1	45	HVT/NDV/ILT + 89/03	3000- (3,5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$)	4 semanas	≥40	10 días después del desafío
2	45	89/03	NA- (3,5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$)	4 semanas	≥40	10 días después del desafío
3	45	Controles desafiados con placebo	---	4 semanas	≥40	10 días después del desafío
4	30	Controles sin desafío de placebo	---	---	≥25	10 días después del desafío

Al eclosionar, los pollitos en cada uno de los grupos de tratamiento de vacunas se marcaron con un conjunto de

números de etiquetas aleatorios asignados mediante el programa de aleatorización de EXCEL. Además, las aves extraídas de cada corral a los 7 días posteriores al desafío para el examen histológico de las bolsas se determinaron al azar mediante el programa de aleatorización de EXCEL.

Los pollitos fueron desafiados a las cuatro semanas de edad con el virus de desafío de la variante E IBDV. Cada pollo recibió 0,06 ml que contienen aproximadamente 102,2 de EID50 por dosis mediante gotas para los ojos. A los siete días posteriores al desafío, se eliminaron 6-9 aves de cada grupo para la evaluación histológica de las bolsas individuales (véase la Tabla 5). Las muestras de bolsa se recolectaron de cada pollo desafiado con cuidado para recolectar el tejido que no había sido aplastado o apretado por las pinzas. La muestra de tejido se colocó en un recipiente individual de formalina al 10 %.

La bolsa de cada pollo desafiado con el virus IBD-Var E se registró como negativa o positiva para atrofia bursal, lesiones macroscópicas totales y/o agotamiento de linfocitos según lo determinado por el examen histológico. Las lesiones de bolsa incluyeron hemorragia macroscópica, edema/exudados, color crema/amarillo, estrías o atrofia grave. La atrofia de bolsa se midió pesando individualmente cada pollo al gramo más cercano. Las bolsas se pesaron individualmente a la centésima de gramo más cercana. Se calcularon las relaciones de peso corporal/bolsa para cada ave que empleaba la fórmula, relación PB/PC: (Peso de la bolsa ÷ entre el peso corporal) x 1000. Una relación de peso de bolsa a peso corporal de más de 2 desviaciones estándar del control desafiado se considera negativa y protectora de la enfermedad de la bolsa infecciosa. Los resultados de este estudio mostraron que los grupos de tratamiento de vacunas 1 y 2 eran negativos para IBD (es decir, no eran estadísticamente diferentes del control sin desafío con placebo) lo que indica que ambas vacunas fueron eficaces y que demuestra además que no hubo interferencia de la protección proporcionada por la cepa 89/03 de la vacuna contra el desafío del IBDV debido a la construcción HVT/NDV/ILT recombinante que también está presente en la vacuna multivalente (véase la Tabla 5).

Tabla 5

Día 7 DATOS DE NECROPSIA PARA EL DESAFÍO DE LA VARIANTE E IBDV			
Grupo	**N.º**	**Vacuna**	**Relación PB/PC media de la bolsa**
1	9	HVT/NDV/ILT + 89/03	5,464
2	9	89/03	5,715
3	9	Controles desafiados con placebo	1,874 (DE+0,641)**
4	6	Controles sin desafío de placebo	5,838
** 2 DE del control es estadísticamente diferente.			

Ejemplo 6

SECUENCIAS

Las siguientes secuencias se han usado en las construcciones a modo de ejemplo de rHVT. Las secuencias de codificación proporcionadas a continuación incluyen codones de parada individuales, que pueden reemplazarse fácilmente con codones de parada alternativos sin modificar las propiedades de los antígenos de proteína que codifican las secuencias de codificación.

Glicoproteína ILTV gD, secuencia de codificación (SEQ ID NO: 1)

ATGCACCGTCCTCATCTCAGACGGCACTCGCGTTACTACGCGAAAGGAGAGGTGCTTAACAAACACAT
GGATTGCGGTGGAAAACGGTGCTGCTCAGGCGCAGCTGTATTCACTCTTTTCTGGACTTGTGTCAGGA
TTATGCGGGAGCATATCTGCTTTGTACGCAACGCTATGGACCGCCATTTATTTTTGAGGAATGCTTTT
TGGACTATCGTACTGCTTTCTTCCTTCGCTAGCCAGAGCACCGCCGCCGTCACGTACGACTACATTTT
AGGCCGTCGCGCGCTCGACGCGCTAACCATACCGGCGGTTGGCCCGTATAACAGATACCTCACTAGGG
TATCAAGAGGCTGCGACGTTGTCGAGCTCAACCCGATTTCTAACGTGGACGACATGATATCGGCGGCC

AAAGAAAAAGAGAAGGGGGGCCCTTTCGAGGCCTCCGTCGTCTGGTTCTACGTGATTAAGGGCGACGA
CGGCGAGGACAAGTACTGTCCAATCTATAGAAAAGAGTACAGGGAATGTGGCGACGTACAACTGCTAT
CTGAATGCGCCGTTCAATCTGCACAGATGTGGGCAGTGGACTATGTTCCTAGCACCCTTGTATCGCGA
AATGGCGCGGGACTGACTATATTCTCCCCCACTGCTGCGCTCTCTGGCCAATACTTGCTGACCCTGAA
AATCGGGAGATTTGCGCAAACAGCTCTCGTAACTCTAGAAGTTAACGATCGCTGTTTAAAGATCGGGT
CGCAGCTTAACTTTTTACCGTCGAAATGCTGGACAACAGAACAGTATCAGACTGGATTTCAAGGCGAA
CACCTTTATCCGATCGCAGACACCAATACACGACACGCGGACGACGTATATCGGGGATACGAAGATAT
TCTGCAGCGCTGGAATAATTTGCTGAGGAAAAAGAATCCTAGCGCGCCAGACCCTCGTCCAGATAGCG
TCCCGCAAGAAATTCCCGCTGTAACCAAGAAAGCGGAAGGGCGCACCCCGGACGCAGAAAGCAGCGAA
AAGAAGGCCCCTCCAGAAGACTCGGAGGACGACATGCAGGCAGAGGCTTCTGGAGAAAATCCTGCCGC
CCTCCCCGAAGACGACGAAGTCCCCGAGGACACCGAGCACGATGATCCAAACTCGGATCCTGACTATT
ACAATGACATGCCCGCCGTGATCCCGGTGGAGGAGACTACTAAAAGTTCTAATGCCGTCTCCATGCCC
ATATTCGCGGCGTTCGTAGCCTGCGCGGTCGCGCTCGTGGGGCTACTGGTTTGGAGCATCGTAAAATG
CGCGCGTAGCTAA

Glicoproteína ILTV gD (SEQ ID NO: 2)

MHRPHLRRHSRYYAKGEVLNKHMDCGGKRCCSGAAVFTLFWTCVRIMREHICFVRNAMDRHLFLRNAF
WTIVLLSSFASQSTAAVTYDYILGRRALDALTIPAVGPYNRYLTRVSRGCDVVELNPISNVDDMISAA
KEKEKGGPFEASVVWFYVIKGDDGEDKYCPIYRKEYRECGDVQLLSECAVQSAQMWAVDYVPSTLVSR
NGAGLTIFSPTAALSGQYLLTLKIGRFAQTALVTLEVNDRCLKIGSQLNFLPSKCWTTEQYQTGFQGE
HLYPIADTNTRHADDVYRGYEDILQRWNNLLRKKNPSAPDPRPDSVPQEIPAVTKKAEGRTPDAESSE
KKAPPEDSEDDMQAEASGENPAALPEDDEVPEDTEHDDPNSDPDYYNDMPAVIPVEETTKSSNAVSMP
IFAAFVACAVALVGLLVWSIVKCARS

Glicoproteína ILTV gI, secuencia de codificación (SEQ ID NO: 3)

ATGGCATCGCTACTTGGAACTCTGGCTCTCCTTGCCGCGACGCTCGCACCCTTCGGCGCGATGGGAAT
CGTGATCACTGGAAATCACGTCTCCGCCAGGATTGACGACGATCACATCGTGATCGTCGCGCCTCGCC
CCGAAGCTACAATTCAACTGCAGCTATTTTTCATGCCTGGCCAGAGACCCCACAAACCCTACTCAGGA
ACCGTCCGCGTCGCGTTTCGGTCTGATATAACAAACCAGTGCTACCAGGAACTTAGCGAGGAGCGCTT
TGAAAATTGCACTCATCGATCGTCTTCTGTTTTTGTCGGCTGTAAAGTGACCGAGTACACGTTCTCCG
CCTCGAACAGACTAACCGGACCTCCACACCCGTTTAAGCTCACTATACGAAATCCTCGTCCGAACGAC
AGCGGGATGTTCTACGTAATTGTTCGGCTAGACGACACCAAAGAACCCATTGACGTCTTCGCGATCCA
ACTATCGGTGTATCAATTCGCGAACACCGCCGCGACTCGCGGACTCTATTCCAAGGCTTCGTGTCGCA
CCTTCGGATTACCTACCGTCCAACTTGAGGCCTATCTCAGGACCGAGGAAAGTTGGCGCAACTGGCAA
GCGTACGTTGCCACGGAGGCCACGACGACCAGCGCCGAGGCGACAACCCCGACGCCCGTCACTGCAAC
CAGCGCCTCCGAACTTGAAGCGGAACACTTTACCTTTCCCTGGCTAGAAAATGGCGTGGATCATTACG
AACCGACACCCGCAAACGAAAATTCAAACGTTACTGTCCGTCTCGGGACAATGAGCCCTACGCTAATT
GGGGTAACCGTGGCTGCCGTCGTGAGCGCAACGATCGGCCTCGTCATTGTAATTTCCATCGTCACCAG
AAACATGTGCACCCCGCACCGAAAATTAGACACGGTCTCGCAAGACGACGAAGAACGTTCCCAAACTA
GAAGGGAATCGCGAAAATTTGGACCCATGGTTGCGTGCGAAATAAACAAGGGGGCTGACCAGGATAGT
GAACTTGTGGAACTGGTTGCGATTGTTAACCCGTCTGCGCTAAGCTCGCCCGACTCAATAAAAATGTG
A

Glicoproteína ILTV gI (SEQ ID NO: 4)

MASLLGTLALLAATLAPFGAMGIVITGNHVSARIDDDHIVIVAPRPEATIQLQLFFMPGQRPHKPYSG
TVRVAFRSDITNQCYQELSEERFENCTHRSSSVFVGCKVTEYTFSASNRLTGPPHPFKLTIRNPRPND
SGMFYVIVRLDDTKEPIDVFAIQLSVYQFANTAATRGLYSKASCRTFGLPTVQLEAYLRTEESWRNWQ
AYVATEATTTSAEATTPTPVTATSASELEAEHFTFPWLENGVDHYEPTPANENSNVTVRLGTMSPTLI
GVTVAAVVSATIGLVIVISIVTRNMCTPHRKLDTVSQDDEERSQTRRESRKFGPMVACEINKGADQDS
ELVELVAIVNPSALSSPDSIKM

Proteína NDV F, secuencia de codificación (SEQ ID NO: 5): clone 30

ATGGGCCCCAGACCTTCTACCAAGAACCCAGTACCTATGATGCTGACTGTCCGAGTCGCGCTGGTACT
GAGTTGCATCTGTCCGGCAAACTCCATTGATGGCAGGCCTCTTGCGGCTGCAGGAATTGTGGTTACAG
GAGACAAAGCCGTCAACATATACACCTCATCCCAGACAGGATCAATCATAGTTAAGCTCCTCCCGAAT
CTGCCCAAGGATAAGGAGGCATGTGCGAAAGCCCCCTTGGATGCATACAACAGGACATTGACCACTTT
GCTCACCCCCCTTGGTGACTCTATCCGTAGGATACAAGAGTCTGTGACTACATCTGGAGGGGGGAGAC
AGGGGCGCCTTATAGGCGCCATTATTGGCGGTGTGGCTCTTGGGGTTGCAACTGCCGCACAAATAACA
GCGGCCGCAGCTCTGATACAAGCCAAACAAAATGCTGCCAACATCCTCCGACTTAAAGAGAGCATTGC
CGCAACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCGCAACTAGCAGTGGCAGTTGGGAAGA
TGCAGCAGTTTGTTAATGACCAATTTAATAAAACAGCTCAGGAATTAGACTGCATCAAAATTGCACAG
CAAGTTGGTGTAGAGCTCAACCTGTACCTAACCGAATTGACTACAGTATTCGGACCACAAATCACTTC
ACCTGCTTTAAACAAGCTGACTATTCAGGCACTTTACAATCTAGCTGGTGGAAATATGGATTACTTAT
TGACTAAGTTAGGTGTAGGGAACAATCAACTCAGCTCATTAATCGGTAGCGGCTTAATCACCGGTAAC
CCTATTCTATACGACTCACAGACTCAACTCTTGGGTATACAGGTAACTCTACCTTCAGTCGGGAAGCT
AAATAATATGCGTGCCACCTACTTGGAAACCTTATCCGTAAGCACAACCAGGGGATTTGCCTCGGCAC
TTGTCCCAAAAGTGGTGACACAGGTCGGTTCTGTGATAGAAGAACTTGACACCTCATACTGTATAGAA
ACTGACTTACATTTATATTGTACAAGAATAGTAACGTTCCCTATGTCCCCTGGTATTTATTCCTGCTT
GAGCGGCAATACGTCGGCCTGTATGTACTCAAAGACCGAAGGCGCACTTACTACACCATACATGACTA
TCAAAGGTTCAGTCATCGCCAACTGCAAGATGACAACATGTAGATGTGTAAACCCCCCGGGTATCATA
TCGCAAAACTATGGAGAAGCCGTGTCTCTAATAGATAAACAATCATGCAATGTTTTATCCTTAGGCGG
GATAACTTTAAGGCTCAGTGGGGAATTCGATGTAACTTATCAGAAGAATATCTCAATACAAGATTCTC
AAGTAATAATAACAGGCAATCTTGATATCTCAACTGAGCTTGGGAATGTCAACAACTCGATCAGTAAT
GCTTTGAATAAGTTAGAGGAAAGCAACAGAAAACTAGACAAAGTCAATGTCAAACTGACTAGCACATC
TGCTCTCATTACCTATATCGTGTTGACTATCATATCTCTTGTTTTTGGTATACTTAGCCTGATTCTAG
CATGCTACCTAATGTACAAGCAAAAGGCGCAACAAAAGACCTTATTATGGCTTGGGAATAATACTCTA
GATCAGATGAGAGCCACTACAAAAATGTGA

Proteína NDV F (SEQ ID NO: 6): clone 30

MGPRPSTKNPVPMMLTVRVALVLSCICPANSIDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPN
LPKDKEACAKAPLDAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGGGRQGRLIGAIIGGVALGVATAAQIT
AAAALIQAKQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNKTAQELDCIKIAQ
QVGVELNLYLTELTTVFGPQITSPALNKLTIQALYNLAGGNMDYLLTKLGVGNNQLSSLIGSGLITGN
PILYDSQTQLLGIQVTLPSVGKLNNMRATYLETLSVSTTRGFASALVPKVVTQVGSVIEELDTSYCIE
TDLHLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTTPYMTIKGSVIANCKMTTCRCVNPPGII
SQNYGEAVSLIDKQSCNVLSLGGITLRLSGEFDVTYQKNISIQDSQVIITGNLDISTELGNVNNSISN
ALNKLEESNRKLDKVNVKLTSTSALITYIVLTIISLVFGILSLILACYLMYKQKAQQKTLLWLGNNTL
DQMRATTKM

Proteína NDV F, secuencia de codificación (SEQ ID NO: 7): (B1 Hitchner)

ATGGATCGATCCCGGTTGGCGCCCTCCAGGTGCAGGATGGGCTCCAGACCTTCTACCAAGAACCCAGC
ACCTATGATGCTGACTATCCGGGTCGCGCTGGTACTGAGTTGCATCTGTCCGGCAAACTCCATTGATG
GCAGGCCTCTTGCAGCTGCAGGAATTGTGGTTACAGGAGACAAAGCAGTCAACATATACACCTCATCC
CAGACAGGATCAATCATAGTTAAGCTCCTCCCGAATCTGCCAAAGGATAAGGAGGCATGTGCGAAAGC
CCCCTTGGATGCATACAACAGGACATTGACCACTTTGCTCACCCCCCTTGGTGACTCTATCCGTAGGA
TACAAGAGTCTGTGACTACATCTGGAGGGGGGAGACAGGGGCGCCTTATAGGCGCCATTATTGGCGGT
GTGGCTCTTGGGGTTGCAACTGCCGCACAAATAACAGCGGCCGCAGCTCTGATACAAGCCAAACAAAA
TGCTGCCAACATCCTCCGACTTAAAGAGAGCATTGCCGCAACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTG
ACGGATTATCGCAACTAGCAGTGGCAGTTGGGAAGATGCAGCAGTTCGTTAATGACCAATTTAATAAA
ACAGCTCAGGAATTAGACTGCATCAAAATTGCACAGCAAGTTGGTGTAGAGCTCAACCTGTACCTAAC
CGAATCGACTACAGTATTCGGACCACAAATCACTTCACCTGCCTTAAACAAGCTGACTATTCAGGCAC
TTTACAATCTAGCTGGTGGGAATATGGATTACTTATTGACTAAGTTAGGTATAGGGAACAATCAACTC
AGCTCATTAATCGGTAGCGGCTTAATCACCGGTAACCCTATTCTATACGACTCACAGACTCAACTCTT
GGGTATACAGGTAACTCTACCTTCAGTCGGGAACCTAAATAATATGCGTGCCACCTACTTGGAAACCT
TATCCGTAAGCACAACCAGGGGATTTGCCTCGGCACTTGTCCCAAAAGTGGTGACACGGGTCGGTTCT

GTGATAGAAGAACTTGACACCTCATACTGTATAGAAACTGACTTAGATTTATATTGTACAAGAATAGT
AACGTTCCCTATGTCCCCTGGTATTTACTCCTGCTTGAGCGGCAATACATCGGCCTGTATGTACTCAA
AGACCGAAGGCGCACTTACTACACCATATATGACTATCAAAGGCTCAGTCATCGCTAACTGCAAGATG
ACAACATGTAGATGTGTAAACCCCCCGGGTATCATATCGCAAAACTATGGAGAAGCCGTGTCTCTAAT
AGATAAACAATCATGCAATGTTTTATCCTTAGGCGGGATAACTTTAAGGCTCAGTGGGGAATTCGATG
TAACTTATCAGAAGAATATCTCAATACAAGATTCTCAAGTAATAATAACAGGCAATCTTGATATCTCA
ACTGAGCTTGGGAATGTCAACAACTCGATCAGTAATGCCTTGAATAAGTTAGAGGAAAGCAACAGAAA
ACTAGACAAAGTCAATGTCAAACTGACCAGCACATCTGCTCTCATTACCTATATCGTTTTGACTATCA
TATCTCTTGTTTTTGGTATACTTAGCCTGATTCTAGCATGCTACCTAATGTACAAGCAAAAGGCGCAA
CAAAAGACCTTATTATGGCTTGGGAATAATACCCTAGATCAGATGAGAGCCACTACAAAAATGTGA

Proteína NDV F (SEQ ID NO: 8): (B1 Hitchner)

MDRSRLAPSRCRMGSRPSTKNPAPMMLTIRVALVLSCICPANSIDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSS
QTGSIIVKLLPNLPKDKEACAKAPLDAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGGGRQGRLIGAIIGG
VALGVATAAQITAAAALIQAKQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNK
TAQELDCIKIAQQVGVELNLYLTESTTVFGPQITSPALNKLTIQALYNLAGGNMDYLLTKLGIGNNQL
SSLIGSGLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGNLNNMRATYLETLSVSTTRGFASALVPKVVTRVGS
VIEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTTPYMTIKGSVIANCKM
TTCRCVNPPGIISQNYGEAVSLIDKQSCNVLSLGGITLRLSGEFDVTYQKNISIQDSQVIITGNLDIS
TELGNVNNSISNALNKLEESNRKLDKVNVKLTSTSALITYIVLTIISLVFGILSLILACYLMYKQKAQ
QKTLLWLGNNTLDQMRATTKM

Promotor ILTV gD (SEQ ID NO: 9)

AAACAGCTGTACTACAGAGTAACCGATGGAAGAACATCGGTCCAGCTAATGTGCCTGTCGTGCACGAG
CCATTCTCCGGAACCTTACTGTCTTTTCGACACGTCTCTTATAGCGAGGGAAAAAGATATCGCGCCAG
AGTTATACTTTACCTCTGATCCGCAAACGGCATACTGCACAATAACTCTGCCGTCCGGCGTTGTTCCG
AGATTCGAATGGAGCCTTAATAATGTTTCACTGCCGGAATATTTGACGGCCACGACCGTTGTTTCGCA
TACCGCTGGCCAAAGTACAGTGTGGAAGAGCAGCGCGAGAGCAGGCGAGGCGTGGATTTCTGGCCGGG
GAGGCAATATATACGAATGCACCGTCCTCATCTCAGACGGCACTCGCGTTACTACGCGAAAGGAGAGG
TGCTTAACAAACACATGGATTGCGGTGGAAAACGGTGCTGCTCAGGCGCAGCTGTATTCACTCTTTTC
TGGACTTGTGTCAGGATTATGCGGGAGCATATCTGCTTTGTACGCAACGCT

Promotor ILTV gI (SEQ ID NO: 10)

TGACTATTACAATGACATGCCCGCCGTGATCCCGGTGGAGGAGACTACTAAAAGTTCTAATGCCGTCT
CCATGCCCATATTCGCGGCGTTCGTAGCCTGCGCGGTCGCGCTCGTGGGGCTACTGGTTTGGAGCATC
GTAAAATGCGCGCGTAGCTAATCGAGCCTAGAATAGGTGGTTTCTTCCTACATGCCACGCCTCACGCT
CATAATATAAATCACATGGAATAGCATACCAATGCCTATTCATTGGGACGTTCGAAAAGC

Promotor hCMV IE (SEQ ID NO: 11): (truncado)

CGCGCCAGGTCAATTCCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTA
CATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGAT
AGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCAC
CAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGCGT
GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC
ACGCTGTTTTGACCTCCATA

Promotor hCMV IE (SEQ ID NO: 12): (Cepa Towne)

GTGAATAATAAAATGTGTGTTTGTCCGAAATACGCGTTTGAGATTTCTGTCCCGACTAAATTCATGTC
GCGCGATAGTGGTGTTTATCGCCGATAGAGATGGCGATATTGGAAAAATCGATATTTGAAAATATGGC
ATATTGAAAATGTCGCCGATGTGAGTTTCTGTGTAACTGATATCGCCATTTTTCCAAAAGTTGATTTT

TGGGCATACGCGATATCTGGCGATACGCTTATATCGTTTACGGGGGATGGCGATAGACGCCTTTGGTG
ACTTGGGCGATTCTGTGTGTCGCAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGATATGAGGCTATA
TCGCCGATAGAGGCGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTGAATCAATAT
TGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATAC
GTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATT
GATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTC
CGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTC
AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATT
TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTC
AATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA
GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTG
GATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGG
CACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAG
GCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCC
ATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGG

Señal de poliadenilación sintética (SEQ ID NO: 13)

GGAATTCTAGATCCCACGTCACTATTGTATACTCTATATTATACTCTATGTTATACTCTGTAATCCTA
CTCAATAAACGTGTCACGCCTGTGAAACCGTACTAAGTCTCCCGTGTCTTCTTATCACCATCAGGTGA
CATCCTCGCCCAGGCTGTCAATCATGCCGGTATCGATTCCAGTAGCACCGGCCCCACGCTGACAACCC
ACTCTTGCAGCGTTAGCAGCGCCCCTCTTAACAAGCCGACCCCCACCAGCGTCGCGGTTACTAACACT
CCTCTCCCC

Señal de poliadenilación HSV TK (SEQ ID NO: 14)

GGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGC
AATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAG
GGCTGGCACTCTGTCGATACCCCACCGAGACCCCATTGGGACCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTC
CCCACCCCAACCCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAAGCCCTG
CCATAGCCACGGGCCCCGTGGGTTAGGGACGGGGTCCCCCATGGGGAATGGTTTATGGTTCGTGGGGG
TTATTATTTTGGGCGTTGCGTGGGGTCAGGTCCACGACTGGACTGAGCAGACAGACCCATGGTTTTTG
GATGGCCTGGGCATGGACCGCATGTACTGGCGCGACACGAACACCGGGCGTCTGTGGCTGCCAAACAC
CCCCGACCCCCAAAAACCACCGCGCGGATTTCTGGCGCCGCCGGACG

Inserción de casete IE-NDV F (virus 1317-46) (SEQ ID NO: 15): (3593 pb)

TAATTAACCCGGGAAGCTTGCATGCCTGCAGTGAATAATAAAATGTGTGTTTGTCCGAAATACGCGTT
TGAGATTTCTGTCCCGACTAAATTCATGTCGCGCGATAGTGGTGTTTATCGCCGATAGAGATGGCGAT
ATTGGAAAAATCGATATTTGAAAATATGGCATATTGAAAATGTCGCCGATGTGAGTTTCTGTGTAACT
GATATCGCCATTTTTCCAAAAGTTGATTTTTGGGCATACGCGATATCTGGCGATACGCTTATATCGTT
TACGGGGGATGGCGATAGACGCCTTTGGTGACTTGGGCGATTCTGTGTGTCGCAAATATCGCAGTTTC
GATATAGGTGACAGACGATATGAGGCTATATCGCCGATAGAGGCGACATCAAGCTGGCACATGGCCAA
TGCATATCGATCTATACATTGAATCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATA
AATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCT
CATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGG
TCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTG
ACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTAT
CATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTA
CATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA
TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCAC
CCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTT

TAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGAC
CATGGATCGATCCCGGTTGGCGCCCTCCAGGTGCAGGATGGGCTCCAGACCTTCTACCAAGAACCCAG
CACCTATGATGCTGACTATCCGGGTCGCGCTGGTACTGAGTTGCATCTGTCCGGCAAACTCCATTGAT
GGCAGGCCTCTTGCAGCTGCAGGAATTGTGGTTACAGGAGACAAAGCAGTCAACATATACACCTCATC
CCAGACAGGATCAATCATAGTTAAGCTCCTCCCGAATCTGCCAAAGGATAAGGAGGCATGTGCGAAAG
CCCCCTTGGATGCATACAACAGGACATTGACCACTTTGCTCACCCCCCTTGGTGACTCTATCCGTAGG
ATACAAGAGTCTGTGACTACATCTGGAGGGGGGAGACAGGGGCGCCTTATAGGCGCCATTATTGGCGG
TGTGGCTCTTGGGGTTGCAACTGCCGCACAAATAACAGCGGCCGCAGCTCTGATACAAGCCAAACAAA
ATGCTGCCAACATCCTCCGACTTAAAGAGAGCATTGCCGCAACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACT
GACGGATTATCGCAACTAGCAGTGGCAGTTGGGAAGATGCAGCAGTTCGTTAATGACCAATTTAATAA
AACAGCTCAGGAATTAGACTGCATCAAAATTGCACAGCAAGTTGGTGTAGAGCTCAACCTGTACCTAA
CCGAATCGACTACAGTATTCGGACCACAAATCACTTCACCTGCCTTAAACAAGCTGACTATTCAGGCA
CTTTACAATCTAGCTGGTGGGAATATGGATTACTTATTGACTAAGTTAGGTATAGGGAACAATCAACT
CAGCTCATTAATCGGTAGCGGCTTAATCACCGGTAACCCTATTCTATACGACTCACAGACTCAACTCT
TGGGTATACAGGTAACTCTACCTTCAGTCGGGAACCTAAATAATATGCGTGCCACCTACTTGGAAACC
TTATCCGTAAGCACAACCAGGGGATTTGCCTCGGCACTTGTCCCAAAAGTGGTGACACGGGTCGGTTC
TGTGATAGAAGAACTTGACACCTCATACTGTATAGAAACTGACTTAGATTTATATTGTACAAGAATAG
TAACGTTCCCTATGTCCCCTGGTATTTACTCCTGCTTGAGCGGCAATACATCGGCCTGTATGTACTCA
AAGACCGAAGGCGCACTTACTACACCATATATGACTATCAAAGGCTCAGTCATCGCTAACTGCAAGAT
GACAACATGTAGATGTGTAAACCCCCCGGGTATCATATCGCAAAACTATGGAGAAGCCGTGTCTCTAA
TAGATAAACAATCATGCAATGTTTTATCCTTAGGCGGGATAACTTTAAGGCTCAGTGGGGAATTCGAT
GTAACTTATCAGAAGAATATCTCAATACAAGATTCTCAAGTAATAATAACAGGCAATCTTGATATCTC
AACTGAGCTTGGGAATGTCAACAACTCGATCAGTAATGCCTTGAATAAGTTAGAGGAAAGCAACAGAA
AACTAGACAAAGTCAATGTCAAACTGACCAGCACATCTGCTCTCATTACCTATATCGTTTTGACTATC
ATATCTCTTGTTTTTGGTATACTTAGCCTGATTCTAGCATGCTACCTAATGTACAAGCAAAAGGCGCA
ACAAAAGACCTTATTATGGCTTGGGAATAATACCCTAGATCAGATGAGAGCCACTACAAAAATGTGAA
CACAGATGAGGAACGAAGGTTTCCCTAATAGTAATTTGTGTGAAAGTTCTGGTAGTCTGTCAGTTCGG
AGAGTTAAGAAAAAAAAAAAACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTGGGTACGATCCTCTAGAGTC
GGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGC
AATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAG
GGCTGGCACTCTGTCGATACCCCACCGAGACCCCATTGGGACCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTC
CCCACCCCAACCCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAAGCCCTG
CCATAGCCACGGGCCCCGTGGGTTAGGGACGGGGTCCCCCATGGGGAATGGTTTATGGTTCGTGGGGG
TTATTATTTTGGGCGTTGCGTGGGGTCAGGTCCACGACTGGACTGAGCAGACAGACCCATGGTTTTTG
GATGGCCTGGGCATGGACCGCATGTACTGGCGCGACACGAACACCGGGCGTCTGTGGCTGCCAAACAC
CCCCGACCCCCAAAAACCACCGCGCGGATTTCTGGCGCCGCCGGACGTCGACTTAAT

Secuencia de inserción de ILTV (SEQ ID NO: 16) (fragmento *Sal*I - *Hind*III de 3563 bp):

gTCGACGGCAGAGTCGCAGACGCCCCTATTGGACGTCAAAATTGTAGAGGTGAAGTTTTCAAACGATG
GCGAAGTAACGGCGACTTGCGTTTCCACCGTCAAATCTCCCTATAGGGTAGAAACTAATTGGAAAGTA
GACCTCGTAGATGTAATGGATGAAATTTCTGGGAACAGTCCCGCCGGGGTTTTTAACAGTAATGAGAA
ATGGCAGAAACAGCTGTACTACAGAGTAACCGATGGAAGAACATCGGTCCAGCTAATGTGCCTGTCGT
GCACGAGCCATTCTCCGGAACCTTACTGTCTTTTCGACACGTCTCTTATAGCGAGGGAAAAAGATATC
GCGCCAGAGTTATACTTTACCTCTGATCCGCAAACGGCATACTGCACAATAACTCTGCCGTCCGGCGT
TGTTCCGAGATTCGAATGGAGCCTTAATAATGTTTCACTGCCGGAATATTTGACGGCCACGACCGTTG
TTTCGCATACCGCTGGCCAAAGTACAGTGTGGAAGAGCAGCGCGAGAGCAGGCGAGGCGTGGATTTCT
GGCCGGGGAGGCAATATATACGAATGCACCGTCCTCATCTCAGACGGCACTCGCGTTACTACGCGAAA
GGAGAGGTGCTTAACAAACACATGGATTGCGGTGGAAAACGGTGCTGCTCAGGCGCAGCTGTATTCAC
TCTTTTCTGGACTTGTGTCAGGATTATGCGGGAGCATATCTGCTTTGTACGCAACGCTATGGACCGCC
ATTTATTTTTGAGGAATGCTTTTTGGACTATCGTACTGCTTTCTTCCTTCGCTAGCCAGAGCACCGCC
GCCGTCACGTACGACTACATTTTAGGCCGTCGCGCGCTCGACGCGCTAACCATACCGGCGGTTGGCCC
GTATAACAGATACCTCACTAGGGTATCAAGAGGCTGCGACGTTGTCGAGCTCAACCCGATTTCTAACG
TGGACGACATGATATCGGCGGCCAAAGAAAAAGAGAAGGGGGGCCCTTTCGAGGCCTCCGTCGTCTGG
TTCTACGTGATTAAGGGCGACGACGGCGAGGACAAGTACTGTCCAATCTATAGAAAAGAGTACAGGGA

ATGTGGCGACGTACAACTGCTATCTGAATGCGCCGTTCAATCTGCACAGATGTGGGCAGTGGACTATG
TTCCTAGCACCCTTGTATCGCGAAATGGCGCGGGACTGACTATATTCTCCCCCACTGCTGCGCTCTCT
GGCCAATACTTGCTGACCCTGAAAATCGGGAGATTTGCGCAAACAGCTCTCGTAACTCTAGAAGTTAA
CGATCGCTGTTTAAAGATCGGGTCGCAGCTTAACTTTTTACCGTCGAAATGCTGGACAACAGAACAGT
ATCAGACTGGATTTCAAGGCGAACACCTTTATCCGATCGCAGACACCAATACACGACACGCGGACGAC
GTATATCGGGGATACGAAGATATTCTGCAGCGCTGGAATAATTTGCTGAGGAAAAAGAATCCTAGCGC
GCCAGACCCTCGTCCAGATAGCGTCCCGCAAGAAATTCCCGCTGTAACCAAGAAAGCGGAAGGGCGCA
CCCCGGACGCAGAAAGCAGCGAAAAGAAGGCCCCTCCAGAAGACTCGGAGGACGACATGCAGGCAGAG
GCTTCTGGAGAAAATCCTGCCGCCCTCCCCGAAGACGACGAAGTCCCCGAGGACACCGAGCACGATGA
TCCAAACTCGGATCCTGACTATTACAATGACATGCCCGCCGTGATCCCGGTGGAGGAGACTACTAAAA
GTTCTAATGCCGTCTCCATGCCCATATTCGCGGCGTTCGTAGCCTGCGCGGTCGCGCTCGTGGGGCTA
CTGGTTTGGAGCATCGTAAAATGCGCGCGTAGCTAATCGAGCCTAGAATAGGTGGTTTCTTCCTACAT
GCCACGCCTCACGCTCATAATATAAATCACATGGAATAGCATACCAATGCCTATTCATTGGGACGTTC
GAAAAGCATGGCATCGCTACTTGGAACTCTGGCTCTCCTTGCCGCGACGCTCGCACCCTTCGGCGCGA
TGGGAATCGTGATCACTGGAAATCACGTCTCCGCCAGGATTGACGACGATCACATCGTGATCGTCGCG
CCTCGCCCCGAAGCTACAATTCAACTGCAGCTATTTTTCATGCCTGGCCAGAGACCCCACAAACCCTA
CTCAGGAACCGTCCGCGTCGCGTTTCGGTCTGATATAACAAACCAGTGCTACCAGGAACTTAGCGAGG
AGCGCTTTGAAAATTGCACTCATCGATCGTCTTCTGTTTTTGTCGGCTGTAAAGTGACCGAGTACACG
TTCTCCGCCTCGAACAGACTAACCGGACCTCCACACCCGTTTAAGCTCACTATACGAAATCCTCGTCC
GAACGACAGCGGGATGTTCTACGTAATTGTTCGGCTAGACGACACCAAAGAACCCATTGACGTCTTCG
CGATCCAACTATCGGTGTATCAATTCGCGAACACCGCCGCGACTCGCGGACTCTATTCCAAGGCTTCG
TGTCGCACCTTCGGATTACCTACCGTCCAACTTGAGGCCTATCTCAGGACCGAGGAAAGTTGGCGCAA
CTGGCAAGCGTACGTTGCCACGGAGGCCACGACGACCAGCGCCGAGGCGACAACCCCGACGCCCGTCA
CTGCAACCAGCGCCTCCGAACTTGAAGCGGAACACTTTACCTTTCCCTGGCTAGAAAATGGCGTGGAT
CATTACGAACCGACACCCGCAAACGAAAATTCAAACGTTACTGTCCGTCTCGGGACAATGAGCCCTAC
GCTAATTGGGGTAACCGTGGCTGCCGTCGTGAGCGCAACGATCGGCCTCGTCATTGTAATTTCCATCG
TCACCAGAAACATGTGCACCCCGCACCGAAAATTAGACACGGTCTCGCAAGACGACGAAGAACGTTCC
CAAACTAGAAGGGAATCGCGAAAATTTGGACCCATGGTTGCGTGCGAAATAAACAAGGGGGCTGACCA
GGATAGTGAACTTGTGGAACTGGTTGCGATTGTTAACCCGTCTGCGCTAAGCTCGCCCGACTCAATAA
AAATGTGATTAAGTCTGAATGTGGCTCTCCAATCATTTCGATTCTCTAATCTCCCAATCCTCTCAAAA
GGGGCAGTATCGGACACGGACTGGGAGGGGCGTACACGATAGTTATATGGTACAGCAGAGGCCTCTGA
ACACTTAGGAGGAGAATTCAGCCGGGGAGAGCCCCTGTTGAGTAGGCTTGGGAGCATATTGCAGGATG
AACATGTTAGTGATAGTTCTCGCCTCTTGTCTTGCGCGCCTAACTTTTGCGACGCGACACGTCCTCTT
TTTGGAAGGCACTCAGGCTGTCCTCGGGGAAGATGATCCCAGAAACGTTCCGGAAGGGACTGTAATCA
AATGGACAAAAGTCCTGCGGAACGCGTGCAAGATGAAGGCGGCCGATGTCTGCTCTTCGCCTAACTAT
TGCTTTCATGATTTAATTTACGACGGAGGAAAGAAAGACTGCCCGCCCGCGGGACCCCTGTCTGCAAA
CCTGGTAATTTTACTAAAGCGCGGCGAAagctt

Inserción de casete de expresión dual (SEQ ID NO: 17): 5920 pb

gTCGACGGCAGAGTCGCAGACGCCCCTATTGGACGTCAAAATTGTAGAGGTGAAGTTTTCAAACGATG
GCGAAGTAACGGCGACTTGCGTTTCCACCGTCAAATCTCCCTATAGGGTAGAAACTAATTGGAAAGTA
GACCTCGTAGATGTAATGGATGAAATTTCTGGGAACAGTCCCGCCGGGGTTTTTAACAGTAATGAGAA
ATGGCAGAAACAGCTGTACTACAGAGTAACCGATGGAAGAACATCGGTCCAGCTAATGTGCCTGTCGT
GCACGAGCCATTCTCCGGAACCTTACTGTCTTTTCGACACGTCTCTTATAGCGAGGGAAAAAGATATC
GCGCCAGAGTTATACTTTACCTCTGATCCGCAAACGGCATACTGCACAATAACTCTGCCGTCCGGCGT
TGTTCCGAGATTCGAATGGAGCCTTAATAATGTTTCACTGCCGGAATATTTGACGGCCACGACCGTTG
TTTCGCATACCGCTGGCCAAAGTACAGTGTGGAAGAGCAGCGCGAGAGCAGGCGAGGCGTGGATTTCT
GGCCGGGGAGGCAATATATACGAATGCACCGTCCTCATCTCAGACGGCACTCGCGTTACTACGCGAAA
GGAGAGGTGCTTAACAAACACATGGATTGCGGTGGAAAACGGTGCTGCTCAGGCGCAGCTGTATTCAC
TCTTTTCTGGACTTGTGTCAGGATTATGCGGGAGCATATCTGCTTTGTACGCAACGCTATGGACCGCC
ATTTATTTTTGAGGAATGCTTTTTGGACTATCGTACTGCTTTCTTCCTTCGCTAGCCAGAGCACCGCC
GCCGTCACGTACGACTACATTTTAGGCCGTCGCGCGCTCGACGCGCTAACCATACCGGCGGTTGGCCC
GTATAACAGATACCTCACTAGGGTATCAAGAGGCTGCGACGTTGTCGAGCTCAACCCGATTTCTAACG

TGGACGACATGATATCGGCGGCCAAAGAAAAAGAGAAGGGGGGCCCTTTCGAGGCCTCCGTCGTCTGG
TTCTACGTGATTAAGGGCGACGACGGCGAGGACAAGTACTGTCCAATCTATAGAAAAGAGTACAGGGA
ATGTGGCGACGTACAACTGCTATCTGAATGCGCCGTTCAATCTGCACAGATGTGGGCAGTGGACTATG
TTCCTAGCACCCTTGTATCGCGAAATGGCGCGGGACTGACTATATTCTCCCCCACTGCTGCGCTCTCT
GGCCAATACTTGCTGACCCTGAAAATCGGGAGATTTGCGCAAACAGCTCTCGTAACTCTAGAAGTTAA
CGATCGCTGTTTAAAGATCGGGTCGCAGCTTAACTTTTTACCGTCGAAATGCTGGACAACAGAACAGT
ATCAGACTGGATTTCAAGGCGAACACCTTTATCCGATCGCAGACACCAATACACGACACGCGGACGAC
GTATATCGGGGATACGAAGATATTCTGCAGCGCTGGAATAATTTGCTGAGGAAAAAGAATCCTAGCGC
GCCAGACCCTCGTCCAGATAGCGTCCCGCAAGAAATTCCCGCTGTAACCAAGAAAGCGGAAGGGCGCA
CCCCGGACGCAGAAAGCAGCGAAAAGAAGGCCCCTCCAGAAGACTCGGAGGACGACATGCAGGCAGAG
GCTTCTGGAGAAAATCCTGCCGCCCTCCCCGAAGACGACGAAGTCCCCGAGGACACCGAGCACGATGA
TCCAAACTCGGATCCTGACTATTACAATGACATGCCCGCCGTGATCCCGGTGGAGGAGACTACTAAAA
GTTCTAATGCCGTCTCCATGCCCATATTCGCGGCGTTCGTAGCCTGCGCGGTCGCGCTCGTGGGGCTA
CTGGTTTGGAGCATCGTAAAATGCGCGCGTAGCTAATCGAGCCTAGAATAGGTGGTTTCTTCCTACAT
GCCACGCCTCACGCTCATAATATAAATCACATGGAATAGCATACCAATGCCTATTCATTGGGACGTTC
GAAAAGCATGGCATCGCTACTTGGAACTCTGGCTCTCCTTGCCGCGACGCTCGCACCCTTCGGCGCGA
TGGGAATCGTGATCACTGGAAATCACGTCTCCGCCAGGATTGACGACGATCACATCGTGATCGTCGCG
CCTCGCCCCGAAGCTACAATTCAACTGCAGCTATTTTTCATGCCTGGCCAGAGACCCCACAAACCCTA
CTCAGGAACCGTCCGCGTCGCGTTTCGGTCTGATATAACAAACCAGTGCTACCAGGAACTTAGCGAGG
AGCGCTTTGAAAATTGCACTCATCGATCGTCTTCTGTTTTTGTCGGCTGTAAAGTGACCGAGTACACG
TTCTCCGCCTCGAACAGACTAACCGGACCTCCACACCCGTTTAAGCTCACTATACGAAATCCTCGTCC
GAACGACAGCGGGATGTTCTACGTAATTGTTCGGCTAGACGACACCAAAGAACCCATTGACGTCTTCG
CGATCCAACTATCGGTGTATCAATTCGCGAACACCGCCGCGACTCGCGGACTCTATTCCAAGGCTTCG
TGTCGCACCTTCGGATTACCTACCGTCCAACTTGAGGCCTATCTCAGGACCGAGGAAAGTTGGCGCAA
CTGGCAAGCGTACGTTGCCACGGAGGCCACGACGACCAGCGCCGAGGCGACAACCCCGACGCCCGTCA
CTGCAACCAGCGCCTCCGAACTTGAAGCGGAACACTTTACCTTTCCCTGGCTAGAAAATGGCGTGGAT
CATTACGAACCGACACCCGCAAACGAAAATTCAAACGTTACTGTCCGTCTCGGGACAATGAGCCCTAC
GCTAATTGGGGTAACCGTGGCTGCCGTCGTGAGCGCAACGATCGGCCTCGTCATTGTAATTTCCATCG
TCACCAGAAACATGTGCACCCCGCACCGAAAATTAGACACGGTCTCGCAAGACGACGAAGAACGTTCC
CAAACTAGAAGGGAATCGCGAAAATTTGGACCCATGGTTGCGTGCGAAATAAACAAGGGGGCTGACCA
GGATAGTGAACTTGTGGAACTGGTTGCGATTGTTAACCCGTCTGCGCTAAGCTCGCCCGACTCAATAA
AAATGTGATTAAGTCTGAATGTGGCTCTCCAATCATTTCGATTCTCTAATCTCCCAATCCTCTCAAAA
GGGGCAGTATCGGACACGGACTGGGAGGGGCGTACACGATAGTTATATGGTACAGCAGAGGCCTCTGA
ACACTTAGGAGGAGAATTCAGCCGGGGAGAGCCCCTGTTGAGTAGGCTTGGGAGCATATTGCAGGATG
AACATGTTAGTGATAGTTCTCGCCTCTTGTCTTGCGCGCCTAACTTTTGCGACGCGACACGTCCTCTT
TTTGGAAGGCACTCAGGCTGTCCTCGGGGAAGATGATCCCAGAAACGTTCCGGAAGGGACTGTAATCA
AATGGACAAAAGTCCTGCGGAACGCGTGCAAGATGAAGGCGGCCGATGTCTGCTCTTCGCCTAACTAT
TGCTTTCATGATTTAATTTACGACGGAGGAAAGAAAGACTGCCCGCCCGCGGGACCCCTGTCTGCAAA
CCTGGTAATTTTACTAAAGCGCGGCGAAAGCTTCGCGCCAGGTCAATTCCCTGGCATTATGCCCAGTA
CATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA
TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCAC
CCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTT
AGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGTTGC
GCCGCCACCATGGGCCCCAGACCTTCTACCAAGAACCCAGTACCTATGATGCTGACTGTCCGAGTCGC
GCTGGTACTGAGTTGCATCTGTCCGGCAAACTCCATTGATGGCAGGCCTCTTGCGGCTGCAGGAATTG
TGGTTACAGGAGACAAAGCCGTCAACATATACACCTCATCCCAGACAGGATCAATCATAGTTAAGCTC
CTCCCGAATCTGCCCAAGGATAAGGAGGCATGTGCGAAAGCCCCCTTGGATGCATACAACAGGACATT
GACCACTTTGCTCACCCCCCTTGGTGACTCTATCCGTAGGATACAAGAGTCTGTGACTACATCTGGAG
GGGGGAGACAGGGGCGCCTTATAGGCGCCATTATTGGCGGTGTGGCTCTTGGGGTTGCAACTGCCGCA
CAAATAACAGCGGCCGCAGCTCTGATACAAGCCAAACAAAATGCTGCCAACATCCTCCGACTTAAAGA
GAGCATTGCCGCAACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCGCAACTAGCAGTGGCAG
TTGGGAAGATGCAGCAGTTTGTTAATGACCAATTTAATAAAACAGCTCAGGAATTAGACTGCATCAAA
ATTGCACAGCAAGTTGGTGTAGAGCTCAACCTGTACCTAACCGAATTGACTACAGTATTCGGACCACA
AATCACTTCACCTGCTTTAAACAAGCTGACTATTCAGGCACTTTACAATCTAGCTGGTGGAAATATGG

ATTACTTATTGACTAAGTTAGGTGTAGGGAACAATCAACTCAGCTCATTAATCGGTAGCGGCTTAATC
ACCGGTAACCCTATTCTATACGACTCACAGACTCAACTCTTGGGTATACAGGTAACTCTACCTTCAGT
CGGGAAGCTAAATAATATGCGTGCCACCTACTTGGAAACCTTATCCGTAAGCACAACCAGGGGATTTG
CCTCGGCACTTGTCCCAAAAGTGGTGACACAGGTCGGTTCTGTGATAGAAGAACTTGACACCTCATAC
TGTATAGAAACTGACTTACATTTATATTGTACAAGAATAGTAACGTTCCCTATGTCCCCTGGTATTTA
TTCCTGCTTGAGCGGCAATACGTCGGCCTGTATGTACTCAAAGACCGAAGGCGCACTTACTACACCAT
ACATGACTATCAAAGGTTCAGTCATCGCCAACTGCAAGATGACAACATGTAGATGTGTAAACCCCCCG
GGTATCATATCGCAAAACTATGGAGAAGCCGTGTCTCTAATAGATAAACAATCATGCAATGTTTTATC
CTTAGGCGGGATAACTTTAAGGCTCAGTGGGGAATTCGATGTAACTTATCAGAAGAATATCTCAATAC
AAGATTCTCAAGTAATAATAACAGGCAATCTTGATATCTCAACTGAGCTTGGGAATGTCAACAACTCG
ATCAGTAATGCTTTGAATAAGTTAGAGGAAAGCAACAGAAAACTAGACAAAGTCAATGTCAAACTGAC
TAGCACATCTGCTCTCATTACCTATATCGTGTTGACTATCATATCTCTTGTTTTTGGTATACTTAGCC
TGATTCTAGCATGCTACCTAATGTACAAGCAAAAGGCGCAACAAAAGACCTTATTATGGCTTGGGAAT
AATACTCTAGATCAGATGAGAGCCACTACAAAAATGTGAGGATCTCTCGAGGAATTCTAGATCCCACG
TCACTATTGTATACTCTATATTATACTCTATGTTATACTCTGTAATCCTACTCAATAAACGTGTCACG
CCTGTGAAACCGTACTAAGTCTCCCGTGTCTTCTTATCACCATCAGGTGACATCCTCGCCCAGGCTGT
CAATCATGCCGGTATCGATTCCAGTAGCACCGGCCCCACGCTGACAACCCACTCTTGCAGCGTTAGCA
GCGCCCCTCTTAACAAGCCGACCCCCACCAGCGTCGCGGTTACTAACACTCCTCTCCCCGACCTGCAA
CTAGT

El alcance de la presente invención no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. En el sentido más amplio, la invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos, y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionas para la descripción.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Intervet International BV Cook, Stephanie Morsey, Mohamad Petersen, Gary Sondermeijer, Paulus JA

<120>CONSTRUCCIONES DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE MAREK RECOMBINANTES NO PATÓGENAS QUE CODIFICAN ANTÍGENOS DEL VIRUS DE LA LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA Y DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

<130> 2011.029-US-PCT

<150> 61/549.844
<151> 21/10/2011

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1305
<212> ADN
<213> Virus de la laringotraqueitis infecciosa

<400> 1

atgcaccgtc ctcatctcag acggcactcg cgttactacg cgaaaggaga ggtgcttaac 60

aaacacatgg attgcggtgg aaaacggtgc tgctcaggcg cagctgtatt cactcttttc 120

tggacttgtg tcaggattat gcgggagcat atctgctttg tacgcaacgc tatggaccgc 180

catttatttt tgaggaatgc tttttggact atcgtactgc tttcttcctt cgctagccag 240

agcaccgccg ccgtcacgta cgactacatt ttaggccgtc gcgcgctcga cgcgctaacc 300

ataccggcgg ttggcccgta taacagatac ctcactaggg tatcaagagg ctgcgacgtt 360

gtcgagctca acccgatttc taacgtggac gacatgatat cggcggccaa agaaaaagag 420

aaggggggcc ctttcgaggc ctccgtcgtc tggttctacg tgattaaggg cgacgacggc 480

gaggacaagt actgtccaat ctatagaaaa gagtacaggg aatgtggcga cgtacaactg 540

ctatctgaat gcgccgttca atctgcacag atgtgggcag tggactatgt tcctagcacc 600

cttgtatcgc gaaatggcgc gggactgact atattctccc ccactgctgc gctctctggc 660

caatacttgc tgaccctgaa aatcgggaga tttgcgcaaa cagctctcgt aactctagaa 720

gttaacgatc gctgtttaaa gatcgggtcg cagcttaact ttttaccgtc gaaatgctgg 780

acaacagaac agtatcagac tggatttcaa ggcgaacacc tttatccgat cgcagacacc 840

aatacacgac acgcggacga cgtatatcgg ggatacgaag atattctgca gcgctggaat 900

aatttgctga ggaaaaagaa tcctagcgcg ccagaccctc gtccagatag cgtcccgcaa 960

gaaattcccg ctgtaaccaa gaaagcggaa gggcgcaccc cggacgcaga aagcagcgaa 1020

aagaaggccc ctccagaaga ctcggaggac gacatgcagg cagaggcttc tggagaaaat 1080

cctgccgccc tccccgaaga cgacgaagtc cccgaggaca ccgagcacga tgatccaaac 1140

tcggatcctg actattacaa tgacatgccc gccgtgatcc cggtggagga gactactaaa 1200

agttctaatg ccgtctccat gcccatattc gcggcgttcg tagcctgcgc ggtcgcgctc 1260

gtggggctac tggtttggag catcgtaaaa tgcgcgcgta gctaa 1305

<210> 2
<211> 434
<212> PRT
<213> Virus de la laringotraqueitis infecciosa

<400> 2

```
Met His Arg Pro His Leu Arg Arg His Ser Arg Tyr Tyr Ala Lys Gly
1               5                  10                  15

Glu Val Leu Asn Lys His Met Asp Cys Gly Gly Lys Arg Cys Cys Ser
            20                  25                  30

Gly Ala Ala Val Phe Thr Leu Phe Trp Thr Cys Val Arg Ile Met Arg
        35                  40                  45

Glu His Ile Cys Phe Val Arg Asn Ala Met Asp Arg His Leu Phe Leu
    50                  55                  60

Arg Asn Ala Phe Trp Thr Ile Val Leu Leu Ser Ser Phe Ala Ser Gln
65                  70                  75                  80

Ser Thr Ala Ala Val Thr Tyr Asp Tyr Ile Leu Gly Arg Arg Ala Leu
                85                  90                  95

Asp Ala Leu Thr Ile Pro Ala Val Gly Pro Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr
            100                 105                 110

Arg Val Ser Arg Gly Cys Asp Val Val Glu Leu Asn Pro Ile Ser Asn
        115                 120                 125

Val Asp Asp Met Ile Ser Ala Ala Lys Glu Lys Glu Lys Gly Gly Pro
    130                 135                 140

Phe Glu Ala Ser Val Val Trp Phe Tyr Val Ile Lys Gly Asp Asp Gly
145                 150                 155                 160

Glu Asp Lys Tyr Cys Pro Ile Tyr Arg Lys Glu Tyr Arg Glu Cys Gly
                165                 170                 175

Asp Val Gln Leu Leu Ser Glu Cys Ala Val Gln Ser Ala Gln Met Trp
            180                 185                 190
```

```
Ala Val Asp Tyr Val Pro Ser Thr Leu Val Ser Arg Asn Gly Ala Gly
        195                 200                 205

Leu Thr Ile Phe Ser Pro Thr Ala Ala Leu Ser Gly Gln Tyr Leu Leu
    210                 215                 220

Thr Leu Lys Ile Gly Arg Phe Ala Gln Thr Ala Leu Val Thr Leu Glu
225                 230                 235                 240

Val Asn Asp Arg Cys Leu Lys Ile Gly Ser Gln Leu Asn Phe Leu Pro
                245                 250                 255

Ser Lys Cys Trp Thr Thr Glu Gln Tyr Gln Thr Gly Phe Gln Gly Glu
            260                 265                 270

His Leu Tyr Pro Ile Ala Asp Thr Asn Thr Arg His Ala Asp Asp Val
        275                 280                 285

Tyr Arg Gly Tyr Glu Asp Ile Leu Gln Arg Trp Asn Asn Leu Leu Arg
    290                 295                 300

Lys Lys Asn Pro Ser Ala Pro Asp Pro Arg Pro Asp Ser Val Pro Gln
305                 310                 315                 320

Glu Ile Pro Ala Val Thr Lys Lys Ala Glu Gly Arg Thr Pro Asp Ala
                325                 330                 335

Glu Ser Ser Glu Lys Lys Ala Pro Pro Glu Asp Ser Glu Asp Asp Met
            340                 345                 350

Gln Ala Glu Ala Ser Gly Glu Asn Pro Ala Ala Leu Pro Glu Asp Asp
        355                 360                 365

Glu Val Pro Glu Asp Thr Glu His Asp Asp Pro Asn Ser Asp Pro Asp
    370                 375                 380

Tyr Tyr Asn Asp Met Pro Ala Val Ile Pro Val Glu Glu Thr Thr Lys
385                 390                 395                 400

Ser Ser Asn Ala Val Ser Met Pro Ile Phe Ala Ala Phe Val Ala Cys
                405                 410                 415

Ala Val Ala Leu Val Gly Leu Leu Val Trp Ser Ile Val Lys Cys Ala
            420                 425                 430

Arg Ser
```

<210> 3
<211> 1089
<212> ADN
<213> Virus de la laringotraqueitis infecciosa

<400> 3

atggcatcgc tacttggaac tctggctctc cttgccgcga cgctcgcacc cttcggcgcg 60

atgggaatcg tgatcactgg aaatcacgtc tccgccagga ttgacgacga tcacatcgtg 120

atcgtcgcgc ctcgccccga agctacaatt caactgcagc tatttttcat gcctggccag 180

agaccccaca aaccctactc aggaaccgtc cgcgtcgcgt ttcggtctga tataacaaac 240

cagtgctacc aggaacttag cgaggagcgc tttgaaaatt gcactcatcg atcgtcttct 300

gtttttgtcg gctgtaaagt gaccgagtac acgttctccg cctcgaacag actaaccgga 360

cctccacacc cgtttaagct cactatacga aatcctcgtc cgaacgacag cgggatgttc 420

tacgtaattg ttcggctaga cgacaccaaa gaacccattg acgtcttcgc gatccaacta 480

tcggtgtatc aattcgcgaa caccgccgcg actcgcggac tctattccaa ggcttcgtgt 540

cgcaccttcg gattacctac cgtccaactt gaggcctatc tcaggaccga ggaaagttgg 600

cgcaactggc aagcgtacgt tgccacggag gccacgacga ccagcgccga ggcgacaacc 660

ccgacgcccg tcactgcaac cagcgcctcc gaacttgaag cggaacactt tacctttccc 720

tggctagaaa atggcgtgga tcattacgaa ccgacacccg caaacgaaaa ttcaaacgtt 780

actgtccgtc tcgggacaat gagccctacg ctaattgggg taaccgtggc tgccgtcgtg 840

agcgcaacga tcggcctcgt cattgtaatt tccatcgtca ccagaaacat gtgcaccccg 900

caccgaaaat tagacacggt ctcgcaagac gacgaagaac gttcccaaac tagaagggaa 960

tcgcgaaaat ttggacccat ggttgcgtgc gaaataaaca agggggctga ccaggatagt 1020

gaacttgtgg aactggttgc gattgttaac ccgtctgcgc taagctcgcc cgactcaata 1080

aaaatgtga 1089

<210> 4
<211> 362
<212> PRT
<213> Virus de la laringotraqueitis infecciosa

<400> 4

Met Ala Ser Leu Leu Gly Thr Leu Ala Leu Leu Ala Ala Thr Leu Ala
1 5 10 15

Pro Phe Gly Ala Met Gly Ile Val Ile Thr Gly Asn His Val Ser Ala
20 25 30

Arg Ile Asp Asp Asp His Ile Val Ile Val Ala Pro Arg Pro Glu Ala

```
        35                  40                  45

Thr Ile Gln Leu Gln Leu Phe Phe Met Pro Gly Gln Arg Pro His Lys
    50                  55                  60

Pro Tyr Ser Gly Thr Val Arg Val Ala Phe Arg Ser Asp Ile Thr Asn
65                  70                  75                  80

Gln Cys Tyr Gln Glu Leu Ser Glu Glu Arg Phe Glu Asn Cys Thr His
                85                  90                  95

Arg Ser Ser Ser Val Phe Val Gly Cys Lys Val Thr Glu Tyr Thr Phe
            100                 105                 110

Ser Ala Ser Asn Arg Leu Thr Gly Pro Pro His Pro Phe Lys Leu Thr
        115                 120                 125

Ile Arg Asn Pro Arg Pro Asn Asp Ser Gly Met Phe Tyr Val Ile Val
    130                 135                 140

Arg Leu Asp Asp Thr Lys Glu Pro Ile Asp Val Phe Ala Ile Gln Leu
145                 150                 155                 160

Ser Val Tyr Gln Phe Ala Asn Thr Ala Ala Thr Arg Gly Leu Tyr Ser
                165                 170                 175

Lys Ala Ser Cys Arg Thr Phe Gly Leu Pro Thr Val Gln Leu Glu Ala
            180                 185                 190

Tyr Leu Arg Thr Glu Glu Ser Trp Arg Asn Trp Gln Ala Tyr Val Ala
        195                 200                 205

Thr Glu Ala Thr Thr Thr Ser Ala Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Val
    210                 215                 220

Thr Ala Thr Ser Ala Ser Glu Leu Glu Ala Glu His Phe Thr Phe Pro
225                 230                 235                 240

Trp Leu Glu Asn Gly Val Asp His Tyr Glu Pro Thr Pro Ala Asn Glu
                245                 250                 255

Asn Ser Asn Val Thr Val Arg Leu Gly Thr Met Ser Pro Thr Leu Ile
            260                 265                 270

Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val Ser Ala Thr Ile Gly Leu Val Ile
        275                 280                 285
```

```
Val Ile Ser Ile Val Thr Arg Asn Met Cys Thr Pro His Arg Lys Leu
    290                 295                 300

Asp Thr Val Ser Gln Asp Asp Glu Glu Arg Ser Gln Thr Arg Arg Glu
305                 310                 315                 320

Ser Arg Lys Phe Gly Pro Met Val Ala Cys Glu Ile Asn Lys Gly Ala
                325                 330                 335

Asp Gln Asp Ser Glu Leu Val Glu Leu Val Ala Ile Val Asn Pro Ser
            340                 345                 350

Ala Leu Ser Ser Pro Asp Ser Ile Lys Met
        355                 360
```

<210> 5
<211> 1662
<212> ADN
<213> Virus de la enfermedad de Newcastle

<400> 5

```
atgggcccca gaccttctac caagaaccca gtacctatga tgctgactgt ccgagtcgcg      60

ctggtactga gttgcatctg tccggcaaac tccattgatg gcaggcctct tgcggctgca     120

ggaattgtgg ttacaggaga caaagccgtc aacatataca cctcatccca gacaggatca     180

atcatagtta agctcctccc gaatctgccc aaggataagg aggcatgtgc gaaagccccc     240

ttggatgcat acaacaggac attgaccact ttgctcaccc cccttggtga ctctatccgt     300

aggatacaag agtctgtgac tacatctgga ggggggagac aggggcgcct tataggcgcc     360

attattggcg gtgtggctct tggggttgca actgccgcac aaataacagc ggccgcagct     420

ctgatacaag ccaaacaaaa tgctgccaac atcctccgac ttaaagagag cattgccgca     480

accaatgagg ctgtgcatga ggtcactgac ggattatcgc aactagcagt ggcagttggg     540

aagatgcagc agtttgttaa tgaccaattt aataaaacag ctcaggaatt agactgcatc     600

aaaattgcac agcaagttgg tgtagagctc aacctgtacc taaccgaatt gactacagta     660

ttcggaccac aaatcacttc acctgcttta aacaagctga ctattcaggc actttacaat     720

ctagctggtg gaaatatgga ttacttattg actaagttag gtgtagggaa caatcaactc     780

agctcattaa tcggtagcgg cttaatcacc ggtaacccta ttctatacga ctcacagact     840

caactcttgg gtatacaggt aactctacct tcagtcggga agctaaataa tatgcgtgcc     900

acctacttgg aaaccttatc cgtaagcaca accaggggat ttgcctcggc acttgtccca     960

aaagtggtga cacaggtcgg ttctgtgata gaagaacttg acacctcata ctgtatagaa    1020

actgacttac atttatattg tacaagaata gtaacgttcc ctatgtcccc tggtatttat    1080

tcctgcttga gcggcaatac gtcggcctgt atgtactcaa agaccgaagg cgcacttact    1140
```

acaccataca tgactatcaa aggttcagtc atcgccaact gcaagatgac aacatgtaga 1200

tgtgtaaacc ccccgggtat catatcgcaa aactatggag aagccgtgtc tctaatagat 1260

aaacaatcat gcaatgtttt atccttaggc gggataactt taaggctcag tggggaattc 1320

gatgtaactt atcagaagaa tatctcaata caagattctc aagtaataat aacaggcaat 1380

cttgatatct caactgagct tgggaatgtc aacaactcga tcagtaatgc tttgaataag 1440

ttagaggaaa gcaacagaaa actagacaaa gtcaatgtca aactgactag cacatctgct 1500

ctcattacct atatcgtgtt gactatcata tctcttgttt ttggtatact tagcctgatt 1560

ctagcatgct acctaatgta caagcaaaag gcgcaacaaa agaccttatt atggcttggg 1620

aataatactc tagatcagat gagagccact acaaaaatgt ga 1662

<210> 6
<211> 553
<212> PRT
<213> Virus de la enfermedad de Newcastle

<400> 6

Met Gly Pro Arg Pro Ser Thr Lys Asn Pro Val Pro Met Met Leu Thr
1 5 10 15

Val Arg Val Ala Leu Val Leu Ser Cys Ile Cys Pro Ala Asn Ser Ile
20 25 30

Asp Gly Arg Pro Leu Ala Ala Ala Gly Ile Val Val Thr Gly Asp Lys
35 40 45

Ala Val Asn Ile Tyr Thr Ser Ser Gln Thr Gly Ser Ile Ile Val Lys
50 55 60

Leu Leu Pro Asn Leu Pro Lys Asp Lys Glu Ala Cys Ala Lys Ala Pro
65 70 75 80

Leu Asp Ala Tyr Asn Arg Thr Leu Thr Thr Leu Leu Thr Pro Leu Gly
85 90 95

Asp Ser Ile Arg Arg Ile Gln Glu Ser Val Thr Thr Ser Gly Gly Gly
100 105 110

Arg Gln Gly Arg Leu Ile Gly Ala Ile Ile Gly Gly Val Ala Leu Gly
115 120 125

Val Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ile Gln Ala
130 135 140

```
Lys Gln Asn Ala Ala Asn Ile Leu Arg Leu Lys Glu Ser Ile Ala Ala
145                 150                 155                 160

Thr Asn Glu Ala Val His Glu Val Thr Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ala
                165                 170                 175

Val Ala Val Gly Lys Met Gln Gln Phe Val Asn Asp Gln Phe Asn Lys
            180                 185                 190

Thr Ala Gln Glu Leu Asp Cys Ile Lys Ile Ala Gln Gln Val Gly Val
        195                 200                 205

Glu Leu Asn Leu Tyr Leu Thr Glu Leu Thr Thr Val Phe Gly Pro Gln
    210                 215                 220

Ile Thr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Leu Thr Ile Gln Ala Leu Tyr Asn
225                 230                 235                 240

Leu Ala Gly Gly Asn Met Asp Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Gly Val Gly
                245                 250                 255

Asn Asn Gln Leu Ser Ser Leu Ile Gly Ser Gly Leu Ile Thr Gly Asn
            260                 265                 270

Pro Ile Leu Tyr Asp Ser Gln Thr Gln Leu Leu Gly Ile Gln Val Thr
        275                 280                 285

Leu Pro Ser Val Gly Lys Leu Asn Asn Met Arg Ala Thr Tyr Leu Glu
    290                 295                 300

Thr Leu Ser Val Ser Thr Thr Arg Gly Phe Ala Ser Ala Leu Val Pro
305                 310                 315                 320

Lys Val Val Thr Gln Val Gly Ser Val Ile Glu Glu Leu Asp Thr Ser
                325                 330                 335

Tyr Cys Ile Glu Thr Asp Leu His Leu Tyr Cys Thr Arg Ile Val Thr
            340                 345                 350

Phe Pro Met Ser Pro Gly Ile Tyr Ser Cys Leu Ser Gly Asn Thr Ser
        355                 360                 365

Ala Cys Met Tyr Ser Lys Thr Glu Gly Ala Leu Thr Thr Pro Tyr Met
    370                 375                 380

Thr Ile Lys Gly Ser Val Ile Ala Asn Cys Lys Met Thr Thr Cys Arg
385                 390                 395                 400
```

```
Cys Val Asn Pro Pro Gly Ile Ile Ser Gln Asn Tyr Gly Glu Ala Val
                405                 410                 415

Ser Leu Ile Asp Lys Gln Ser Cys Asn Val Leu Ser Leu Gly Gly Ile
            420                 425                 430

Thr Leu Arg Leu Ser Gly Glu Phe Asp Val Thr Tyr Gln Lys Asn Ile
        435                 440                 445

Ser Ile Gln Asp Ser Gln Val Ile Ile Thr Gly Asn Leu Asp Ile Ser
    450                 455                 460

Thr Glu Leu Gly Asn Val Asn Asn Ser Ile Ser Asn Ala Leu Asn Lys
465                 470                 475                 480

Leu Glu Glu Ser Asn Arg Lys Leu Asp Lys Val Asn Val Lys Leu Thr
                485                 490                 495

Ser Thr Ser Ala Leu Ile Thr Tyr Ile Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu
            500                 505                 510

Val Phe Gly Ile Leu Ser Leu Ile Leu Ala Cys Tyr Leu Met Tyr Lys
        515                 520                 525

Gln Lys Ala Gln Gln Lys Thr Leu Leu Trp Leu Gly Asn Asn Thr Leu
    530                 535                 540

Asp Gln Met Arg Ala Thr Thr Lys Met
545                 550
```

<210> 7
<211> 1698
<212> ADN
<213> Virus de la enfermedad de Newcastle

<400> 7

```
atggatcgat cccggttggc gccctccagg tgcaggatgg gctccagacc ttctaccaag      60

aacccagcac ctatgatgct gactatccgg gtcgcgctgg tactgagttg catctgtccg     120

gcaaactcca ttgatggcag gcctcttgca gctgcaggaa ttgtggttac aggagacaaa     180

gcagtcaaca tatacacctc atcccagaca ggatcaatca tagttaagct cctcccgaat     240

ctgccaaagg ataaggaggc atgtgcgaaa gccccccttgg atgcatacaa caggacattg     300

accactttgc tcacccccct tggtgactct atccgtagga tacaagagtc tgtgactaca     360

tctggagggg ggagacaggg gcgccttata ggcgccatta ttggcggtgt ggctcttggg     420

gttgcaactg ccgcacaaat aacagcggcc gcagctctga tacaagccaa acaaaatgct     480
```

gccaacatcc tccgacttaa agagagcatt gccgcaacca atgaggctgt gcatgaggtc 540

actgacggat tatcgcaact agcagtggca gttgggaaga tgcagcagtt cgttaatgac 600

caatttaata aaacagctca ggaattagac tgcatcaaaa ttgcacagca agttggtgta 660

gagctcaacc tgtacctaac cgaatcgact acagtattcg gaccacaaat cacttcacct 720

gccttaaaca agctgactat tcaggcactt tacaatctag ctggtgggaa tatggattac 780

ttattgacta agttaggtat agggaacaat caactcagct cattaatcgg tagcggctta 840

atcaccggta accctattct atacgactca cagactcaac tcttgggtat acaggtaact 900

ctaccttcag tcgggaacct aaataatatg cgtgccacct acttggaaac cttatccgta 960

agcacaacca ggggatttgc ctcggcactt gtcccaaaag tggtgacacg ggtcggttct 1020

gtgatagaag aacttgacac ctcatactgt atagaaactg acttagattt atattgtaca 1080

agaatagtaa cgttccctat gtcccctggt atttactcct gcttgagcgg caatacatcg 1140

gcctgtatgt actcaaagac cgaaggcgca cttactacac catatatgac tatcaaaggc 1200

tcagtcatcg ctaactgcaa gatgacaaca tgtagatgtg taaacccccc gggtatcata 1260

tcgcaaaact atggagaagc cgtgtctcta atagataaac aatcatgcaa tgttttatcc 1320

ttaggcggga taactttaag gctcagtggg gaattcgatg taacttatca gaagaatatc 1380

tcaatacaag attctcaagt aataataaca ggcaatcttg atatctcaac tgagcttggg 1440

aatgtcaaca actcgatcag taatgccttg aataagttag aggaaagcaa cagaaaacta 1500

gacaaagtca atgtcaaact gaccagcaca tctgctctca ttacctatat cgttttgact 1560

atcatatctc ttgtttttgg tatacttagc ctgattctag catgctacct aatgtacaag 1620

caaaaggcgc aacaaaagac cttattatgg cttgggaata ataccctaga tcagatgaga 1680

gccactacaa aaatgtga 1698

<210> 8
<211> 565
<212> PRT
<213> Virus de la enfermedad de Newcastle

<400> 8

Met Asp Arg Ser Arg Leu Ala Pro Ser Arg Cys Arg Met Gly Ser Arg
1 5 10 15

Pro Ser Thr Lys Asn Pro Ala Pro Met Met Leu Thr Ile Arg Val Ala
20 25 30

Leu Val Leu Ser Cys Ile Cys Pro Ala Asn Ser Ile Asp Gly Arg Pro
35 40 45

Leu Ala Ala Ala Gly Ile Val Val Thr Gly Asp Lys Ala Val Asn Ile

```
    50                  55                  60

Tyr Thr Ser Ser Gln Thr Gly Ser Ile Ile Val Lys Leu Leu Pro Asn
65                  70                  75                  80

Leu Pro Lys Asp Lys Glu Ala Cys Ala Lys Ala Pro Leu Asp Ala Tyr
                85                  90                  95

Asn Arg Thr Leu Thr Thr Leu Leu Thr Pro Leu Gly Asp Ser Ile Arg
            100                 105                 110

Arg Ile Gln Glu Ser Val Thr Thr Ser Gly Gly Gly Arg Gln Gly Arg
        115                 120                 125

Leu Ile Gly Ala Ile Ile Gly Gly Val Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Gln Ile Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ile Gln Ala Lys Gln Asn Ala
145                 150                 155                 160

Ala Asn Ile Leu Arg Leu Lys Glu Ser Ile Ala Ala Thr Asn Glu Ala
                165                 170                 175

Val His Glu Val Thr Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ala Val Ala Val Gly
            180                 185                 190

Lys Met Gln Gln Phe Val Asn Asp Gln Phe Asn Lys Thr Ala Gln Glu
        195                 200                 205

Leu Asp Cys Ile Lys Ile Ala Gln Gln Val Gly Val Glu Leu Asn Leu
    210                 215                 220

Tyr Leu Thr Glu Ser Thr Thr Val Phe Gly Pro Gln Ile Thr Ser Pro
225                 230                 235                 240

Ala Leu Asn Lys Leu Thr Ile Gln Ala Leu Tyr Asn Leu Ala Gly Gly
                245                 250                 255

Asn Met Asp Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Gly Ile Gly Asn Asn Gln Leu
            260                 265                 270

Ser Ser Leu Ile Gly Ser Gly Leu Ile Thr Gly Asn Pro Ile Leu Tyr
        275                 280                 285

Asp Ser Gln Thr Gln Leu Leu Gly Ile Gln Val Thr Leu Pro Ser Val
    290                 295                 300
```

```
Gly Asn Leu Asn Asn Met Arg Ala Thr Tyr Leu Glu Thr Leu Ser Val
305                 310                 315                 320

Ser Thr Thr Arg Gly Phe Ala Ser Ala Leu Val Pro Lys Val Val Thr
                325                 330                 335

Arg Val Gly Ser Val Ile Glu Glu Leu Asp Thr Ser Tyr Cys Ile Glu
            340                 345                 350

Thr Asp Leu Asp Leu Tyr Cys Thr Arg Ile Val Thr Phe Pro Met Ser
        355                 360                 365

Pro Gly Ile Tyr Ser Cys Leu Ser Gly Asn Thr Ser Ala Cys Met Tyr
    370                 375                 380

Ser Lys Thr Glu Gly Ala Leu Thr Thr Pro Tyr Met Thr Ile Lys Gly
385                 390                 395                 400

Ser Val Ile Ala Asn Cys Lys Met Thr Thr Cys Arg Cys Val Asn Pro
                405                 410                 415

Pro Gly Ile Ile Ser Gln Asn Tyr Gly Glu Ala Val Ser Leu Ile Asp
            420                 425                 430

Lys Gln Ser Cys Asn Val Leu Ser Leu Gly Gly Ile Thr Leu Arg Leu
        435                 440                 445

Ser Gly Glu Phe Asp Val Thr Tyr Gln Lys Asn Ile Ser Ile Gln Asp
    450                 455                 460

Ser Gln Val Ile Ile Thr Gly Asn Leu Asp Ile Ser Thr Glu Leu Gly
465                 470                 475                 480

Asn Val Asn Asn Ser Ile Ser Asn Ala Leu Asn Lys Leu Glu Glu Ser
                485                 490                 495

Asn Arg Lys Leu Asp Lys Val Asn Val Lys Leu Thr Ser Thr Ser Ala
            500                 505                 510

Leu Ile Thr Tyr Ile Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu Val Phe Gly Ile
        515                 520                 525

Leu Ser Leu Ile Leu Ala Cys Tyr Leu Met Tyr Lys Gln Lys Ala Gln
    530                 535                 540

Gln Lys Thr Leu Leu Trp Leu Gly Asn Asn Thr Leu Asp Gln Met Arg
545                 550                 555                 560
```

Ala Thr Thr Lys Met
565

<210> 9
<211> 527
<212> ADN
<213> Virus de la laringotraqueitis infecciosa

<400> 9

aaacagctgt actacagagt aaccgatgga agaacatcgg tccagctaat gtgcctgtcg 60

tgcacgagcc attctccgga accttactgt cttttcgaca cgtctcttat agcgagggaa 120

aaagatatcg cgccagagtt atactttacc tctgatccgc aaacggcata ctgcacaata 180

actctgccgt ccggcgttgt tccgagattc gaatggagcc ttaataatgt ttcactgccg 240

gaatatttga cggccacgac cgttgtttcg cataccgctg gccaaagtac agtgtggaag 300

agcagcgcga gagcaggcga ggcgtggatt tctggccggg gaggcaatat atacgaatgc 360

accgtcctca tctcagacgg cactcgcgtt actacgcgaa aggagaggtg cttaacaaac 420

acatggattg cggtggaaaa cggtgctgct caggcgcagc tgtattcact cttttctgga 480

cttgtgtcag gattatgcgg gagcatatct gctttgtacg caacgct 527

<210> 10
<211> 264
<212> ADN
<213> Virus de la laringotraqueitis infecciosa

<400> 10

tgactattac aatgacatgc ccgccgtgat cccggtggag gagactacta aaagttctaa 60

tgccgtctcc atgcccatat tcgcggcgtt cgtagcctgc gcggtcgcgc tcgtggggct 120

actggtttgg agcatcgtaa aatgcgcgcg tagctaatcg agcctagaat aggtggtttc 180

ttcctacatg ccacgcctca cgctcataat ataaatcaca tggaatagca taccaatgcc 240

tattcattgg gacgttcgaa aagc 264

<210> 11
<211> 360
<212> ADN
<213> Citomegalovirus humano

<400> 11

cgcgccaggt caattccctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact 60

tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac 120

atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca ccccattgac 180

gtcaatggga gtttgttttg gcaccaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac 240

tccgccccat tgacgcaaat gggcggtagc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag 300

ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata 360

<210> 12
<211> 1191
<212> ADN
<213> Citomegalovirus humano

<400> 12

gtgaataata aaatgtgtgt ttgtccgaaa tacgcgtttg agatttctgt cccgactaaa 60

ttcatgtcgc gcgatagtgg tgtttatcgc cgatagagat ggcgatattg gaaaaatcga 120

tatttgaaaa tatggcatat tgaaaatgtc gccgatgtga gtttctgtgt aactgatatc 180

gccatttttc caaaagttga tttttgggca tacgcgatat ctggcgatac gcttatatcg 240

tttacggggg atggcgatag acgcctttgg tgacttgggc gattctgtgt gtcgcaaata 300

tcgcagtttc gatataggtg acagacgata tgaggctata tcgccgatag aggcgacatc 360

aagctggcac atggccaatg catatcgatc tatacattga atcaatattg gccattagcc 420

atattattca ttggttatat agcataaatc aatattggct attggccatt gcatacgttg 480

tatccatatc ataatatgta catttatatt ggctcatgtc caacattacc gccatgttga 540

cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca 600

tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgcctggctg accgcccaac 660

gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact 720

ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa 780

gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg 840

cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta 900

gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg 960

tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg 1020

caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg 1080

ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag 1140

atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata gaagacaccg g 1191

<210> 13
<211> 281
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220><223> Secuencia sintética

<400> 13

ggaattctag atcccacgtc actattgtat actctatatt atactctatg ttatactctg 60

taatcctact caataaacgt gtcacgcctg tgaaaccgta ctaagtctcc cgtgtcttct 120

tatcaccatc aggtgacatc ctcgcccagg ctgtcaatca tgccggtatc gattccagta 180

gcaccggccc cacgctgaca acccactctt gcagcgttag cagcgcccct cttaacaagc 240

cgacccccac cagcgtcgcg gttactaaca ctcctctccc c 281

<210> 14
<211> 523
<212> ADN
<213> virus del herpes simple

<400> 14

gggagatggg ggaggctaac tgaaacacgg aaggagacaa taccggaagg aacccgcgct 60

atgacggcaa taaaaagaca gaataaaacg cacgggtgtt gggtcgtttg ttcataaacg 120

cggggttcgg tcccagggct ggcactctgt cgatacccca ccgagacccc attgggacca 180

atacgcccgc gtttcttcct tttccccacc ccaaccccca agttcgggtg aaggcccagg 240

gctcgcagcc aacgtcgggg cggcaagccc tgccatagcc acgggccccg tgggttaggg 300

acggggtccc ccatggggaa tggtttatgg ttcgtggggg ttattatttt gggcgttgcg 360

tggggtcagg tccacgactg gactgagcag acagacccat ggtttttgga tggcctgggc 420

atggaccgca tgtactggcg cgacacgaac accgggcgtc tgtggctgcc aaacaccccc 480

gacccccaaa aaccaccgcg cggatttctg gcgccgccgg acg 523

<210> 15
<211> 3593
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220><223> Inserción de casete de expresión

<400> 15

taattaaccc gggaagcttg catgcctgca gtgaataata aaatgtgtgt ttgtccgaaa 60

tacgcgtttg agatttctgt cccgactaaa ttcatgtcgc gcgatagtgg tgtttatcgc 120

cgatagagat ggcgatattg gaaaaatcga tatttgaaaa tatggcatat tgaaaatgtc 180

gccgatgtga gtttctgtgt aactgatatc gccatttttc caaaagttga tttttgggca 240

tacgcgatat ctggcgatac gcttatatcg tttacggggg atggcgatag acgcctttgg 300

tgacttgggc gattctgtgt gtcgcaaata tcgcagtttc gatataggtg acagacgata 360

tgaggctata tcgccgatag aggcgacatc aagctggcac atggccaatg catatcgatc 420

tatacattga atcaatattg gccattagcc atattattca ttggttatat agcataaatc 480

aatattggct attggccatt gcatacgttg tatccatatc ataatatgta catttatatt 540

ggctcatgtc caacattacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa 600

tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg 660

gtaaatggcc cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg 720

tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta 780

cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gcccccctatt 840

gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac 900

tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt 960

tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac 1020

cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt 1080

cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat 1140

ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt 1200

gacctccata gaagacaccg ggaccatgga tcgatcccgg ttggcgccct ccaggtgcag 1260

gatgggctcc agaccttcta ccaagaaccc agcacctatg atgctgacta tccgggtcgc 1320

gctggtactg agttgcatct gtccggcaaa ctccattgat ggcaggcctc ttgcagctgc 1380

aggaattgtg gttacaggag acaaagcagt caacatatac acctcatccc agacaggatc 1440

aatcatagtt aagctcctcc cgaatctgcc aaaggataag gaggcatgtg cgaaagcccc 1500

cttggatgca tacaacagga cattgaccac tttgctcacc ccccttggtg actctatccg 1560

taggatacaa gagtctgtga ctacatctgg agggggggaga cagggcgcc ttataggcgc 1620

cattattggc ggtgtggctc ttggggttgc aactgccgca caaataacag cggccgcagc 1680

tctgatacaa gccaaacaaa atgctgccaa catcctccga cttaaagaga gcattgccgc 1740

aaccaatgag gctgtgcatg aggtcactga cggattatcg caactagcag tggcagttgg 1800

gaagatgcag cagttcgtta atgaccaatt taataaaaca gctcaggaat tagactgcat 1860

caaaattgca cagcaagttg gtgtagagct caacctgtac ctaaccgaat cgactacagt 1920

attcggacca caaatcactt cacctgcctt aaacaagctg actattcagg cactttacaa 1980

tctagctggt gggaatatgg attacttatt gactaagtta ggtataggga acaatcaact 2040

cagctcatta atcggtagcg gcttaatcac cggtaaccct attctatacg actcacagac 2100

tcaactcttg ggtatacagg taactctacc ttcagtcggg aacctaaata atatgcgtgc 2160

cacctacttg gaaaccttat ccgtaagcac aaccagggga tttgcctcgg cacttgtccc 2220

aaaagtggtg acacgggtcg gttctgtgat agaagaactt gacacctcat actgtataga 2280

aactgactta gatttatatt gtacaagaat agtaacgttc cctatgtccc ctggtattta 2340

ctcctgcttg agcggcaata catcggcctg tatgtactca aagaccgaag gcgcacttac 2400

tacaccatat atgactatca aaggctcagt catcgctaac tgcaagatga caacatgtag 2460

atgtgtaaac cccccgggta tcatatcgca aaactatgga gaagccgtgt ctctaataga 2520

taaacaatca tgcaatgttt tatccttagg cgggataact ttaaggctca gtggggaatt 2580

cgatgtaact tatcagaaga atatctcaat acaagattct caagtaataa taacaggcaa 2640

tcttgatatc tcaactgagc ttgggaatgt caacaactcg atcagtaatg ccttgaataa 2700

gttagaggaa agcaacagaa aactagacaa agtcaatgtc aaactgacca gcacatctgc 2760

tctcattacc tatatcgttt tgactatcat atctcttgtt tttggtatac ttagcctgat 2820

tctagcatgc tacctaatgt acaagcaaaa ggcgcaacaa aagaccttat tatggcttgg 2880

gaataatacc ctagatcaga tgagagccac tacaaaaatg tgaacacaga tgaggaacga 2940

aggtttccct aatagtaatt tgtgtgaaag ttctggtagt ctgtcagttc ggagagttaa 3000

gaaaaaaaaa aaaccccccc ccccccccccc ccccccccct gggtacgatc ctctagagtc 3060

gggagatggg ggaggctaac tgaaacacgg aaggagacaa taccggaagg aacccgcgct 3120

atgacggcaa taaaaagaca gaataaaacg cacgggtgtt gggtcgtttg ttcataaacg 3180

cggggttcgg tcccagggct ggcactctgt cgatacccca ccgagacccc attgggacca 3240

atacgcccgc gtttcttcct tttccccacc ccaaccccca agttcgggtg aaggcccagg 3300

gctcgcagcc aacgtcgggg cggcaagccc tgccatagcc acgggccccg tgggttaggg 3360

acggggtccc ccatggggaa tggtttatgg ttcgtggggg ttattatttt gggcgttgcg 3420

tggggtcagg tccacgactg gactgagcag acagacccat ggtttttgga tggcctgggc 3480

atggaccgca tgtactggcg cgacacgaac accgggcgtc tgtggctgcc aaacaccccc 3540

gacccccaaa aaccaccgcg cggatttctg gcgccgccgg acgtcgactt aat 3593

<210> 16
<211> 3569
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220><223> Inserción de casete de expresión

<400> 16

gtcgacggca gagtcgcaga cgcccctatt ggacgtcaaa attgtagagg tgaagttttc 60

aaacgatggc gaagtaacgg cgacttgcgt ttccaccgtc aaatctccct atagggtaga 120

aactaattgg aaagtagacc tcgtagatgt aatggatgaa atttctggga acagtcccgc 180

cggggttttt aacagtaatg agaaatggca gaaacagctg tactacagag taaccgatgg 240

aagaacatcg gtccagctaa tgtgcctgtc gtgcacgagc cattctccgg aaccttactg 300

tcttttcgac acgtctctta tagcgaggga aaaagatatc gcgccagagt tatactttac 360

ctctgatccg caaacggcat actgcacaat aactctgccg tccggcgttg ttccgagatt 420

cgaatggagc cttaataatg tttcactgcc ggaatatttg acggccacga ccgttgtttc 480

gcataccgct ggccaaagta cagtgtggaa gagcagcgcg agagcaggcg aggcgtggat 540

ttctggccgg ggaggcaata tatacgaatg caccgtcctc atctcagacg gcactcgcgt 600

tactacgcga aaggagaggt gcttaacaaa cacatggatt gcggtggaaa acggtgctgc 660

tcaggcgcag ctgtattcac tcttttctgg acttgtgtca ggattatgcg ggagcatatc 720

tgctttgtac gcaacgctat ggaccgccat ttatttttga ggaatgcttt ttggactatc 780

gtactgcttt cttccttcgc tagccagagc accgccgccg tcacgtacga ctacatttta 840

ggccgtcgcg cgctcgacgc gctaaccata ccggcggttg gcccgtataa cagatacctc 900

actagggtat caagaggctg cgacgttgtc gagctcaacc cgatttctaa cgtggacgac 960

atgatatcgg cggccaaaga aaaagagaag gggggccctt tcgaggcctc cgtcgtctgg 1020

ttctacgtga ttaagggcga cgacggcgag gacaagtact gtccaatcta tagaaaagag 1080

tacagggaat gtggcgacgt acaactgcta tctgaatgcg ccgttcaatc tgcacagatg 1140

tgggcagtgg actatgttcc tagcaccctt gtatcgcgaa atggcgcggg actgactata 1200

ttctccccca ctgctgcgct ctctggccaa tacttgctga ccctgaaaat cgggagattt 1260

gcgcaaacag ctctcgtaac tctagaagtt aacgatcgct gtttaaagat cgggtcgcag 1320

cttaactttt taccgtcgaa atgctggaca acagaacagt atcagactgg atttcaaggc 1380

gaacaccttt atccgatcgc agacaccaat acacgacacg cggacgacgt atatcgggga 1440

tacgaagata ttctgcagcg ctggaataat ttgctgagga aaaagaatcc tagcgcgcca 1500

gaccctcgtc cagatagcgt cccgcaagaa attcccgctg taaccaagaa agcggaaggg 1560

cgcaccccgg acgcagaaag cagcgaaaag aaggcccctc cagaagactc ggaggacgac 1620

atgcaggcag aggcttctgg agaaaatcct gccgccctcc ccgaagacga cgaagtcccc 1680

gaggacaccg agcacgatga tccaaactcg gatcctgact attacaatga catgcccgcc 1740

gtgatcccgg tggaggagac tactaaaagt tctaatgccg tctccatgcc catattcgcg 1800

gcgttcgtag cctgcgcggt cgcgctcgtg gggctactgg tttggagcat cgtaaaatgc 1860

gcgcgtagct aatcgagcct agaataggtg gtttcttcct acatgccacg cctcacgctc 1920

ataatataaa tcacatggaa tagcatacca atgcctattc attgggacgt tcgaaaagca 1980

tggcatcgct acttggaact ctggctctcc ttgccgcgac gctcgcaccc ttcggcgcga 2040

tgggaatcgt gatcactgga aatcacgtct ccgccaggat tgacgacgat cacatcgtga 2100

tcgtcgcgcc tcgccccgaa gctacaattc aactgcagct atttttcatg cctggccaga 2160

gaccccacaa accctactca ggaaccgtcc gcgtcgcgtt tcggtctgat ataacaaacc 2220

agtgctacca ggaacttagc gaggagcgct ttgaaaattg cactcatcga tcgtcttctg 2280

tttttgtcgg ctgtaaagtg accgagtaca cgttctccgc ctcgaacaga ctaaccggac 2340

ctccacaccc gtttaagctc actatacgaa atcctcgtcc gaacgacagc gggatgttct 2400

acgtaattgt tcggctagac gacaccaaag aacccattga cgtcttcgcg atccaactat 2460

cggtgtatca attcgcgaac accgccgcga ctcgcggact ctattccaag gcttcgtgtc 2520

gcaccttcgg attacctacc gtccaacttg aggcctatct caggaccgag gaaagttggc 2580

gcaactggca agcgtacgtt gccacggagg ccacgacgac cagcgccgag gcgacaaccc 2640

cgacgcccgt cactgcaacc agcgcctccg aacttgaagc ggaacacttt acctttccct 2700

ggctagaaaa tggcgtggat cattacgaac cgacacccgc aaacgaaaat tcaaacgtta 2760

ctgtccgtct cgggacaatg agccctacgc taattggggt aaccgtggct gccgtcgtga 2820

gcgcaacgat cggcctcgtc attgtaattt ccatcgtcac cagaaacatg tgcaccccgc 2880

accgaaaatt agacacggtc tcgcaagacg acgaagaacg ttcccaaact agaagggaat 2940

cgcgaaaatt tggacccatg gttgcgtgcg aaataaacaa gggggctgac caggatagtg 3000

aacttgtgga actggttgcg attgttaacc cgtctgcgct aagctcgccc gactcaataa 3060

aaatgtgatt aagtctgaat gtggctctcc aatcatttcg attctctaat ctcccaatcc 3120

tctcaaaagg ggcagtatcg gacacggact gggaggggcg tacacgatag ttatatggta 3180

cagcagaggc ctctgaacac ttaggaggag aattcagccg gggagagccc ctgttgagta 3240

ggcttgggag catattgcag gatgaacatg ttagtgatag ttctcgcctc ttgtcttgcg 3300

cgcctaactt ttgcgacgcg acacgtcctc tttttggaag gcactcaggc tgtcctcggg 3360

gaagatgatc ccagaaacgt tccggaaggg actgtaatca aatggacaaa agtcctgcgg 3420

aacgcgtgca agatgaaggc ggccgatgtc tgctcttcgc ctaactattg ctttcatgat 3480

ttaatttacg acggaggaaa gaaagactgc ccgcccgcgg gacccctgtc tgcaaacctg 3540

gtaattttac taaagcgcgg cgaaagctt 3569

<210> 17
<211> 5921
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220><223> Inserción de casete de expresión

<400> 17

gtcgacggca gagtcgcaga cgcccctatt ggacgtcaaa attgtagagg tgaagttttc 60

aaacgatggc gaagtaacgg cgacttgcgt ttccaccgtc aaatctccct atagggtaga 120

aactaattgg aaagtagacc tcgtagatgt aatggatgaa atttctggga acagtcccgc 180

cggggttttt aacagtaatg agaaatggca gaaacagctg tactacagag taaccgatgg 240

aagaacatcg gtccagctaa tgtgcctgtc gtgcacgagc cattctccgg aaccttactg 300

tcttttcgac acgtctctta tagcgaggga aaaagatatc gcgccagagt tatactttac 360

ctctgatccg caaacggcat actgcacaat aactctgccg tccggcgttg ttccgagatt 420

cgaatggagc cttaataatg tttcactgcc ggaatatttg acggccacga ccgttgtttc 480

gcataccgct ggccaaagta cagtgtggaa gagcagcgcg agagcaggcg aggcgtggat 540

ttctggccgg ggaggcaata tatacgaatg caccgtcctc atctcagacg gcactcgcgt 600

tactacgcga aaggagaggt gcttaacaaa cacatggatt gcggtggaaa acggtgctgc 660

tcaggcgcag ctgtattcac tcttttctgg acttgtgtca ggattatgcg ggagcatatc 720

tgctttgtac gcaacgctat ggaccgccat ttatttttga ggaatgcttt ttggactatc 780

gtactgcttt cttccttcgc tagccagagc accgccgccg tcacgtacga ctacatttta 840

ggccgtcgcg cgctcgacgc gctaaccata ccggcggttg gcccgtataa cagatacctc 900

actagggtat caagaggctg cgacgttgtc gagctcaacc cgatttctaa cgtggacgac 960

atgatatcgg cggccaaaga aaaagagaag gggggccctt tcgaggcctc cgtcgtctgg 1020

ttctacgtga ttaagggcga cgacggcgag gacaagtact gtccaatcta tagaaaagag 1080

tacagggaat gtggcgacgt acaactgcta tctgaatgcg ccgttcaatc tgcacagatg 1140

tgggcagtgg actatgttcc tagcaccctt gtatcgcgaa atggcgcggg actgactata 1200

ttctccccca ctgctgcgct ctctggccaa tacttgctga ccctgaaaat cgggagattt 1260

gcgcaaacag ctctcgtaac tctagaagtt aacgatcgct gtttaaagat cgggtcgcag 1320

cttaactttt taccgtcgaa atgctggaca acagaacagt atcagactgg atttcaaggc 1380

gaacaccttt atccgatcgc agacaccaat acacgacacg cggacgacgt atatcgggga 1440

tacgaagata ttctgcagcg ctggaataat ttgctgagga aaaagaatcc tagcgcgcca 1500

gaccctcgtc cagatagcgt cccgcaagaa attcccgctg taaccaagaa agcggaaggg 1560

cgcaccccgg acgcagaaag cagcgaaaag aaggcccctc cagaagactc ggaggacgac 1620

atgcaggcag aggcttctgg agaaaatcct gccgccctcc ccgaagacga cgaagtcccc 1680

gaggacaccg agcacgatga tccaaactcg gatcctgact attacaatga catgcccgcc 1740

gtgatcccgg tggaggagac tactaaaagt tctaatgccg tctccatgcc catattcgcg 1800

gcgttcgtag cctgcgcggt cgcgctcgtg gggctactgg tttggagcat cgtaaaatgc 1860

gcgcgtagct aatcgagcct agaataggtg gtttcttcct acatgccacg cctcacgctc 1920

ataatataaa tcacatggaa tagcatacca atgcctattc attgggacgt tcgaaaagca 1980

tggcatcgct acttggaact ctggctctcc ttgccgcgac gctcgcaccc ttcggcgcga 2040

tgggaatcgt gatcactgga aatcacgtct ccgccaggat tgacgacgat cacatcgtga 2100

tcgtcgcgcc tcgccccgaa gctacaattc aactgcagct atttttcatg cctggccaga 2160

gaccccacaa accctactca ggaaccgtcc gcgtcgcgtt tcggtctgat ataacaaacc 2220

agtgctacca ggaacttagc gaggagcgct ttgaaaattg cactcatcga tcgtcttctg 2280

tttttgtcgg ctgtaaagtg accgagtaca cgttctccgc ctcgaacaga ctaaccggac 2340

ctccacaccc gtttaagctc actatacgaa atcctcgtcc gaacgacagc gggatgttct 2400

acgtaattgt tcggctagac gacaccaaag aacccattga cgtcttcgcg atccaactat 2460

cggtgtatca attcgcgaac accgccgcga ctcgcggact ctattccaag gcttcgtgtc 2520

gcaccttcgg attacctacc gtccaacttg aggcctatct caggaccgag gaaagttggc 2580

gcaactggca agcgtacgtt gccacggagg ccacgacgac cagcgccgag gcgacaaccc 2640

cgacgcccgt cactgcaacc agcgcctccg aacttgaagc ggaacacttt acctttccct 2700

ggctagaaaa tggcgtggat cattacgaac cgacacccgc aaacgaaaat tcaaacgtta 2760

ctgtccgtct cgggacaatg agccctacgc taattggggt aaccgtggct gccgtcgtga 2820

gcgcaacgat cggcctcgtc attgtaattt ccatcgtcac cagaaacatg tgcaccccgc 2880

accgaaaatt agacacggtc tcgcaagacg acgaagaacg ttcccaaact agaagggaat 2940

cgcgaaaatt tggacccatg gttgcgtgcg aaataaacaa gggggctgac caggatagtg 3000

aacttgtgga actggttgcg attgttaacc cgtctgcgct aagctcgccc gactcaataa 3060

aaatgtgatt aagtctgaat gtggctctcc aatcatttcg attctctaat ctcccaatcc 3120

tctcaaaagg ggcagtatcg gacacggact gggaggggcg tacacgatag ttatatggta 3180

cagcagaggc ctctgaacac ttaggaggag aattcagccg gggagagccc ctgttgagta 3240

ggcttgggag catattgcag gatgaacatg ttagtgatag ttctcgcctc ttgtcttgcg 3300

cgcctaactt ttgcgacgcg acacgtcctc tttttggaag gcactcaggc tgtcctcggg 3360

gaagatgatc ccagaaacgt tccggaaggg actgtaatca aatggacaaa agtcctgcgg 3420

aacgcgtgca agatgaaggc ggccgatgtc tgctcttcgc ctaactattg ctttcatgat 3480

ttaatttacg acggaggaaa gaaagactgc ccgcccgcgg gacccctgtc tgcaaacctg 3540

gtaattttac taaagcgcgg cgaaagcttc gcgccaggtc aattccctgg cattatgccc 3600

agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta 3660

ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac 3720

ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc 3780

aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtagcg 3840

tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc tcgtttagtg aaccgtcaga tcgcctggag 3900

acgccatcca cgctgttttg acctccatag aagacaccgg ttgcgccgcc accatgggcc 3960

ccagaccttc taccaagaac ccagtaccta tgatgctgac tgtccgagtc gcgctggtac 4020

tgagttgcat ctgtccggca aactccattg atggcaggcc tcttgcggct gcaggaattg 4080

tggttacagg agacaaagcc gtcaacatat acacctcatc ccagacagga tcaatcatag 4140

ttaagctcct cccgaatctg cccaaggata aggaggcatg tgcgaaagcc cccttggatg 4200

catacaacag gacattgacc actttgctca ccccccttgg tgactctatc cgtaggatac 4260

aagagtctgt gactacatct ggaggggga gacaggggcg ccttataggc gccattattg 4320

gcggtgtggc tcttggggtt gcaactgccg cacaaataac agcggccgca gctctgatac 4380

aagccaaaca aaatgctgcc aacatcctcc gacttaaaga gagcattgcc gcaaccaatg 4440

aggctgtgca tgaggtcact gacggattat cgcaactagc agtggcagtt gggaagatgc 4500

agcagtttgt taatgaccaa tttaataaaa cagctcagga attagactgc atcaaaattg 4560

cacagcaagt tggtgtagag ctcaacctgt acctaaccga attgactaca gtattcggac 4620

cacaaatcac ttcacctgct ttaaacaagc tgactattca ggcactttac aatctagctg 4680

gtggaaatat ggattactta ttgactaagt taggtgtagg gaacaatcaa ctcagctcat 4740

taatcggtag cggcttaatc accggtaacc ctattctata cgactcacag actcaactct 4800

tgggtataca ggtaactcta ccttcagtcg ggaagctaaa taatatgcgt gccacctact 4860

tggaaacctt atccgtaagc acaaccaggg gatttgcctc ggcacttgtc ccaaaagtgg 4920

tgacacaggt cggttctgtg atagaagaac ttgacacctc atactgtata gaaactgact 4980

tacatttata ttgtacaaga atagtaacgt tccctatgtc ccctggtatt tattcctgct 5040

tgagcggcaa tacgtcggcc tgtatgtact caaagaccga aggcgcactt actacaccat 5100

acatgactat caaaggttca gtcatcgcca actgcaagat gacaacatgt agatgtgtaa 5160

acccccggg tatcatatcg caaaactatg gagaagccgt gtctctaata gataaacaat 5220

catgcaatgt tttatcctta ggcgggataa ctttaaggct cagtggggaa ttcgatgtaa 5280

cttatcagaa gaatatctca atacaagatt ctcaagtaat aataacaggc aatcttgata 5340

tctcaactga gcttgggaat gtcaacaact cgatcagtaa tgctttgaat aagttagagg 5400

aaagcaacag aaaactagac aaagtcaatg tcaaactgac tagcacatct gctctcatta 5460

cctatatcgt gttgactatc atatctcttg tttttggtat acttagcctg attctagcat 5520

gctacctaat gtacaagcaa aaggcgcaac aaaagacctt attatggctt gggaataata 5580

ctctagatca gatgagagcc actacaaaaa tgtgaggatc tctcgaggaa ttctagatcc 5640

cacgtcacta ttgtatactc tatattatac tctatgttat actctgtaat cctactcaat 5700

aaacgtgtca cgcctgtgaa accgtactaa gtctcccgtg tcttcttatc accatcaggt 5760

gacatcctcg cccaggctgt caatcatgcc ggtatcgatt ccagtagcac cggccccacg 5820

ctgacaaccc actcttgcag cgttagcagc gcccctctta acaagccgac ccccaccagc 5880

gtcgcggtta ctaacactcc tctccccgac ctgcaactag t 5921

REIVINDICACIONES

1. Un virus de la enfermedad de Marek no patógeno ($rMDV_{np}$) que comprende un primer ácido nucleico insertado en un primer sitio no esencial en el genoma de $rMDV_{np}$ y un segundo ácido nucleico insertado en un segundo sitio no esencial en el genoma de $rMDV_{np}$;
en donde el primer ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína gD del virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV) y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ILTV gI;
en donde segundo ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV F);
en donde el primer sitio no esencial y el segundo sitio no esencial son el sitio US2 o el sitio UL54.5, o como alternativa, el primer sitio no esencial es el sitio US2 y el segundo sitio no esencial está entre los genes UL7 y UL8; y en donde el $rMDV_{np}$ es un herpesvirus recombinante de pavos (rHVT).

2. El rHVT de la reivindicación 1, en el que el primer sitio no esencial y el segundo sitio no esencial son el sitio US2.

3. El rHVT de la reivindicación 1, en el que el primer sitio no esencial y el segundo sitio no esencial son el sitio UL54.5.

4. El rHVT de la reivindicación 1, en el que el primer sitio no esencial es el sitio US2 y el segundo sitio no esencial está entre los genes UL7 y UL8.

5. El rHVT de las reivindicaciones 1-4, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gD de ILTV está operativamente bajo el control de un primer promotor, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gI de ILTV está operativamente bajo el control de un segundo promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F de NDV está operativamente bajo el control de un tercer promotor.

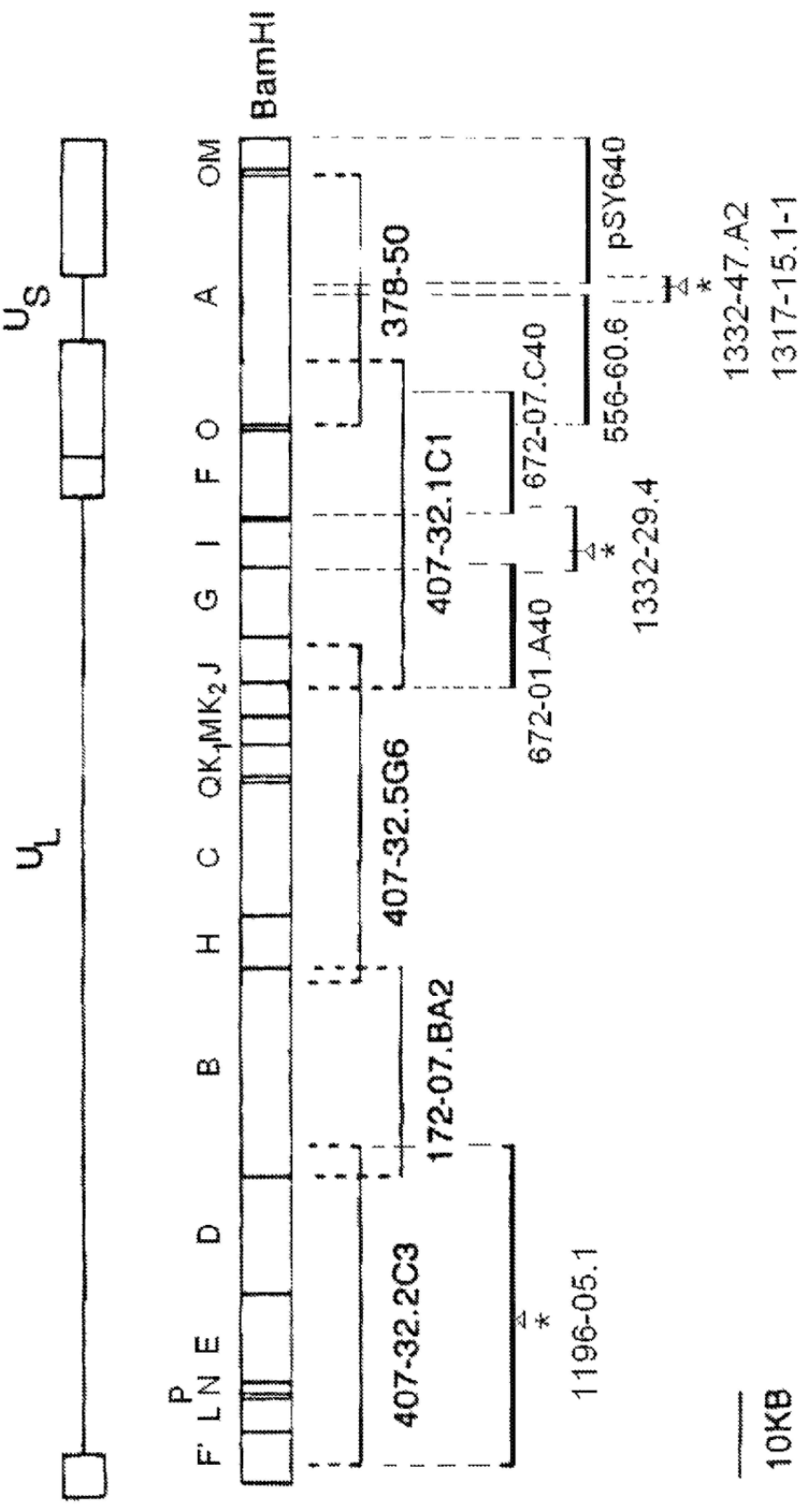
6. El rHVT de la reivindicación 5, en el que el primer promotor es el promotor ILTV gD endógeno, el segundo promotor en el promotor ILTV gI endógeno y el tercer promotor es el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (hCMV IE).

7. Una vacuna que comprende el rHTV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

8. La vacuna de la reivindicación 7, que comprende además un virus de la enfermedad de la bolsa infecciosa vivo moderado (IBDV).

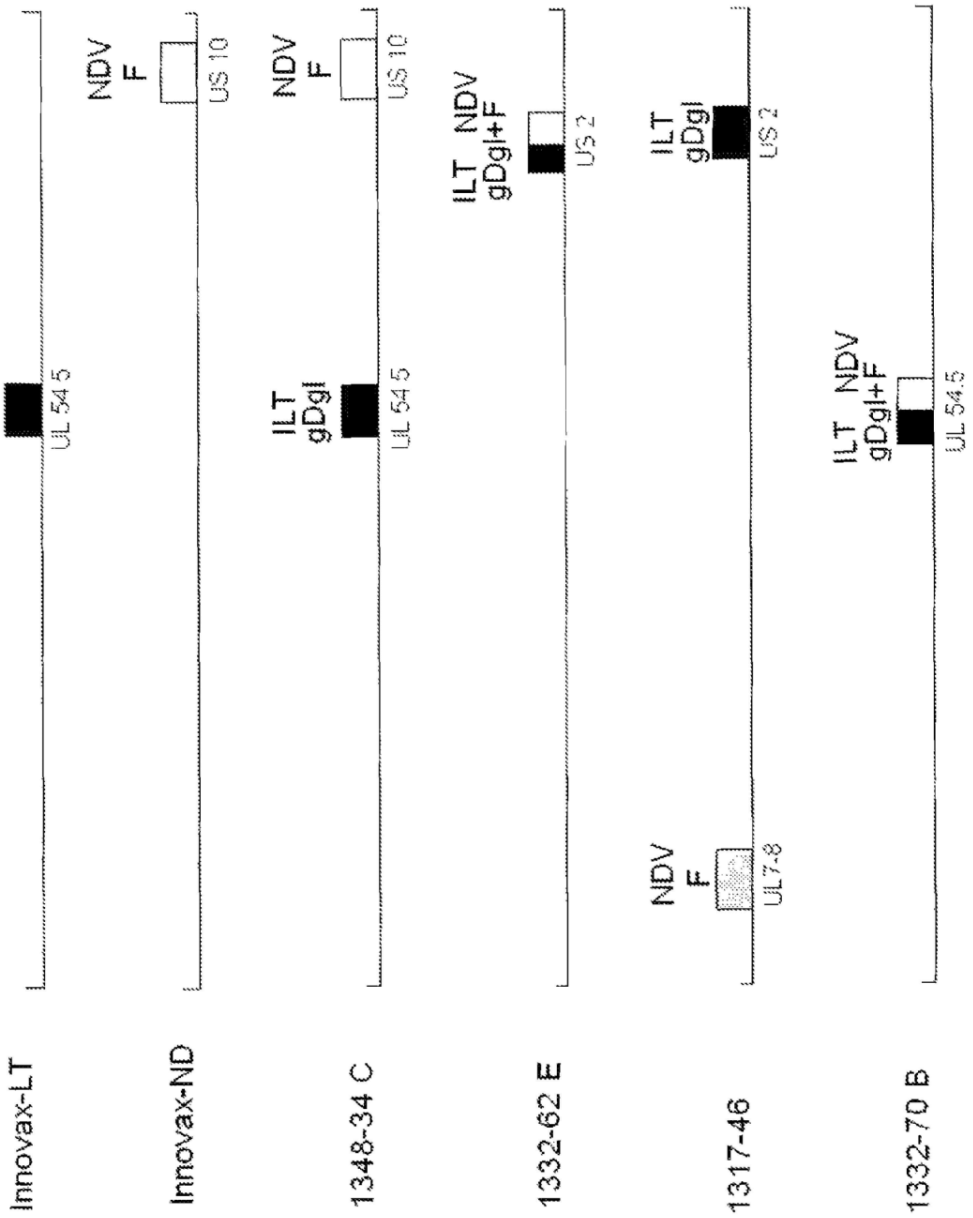
9. La vacuna de la reivindicación 8, en la que el IBDV vivo moderado es la cepa 89/03.

FIGURA 1



U_L
U_S
F' L N E P D B H C QK_1MK_2 J G I F O A OM
BamHI
407-32.2C3
172-07.BA2
407-32.5G6
407-32.1C1
378-50
1196-05.1
672-01.A40
1332-29.4
672-07.C40
556-60.6
pSY640
1332-47.A2
1317-15.1-1
10KB

FIGURA 2


Innovax-LT
ILT gDgI
UL 54.5
NDV F
US 10
Innovax-ND
1348-34 C
1332-62 E
ILT NDV gDgI+F
US 2
1317-46
UL7-8
1332-70 B