

**VECTORES RECOMBINANTES DE HVT QUE EXPRESAN MÚLTIPLES
ANTÍGENOS DE PATÓGENOS DE AVES Y VACUNAS QUE LOS COMPRENDEN
REFERENCIA A UNA SOLICITUD RELACIONADA**

Esta solicitud invoca prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EE.UU. N°: 62/433.842, presentada el 14 de diciembre, 2016.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con vectores virales recombinantes para la inserción y expresión de genes extraños para usar como vehículos de inmunización seguros en la protección contra una variedad de patógenos. También se relaciona con una composición o vacuna multivalente que comprende uno o más vectores virales recombinantes para la protección contra una variedad de patógenos. La presente invención se relaciona con métodos para elaborar y usar los vectores virales recombinantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La vacunación de aves de corral se utiliza ampliamente para proteger a manadas de aves de corral contra enfermedades devastadoras que incluyen la enfermedad de Newcastle (ND), enfermedad de bursitis infecciosa (IBD), enfermedad de Marek (MD), bronquitis infecciosa (IB), laringotraqueítis infecciosa (ILT) e influenza aviar (AI). La ND es causada por el paramixovirus aviar 1 (APMV-1) también denominado virus ND (NDV) que pertenece a la familia *Paramyxoviridae*. La MD es causada por el herpesvirus de gálidos 2 (familia *Herpesviridae*) también denominado serotipo 1 del virus MD (MDV1). La IB es causada por el virus IB (IBV) que pertenece a la familia *Coronaviridae*, la ILT es causada por el herpesvirus de gálidos 1 (familia *Herpesviridae*) también denominado virus ILT (ILTV) y la AI es causada por el virus AI (AIV)

que pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*.

Se han propuesto numerosos vectores virales recombinantes de aves con el objeto de vacunar a las contra estos patógenos aviares. Los vectores virales usados comprenden los virus avipox, en especial fowlpox (EP-A-0.517.292), el virus de Marek, tales como los serotipos 1, 2 y 3 (HVT) (WO87/04463; WO2013/082317) o, como alternativa, los adenovirus ITLV, NDV y aviares. Cuando algunos de estos vectores virales aviares recombinantes se utilizaban para una vacunación, presentaban niveles variables de protección.

Se han desarrollado, y cuentan con licencia, varios herpesvirus recombinantes de pavos (HVT, también denominados vectores herpesvirus Meleagrid 1 o serotipo 3 de MDV) que expresan antígenos de diversos patógenos (Patentes de los EEUU N°: 5.980.906, 5.853.733, 6.183.753, 5.187.087) que incluyen IBDV, NDV, ILTV y AIV. De particular interés es un vector HVT que expresa un gen protector VP2 del IBDV que ha mostrado ventajas evidentes frente a las vacunas clásicas contra la IBD (Bublott y col *J. Comp. Path.*, 2007, volumen 137, S81-S84; US 5.980.906). Otros vectores de interés del HVT son aquellos que expresan uno o más genes protectores de NDV (Morgan y col 1992, *Avian Dis.*, 36, 858-70; US 6.866.852; US 5.650.153), ILTV (Johnson y col, 2010 *Avian Dis* 54, 1251-1259; US 6.299.882; US 5.853.733, EP 1801204) o NDV e IBDV (US 9.114.108; WO2016102647, WO2013/057235, WO2015032910, WO2013144355). En US2016/0158347 se informó del uso del agonista del oligodesoxinucleótido TLR21 para aumentar la respuesta inmunológica contra el antígeno que es expresado por el vector HVT.

Uno de los problemas de índole práctico relacionados con el uso de

varias vacunas recombinantes basadas en HVT juntas es su interferencia. Se induce una protección menor al menos contra una de las enfermedades cuando se mezclan dos HVT recombinantes que expresan diferentes antígenos (Rudolf Heine 2011; *Issues of the Poultry Recombinant Viral Vector Vaccines which May Cause an Effect on the Economic Benefits of those Vaccines*; artículo presentado en el XVII Congreso de la *World Veterinary Poultry Association* (WVPA) en Cancún, Méjico, 14-18 de agosto, 2011; Slacum G, Hein R. y Lynch P., 2009, *The compatibility of HVT recombinants with other Marek's disease vaccines*, 58ª Conferencia de *Western Poultry Disease*, Sacramento, CA, EEUU, 23-25 de marzo, página 84).

Teniendo en cuenta el potencial efecto de los patógenos de animales, tales como NDV e IBVD, en la salud pública veterinaria y la economía, se necesitan métodos eficientes para prevenir una infección y proteger a los animales. Persiste la necesidad de una solución para vacunas eficaces de vectores combinados y un método adecuado para elaborar la vacuna que podría aliviar el problema de la interferencia observada entre dos vacunas de vectores basados en HVT.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención mostró resultados sorprendentes cuando composiciones o vacunas polivalentes que comprenden un vector HVT recombinante fueron eficaces en la protección de animales contra una variedad de patógenos de aves sin interferencia. También se observaron resultados sorprendentes cuando varias combinaciones de promotores/conectores, genes de codones optimizados, colas poliA y sitios de inserción conferían diferentes niveles de eficacia y estabilidad a la expresión de uno o más genes heterólogos

in vivo e *in vitro*. La presente invención provee vectores HVT estables capaces de expresar de manera eficiente múltiples genes y superan el problema bien conocido que los vectores HVT con múltiples insertos son menos estables.

La presente invención se relaciona con un vector HVT recombinante que comprende uno, dos o más polinucleótidos heterólogos que codifican y que expresan por lo menos un antígeno de un patógeno aviar.

La presente invención provee una composición o vacuna que comprende uno o más vectores HVT recombinantes que comprenden uno, dos o más polinucleótidos heterólogos que codifican y que expresan por lo menos un antígeno de un patógeno aviar.

La presente invención se relaciona con un método de vacunación de un animal, o que induce una respuesta inmunogénica o protectora en un animal, que comprende por lo menos una administración de la composición o el vector de la presente invención.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, y que no limita la invención a las formas de realización específicas descritas, se puede comprender en conjunto con las figuras acompañantes, que se incorporan a la presente como referencia, en las cuales:

La Figura 1 es una tabla que muestra la SEQ ID NO asignada a cada secuencia de ADN y proteína.

La Figura 2 representa la estructura genómica de HVT y sus sitios de inserción.

La Figura 3 representa el mapa del plásmido pFSV40VP2.

La Figura 4 representa en forma esquemática los sitios de unión de los cebadores para vHVT309.

La Figura 5 representa el resultado de identidad por PCR para vHVT309.

La Figura 6 representa el mapa del plásmido pFIRESVP2.

La Figura 7 representa en forma esquemática los sitios de unión de los cebadores para vHVT310.

La Figura 8 representa el resultado de identidad por PCR para vHVT310.

La Figura 9 representa el mapa del plásmido pFP2AVP2.

La Figura 10 representa en forma esquemática los sitios de unión de los cebadores para vHVT311.

La Figura 11 representa el resultado de identidad por PCR para vHVT311.

La Figura 12 representa el mapa del plásmido pVP2IRESgD.

La Figura 13 representa en forma esquemática los sitios de unión de los cebadores para vHVT317.

La Figura 14 representa el resultado de identidad por PCR para vHVT317.

La Figura 15 representa el mapa del plásmido pFwtSV40VP2.

La Figura 16 representa en forma esquemática los sitios de unión de los cebadores para vHVT313.

La Figura 17 representa el resultado de identidad por PCR para vHVT313.

La Figura 18 representa el mapa del plásmido pVP2IRESFwt.

La Figura 19 representa en forma esquemática los sitios de unión de los cebadores para vHVT316.

La Figura 20 representa el resultado de identidad por PCR para vHVT316.

Las Figuras 21A-21D representan alineamientos de secuencias de ADN y proteína.

La Figura 22 representa el mapa del plásmido HVT US2SVgDwtsyn.

La Figura 23 representa el mapa del plásmido pHVTIG1gDCaFopt.

La Figura 24 representa en forma esquemática los sitios de unión de los cebadores para vHVT308.

La Figura 25 representa el resultado de identidad por PCR para vHVT308.

La Figura 26 representa el mapa de plásmidos pFwtIRESgD.

La Figura 27 representa en forma esquemática los sitios de unión de los cebadores para vHVT322.

La Figura 28 representa el resultado de identidad por PCR para vHVT322.

La Figura 29 representa el mapa del plásmido pHVTUS2SVgDwtsyn.

La Figura 30 representa en forma esquemática los sitios de unión de los cebadores para vHVT406.

La Figura 31 representa el resultado de identidad por PCR para vHVT406.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Aunque la invención se ha descrito con relación a formas de realización específicas de la misma, se comprenderá que se le pueden efectuar modificaciones adicionales y esta solicitud pretende abarcar toda variación, uso o adaptación de la invención respetando, en términos generales, los principios

de la invención e incluyendo tales alejamientos de la presente divulgación según la práctica común o propia del arte a la cual pertenece la invención y según puede aplicarse a las características esenciales descritas precedentemente y a continuación dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Esta invención incluye todas las modificaciones y los equivalentes del objeto indicado en los aspectos o las reivindicaciones presentados en la presente hasta el grado máximo permitido por la ley vigente.

Se debe tener en cuenta que en esta divulgación y en particular en las reivindicaciones, los términos tales como “comprende”, “comprendía”, “que comprende” y semejantes pueden tener el significado que se atribuye a los mismos bajo la Ley de Patentes de los EEUU; por ejemplo, pueden significar “incluye”, “incluía”, “incluyendo” y semejantes; y que los términos tales como “que consiste esencialmente en” y “consiste esencialmente en” tienen el significado que se atribuye a los mismos bajo la Ley de Patentes de los EEUU, por ejemplo, permiten elementos no enumerados explícitamente, pero excluyen los elementos hallados en la técnica anterior o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

Los términos en singular “un”, “una”, “la” y “el” incluyen los referentes en plural a menos que el contexto claramente indique lo contrario. De manera similar, el término “o” incluirá “y”, a menos que el contexto claramente indique lo contrario. La palabra “o” significa cualquier miembro de una lista particular y también incluye cualquier combinación de miembros de dicha lista.

También se comprenderá que, aunque en la presente se pueden emplear los términos primero, segundo, etc. para describir varios elementos, estos elementos no deberían verse limitados por estos términos. Estos

términos solamente se usan para distinguir a los elementos entre sí. Por ejemplo, un primer gesto podría denominarse un segundo gesto y, de manera similar, un segundo gesto podría denominarse un primer gesto, sin apartarse del alcance de la presente invención. Todos los métodos o procesos que se describen en la presente se pueden realizar en cualquier orden apropiado a menos que se indique lo contrario en la presente o bien que el contexto lo contraindique claramente.

El término "animal" se usa en la presente para incluir todos los mamíferos, aves y peces. El animal, según se usa en la presente, se puede seleccionar del grupo que consiste en equinos (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felinos (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros grandes felinos y otros felinos, incluyendo guepardos y lince), bovinos (por ejemplo, ganado vacuno), porcinos (por ejemplo, cerdos), ovinos (por ejemplo, ovejas, cabras, llamas, bisontes), aves (por ejemplo, pollos, patos, gansos, pavos, codornices, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos, avestruces, emús y casuarios), primates (por ejemplo, prosimios, tarsios, monos, gibones, simios), humanos y peces. El término "animal" también incluye un animal individual en todas las etapas del desarrollo, incluyendo las etapas embrionaria y fetal.

El término "aproximadamente" según se usa en la presente, significa aproximadamente, en la región de, más o menos o alrededor de. Cuando el término "aproximadamente" se usa en junto con un rango numérico, modifica dicho rango al extender los límites por encima y por debajo de los valores numéricos indicados. En general, el término "aproximadamente" se usa en la presente para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor

establecido por una varianza del 10%. En un aspecto, el término "aproximadamente" significa más o menos un 20% del valor numérico del número con el cual se está siendo utilizando. Por ello, aproximadamente 50% significa en el rango de 45%-55%. Los rangos numéricos indicados en la presente por los puntos extremos incluyen todos los números y fracciones incluidos en dicho rango (por ejemplo, entre 1 y 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,90, 4 y 5). También se deberá comprender que todos los números y fracciones de los mismos son factibles de ser modificados por el término "aproximadamente."

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos consecutivos.

Los términos "ácido nucleico", "nucleótido" y "polinucleótido" se usan indistintamente y se refieren a ARN, ADN, ADNc o ARNc y derivados de los mismos, tales como aquellos que contienen esqueletos modificados. Se podrá apreciar que la invención provee polinucleótidos que comprenden secuencias complementarias de las que se describen en la presente. El "polinucleótido" contemplado en la presente invención incluye tanto la hebra directa (5' a 3') como la hebra complementaria inversa (3' a 5'). Los polinucleótidos de acuerdo con la invención se pueden preparar de diferentes maneras (por ejemplo mediante síntesis química, clonación de genes, etc.) y pueden tomar diversas formas (por ejemplo, lineal o ramificada, de cadena simple o doble o un híbrido de los mismos, cebadores, sondas, etc.).

Los términos "ADN genómico" o "genoma" se usan indistintamente y se refieren a la información genética hereditaria de un organismo huésped. El

ADN genómico comprende el ADN del núcleo (también denominado ADN cromosómico) pero también el ADN de los plástidos (por ejemplo, cloroplastos) y otros organelas celulares (por ejemplo, mitocondrias). El ADN genómico o genoma contemplado en la presente invención también se refiere al ARN de un virus. El ARN puede comprender la hebra positiva o la hebra negativa del ARN. El término “ADN genómico” contemplado en la presente invención incluye el ADN genómico que contiene secuencias complementarias de las que se describieron en la presente. El término “ADN genómico” también se refiere al ARN mensajero (ARNm), al ADN complementario (ADNc) y ARN complementario (ARNc).

El término “gen” se usa en un sentido amplio para hacer referencia a cualquier segmento de polinucleótido asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes o polinucleótidos incluyen intrones y exones en una secuencia genómica, o simplemente las secuencias de codificación como en los ADNc, tal como un marco de lectura abierto (ORF), comenzando por el codón de inicio (codón de metionina) y terminando con una señal de terminación (codón de terminación). Los genes y polinucleótidos también pueden incluir regiones que regulan su expresión, tales como de inicio de la transcripción, la traducción y terminación de la transcripción. Por lo tanto, también se incluyen promotores y regiones de unión a ribosomas (en general, estos elementos reguladores se encuentran aproximadamente entre 60 y 250 nucleótidos 5' con respecto al codón de inicio de la secuencia codificante o gen; Doree S M y col.; Pandher K y col.; Chung J Y col.), terminadores de la transcripción (en general, el terminador se encuentra dentro de los 50 nucleótidos aproximadamente 3' con respecto al codón de terminación de la

secuencia de codificación o gen; Ward C K y col.). Un gen o polinucleótido también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional, o codifica una proteína específica, y que incluye secuencias reguladoras.

El término “ADN heterólogo”, según se usa en la presente, se refiere al ADN derivado de un organismo diferente, tal como un tipo de célula diferente o una especie diferente del receptor. El término también se refiere al ADN, o un fragmento del mismo, en el mismo genoma del ADN huésped, en donde el ADN heterólogo se inserta en una región del genoma que es diferente de su ubicación original.

Según se usa en la presente, el término “antígeno” o “inmunógeno” se refiere a una sustancia que induce una respuesta inmunológica específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o porción de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una porción o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmunológica luego de su presentación en un animal huésped; un polipéptido, un epítopo, un hapteno o cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o una antitoxina.

El término “proteína o péptido inmunogénico”. Según se usa en la presente, incluye polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido que una vez administrados al huésped pueden evocar una respuesta inmunológica de tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. Preferiblemente el fragmento de proteína es tal que tiene sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína total. Por consiguiente, un

fragmento de proteína de acuerdo con la invención comprende o consiste esencialmente en o consiste en por lo menos un epítopo o determinante antigénico. Una proteína o polipéptido "inmunogénico", según se usa en la presente, incluye la secuencia completa de la proteína, sus análogos o fragmentos inmunogénicos de la misma. Un "fragmento inmunogénico" se refiere a un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopes y por consiguiente genera la respuesta inmunológica que se describió previamente. Dichos fragmentos se pueden identificar usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopes, bien conocidas en el arte. Por ejemplo, los epítopes lineales se pueden determinar, por ejemplo, mediante síntesis concurrente de grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a porciones de la molécula de proteína, y reacción de los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos aún están unidos a los soportes. De manera similar, los epítopes conformacionales se identifican fácilmente mediante determinación de la conformación espacial de los aminoácidos tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional.

El término "proteína o péptido inmunogénico" también contempla supresiones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre y cuando el polipéptido produzca una respuesta inmunológica como se define en la presente. El término "variación conservadora" hace referencia al reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo similar desde el punto de vista biológico, o al reemplazo de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico, de modo que el residuo de aminoácido codificado no cambie o sea otro residuo similar desde el punto de vista biológico. En este sentido, las sustituciones

particularmente preferidas generalmente serán conservadoras, es decir, serán sustituciones que tendrán lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen en general en cuatro familias: (1) ácidos: aspartato y glutamato; (2) básicos: lisina, arginina, histidina; (3) no polares: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano; y (4) polares sin carga: glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Ocasionalmente, los aminoácidos fenilalanina, triptofano y tirosina se clasifican como aminoácidos aromáticos. Los ejemplos de variaciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo hidrofóbico, tales como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro residuo hidrofóbico, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, de ácido glutámico por ácido aspártico o de glutamina por asparagina y semejantes; o una sustitución conservadora similar de un aminoácido por un aminoácido relacionado desde el punto de vista estructural, que no tiene un efecto importante sobre la actividad biológica. Por consiguiente, las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan de manera sustancial la inmunogenicidad de la proteína, se encuentran dentro de la definición del polipéptido de referencia. Todos los polipéptidos producidos con estas modificaciones están incluidos en la presente. El término "variación conservadora" también incluirá el uso de un aminoácido sustituido en lugar del aminoácido original no sustituido, siempre que los anticuerpos generados contra el polipéptido sustituido también generen una reacción inmunológica con el polipéptido no sustituido.

El término "epitope" se refiere al sitio sobre un antígeno o hapteno al

cual responden células B y/o células T específicas. El término también se usa indistintamente con los términos "determinante antigénico" o "sitio de determinante antigénico". Los anticuerpos que reconocen al mismo epítopo se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno blanco.

Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmunológica celular y/o mediada por anticuerpos a una composición o vacuna de interés. Habitualmente, una "respuesta inmunológica" incluye, pero en un sentido no taxativo, uno o más de los siguientes efectos: producción de anticuerpos, células B, células T ayudantes y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a uno o más antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped expresará una respuesta inmunológica ya sea terapéutica o protectora de manera tal que mejorará la resistencia a una nueva infección y/o se reducirá la severidad clínica de la enfermedad. Dicha protección se demostrará ya sea mediante una reducción o la falta de los síntomas que normalmente son expresados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral disminuido en el huésped infectado.

Los términos "recombinante" y "modificado genéticamente" se usan indistintamente y se refieren a cualquier modificación, alteración o modificación genética de un polinucleótido o una proteína con respecto a su forma o estructura nativa, o cualquier modificación, alteración o modificación genética de un polinucleótido o proteína en su entorno o alrededores nativos. La modificación, alteración o modificación genética de un polinucleótido o de una proteína puede incluir, pero en un sentido no taxativo, la supresión de uno o

más nucleótidos o aminoácidos, la supresión de un gen completo, la optimización de codones de un gen, la sustitución conservadora de aminoácidos, la inserción de uno o más polinucleótidos heterólogos.

Los términos “vacuna o composición polivalente”, “vacuna o composición combinada o combo” y “vacuna o composición multivalente” se usan indistintamente para hacer referencia a una composición o vacuna que contiene más de una composición o vacuna. La vacuna o composición polivalente puede contener dos, tres, cuatro o más composiciones o vacunas. La vacuna o composición polivalente puede comprender vectores virales recombinantes, virus de tipo salvaje activos o atenuados o muertos, o una mezcla de vectores virales recombinantes y virus de tipo salvaje en las formas activas o atenuadas o muertas.

Una forma de realización de la invención provee un vector viral HVT recombinante que comprende uno, dos o más polinucleótidos heterólogos que codifican y que expresan por lo menos un antígeno o polipéptido de un patógeno aviar. Las cepas de HVT usadas para el vector viral recombinante pueden comprender cualquiera de las cepas HVT que incluyen, pero en un sentido no taxativo, la cepa FC126 de HVT (Igarashi T. y col., *J. Gen. Virol.* 70, 1789-1804, 1989).

Los genes que codifican antígenos o polipéptidos pueden comprender aquellos que codifican la proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F), la hemaglutinina neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-HN), glicoproteína C del virus de la enfermedad de Marek (gC), la glicoproteína B del virus de la enfermedad de Marek (gB), la glicoproteína E del virus de la enfermedad de Marek (gE), la glicoproteína I del

virus de la enfermedad de Marek (gI), la glicoproteína H del virus de la enfermedad de Marek (gH) o la glicoproteína L del virus de la enfermedad de Marek (gL), VP2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV), VPX del IBDV, VP3 del IBDV, VP4 del IBDV, la glicoproteína B del ILTV, la glicoproteína I del ILTV, UL32 del ILTV, la glicoproteína D del ILTV, la glicoproteína E del ILTV, la glicoproteína C del ILTV, hemaglutinina de la influenza (HA), neuraminidasa de la influenza (NA), genes protectores derivados de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) o de *Mycoplasma synoviae* (MS) o combinaciones de los mismos. El antígeno o polipéptido puede ser cualquier antígeno del patógeno de aves de corral seleccionado del grupo que consiste en el virus de encefalomiелitis aviar, el reovirus aviar, el paramixovirus aviar, el metapneumovirus aviar, el virus de la influenza aviar, un adenovirus aviar, un virus fowl pox, un coronavirus aviar, un rotavirus aviar, un virus de anemia de pollos, un astrovirus aviar, un parvovirus aviar, un retrovirus aviar, un picornavirus aviar, coccidiosis (*Eimeria sp.*), *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.*, *Pasteurella sp.*, *Avibacterium sp.*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Clostridium sp.* y *Escherichia coli*.

Aún más, se considera que los antígenos o polipéptidos mencionados precedentemente se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Según se utiliza en la presente, el término “homólogos” incluye ortólogos, análogos y parálogos. El término “análogos” hace referencia a dos polinucleótidos o polipéptidos que tienen una función idéntica o similar, pero que han evolucionado por separado en organismos no relacionados. El término “ortólogos” hace referencia a dos polinucleótidos o polipéptidos de especies diferentes, pero que han evolucionado a partir de un gen ancestral común por

especiación. Normalmente, los ortólogos codifican polipéptidos que cumplen funciones idénticas o funciones similares. El término “parálogos” hace referencia a dos polinucleótidos o polipéptidos que están relacionados por duplicación dentro de un genoma. Los parálogos habitualmente cumplen funciones diferentes, pero estas funciones pueden estar relacionadas. Los análogos, ortólogos y parálogos de un polipéptido de tipo salvaje pueden diferir del polipéptido de tipo salvaje por modificaciones de postraducción, por diferencias en la secuencia de aminoácidos o ambas. En particular, los homólogos de la invención exhibirán en general al menos 80-85%, 85-90%, 90-95% o 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia, con todo o parte de las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos de los antígenos descritos antes, y su función será similar.

En una forma de realización, la presente invención provee un vector viral HVT recombinante que comprende uno, dos o más polinucleótidos heterólogos que codifican y que expresan el antígeno o polipéptido NDV-F, el antígeno o polipéptido VP2 del IBDV, el antígeno o polipéptido gD del ILTV o una combinación de los mismos. En un aspecto de la forma de realización, el antígeno o polipéptido NDV-F presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 5 o 22, o una variante conservadora, una variante alélica, un homólogo o un fragmento inmunogénico que comprende por lo menos ocho o por lo menos diez aminoácidos consecutivos de uno de estos polipéptidos, o una combinación de estos polipéptidos. En otro aspecto de la forma de realización, el polinucleótido heterólogo codifica un antígeno o polipéptido NDV-F que presenta por lo menos

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 5. En aún otro aspecto de la forma de realización, el polinucleótido heterólogo presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polinucleótido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 3, 4 o 21.

En otro aspecto de la forma de realización, el antígeno o polipéptido VP2 del IBDV presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 2, o una variante conservadora, una variante alélica, un homólogo o un fragmento inmunogénico que comprende por lo menos ocho o por lo menos diez aminoácidos consecutivos de uno de estos polipéptidos, o una combinación de estos polipéptidos. En otro aspecto de la forma de realización, el polinucleótido heterólogo codifica un antígeno o polipéptido VP2 del IBDV que presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 2. En aún otro aspecto de la forma de realización, el polinucleótido heterólogo presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polinucleótido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 1.

En otro aspecto de la forma de realización, el antígeno o polipéptido gD del ILTV presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 17, o una variante conservadora,

una variante alélica, un homólogo o un fragmento inmunogénico que comprende por lo menos ocho o por lo menos diez aminoácidos consecutivos de uno de estos polipéptidos, o una combinación de estos polipéptidos. En otro aspecto de la forma de realización, el polinucleótido heterólogo codifica un antígeno o polipéptido gD del ILTV que presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 17. En aún otro aspecto de la forma de realización, el polinucleótido heterólogo presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polinucleótido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 16.

Las variantes incluyen las variantes alélicas. El término “variante alélica” hace referencia a un polinucleótido o un polipéptido que contiene polimorfismos que dan como resultado cambios en las secuencias de aminoácidos de una proteína y que existen dentro de una población natural (por ejemplo, una especie o una variedad de virus). Dichas variaciones alélicas naturales típicamente pueden dar como resultado una variación de 1-5% en un polinucleótido o un polipéptido. Las variantes alélicas se pueden identificar mediante secuenciación de la secuencia del ácido nucleico de interés en diversas especies, lo cual se puede efectuar fácilmente usando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético del gen en dichas especies. Se considera que cualquiera y la totalidad de las variaciones de los ácidos nucleicos y de los polimorfismos o las variaciones de los aminoácidos resultantes, que son el resultado de una variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional del gen de interés, se encuentran dentro del

alcance de la invención.

El término “identidad” con respecto a secuencias puede hacer referencia, por ejemplo, al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las dos secuencias, en donde el alineamiento de las dos secuencias se puede determinar de acuerdo con el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur y Lipman). La identidad de secuencia o similitud de secuencia de dos secuencias de aminoácidos, o la identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el paquete de software Vector NTI (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA). Cuando se dice que dos secuencias de ARN son similares o tienen un grado de identidad u homología de secuencia con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN. Por lo tanto, las secuencias de ARN se encuentran dentro del alcance de la invención y se pueden obtener a partir de secuencias de ADN, si se tiene en cuenta que la timidina (T) en las secuencias de ADN es igual al uracilo (U) en las secuencias de ARN.

Los polinucleótidos de la invención incluyen secuencias que son degeneradas como resultado del código genético, por ejemplo, del uso de codones optimizados para un huésped específico. Según se utiliza en la presente, el término “optimizado” hace referencia a un polinucleótido que fue manipulado genéticamente para incrementar su expresión en una especie dada. Para proporcionar polinucleótidos optimizados que codifican polipéptidos NDV-F, VP2 del IBDV o gD del ILTV, se puede modificar la secuencia de ADN de estos genes para que 1) comprenda los codones preferidos por los genes

de gran expresión en una especie particular; 2) comprenda un contenido de A+T o G+C en la composición de las bases de nucleótidos que sea sustancialmente el que se encuentra en dichas especies; 3) forme una secuencia de inicio en dichas especies; o 4) elimine las secuencias que causan desestabilización, poliadenilación inapropiada, degradación y terminación de ARN, o que forme horquillas en la estructura secundaria o sitios de procesamiento de ARN. Se puede lograr una mayor expresión de proteínas NDV F, VP2 del IBDV o gD del ILTV en dichas especies utilizando la frecuencia de distribución de utilización de codones en eucariotas y procariotas, o en una especie particular. El término “frecuencia de uso de los codones preferidos” hace referencia a la preferencia que presenta una célula huésped específica en el uso de los codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Hay 20 aminoácidos naturales, y la mayoría de ellos es especificada por más de un codón. Por ello, todas las secuencias de nucleótidos degeneradas están incluidas en la divulgación siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido NDV-F, VP2 del IBDV o gD del ILTV codificado por la secuencia de nucleótidos permanezca funcionalmente sin cambios.

La expresión exitosa de los polinucleótidos heterólogos por el virus infeccioso recombinante/modificado requiere dos condiciones. Primero, los polinucleótidos heterólogos se deben insertar o introducir en una región del genoma del virus para que el virus modificado permanezca viable. La segunda condición para la expresión de los polinucleótidos heterólogos insertados es la presencia de secuencias reguladoras que permiten la expresión del gen en el antecedente viral (por ejemplo: promotores, potenciadores, sitios de corte y empalme donantes y aceptores y de intrones, una secuencia consenso de

inicio de la traducción de Kozak, señales de poliadenilación, elementos de secuencia no traducidos).

El sitio de inserción puede ser cualquier región no esencial del genoma del HVT, que incluyen, pero en un sentido no taxativo, la región entre el codón de terminación STOP de ORF UL55 y la unión de UL con la región de repetición adyacente (región intergénica 1, locus IG1, US 5.980.906), el locus IG2 (región intergénica 2), el locus IG3 (región intergénica 3), el locus UL43, el locus US10, el locus US2, el locus SORF3/US2 (véase la Figura 2)

En general, resulta ventajoso emplear un promotor fuerte que sea funcional en las células eucariotas. Los promotores incluyen, pero en un sentido no taxativo, un promotor del citomegalovirus (CMV) humano (hCMV) temprano inmediato (IE), un promotor IE del CMV de ratón (mCMV), un promotor IE del CMV de cobayo (gpCMV), un promotor SV40, promotores del virus de *Pseudorabies* tal como el promotor de la glicoproteína X, el promotor del virus de *Herpes Simplex* 1 tal como el promotor alfa 4, promotores de los virus de la enfermedad de Marek (que incluyen MDV-1, MDV-2 y HVT) tales como los que dirigen la expresión de las glicoproteínas gC, gB, gE o gI, el promotor HHV3gB (promotor de la glicoproteína B tipo 3 del *Herpesvirus* humano), promotores del virus de laringotraqueítis infecciosa tales como los promotores de los genes de la glicoproteína gB, gE, gI, gD, gC, u otros promotores de herpesvirus .

Una forma de realización de la invención provee un vector HVT recombinante que comprende un primer polinucleótido heterólogo que codifica y que expresa el antígeno o polipéptido VP2 del IBDV y un segundo polinucleótido que codifica y que expresa el antígeno o polipéptido NDV-F. En

un aspecto de la forma de realización, el antígeno o polipéptido NDV-F presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 5. En otro aspecto de la forma de realización, el antígeno o polipéptido VP2 del IBDV presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 2. En otro aspecto, el polinucleótido que codifica el polipéptido NDV-F está ligado operativamente al promotor SV40 que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 7 y la expresión del antígeno o polipéptido NDV-F está regulada por el promotor SV40. En aún otro aspecto, la expresión del antígeno o polipéptido NDV-F está regulada por la señal poliA SV40 cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 8, o la señal poliA sintética cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 9. En otro aspecto, la expresión del antígeno o polipéptido VP2 del IBDV está regulada por el promotor IE del mCMV cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 6 y la señal poliA SV40 cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 8 o la señal poliA sintética cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 9.

Otra forma de realización de la invención provee un vector HVT recombinante que comprende un primer polinucleótido heterólogo que codifica y que expresa el antígeno o polipéptido VP2 del IBDV y un segundo polinucleótido que codifica y que expresa el antígeno o polipéptido NDV-F, y que además comprende una secuencia que regula la expresión del segundo polinucleótido. Las secuencias reguladoras o los conectores pueden comprender un sitio de ingreso a ribosomas interno (IRES), una secuencia de

ARN derivada del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) o una secuencia que codifica un péptido autoescindible 2A del teschovirus porcino o un péptido (P2A) del virus de la enfermedad de fiebre aftosa (FMDV).

En un aspecto de la forma de realización, el vector HVT recombinante comprende un primer polinucleótido que codifica el antígeno VP2 del IBDV y un segundo polinucleótido que codifica el antígeno NDV-F, y comprende además el IRES cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 10. En otro aspecto de la forma de realización, el HVT recombinante comprende un primer polinucleótido que codifica el antígeno VP2 del IBDV y un segundo polinucleótido codifica el antígeno NDV-F, y comprende además el P2A que codifica un polinucleótido cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 11.

Una forma de realización de la invención provee un vector HVT recombinante que comprende un primer polinucleótido heterólogo que codifica y que expresa el antígeno o polipéptido NDV-F y un segundo polinucleótido que codifica y que expresa el antígeno o polipéptido gD del ILTV, y que además comprende una secuencia que regula la expresión del segundo polinucleótido. Las secuencias reguladoras o los conectores pueden comprender un sitio de ingreso a ribosomas interno (IRES), una secuencia de ARN derivada del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) o una secuencia que codifica un péptido autoescindible 2A del teschovirus porcino o un péptido (P2A) del virus de la enfermedad de fiebre aftosa (FMDV). En un aspecto de la forma de realización, el antígeno o polipéptido gD del ILTV presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 17. En otro aspecto de la forma de realización, el antígeno o polipéptido NDV-F

presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 5 o 22. En aún otro aspecto de la forma de realización, el vector HVT recombinante comprende un primer polinucleótido que codifica el antígeno NDV F y un segundo polinucleótido que codifica el antígeno gD del ILTV, y comprende además el IRES cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 10.

Otra forma de realización de la invención provee un vector HVT recombinante que comprende un primer polinucleótido heterólogo que codifica y que expresa el antígeno o polipéptido NDV-F y un segundo polinucleótido que codifica y que expresa el antígeno o polipéptido gD del ILTV. En un aspecto de la forma de realización, el antígeno o polipéptido gD del ILTV presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 17. En otro aspecto de la forma de realización, el antígeno o polipéptido NDV-F presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 5 o 22. En un aspecto, el polinucleótido que codifica el polipéptido NDV F está ligado operativamente al promotor SV40 y la expresión del antígeno o polipéptido NDV F está regulada por el promotor SV40. En otro aspecto, el polinucleótido que codifica el polipéptido gD del ILTV está ligado operativamente al promotor HHV3gB y la expresión del antígeno o polipéptido gD del ILTV está regulada por el promotor HHV3gB. En aún otro aspecto, el promotor HHV3gB se encuentra en la dirección inversa. En aún otro aspecto, las expresiones del antígeno NDV F y

del antígeno gD del ILTV están reguladas por el promotor SV40 y el promotor HHV3gB inverso, y se encuentran en direcciones opuestas.

Otra forma de realización de la invención provee un vector HVT recombinante que comprende un primer polinucleótido heterólogo que codifica y que expresa el antígeno o polipéptido VP2 del IBDV y un segundo polinucleótido que codifica y que expresa el antígeno o polipéptido gD del ILTV. En un aspecto de la forma de realización, el antígeno o polipéptido gD del ILTV presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 17. En otro aspecto de la forma de realización, el antígeno o polipéptido VP2 del IBDV presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 2. En aún otro aspecto de la forma de realización, el vector HVT recombinante comprende un primer polinucleótido que codifica el antígeno VP2 del IBDV y un segundo polinucleótido que codifica el antígeno gD del ILTV, y comprende además el IRES cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 10.

Otra forma de realización de la invención provee un vector HVT recombinante que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica y que expresa el antígeno o polipéptido gD del ILTV. En un aspecto de la forma de realización, el antígeno o polipéptido gD del ILTV presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 17. En otro aspecto de la forma de realización, el polinucleótido que codifica el polipéptido gD del ILTV está ligado operativamente al promotor SV40 y la

expresión del antígeno o polipéptido gD del ILTV está regulada por el promotor SV40.

En una forma de realización, los polinucleótidos que codifican el antígeno VP2 del IBDV y/o el antígeno NDV-F y/o el antígeno gD del ILTV se pueden insertar en una o más regiones de locus seleccionadas del grupo que consiste en IG1, IG2, US10, US2, SORF3-US2 y gD del genoma del HVT. En otra forma de realización, los polinucleótidos que codifican el antígeno VP2 del IBDV y/o el antígeno NDV-F y/o el antígeno gD del ILTV se insertan en el mismo locus, tal como IG1 del genoma de HVT.

En una forma de realización, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica o vacuna que comprende uno o más vectores HVT recombinantes de la presente invención y un transportador, excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente o veterinariamente aceptable. El vector HVT puede comprender dos polinucleótidos heterólogos, y donde el primer polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un antígeno VP2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV), un antígeno de la glicoproteína D (gD) del virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV) y un antígeno F del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F), y en donde el segundo polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un antígeno VP2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV), un antígeno de la glicoproteína D (gD) del virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV) y un antígeno F del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F).

En otra forma de realización, la presente invención provee una

composición o vacuna que comprende un vector viral HVT que comprende: i) un primer polinucleótido heterólogo que codifica y que expresa un antígeno VP2 del IBDV o un antígeno NDV-F; ii) un segundo polinucleótido que codifica y que expresa un antígeno NDV-F o un antígeno VP2 del IBDV; y iii) opcionalmente, un transportador, excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente o veterinariamente aceptable. En aún otra forma de realización, la presente invención provee una composición o vacuna que comprende un vector viral HVT que comprende: i) un primer polinucleótido heterólogo que codifica y que expresa un antígeno VP2 del IBDV o un antígeno gD del ILTV; ii) un segundo polinucleótido que codifica y que expresa un antígeno gD del ILTV o un VP2 del IBDV; y iii) opcionalmente, un transportador, excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente o veterinariamente aceptable. En aún otra forma de realización, la presente invención provee una composición o vacuna que comprende un vector viral HVT que comprende: i) un primer polinucleótido heterólogo que codifica y que expresa un antígeno NDV-F o un antígeno gD del ILTV; ii) un segundo polinucleótido que codifica y que expresa un antígeno gD del ILTV o un antígeno NDV-F; y iii) opcionalmente, un transportador, excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente o veterinariamente aceptable. En aún otra forma de realización, la presente invención provee una composición o vacuna que comprende un vector viral HVT que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica y que expresa un antígeno gD del ILTV, y opcionalmente, un transportador, excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente o veterinariamente aceptable. En aún otra forma de realización, la presente invención provee una composición o vacuna que comprende un HVT que

comprende un polinucleótido que presenta por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polinucleótido que presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 25, 26 o 27. En una forma de realización, se muestra que la inserción de dos o más polinucleótidos heterólogos en un locus confiere una mejor protección y eficacia que la inserción en múltiples loci. En otra forma de realización, se muestra que la expresión de más de un polinucleótido heterólogo de un solo ARNm a través de un IRES o P2A provee una mayor protección y eficacia contra las enfermedades de las aves. En aún otra forma de realización, los datos experimentales provistos por la presente invención divulgan que las construcciones que comprenden elementos de un IRES proporcionan una mayor protección que las construcciones que comprenden elementos de P2A.

Los transportadores o adyuvantes o vehículos o excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables son bien conocidos por un especialista en el arte. Por ejemplo, un transportador o adyuvante o vehículo o excipiente farmacéuticamente o veterinariamente aceptable puede ser un diluyente de una vacuna contra la enfermedad de Marek usado para las vacunas MD. Otros transportadores o adyuvantes o vehículos o excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables que se pueden usar en los métodos de esta invención incluyen, pero en un sentido no taxativo, una solución 0,9% de NaCl (por ejemplo, salina) o una solución amortiguadora de fosfato, poli-(L-glutamato), el diluyente para inyecciones de Ringer lactato (cloruro de sodio, lactato de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio) o polivinilpirrolidona. Los transportadores o vehículos o adyuvantes o excipientes

farmacéuticamente o veterinariamente aceptables pueden comprender cualquier compuesto o combinación de compuestos que faciliten la administración del vector (o proteína expresada a partir de un vector de la invención *in vitro*) que faciliten la transfección o infección y/o mejoren la preservación del vector (o de la proteína). Las dosis y los volúmenes de dosis se describen en la presente en la descripción general y también pueden ser determinados por el especialista a partir de esta divulgación conjuntamente con el conocimiento en el arte, sin una experimentación innecesaria.

Opcionalmente se pueden agregar otros compuestos como transportadores o adyuvantes o vehículos o excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables, que incluyen, pero en un sentido no taxativo, alúmina; oligonucleótidos CpG (ODN), en particular ODN 2006, 2007, 2059 o 2135 (Pontarollo R.A. y col., *Vet. Immunol. Immunopath*, 2002, 84: 43-59; Wernette C.M. y col., *Vet. Immunol. Immunopath*, 2002, 84: 223-236; Mutwiri G. y col., *Vet. Immunol. Immunopath*, 2003, 91: 89-103); poliA-poliU, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) ("Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach", editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, *Pharmaceutical Biotechnology*, 6: p. 03, p. 157); N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)propandiamina (tal como AVRIDINE®) (*Ibid*, p. 148); carbómero, quitosán (véase la Patente de los EEUU N° Acta: 5.980.912).

Las composiciones farmacéuticas y vacunas de acuerdo con la invención pueden comprender o consistir esencialmente en uno o más adyuvantes. Los adyuvantes adecuados para usar en la práctica de la presente invención son (1) polímeros de ácido acrílico o metacrílico, polímeros derivados de anhídrido maleico y alquenilo, (2) secuencias inmunoestimulantes

(ISS), tales como secuencias de oligodesoxirribonucleótidos que tienen una o más unidades de CpG no metiladas (Klinman y col., 1996; WO98/16247), (3) una emulsión de aceite en agua, tal como la emulsión SPT que se describe en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" publicada por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 que se describe en la página 183 del mismo trabajo, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, por ejemplo, DDA, (5) citoquinas, (6) hidróxido de alúmina o fosfato de alúmina, (7) saponina u (8) otros adyuvantes que se describen en cualquiera de los documentos citados e incorporados a modo de referencia en la presente solicitud, o (9) cualquier combinación o mezclas de los mismos.

En una forma de realización, el adyuvante puede incluir TS6 TS7, TS8 y TS9 (US 7.371.395), LR2, LR3 y LR4 (US 7.691.368), TSAP (US 20110129494), TRIGEN™ (Newport Labs), ARNhd sintéticos (por ejemplo, poli-IC, poli-ICLC [HILTONOL®]) y los adyuvantes MONTANIDE™ (Ag/Ac, Ag/Ac/Ag, Ac/Ag, IMS y Gel; todos producidos por SEPPIC).

En otra forma de realización, la invención provee la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna o composición para suministrar los vectores HVT recombinantes en una célula blanco. La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz es de experimentación rutinaria para un especialista en el arte.

Otro aspecto de la invención se relaciona con un método para inducir en un animal una respuesta inmunológica contra uno o más antígenos o una respuesta protectora en un animal contra uno o más patógeno aviares, donde dicho método comprende inocular al animal, por lo menos una vez, la vacuna o

composición farmacéutica de la presente invención. Aún otro aspecto de la invención se relaciona con un método para inducir una respuesta inmunológica en un animal contra uno o más antígenos o una respuesta protectora en un animal contra uno o más patógeno aviares según un régimen de administración de sensibilización-refuerzo, que está compuesto por al menos una administración primaria y por lo menos una administración de refuerzo usando por lo menos un polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno común. La composición o vacuna inmunológica usada en la administración primaria puede ser de la misma naturaleza o de naturaleza diferente a la usada como refuerzo.

Los patógenos aviares pueden comprender el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (es decir, IBDV o virus de la enfermedad de Gumboro), el virus de la enfermedad de Marek (MDV), el virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV), el virus de la encefalomiелitis aviar, un reovirus aviar, un paramixovirus aviar, un metapneumovirus aviar, un virus de influenza aviar, un adenovirus aviar, un virus fowl pox, un coronavirus aviar, un rotavirus aviar, un parvovirus aviar, un astrovirus aviar y un virus de anemia de pollo, coccidiosis (*Eimeria sp.*), *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella sp.*, *Avibacterium sp.*, *E. coli* o *Clostridium sp.*

Habitualmente, la administración de la vacuna en las aves se efectúa ya sea el día uno de vida por la ruta subcutánea o intramuscular o *in ovo* en embriones de 17-19 días de vida. La segunda administración se puede efectuar dentro de los 0-30 días después de la primera administración.

Se puede emplear una variedad de rutas de administración en pollos de pocos días de vida, tal como por vía subcutánea o intramuscular, intradérmica,

transdérmica. La vacunación *in ovo* se puede efectuar en el saco amniótico y/o en el embrión. Se pueden utilizar dispositivos de administración *in ovo* y SC disponibles comercialmente para la vacunación.

La composición o vacuna puede contener una dosis de entre aproximadamente 10^2 y aproximadamente 10^{20} , entre aproximadamente 10^3 y aproximadamente 10^{18} , entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^{16} , entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^{12} VLP (partículas tipo virus) producida *in vitro* o *in vivo* a partir de un vector viral, un plásmido o un baculovirus. El vector viral se puede titular basado en cualquier método de titulación de virus que incluye, pero en un sentido no taxativo, FFA (ensayo formador de focos) o FFU (unidades formadores de focos), TCID₅₀ (50% de la dosis infecciosa de cultivo tisular), PFU (unidades formadoras de placas) y FAID₅₀ (50% de la dosis infecciosa de anticuerpos fluorescentes) y las VLP producidas *in vitro* se pueden titular en un ensayo de hemaglutinación, ELISA y microscopía electrónica. También se pueden aplicar otros métodos dependiendo del tipo de VLP.

La composición o vacuna puede contener entre aproximadamente $10^{2,0}$ y aproximadamente $10^{7,0}$ TCID₅₀ o PFU/dosis, entre aproximadamente $10^{2,0}$ y aproximadamente $10^{7,0}$ TCID₅₀ o PFU/dosis y entre aproximadamente $10^{2,0}$ y aproximadamente $10^{6,5}$ TCID₅₀ o PFU/dosis.

Los volúmenes de dosis pueden ser de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 ml, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 5 ml.

A continuación la presente invención se describirá con referencia a los siguientes ejemplos no taxativos.

EJEMPLOS

La construcción de insertos de ADN, plásmidos y vectores virales recombinantes se llevó a cabo usando las técnicas estándares de biología molecular descritas en J. Sambrook y *col.*, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4° edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2014).

Ejemplo 1 Construcción de vectores de HVT recombinantes que expresan dos genes

Ejemplo 1.1 Construcción de vHVT309 recombinante que expresa IBDV-VP2 y NDV-F

El objetivo del estudio es construir un HVT recombinante en donde se integra un casete de expresión que contiene un promotor de citomegalovirus de ratón (mCMV), un gen que codifica para la proteína viral 2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (VP2), la cola de poli A del virus del simio 40 (poli A de SV40), el promotor del virus del simio 40 (promotor de SV40), un gen que codifica para una proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F) y una cola de poli A sintética (cola de poli A sin) en el sitio intergénico 1 (IG1).

El virus parental que se usa en la construcción es el vHVT13 (un vector de HVT que expresa el gen VP2 de IBDV, el ingrediente activo de la vacuna VAXXITEK® de Merial (HVT+IBD), también conocido como vHVT17 en el documento US 5.980.906). El vector vHVT13 contiene un casete de expresión compuesto por el promotor IE de mCMV (SEQ ID NO:6), el gen VP2 del IBDV (SEQ ID NO:1 que codifica para la SEQ ID NO:2), y la cola de poli A de SV40 (SEQ ID NO:8) insertados en el sitio de inserción IG1. Se sintetizó

químicamente y se optimizaron sus codones una Proteína de Fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F) correspondiente a la secuencia del genotipo VIId (GenScript). El sitio de escisión de la proteína F de este gen sintético se alteró para que coincida con una secuencia de sitio de escisión F lentogénica y la secuencia génica de NDV-F resultante tiene un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de NDV-F depositada en GenBank (AY337464). Se usó el promotor IE de CMV de ratón para el IBD-VP2, y se usó el promotor de SV40 para el NDV-F. El *locus* de inserción es el sitio intergénico 1 (IG1) en el HVT (Figura 2). El plásmido donante pFSV40VP2 (un plásmido de inserción que contiene la poli A de VP2/SV40 y el brazo flanqueante de IG1+promotor de SV40+NDV-F+poli A sintética) se construyó como se describe más adelante. Se usaron células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) para la recombinación *in vitro*.

Construcción del plásmido donante

El ADN sintético en el pUC57 que contiene el gen VP2 del IBDV (SEQ ID NO:1 que codifica para la SEQ ID NO:2), la cola de poli A de SV40 (SEQ ID NO:8), el promotor de SV40 (SEQ ID NO:7), el gen NDV-F (SEQ ID NO:3 que codifica para la SEQ ID NO:5), y una cola de poli A sintética (SEQ ID NO:9) se sintetizó mediante GeneScript (Figura 3). El plásmido, pFSV40VP2 se transformó usando el kit Top10 Oneshot (# de catálogo C404002, Invitrogen) y se hizo crecer un cultivo a gran escala y se hizo la extracción de plásmidos usando el kit Maxi Prep de Qiagen. La expresión transitoria de la maxi prep se verificó usando el reactivo de transfección Fugene en células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) y suero policlonal de pollo contra el NDV.

Generación de recombinante

Se siguió un procedimiento de recombinación homóloga estándar mediante electroporación de células CEF secundarias usando el plásmido pFSV40VP2 y ADN viral aislado de la Vacuna vHVT13. La co-electroporación se llevó a cabo usando 1×10^7 CEF 2° en 300 μ l de Opti-MEM y se hizo tratamiento a 150 volts con capacitancia 950 en una cubeta de electroporación de 2 mm. Las células transfectadas se sembraron en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 4 días. Las células crecidas en la placa de 96 pocillos se duplicaron luego en dos placas de 96 pocillos y se incubaron durante 3 días más. Un juego de placas de 96 pocillos se usó para la IFA usando suero policlonal de pollo contra el NDV-F para identificar los pocillos positivos que contiene recombinantes y otro grupo de placas de 96 pocillos se usó para recuperar las células infectadas a partir de los pocillos positivos.

Los métodos de purificación de virus recombinantes se llevaron a cabo primero por duplicación de placa de 96 pocillos y selección mediante IFA de los pocillos que contiene las placas más positivas por IFA con la menor cantidad de placas negativas por IFA. Los pocillos que cumplen con esos criterios se cosecharon y se llevaron a 1 ml con DMEM+2% de FBS. A partir de la reserva de 1 ml, se tomaron entre 5 y 20 μ l y se mezclaron con 1×10^7 CEF en 10 ml de DMEM+2% de FBS y se separaron en alícuotas a una nueva placa de 96 pocillos para tener placas de virus individuales por pocillo. Las placas de 96 pocillos se duplicaron después de 5 días de incubación y se probaron los pocillos que contenían las placas para ver la presencia de recombinantes dobles y ausencia de virus parental vHVT13 por IFA y PCR. Nuevamente, los pocillos que parecían tener más virus recombinante, por comparación de los resultados de bandeo por PCR, se cosecharon y llevaron a 1 ml y se separaron

en alícuotas en nuevas placas de 96 pocillos. Después de dos rondas de purificación de células infectadas con virus, se aisló virus recombinante que expresa la proteína NDV-F y se ensayó la pureza del virus recombinante por IFA y PCR para confirmar la ausencia de virus parental.

Análisis de recombinantes por PCR

Se extrajo ADN de una reserva de virus por extracción con fenol/cloroformo, precipitación con etanol, y se resuspendió en HEPES 20 mM. Se diseñaron cebadores de PCR (Tabla 1) para identificar específicamente el gen IBDV-VP2 y el gen NDV-F Vllid, los promotores, las poli A, así como también la pureza del virus recombinante de virus parental Vaxxitek. Las localizaciones de los sitios de unión de los cebadores se muestran en la Figura 4. La PCR se llevó a cabo usando 200 µg de molde de ADN junto con los pares de cebadores específicos que se indican en la Tabla 1. Las condiciones de ciclado de la PCR son como sigue: 94°C – 2 min; 30 ciclos de 94°C – 30 segundos, 60°C – 45 segundos, 68°C – 3 min (5 min para el grupo de cebadores MB080+MB081); 68°C – 5 min (7 min para el grupo de cebadores MB080+MB081).

Tabla 1 Bandas de PCR esperadas usando los juegos de cebadores específicos

Grupo de cebadores	Vaxxitek	vHVT309
MB080+MB081	3350	5577
MB010+NDVFVllidopt.F	--	737
MB080+VP2.F	405	2632
SV40tailR+mCMVF	3021	3021
syntailR+SV40promoterF	--	2184

Análisis de expresión

Para la prueba por inmunofluorescencia, se diluyó el material recombinante 1:100 en medio. Aproximadamente 50 µl del virus diluido se agregó a 20 ml de DMEM+2% de FBS con 2×10^7 CEF y luego se separó en alícuotas en dos placas de 96 pocillos (100 µl/pocillo). Se incubaron las placas durante 4 días a 37°C+5% de CO₂ hasta que las placas virales se hicieron visibles. Se fijaron las placas con 95% de acetona enfriada en hielo durante tres minutos, se dejaron secar al aire durante diez minutos y se lavaron tres veces con agua. Se llevó a cabo una tinción inmunofluorescente dual para la placa #1 usando antisuero de pollo contra el virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV Pab) (lote # C0117A, Charles Rivers Laboratories) a 1:500 y anticuerpo monoclonal anti-HVT L78 (Mab anti-HVT) (Lee y col., 1983, J. Immunol. 130 (2) 1003-6; lote Merial) a 1:3000 y se incubó la placa a 37°C durante 1 hora. La inmunofluorescencia dual se llevó a cabo para la placa #2 usando el antisuero de pollo contra virus de la Enfermedad de Bursitis Infecciosa (IBDV Pab) a 1:500 (lote # G0117, Charles Rivers Laboratories) y anticuerpo monoclonal anti-HVT L78 (Mab anti-HVT) (Merial) a 1:3000 y se incubó la placa a 37°C durante 1 hora. Después de una hora de incubación, se lavaron las placas tres veces con PBS. Tanto a la placa #1 como a la #2 se agregó anti-IgG de pollo marcado con FITC (# de catálogo F8888, Sigma) a 1:500 y anticuerpo de burro anti ratón con Alexa Flúor marcado con TRITC (# de catálogo A10037, Invitrogen) a 1:300. Nuevamente, se incubaron las placas a 37°C durante 1 hora. Después de una hora de incubación se lavaron las células tres veces con PBS y se visualizaron con un microscopio de

fluorescencia usando filtro para isotiocianato de fluoresceína (FITC) y filtro para tetrametil rodamina iso-tiocianato (TRITC).

Resultados

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del plásmido donante pFSV40VP2 se les asigna SEQ ID NO como se muestra en la Figura 1.

Análisis de generación y expresión recombinante

El ADN genómico del virus vHVT13 se coelectroporó con el plásmido donante pFSV40VP2 para generar un recombinante usando la técnica de recombinación homóloga. Se separó el virus recombinante del virus Vaxxitek parental por selección de pocillos inmunofluorescentes positivos y tamizaje por PCR en ronda múltiple de purificación en placa. Se escaló un virus recombinante purificado en placa que expresa la proteína NDV-F, designado vHVT309, desde frascos de cultivo de tejido a 5 botellas de rodar de 850cm². Después de aproximadamente 72 hrs posteriores a la infección se recolectaron las CEF infectadas. Las alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido, cada alícuota contenía 10% de FBS y DMSO 10%. Las titulaciones se llevaron a cabo por triplicado en CEF y se obtuvo un título de $1,5 \times 10^5$ pfu/ml para vHVT309.

Se llevó a cabo una tinción inmunofluorescente dual usando antisuero de pollo (Pab) a 1:500 y anticuerpo monoclonal anti-HVT L78 (Mab) a 1:3000 seguido por un anti-IgG de pollo marcado con FITC a 1:500 y anticuerpo de burro anti ratón con Alexa Flúor marcado con TRITC a 1:300. La placa #1 compara la expresión del virus de la Enfermedad de Newcastle con HVT y la placa #2 compara la expresión del virus de la Enfermedad de Bursitis

Infecciosa con HVT. Se encontró que todas las placas positivas para HVT TRITC examinadas de vHVT309 expresan las proteínas NDV-F e IBDV-VP2.

Análisis por PCR de vHVT309

La pureza del virus recombinante se verificó por PCR usando pares de cebadores que son específicos por los brazos flanqueantes de HVT, los promotores, los genes de NDV-F e IBDV-VP2, y las colas poli A. Los resultados de PCR demuestran que el virus recombinante vHVT309 porta el casete de expresión deseado y que la solución madre de virus está libre de cantidades detectables de virus Vaxxitek parental (Tabla 1 y Figura 5).

CONCLUSIÓN

En base a la prueba de PCR y en análisis de inmunofluorescencia, vHVT309 es un virus recombinante que contiene un gen de IBDV-VP2 bajo el control del promotor mCMV y un gen de NDV-F bajo el control de un promotor de SV40. El recientemente generado vHVT309 está libre de cualquier virus vHVT13 parental detectable.

Ejemplo 1.2 Construcción de vHVT310 recombinante que expresa IBDV-VP2 y NDV-F

El objetivo del estudio es construir un HVT recombinante en el cual se integra un casete de expresión que contiene un promotor de citomegalovirus de ratón (mCMV), un gen que codifica para una proteína viral 2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (VP2), sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), un gen que codifica para una proteína de fusión del virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV-F), y la cola de poli A del virus del simio 40 (poli A de SV40) en el sitio intergénico 1 (IG1) (Figura 2).

El virus parental que se usa en la construcción es el vHVT13. Se sintetizó químicamente una Proteína de Fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F) correspondiente a la secuencia del genotipo VIIId y se optimizaron sus codones (GenScript). El sitio de escisión de la proteína F de este gen sintético se alteró para que coincida con una secuencia de sitio de escisión F lentogénica y la secuencia génica de NDV-F resultante tiene un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de NDV-F depositada en GenBank (AY337464). Se usó el promotor IE de CMV de ratón para el IBD-VP2 (en el virus Vaxxitek parental). IRES, una secuencia de ARN derivada del virus de Encefalomiocarditis (EMCV), que permite la iniciación de la traducción en un ARNm inmediatamente corriente debajo de donde se localiza el IRES, se insertó en el extremo del gen VP2 para iniciar la traducción de un gen NDV-F corriente abajo. Esta fue la primera vez que se usó IRES en un vector HVT.

El *locus* de inserción es el sitio intergénico 1 (IG1) en HVT (Figura 2). El plásmido donante pFIRESVP2 (un plásmido de inserción que contiene el gen VP2 + IRES+NDV-F y poli A de SV40/brazo flanqueante de IG1) se construyó como se describe más adelante. Se usaron células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) para la recombinación *in vitro*.

Construcción del plásmido donante:

El ADN sintético en pUC57 que contiene el gen VP2 del IBDV (SEQ ID NO:1 que codifica para la SEQ ID NO:2), IRES (SEQ ID NO:10), el gen NDV-F (SEQ ID NO:3 que codifica para la SEQ ID NO:5), y la cola de poli A de SV40 (SEQ ID NO:8) se sintetizó mediante GeneScript (Figura 6). El plásmido, pFIRESVP2 se transformó usando el kit Top10 Oneshot (# de catálogo

C404002, Invitrogen) y se hizo crecer un cultivo a gran escala y se hizo la extracción de plásmidos usando el kit Maxi Prep de Qiagen.

Generación de recombinante

El procedimiento de recombinación homóloga como se describe en el Ejemplo 1.1 se siguió para elaborar el vHVT310 recombinante.

Análisis de recombinantes por PCR

El procedimiento de análisis mediante PCR como se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para verificar a vHVT310.

Análisis de expresión

El análisis de expresión que se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para analizar la expresión de vHVT310.

Resultados

La secuencia de nucleótidos y aminoácidos del plásmido donante pFIRESV2 se les asignó SEQ ID NO como se muestra en la Figura 1.

Análisis de generación y expresión recombinante

El ADN genómico del virus Vaxxitek se electroporó con el plásmido donante pFIRESV2 para generar el virus recombinante usando técnica de recombinación homóloga. Se separó el virus recombinante del virus vHVT13 parental por selección de pocillos positivos para inmunofluorescencia y tamizaje por PCR en ronda múltiple de purificación en placa. Un virus recombinante purificado en placa que expresa la proteína NDV-F, designado vHVT310, se escaló desde frascos de cultivo de tejido a 5 botellas para rodar de 850 cm². Después de aproximadamente 72 hrs posteriores a la infección se recolectaron las CEF infectadas. Las alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido, cada alícuota contenía 10% de FBS y DMSO 10%. Las titulaciones se

llevaron a cabo por triplicado en CEF y se obtuvo un título de $2,0 \times 10^6$ pfu/ml para vHVT310.

La tinción de inmunofluorescencia dual se llevó a cabo usando antisuero de pollo (Pab) a 1:500 y anticuerpo monoclonal anti-HVT L78 (Mab) a 1:3000 seguido por un anti-IgG de pollo marcado con FITC a 1:500 y anticuerpo de burro anti ratón con Alexa Flúor marcado con TRITC a 1:300. La placa #1 compara la expresión del virus de la Enfermedad de Newcastle con HVT y la placa #2 compara la expresión del virus de la Enfermedad de Bursitis Infecciosa con HVT. Se encontró que todas las placas examinadas positivas para HVT TRITC de vHVT310 expresan las proteínas NDV-F e IBDV-VP2.

Análisis mediante PCR de vHVT310

La pureza del virus recombinante se verificó mediante PCR usando pares de cebadores que son específicos para los brazos flanqueantes de HVT, el promotor, los genes de NDV-F e IBDV-VP2, y la cola poliA. Los resultados de PCR demuestran que el virus recombinante vHVT310 porta el casete de expresión deseado y la solución madre del virus está libre de cantidades detectables del virus Vaxxitek parental (Tabla 2 y Figura 7-8).

Tabla 2 Bandas de PCR esperadas usando los conjuntos de cebadores específicos

Grupo de cebadores	Vaxxitek	vHVT310
MB080+MB081	3350	5586
MB080+NDVFVlIdopt.F	--	798
MB080+VP2.F	405	2641
SV40tailR+mCMVF	3021	5257

CONCLUSIÓN

En base al estudio de PCR y el análisis de inmunofluorescencia, vHVT310 es un virus recombinante que contiene el gen IBDV-VP2 y NDV-F bajo el control del promotor mCMV, en donde la traducción del gen NDV-F es iniciada por IRES de EMCV. El recientemente generado vHVT310 recombinante está libre de cualquier virus vHVT13 parental detectable.

Ejemplo 1.3 Construcción de vHVT311 recombinante que expresa IBDV-VP2 y NDV-F

El objetivo del estudio es construir un HVT recombinante en el cual se integra un casete de expresión que contiene un promotor de citomegalovirus de ratón (mCMV), un gen que codifica para una proteína viral 2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (VP2), péptido 2A de teschovirus-1 de porcino autoescindible (P2A), un gen que codifica para una proteína de fusión del virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV-F), y la cola de poli A del virus del simio 40 (poli A de SV40) en el sitio intergénico 1 (IG1) (Figura 2).

El virus parental que se usa en la construcción es el vHVT13 (un vector de HVT que expresa el gen VP2 de IBDV, Vacuna VAXXITEK® de Merial (HVT+IBD)). El polinucleótido que corresponde a la secuencia de la proteína de fusión del virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV-F) de tipo salvaje del genotipo VIId se sintetizó químicamente (GenScript). El sitio de escisión de la proteína F de este gen sintético se alteró para que coincida con una secuencia de sitio de escisión F lentogénica y la secuencia génica de NDV-F resultante tiene un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de NDV-F depositada en GenBank (AY337464). Se usó el promotor IE de CMV de ratón para el IBD-VP2 (en el virus Vaxxitek parental). Un péptido 2A de teschovirus-1 de porcino autoescindible (P2A) que permite la “escisión”

cotraduccional de los genes corriente arriba y corriente abajo, VP2 y F, respectivamente de un promotor individual mCMV, se insertó en el extremo del gen VP2. Esta es la primera vez que se usó P2A en vectores HVT.

El *locus* de inserción es el sitio intergénico 1 (IG1) en HVT (Figura 2). El plásmido donante pFP2AVP2 (un plásmido de inserción que contiene a VP2+P2A+NDV-F y poli A de SV40/brazo flanqueante de IG1) se construyó como se describe más adelante. Se usaron células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) para la recombinación *in vitro*.

Construcción del plásmido donante

El ADN sintético en pUC57 que contiene el gen VP2 del IBDV (SEQ ID NO:1 que codifica para la SEQ ID NO:2), ADN que codifica para P2A (SEQ ID NO:11), el gen NDV-F (SEQ ID NO:4 que codifica para la SEQ ID NO:5), y la cola de poli A de SV40 (SEQ ID NO:8) se sintetizó mediante GeneScript (Figura 9). El plásmido, pFP2AVP2 se transformó usando el kit Top10 Oneshot (# de catálogo C404002, Invitrogen) y se hizo crecer un cultivo a gran escala y se hizo la extracción de plásmidos usando el kit Maxi Prep de Qiagen.

Generación de recombinante

El procedimiento de recombinación homóloga como se describe en el Ejemplo 1.1 se siguió para elaborar el vHVT311 recombinante.

Análisis de recombinantes por PCR

El procedimiento de análisis mediante PCR como se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para verificar vHVT311.

Análisis de expresión

El análisis de expresión que se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para analizar la expresión de vHVT311.

Resultados

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del plásmido donante pFP2AVP2 se les asignó SEQ ID NO como se muestra en la Figura 1.

Análisis de generación y expresión recombinante

El ADN genómico del virus Vaxxitek se electroporó con pFP2AVP2 plásmido donante para generar el virus recombinante usando la técnica de recombinación homóloga. Se separó el virus recombinante del virus Vaxxitek parental por selección de pocillos positivos para inmunofluorescencia y tamizaje por PCR en ronda múltiple de purificación en placa. Un virus recombinante purificado en placa que expresa la proteína NDV-F, designado vHVT311, se escaló desde frascos de cultivo de tejido a 5 botellas para rodar de 850cm². Después de aproximadamente 72 hrs posteriores a la infección se recolectaron las CEF infectadas. Las alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido, cada alícuota contenía 10% de FBS y DMSO 10%. Las titulaciones se llevaron a cabo por triplicado en CEF y se obtuvo un título de $2,5 \times 10^6$ pfu/ml para vHVT311.

Se llevó a cabo inmunofluorescencia dual usando antisuero de pollo (Pab) a 1:500 y un anticuerpo monoclonal (Mab) a 1:3000 seguido por un anti-IgG de pollo marcado con FITC a 1:500 y anticuerpo de burro anti ratón con Alexa Flúor marcado con TRITC a 1:300. La placa #1 compara la expresión del virus de la Enfermedad de Newcastle con HVT y la placa #2 compara la expresión del virus de la Enfermedad de Bursitis Infecciosa con el virus de la Enfermedad de Newcastle. Se encontró que todas las placas examinadas positivas para HVT TRITC de vHVT311 expresan NDV-F y se encontró que

todas las placas positivas para NDV TRITC que expresan las proteínas IBDV-VP2.

Análisis mediante PCR de vHVT311

La pureza del virus recombinante se verificó mediante PCR usando pares de cebadores que son específicos para los brazos flanqueantes de HVT, el promotor, los genes de NDV-F e IBDV-VP2, y la cola poli A. Los resultados de PCR demuestran que el virus recombinante vHVT311 porta el casete de expresión deseado y la solución madre del virus está libre de cantidades detectables del virus Vaxxitek parental (Tabla 3 y Figura 10-11).

Tabla 3 Bandas de PCR esperadas usando los conjuntos de cebadores específicos

Grupo de cebadores	Vaxxitek	vHVT311
MB080+MB081	3350	5101
MB080+NDVFVlIdwt.F	--	840
MB080+VP2.F	405	2156
SV40tailR+mCMVF	3021	4772

CONCLUSIÓN

En base al estudio de PCR y el análisis de inmunofluorescencia, vHVT311 es un virus recombinante que contiene el gen IBDV-VP2 y NDV-F bajo el control del promotor mCMV en donde la escisión mediada por el péptido 2A produce la coexpresión de las proteínas VP2 y F. El recientemente generado vHVT311 recombinante está libre de cualquier virus vHVT13 parental detectable.

Ejemplo 1.4 Construcción de vHVT317 recombinante que expresa IBDV-VP2 e ILTV-gD

El objetivo del estudio es construir un HVT recombinante en el cual se integra un casete de expresión que contiene un promotor de citomegalovirus de ratón (mCMV), un gen que codifica para una proteína viral 2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (VP2), sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), un gen que codifica para una proteína glicoproteína D de laringotraqueítis infecciosa (ILTV-gD), y la cola de poli A del virus del simio 40 (poli A de SV40) en el sitio intergénico 1 (IG1) (Figura 2).

El virus parental que se usa en la construcción es el vHVT13. En la construcción se usó una secuencia de la glicoproteína D del virus de laringotraqueítis infecciosa (ILTV gD) que se sintetizó químicamente (GenScript). Se usó el promotor IE de CMV de ratón para el IBD-VP2 (en el virus vHVT13 parental). Se insertó una secuencia de ARN (IRES) derivada del virus de encefalomiocarditis (EMCV), que permite la iniciación de la traducción en un ARNm inmediatamente corriente debajo de donde se localiza el IRES, en el extremo del gen VP2 para iniciar la traducción de un gen ILTV-gD corriente abajo.

El *locus* de inserción es el sitio intergénico 1 (IG1) en HVT (Figura 2). El plásmido donante pVP2IRESgD (un plásmido de inserción que contiene el gen VP2 + IRES+ILTV-gD y poli A de SV40/brazo flanqueante de IG1) se construyó como se describe más adelante. Se usaron células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) para la recombinación *in vitro*.

Construcción del plásmido donante

El ADN sintético en pUC57 que contiene el gen VP2 del IBDV (SEQ ID NO:1 que codifica para la SEQ ID NO:2), IRES (SEQ ID NO:10), gen ILTV-gD (SEQ ID NO:12 que codifica para la SEQ ID NO:13), y la cola de poli A de SV40 (SEQ ID NO:8) se sintetizó mediante GenScript. El plásmido, pFIRESVP2 se transformó en células competentes dcm-/dam- (New England Biolabs, # de catálogo C2925I) y luego se digirieron con *HindIII/SalI*. El fragmento 5kb se extrajo en gel. Se sintetizó un ADN sintético en pUC57 conteniendo un IRES parcial, ILTV-gD de tipo salvaje, y la cola de poli A de SV40 mediante GenScript. El plásmido, Sal-Fse gD-IRES se digirió con *HindIII/SalI*. El fragmento de 1,9 kb se extrajo en gel. Los dos fragmentos se ligaron y se transformaron usando el kit Top10 Oneshot (# de catálogo C404002, Invitrogen). Las colonias se tamizaron con *HindIII/SbfI* para el patrón correcto. El plásmido donante final se verificó por secuenciación y se designó pVP2IRESgD (véase la Figura 12).

Generación de recombinante

El procedimiento de recombinación homóloga como se describe en el Ejemplo 1.1 se siguió para elaborar el vHVT317 recombinante.

Análisis de recombinantes por PCR

El procedimiento de análisis mediante PCR como se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para verificar vHVT317.

Análisis de expresión

El análisis de expresión que se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para analizar la expresión de vHVT317.

Resultados

La secuencia de nucleótidos y aminoácidos del plásmido donante pVP2IRESgD se les asignó SEQ ID NO como se muestra en la Figura 1.

Análisis de generación y expresión recombinante

Se llevó a cabo inmunofluorescencia dual usando antisuero de pollo (anticuerpo policlonal) a 1:500 y un anticuerpo monoclonal (Mab) a 1:3000 seguido por un anti-IgG de pollo marcado con FITC a 1:500 y anticuerpo de burro anti ratón con Alexa Flúor marcado con TRITC a 1:300. Se encontró que todas las placas examinadas de vHVT317 expresan proteínas IBDV-VP2 en comparación con placas positivas para HVT y se encontró que todas las placas expresan proteínas ILTV-gD cuando se compara con placas positivas para IBDV.

Análisis mediante PCR de vHVT317

La pureza del virus recombinante se verificó mediante PCR usando pares de cebadores que son específicos para los brazos flanqueantes de HVT, el promotor, los genes ILTV-gD e IBDV-VP2, y la cola poli A. Los resultados de PCR demuestran que el virus recombinante vHVT317 porta el casete de expresión deseado y la solución madre del virus está libre de cantidades detectables del virus Vaxxitek parental (Tabla 4 and Figura 13-14).

Tabla 4 Bandas de PCR esperadas usando los conjuntos de cebadores específicos

Grupo de cebadores	Vaxxitek	vHVT317
MB080+MB081	3350	5101
MB080+ILTgDwt.F	--	825
MB080+VP2.F	405	2272
SV40tailR+mCMVF	3021	4888

CONCLUSIÓN

En base al estudio de PCR y el análisis de inmunofluorescencia, vHVT317 es un virus recombinante que contiene un gen IBDV-VP2 e ILTV-gD bajo el control del promotor mCMV, en donde la traducción del gen ILTV-gD es iniciada por IRES de EMCV. El recientemente generado vHVT317 recombinante está libre de cualquier virus vHVT13 parental detectable.

Ejemplo 1.5 Construcción de vHVT313 recombinante que expresa IBDV-VP2 y NDV-F

El objetivo del estudio es construir un HVT recombinante en el cual se integra un casete de expresión que contiene un promotor de citomegalovirus de ratón (mCMV), un gen que codifica para una proteína viral 2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (VP2), la cola de poli A del virus del simio 40 (poli A de SV40), el promotor del virus del simio 40 (promotor de SV40), un gen que codifica para una proteína de fusión de tipo salvaje del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F) y una cola de poli A sintética (cola de poli A sin) en el sitio intergénico 1 (IG1) (Figura 2).

El virus parental que se usa en la construcción es el vHVT13. Se sintetizó químicamente una proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F) correspondiente a la secuencia de tipo salvaje de genotipo VIId (GenScript). El sitio de escisión de la proteína F de este gen sintético se alteró para que coincida con una secuencia de sitio de escisión F lentogénica y la secuencia génica de NDV-F resultante tiene un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de NDV-F depositada en GenBank

(AY337464). Se usó el promotor CMV IE de ratón para IBD-VP2 (en el virus Vaxxitek parental) y el promotor de SV40 para NDV-F.

El *locus* de inserción es el sitio intergénico 1 (IG1) (Figura 2). El plásmido donante pFwtSV40VP2 (un plásmido de inserción que contiene la poli A de VP2/SV40 y el brazo flanqueante de IG1+promotor de SV40+NDV-F+poli A sintética) se construyó como se describe más adelante. Se usaron células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) para la recombinación *in vitro*.

Construcción del plásmido donante

El ADN sintético en pUC57 que contiene el gen VP2 del IBDV (SEQ ID NO:1 que codifica para la SEQ ID NO:2), la cola de poli A de SV40 (SEQ ID NO:8), el promotor de SV40 (SEQ ID NO:7), el gen NDV-F (SEQ ID NO:4 que codifica para la SEQ ID NO:5), y una cola de poli A sintética (SEQ ID NO:9) se sintetizó mediante GeneScript.

El plásmido, pFSV40VP2 se digirió luego con *SbfI*/*AvrII* y el fragmento de 5,6 kb se extrajo en gel. Un plásmido, pHM103NDVFwtsyn también se digirió con *SbfI*/*AvrII* y el fragmento de 1,9 kb se extrajo en gel. Los fragmentos se ligaron luego entre sí y se transformaron usando el kit Top10 Oneshot (# de catálogo C404002, Invitrogen). Se tamizaron las colonias con *PstI* para el patrón correcto. La expresión transitoria de la maxi prep se verificó usando el reactivo de transfección Fugene en células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) y suero policlonal de pollo contra el NDV. El plásmido donante final se verificó por secuenciación y se designó pFwtSV40VP2 (véase la Figura 15).

Generación de recombinante

El procedimiento de recombinación homóloga como se describe en el Ejemplo 1.1 se siguió para elaborar el vHVT313 recombinante.

Análisis de recombinantes por PCR

El procedimiento de análisis mediante PCR como se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para verificar vHVT313.

Análisis de expresión

El análisis de expresión que se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para analizar la expresión de vHVT313.

Resultados

A la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del plásmido donante pFwtSV40VP2 se les asignó SEQ ID NO como se muestra en la Figura 1.

Análisis de generación y expresión recombinante

Se llevó a cabo inmunofluorescencia dual usando antisuero de pollo (Pab) y un anticuerpo monoclonal anti-HVT (Mab) seguido por un anti-IgG de pollo marcado con FITC y anticuerpo de burro anti ratón con Alexa Flúor marcado con TRITC. Se encontró que todas las placas positivas para TRITC examinadas de vHVT313 expresan las proteínas NDV-F y IBDV-VP2.

Análisis mediante PCR de vHVT313

La pureza del virus recombinante se verificó mediante PCR usando pares de cebadores que son específicos para los brazos flanqueantes de HVT, los promotores, los genes de NDV-F e IBDV-VP2, y las colas poli A. Los resultados de PCR demuestran que el virus recombinante vHVT313 porta el casete de expresión deseado y la solución madre del virus está libre de cantidades detectables del virus Vaxxitek parental (Tabla 5 y Figura 16-17).

Tabla 5 Bandas de PCR esperadas usando los conjuntos de cebadores específicos

Grupo de cebadores	Vaxxitek	vHVT313
--------------------	----------	---------

MB080+MB081	3350	5574
MB080+312P6	--	556
MB080+VP2.F	405	2629
SV40tailR+mCMVF	3021	3021
SyntailR+SV40promoterF	--	2181

CONCLUSIÓN

En base al estudio de PCR y el análisis de inmunofluorescencia, vHVT313 es un virus recombinante que contiene un gen IBDV-VP2 bajo el control del promotor mCMV y un gen NDV-F de tipo salvaje bajo el control de un promotor de SV40. El recientemente generado vHVT313 está libre de cualquier detectable virus Vaxxitek parental.

Ejemplo 1.6 Construcción de vHVT316 recombinante que expresa IBDV-VP2 y NDV-F

El objetivo del estudio es construir un HVT recombinante en el cual se integra un casete de expresión que contiene un promotor de citomegalovirus de ratón (mCMV), un gen que codifica para una proteína viral 2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (VP2), sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), un gen que codifica para una proteína de fusión de tipo salvaje del virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV-F), y la cola de poli A del virus del simio 40 (poli A de SV40) en el *locus* IG1 (Figura 2).

El virus parental que se usa en la construcción es el vHVT13. Se sintetizó químicamente una proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F) correspondiente a la secuencia de tipo salvaje de genotipo VIIId (GenScript). El sitio de escisión de la proteína F de este gen sintético se

alteró para que coincidiera con una secuencia de sitio de escisión F lentogénica y la secuencia génica de NDV-F resultante tiene un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de NDV-F depositada en GenBank (AY337464). Se usó el promotor IE de CMV de ratón para el IBD-VP2 (en el virus Vaxxitek parental). Se insertó el IRES en el extremo del gen VP2 para iniciar la traducción de un gen NDV-F corriente abajo.

El *locus* de inserción es IG1 (Figura 2). El plásmido donante pVP2IRESFwt (un plásmido de inserción que contiene el gen VP2 + IRES+NDV-F y poli A de SV40/brazo flanqueante de IG1) se construyó como se describe más adelante. Se usaron células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) para la recombinación *in vitro*.

Construcción del plásmido donante

El ADN sintético en pUC57 que contiene el gen VP2 del IBDV (SEQ ID NO:1 que codifica para la SEQ ID NO:2), IRES(SEQ ID NO:10), gen NDV-F (SEQ ID NO:4 que codifica para la SEQ ID NO:5), y la cola de poli A de SV40 (SEQ ID NO:8), se sintetizó mediante GenScript. El plásmido, pFIRESVP2 se transformó en células competentes dcm-/dam- (New England Biolabs, # de catálogo C2925I) y luego se digirieron con *HindIII/SalI*. El fragmento de 5kb se extrajo en gel. Un ADN sintético en pUC57 conteniendo un IRES parcial, NDV-F de tipo salvaje, y la cola de poli A de SV40 se sintetizó mediante GenScript. El plásmido, Sal-Hind-Fwt+ se digirió con *HindIII/SalI*. El fragmento de 2,2 kb se extrajo en gel. Los dos fragmentos se ligaron y se transformaron usando el kit Top10 Oneshot (# de catálogo C404002, Invitrogen). El plásmido donante final se verificó por secuenciación y se designó como pVP2IRESFwt (véase la Figura 18).

Generación de recombinante

El procedimiento de recombinación homóloga como se describe en el Ejemplo 1.1 se siguió para elaborar el vHVT316 recombinante.

Análisis de recombinantes por PCR

El procedimiento de análisis mediante PCR como se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para verificar vHVT316.

Análisis de expresión

El análisis de expresión que se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para analizar la expresión de vHVT316.

Resultados

A la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del plásmido donante pVP2IRESFwt se les asignó SEQ ID NO como se muestra en la Figura 1.

Análisis de generación y expresión recombinante

La tinción de inmunofluorescencia dual se llevó a cabo usando antisuero de pollo (Pab) y un anticuerpo monoclonal (Mab) seguido por un anti-IgG de pollo marcado con FITC y anticuerpo de burro anti ratón con Alexa Flúor marcado con TRITC. Se encontró que todas las placas examinadas de vHVT316 expresan las proteínas IBDV-VP2 en comparación con placas positivas para HVT y se encontró que todas las placas expresan proteínas IBDV-VP2 cuando se compara con placas positivas para NDV.

Análisis mediante PCR de vHVT316

La pureza del virus recombinante se verificó mediante PCR usando pares de cebadores que son específicos para los brazos flanqueantes de HVT, el promotor, los genes de NDV-F e IBDV-VP2, y la cola poli A. Los resultados de PCR demuestran que el virus recombinante vHVT316 porta el casete de

expresión deseado y la solución madre del virus está libre de cantidades detectables del virus Vaxxitek parental (Tabla 6 y Figura 19-20).

Tabla 6 Bandas de PCR esperadas usando los conjuntos de cebadores específicos

Grupo de cebadores	Vaxxitek	vHVT316
MB080+MB081	3350	5574
MB080+312P6	--	604
MB080+VP2.F	405	2629
SV40tailR+mCMVF	3021	5245

CONCLUSIÓN

En base al estudio de PCR y el análisis de inmunofluorescencia, vHVT316 es un virus recombinante que contiene el gen IBDV-VP2 y NDV-F bajo el control del promotor mCMV, en donde la traducción del gen NDV-F es iniciada por IRES de EMCV. El recientemente generado vHVT316 recombinante está libre de cualquier detectable virus Vaxxitek parental.

Ejemplo 1.7 Construcción de vHVT407 recombinante que expresa IBDV-VP2 e ILTV-gD

El objetivo del estudio es construir un HVT recombinante en el cual se integra un casete de expresión que contiene un promotor de SV40, ILTV glicoproteína D, y poli A sintética en el sitio SORF3-US2 de vHVT13.

El virus parental que se usa en la construcción es el vHVT13. En la construcción se usó una secuencia de glicoproteína D de virus de laringotraqueítis infecciosa (ILTV gD) que se sintetizó químicamente (GenScript). El promotor de SV40 se usó para ILTV gD. El *locus* de inserción

es SORF3-US2 para gD de ILTV e IG1 para VP2 de IBDV de vVHT13 (Figura 2). Se construyó el plásmido donante HVT US2SVgDwtsyn conteniendo los brazos SORF3-US2, el promotor de SV40 (SEQ ID NO:7), gen que codifica para la gD de ILTV de tipo salvaje (SEQ ID NO:12 que codifica para la SEQ ID NO:13), y poliA sintética (SEQ ID NO:9) (véase la Figura 22). Se usaron células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) para la recombinación *in vitro*.

Generación de recombinante

El procedimiento de recombinación homóloga como se describe en el Ejemplo 1.1 se siguió para elaborar el vHVT407 recombinante.

Análisis de recombinantes por PCR

El procedimiento de análisis mediante PCR como se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para verificar vHVT407.

Análisis de expresión

El análisis de expresión que se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para analizar la expresión de vHVT407.

Resultados

A la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del plásmido donante HVT US2SVgDwtsyn se les asignó SEQ ID NO como se muestra en la Figura 1.

Análisis de generación y expresión recombinante

La tinción de inmunofluorescencia dual se llevó a cabo usando antisuero de pollo (Pab) y un anticuerpo monoclonal (Mab) seguido por un anti-IgG de pollo marcado con FITC y anticuerpo de burro anti ratón con Alexa Flúor marcado con TRITC. Se encontró que todas las placas examinadas de vHVT407 expresan las proteínas IBDV-VP2 y gD de ILTV.

Análisis mediante PCR de vHVT407

La pureza del virus recombinante se verificó mediante PCR usando pares de cebadores que son específicos para los brazos flanqueantes de HVT, el promotor, los genes de gD de ILTV e IBDV-VP2, y la cola poli A. Los resultados de PCR demuestran que el virus vHVT407 recombinante porta el casete de expresión deseado y la solución madre del virus está libre de cantidades detectables del virus vHVT13 parental.

CONCLUSIÓN

En base al estudio de PCR y el análisis de inmunofluorescencia, el vHVT407 es un virus recombinante que contiene los genes de IBDV-VP2 y gD de ILTV. El recientemente generado vHVT407 recombinante está libre de cualquier virus vHVT13 parental detectable.

Ejemplo 1.8 Construcción de vHVT308 recombinante que expresa NDV-F e ILTV-gD en direcciones opuestas

El objetivo del estudio es construir un plásmido de inserción para el sitio I de región intergénica que contendría una cola poli A sintética, F de NDV, promotor de SV40, promotor HHV3gB, gD de ILTV, y la cola de poli A de SV40 para la recombinación homóloga en HVT FC126.

El virus parental que se usa en la construcción es HVT FC126. Se sintetizó químicamente una proteína de fusión sintética del virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV-F) (SEQ ID NO:21 que codifica para la SEQ ID NO:22) correspondiente a la secuencia de genotipo V y se optimizaron sus codones (GenScript). El sitio de escisión de la proteína F de este gen sintético se alteró para que coincida con una secuencia de sitio de escisión F lentogénica. Se sintetizó químicamente una glicoproteína D de ILTV sintética de tipo salvaje (SEQ ID NO:12 que codifica para la SEQ ID NO:13). Se

construyó el plásmido donante pHVTIG1gDCaFopt que contenía el promotor HHV3gB (promotor de glicoproteína B de Herpesvirus humano tipo 3) en la orientación invertida dirigiendo la expresión de ILTV-gD + cola poli A de SV40, y el promotor de SV40 dirigiendo la expresión de la proteína de fusión de Newcastle + cola poli A sintética (véase la Figura23). Se usaron células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) para la recombinación *in vitro*.

Generación de recombinante

El procedimiento de recombinación homóloga como se describe en el Ejemplo 1.1 se siguió para elaborar el vHVT308 recombinante. Se realizó un pasaje en serie a pre-MSV+13.

Análisis de recombinantes por PCR

El procedimiento de análisis mediante PCR como se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para verificar el vHVT308 recombinante.

Análisis de expresión

El análisis de expresión que se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para analizar la expresión del vHVT308 recombinante.

Resultados

A la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del plásmido donante pHVTIG1gDCaFopt se les asignó SEQ ID NO como se muestra en la Figura 1.

Análisis de generación y expresión recombinante

La tinción de inmunofluorescencia dual se llevó a cabo usando antisuero de pollo (Pab) y un anticuerpo monoclonal (Mab) seguido por un anti-IgG de pollo marcado con FITC y anticuerpo de burro anti ratón con Alexa Flúor marcado con TRITC. Se encontró que todas las placas examinadas de vHVT308 expresan las proteínas NDV-F e ILTV-gD.

Análisis mediante PCR de vHVT308

La pureza del virus recombinante se verificó mediante PCR usando pares de cebadores que son específicos para los brazos flanqueantes de HVT, los promotores, los genes NDV-F e ILTV-gD, y las colas poli A. Los resultados de PCR demuestran que el virus recombinante vHVT308 porta el casete de expresión deseado y la solución madre de virus está libre de cantidades detectables de virus HVT parental (Tabla 6.1 y Figuras 24 y 25).

Tabla 6.1 Bandas de PCR esperadas usando los conjuntos de cebadores específicos

Grupo de cebadores	HVT FC126	vHVT308
MB080 + MB081	323bp	4697bp
syntailR + SV40promoterF	-	2196bp
CAoptF.RP + 404P12	-	2056bp
HHV3gBF + SV40tailR	-	2043bp

Las reacciones de PCR con todos los pares de cebadores dieron como resultado los productos y los patrones de bandas de PCR esperados. Como se mostró precedentemente, no existe evidencia del virus HVT parental en vHVT308 y vHVT308 es estable a los pasajes pre-MSV+13.

CONCLUSIÓN

En base al estudio de PCR y el análisis de inmunofluorescencia, el vHVT308 es un virus HVT recombinante que contiene un gen NDV-F bajo el control de un promotor de SV40 y un gen ILTV-gD bajo el control de un

promotor HHV3gB. El vHVT308 está libre de cualquier virus HVT parental detectable.

Ejemplo 1.9 Construcción de vHVT322 recombinante que expresa NDV-F e ILTV-gD

El objetivo del estudio es construir un HVT recombinante en el cual se integra un casete de expresión que contiene un promotor de mCMV, proteína de fusión del virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV-F), sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), glicoproteína D de laringotraqueítis infecciosa (ILTV-gD), y la cola de poli A del virus del simio 40 (poli A de SV40) se recombinará de manera homóloga con los brazos flanqueantes en la región intergénica 1 (IG1) de vHVT13 (HVT+IBD).

El virus parental que se usa en la construcción es el vHVT13. Se sintetizó químicamente una proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F) correspondiente a la secuencia de tipo salvaje de genotipo VIIId (SEQ ID NO:4 que codifica para la SEQ ID NO:5) (GenScript). El sitio de escisión de la proteína F de este gen sintético se alteró para que coincida con una secuencia de sitio de escisión F lentogénica y la secuencia génica de NDV-F resultante tiene un 99% de identidad de nucleótidos así como también de aminoácidos con la secuencia de NDV-F depositada en GenBank (AY337464). Se sintetizó químicamente una glicoproteína D de ILTV sintética de tipo salvaje (SEQ ID NO:12 que codifica para la SEQ ID NO:13). El plásmido donante pFwtIRESgD contenía el brazo flanqueante izquierdo de IG1, promotor mCMV (CMV IE de ratón), NDV-F, IRES, ILTV-gD, poli A de SV40, y el brazo flanqueante derecho de IG1 (véase la Figura26). Se usaron células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) para la recombinación *in vitro*.

Generación de recombinante

El procedimiento de recombinación homóloga como se describe en el Ejemplo 1.1 se siguió para elaborar el vHVT322 recombinante. Se realizó un pasaje en serie a pre-MSV+13.

Análisis de recombinantes por PCR

El procedimiento de análisis mediante PCR como se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para verificar el vHVT322 recombinante.

Análisis de expresión

El análisis de expresión que se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para analizar la expresión del vHVT322 recombinante.

Resultados

A la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del plásmido donante pFwtIRESgD se les asignó SEQ ID NO como se muestra en la Figura 1.

Análisis de generación y expresión recombinante

La tinción de inmunofluorescencia dual se llevó a cabo usando antisuero de pollo (Pab) y un anticuerpo monoclonal (Mab) seguido por un anti-IgG de pollo marcado con FITC y anticuerpo de burro anti ratón con Alexa Flúor marcado con TRITC. Se encontró que todas las placas positivas para TRITC examinadas de vHVT322 expresan las proteínas NDV-F e ILTV-gD.

Análisis mediante PCR de vHVT322

La pureza del virus recombinante se verificó mediante PCR usando pares de cebadores que son específicos para los brazos flanqueantes de HVT, el promotor, los genes NDV-F e ILTV-gD, y la cola poli A. Los resultados de PCR demuestran que el virus vHVT322 recombinante porta el casete de

expresión deseado y la solución madre de virus está libre de cantidades detectables de vHVT13 parental (Tabla 6.2 y las Figuras 27 y 28).

Tabla 6.2 Bandas de PCR esperadas usando los conjuntos de cebadores específicos

Grupo de cebadores	vHVT13	vHVT322
MB080 + MB081	3350bp	5804bp
MB080 + ILTgDwtF	-	1653bp
MB080 + 312P6	-	2485bp
mCMVF + SV40PolyA.R1	3021bp	5105bp

Las reacciones de PCR con todos los pares de cebadores dieron como resultado los productos y los patrones de bandas de PCR esperados. Como se muestra precedentemente, no existe evidencia de virus vHVT13 parental en vHVT322.

CONCLUSIÓN

En base al estudio de PCR y el análisis de inmunofluorescencia, vHVT322 es un virus HVT recombinante que contiene un gen NDV-F e ILTV-gD bajo el control del promotor mCMV. vHVT322 está libre de cualquier virus vHVT13 parental detectable.

Ejemplo 1.10 Construcción de vHVT406 recombinante que expresa ILT-gDwt

El objetivo del estudio es construir un HVT recombinante del cual el sitio SORF3-US2 contiene el promotor de SV40, gD de laringotraqueítis infecciosa, y una cola de poli A sintética para la recombinación homóloga en HVT FC126.

El virus parental que se usa en la construcción es HVT FC126. Se sintetizó químicamente la glicoproteína D de tipo salvaje (gDwt) del virus de laringotraqueítis infecciosa (ILTV). El plásmido donante pHVTUS2SVgDwtsyn contenía los brazos SORF3 y US2 de HVT FC126, el promotor de SV40, la gDwt de ILTV (SEQ ID NO:12 que codifica para la SEQ ID NO:13) y la poli A sintética (véase la Figura 29). Se usaron células fibroblásticas de embrión de pollo (CEF) para la recombinación *in vitro*.

Generación de recombinante

El procedimiento de recombinación homóloga como se describe en el Ejemplo 1.1 se siguió para elaborar el vHVT406 recombinante. Se realizó un pasaje en serie a pre-MSV+13 (x+12).

Análisis de recombinantes por PCR

El procedimiento de análisis mediante PCR como se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para verificar el vHVT406 recombinante.

Análisis de expresión

El análisis de expresión que se describe en el Ejemplo 1.1 se llevó a cabo para analizar la expresión del vHVT406 recombinante.

Resultados

A la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del plásmido donante pHVTUS2SVgDwtsyn se les asignó SEQ ID NO como se muestra en la Figura 1.

Análisis de generación y expresión recombinante

El ADN genómico del virus HVT se electroporó con el plásmido donante pHVTUS2SVgDwtsyn para generar HVT recombinante usando la técnica de recombinación homóloga. El virus recombinante se separó del virus HVT

parental por selección de pocillos positivos para inmunofluorescencia y tamizaje por PCR en ronda múltiple de purificación en placa. Un virus HVT recombinante purificado en placa expresando la proteína ILTV-gD se designó vHVT406.

Se visualizaron las placas de virus vHVT406 recombinante usando los filtros para TRITC y FITC para la tinción dual. El FITC mostró la expresión de ILTV-gDwt y el TRITC mostró la expresión de HVT. Debido a los pocillos pequeños de las placas de 96 pocillos, cada pocillo se registró con las placas primero con el filtro para TRITC y luego se volvió a contar con el filtro para FITC. Se contaron unas 600+ placas combinadas entre el pasaje pre-MSV y pre-MSV+13. Todas las placas fueron positivas para FITC y TRITC para ambos pasajes.

Análisis mediante PCR de vHVT406

El análisis mediante PCR de vHVT406 se llevó a cabo usando los cebadores de PCR enumerados en la Tabla 6.3 (véase la Figura 30). Como se muestra en la Figura 31, los tamaños de los productos de PCR después de la electroforesis en gel se corresponden bien con los tamaños esperados y los patrones de bandas. No existe evidencia del virus HVT FC126 parental en vHVT406.

Tabla 6.3 Bandas de PCR esperadas usando los conjuntos de cebadores específicos

Cebador	HVT FC126	pHVTUS2SVgDwtsyn	vHVT406
SORF3.FP + US2.RP	0,334	2,218	2,218
SORF3.FP + 404P12	--	0,733	0,733

SV40promoterF syntailR	+	--	1,829	1,829
MB080 + MB081		0,323	--	0,323
primer		SB-1	pHVTUS2SVgDwtsyn	vHVT406
SB1SORF4 + SB1US2R		0,989	--	--

CONCLUSIÓN

En base al estudio de PCR y el análisis de inmunofluorescencia, vHVT406 es un virus HVT recombinante que contiene un promotor de SV40, gen ILTV-gDwt, y una cola de poli A sintética en el sitio SOrf3-US2. El vHVT406 está libre de cualquier virus HVT parental detectable.

Ejemplo 1.11 Estudio de estabilidad *in vitro* de los vectores HVT

Se evaluó en los vectores HVT construidos precedentemente la estabilidad genómica/expresión después de múltiples pasajes *in vitro* en células de fibroblastos de embrión de pollo (CEF). Los vectores de HVT que expresan dos genes fueron estable después de múltiples pasajes. Al contrario del conocimiento general que los HVT con insertos múltiples son menos estables los resultados demostraron de manera sorprendente que los vectores HVT de la presente invención son estable y expresan dos genes de manera eficaz.

Ejemplo 2 Eficacia de la enfermedad de Newcastle (ND) inducida en el D28 por vHVT306, vHVT309, vHVT310 & vHVT311 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de cuatro construcciones recombinantes de HVT (vHVT306, vHVT309, vHVT310 & vHVT311) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV administrados a pollos SPF

de un día de edad contra desafíos con enfermedad de Newcastle (cepa Texas GB) llevados a cabo en el D28.

Las características de estos candidatos para vacuna se describen en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7 Características de los vectores usados en el estudio de desafío

Nombre	Virus parental	gen	Promotor/ conector	Poli-A	Locus
vHVT306*	vHVT13**	IBDV VP2	mCMV IE	Poli A de SV40	IG1
		NDV F	SV40	Poli A sintético	SORF3-US2
vHVT309	vHVT13	IBDV VP2	mCMV IE	Poli A de SV40	IG1
		NDV F	SV40	Poli A sintético	IG1
vHVT310	vHVT13	IBDV VP2	mCMV IE	N/A	IG1
		NDV F	IRES	Poli A de SV40	IG1
vHVT311	vHVT13	IBDV VP2	mCMV IE	N/A	IG1
		NDV F	P2A	Poli A de SV40	IG1

vHVT306*: el vector vHVT que expresa VP2 de IBDV y F de NDV (véase US9.114.108), se usó como control.

vHVT13** es el ingrediente activo de la vacuna VAXXITEK HVT-IBD con licencia de un vector de HVT que expresa el gen VP2 del IBDV (descrito como vHVT17 en el documento US 5.980.906 y EP 0 719 864).

Se asignaron noventa y nueve pollos libres de patógenos (SPF) de un día de edad a 5 grupos como se muestra en la Tabla 8. Todas las aves de los grupos 1 a 4 (20 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones HVT-IBD+ND a la dosis indicada (véase la

Tabla 8). Las 15 aves del grupo 5 se dejaron sin vacunar. Veintiocho (D28) días después de la vacunación, las aves en cada grupo se desafiaron con la cepa de NDV Texas GB por vía intramuscular (IM) ($10^{4.0}$ dosis de huevos infecciosos 50% (EID₅₀) en 0,1 mL/ave). Se observaron las aves para ver signos clínicos durante 14 días después del desafío. Las aves que no mostraron ningún signo clínico de ND (incluyendo signos nerviosos centrales o respiratorios y/o muerte) hasta los 14 días después del desafío se consideraron como protegidas.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 8. Todas las aves control del grupo 5 murieron después del desafío. La protección en los grupos vacunados alcanzó por lo menos 90%.

Tabla 8 Eficacia de ND inducida por diferentes construcciones dobles de HVT-IBD+ND en pollos SPF

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Protección contra ND después de desafío en el D28
1	vHVT306*	1580	95% (19/20)
2	vHVT309	1680	90% (18/20)
3	vHVT310	2840	95% (19/20)
4	vHVT311	2980	90% (18/20)
5	-	-	0% (0/15)

vHVT306*: usado como control

Ejemplo 3 Eficacia de IBD inducida por vHVT309, vHVT310, vHVT311 y vHVT407 contra un desafío estándar con IBDV en el D35

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de tres construcciones recombinantes de HVT (vHVT309, vHVT310 & vHVT311) que expresan el gen

VP2 del IBDV y el gen F del NDV y una construcción (vHVT407) expresando el gen VP2 del IBDV y el gen gD de ILTV administradas a pollos SPF de un día de edad contra un desafío estándar con IBDV llevado a cabo en el D35.

Los pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad se asignaron a 4 grupos como se muestra en la Tabla 9. Todas las aves de los grupos 1 a 4 (20 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de diferentes construcciones HVT-IBD+ND o HVT-IBD+ILT a la dosis indicada. Las 20 aves del grupo 5 se dejaron sin vacunar. Treinta y cinco días después de la vacunación (en el D35), se desafiaron todas las aves con la cepa STC clásica del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) por vía intraocular (IO) ($10^{2,0}$ EID₅₀ en 0,03 mL/ave). Cuatro días después del desafío (en el D39) se sacrificaron todas las aves y se hizo una necropsia para examinar las lesiones groseras de la bolsa.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 9. Todas las aves vacunadas (excepto dos aves vacunadas con vHVT311) resultaron protegidas contra IBD, mientras que ninguna de las aves control resultaron protegidas.

Tabla 9 Eficacia de IBD inducida por diferentes construcciones dobles HVT-IBD+ND o HVT-IBD+ILT en pollos SPF después del desafío en el D35 con la cepa STC de IBDV

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	protección contra IBD STC después del desafío en el D35
1	vHVT309	2180	100% (20/20)
2	vHVT310	3980	100% (20/20)

3	vHVT311	3180	90% (18/20)
4	vHVT407	1220	100% (20/20)
5	-	-	0% (0/20)

Ejemplo 4 Eficacia de IBD inducida por vHVT309, vHVT310, vHVT311 y vHVT407 contra un desafío con IBDV variante en el D35

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de tres construcciones recombinantes de HVT (vHVT309, vHVT310 & vHVT311) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV y una construcción (vHVT407) que expresa el gen VP2 del IBDV y el gen gD de ILTV administrados a pollos SPF de un día de edad contra un desafío con IBDV variante (Delaware E) realizado en el D35.

Los pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad se asignaron a 6 grupos como se muestra en la Tabla 10. Todas las aves de los grupos 1 a 4 (19-20 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de diferentes construcciones HVT-IBD+ND o HVT-IBD+ILT a la dosis indicada. Las aves del grupo 5 (19 aves) y grupo 6 (18 aves) se dejaron sin vacunar. Al D35, todas las aves de los grupos 1 a 5 se desafiaron con la cepa E variante Delaware del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) por vía intraocular (IO) ($10^{3,0}$ EID₅₀ en 0,03 mL/ave). Las aves del grupo 6 se dejaron sin desafiar. Al D46, se midió el peso corporal y el peso de la bolsa de todas las aves. Se calcularon las proporciones B/B (proporción de peso de la bolsa/peso corporal x100) para todos los grupos.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 10. Las aves vacunadas de los grupos 1 y 2 tuvieron una proporción media de peso B/B similar a la de los controles no desafiados no vacunados (grupo 6) y mayor que

aquellas de los controles desafiados no vacunados (grupo 5). Las aves del grupo 3 no resultaron protegidos y las aves del grupo 4 resultaron parcialmente protegidos. Sorprendentemente, vHVT310 que contiene IRES proveyó una mejor protección que vHVT311 que contiene P2A.

Tabla 10 Eficacia de IBD inducida por diferentes construcciones dobles HVT-IBD+ND o HVT-IBD+ILT en pollos SPF después del desafío en el D35 con la cepa de IBDV variante E

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Número de aves	Desafío con IBDV en el D35	Media de proporción en peso de B/B
1	vHVT309	2180	20	Si	0,43
2	vHVT310	3980	20	Si	0,50
3	vHVT311	3180	20	Si	0,18
4	vHVT407	1220	19	Si	0,32
5	-	-	19	Si	0,13
6	-	-	18	No	0,45

Ejemplo 5 Eficacia de IBD inducida por vHVT306, vHVT309 & vHVT310 contra un desafío con vvIBDV en el D28 en pollos parrilleros

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de tres construcciones recombinantes de HVT (vHVT306, vHVT309 & vHVT310) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV administrados a pollos parrilleros de un día de vida contra desafío con vvIBDV realizado en el D28.

Se asignaron setenta pollos parrilleros de un día de edad (línea Hubbard JA957) a 5 grupos como se muestra en la Tabla 11. Todas las aves de los

grupos 2 a 5 (aproximadamente 15 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones HVT-IBD+ND a la dosis indicada. Diez aves del grupo 1 se dejaron sin vacunar. Veintiocho días después de la vacunación (en el D28), se desafiaron todas las aves con la cepa muy virulenta de IBDV (vvIBDV) 91-168 por vía intraocular (IO) ($10^{4,3}$ EID₅₀ en 0,05 mL/ave). Diez días después del desafío (en el D38) se sacrificaron todas las aves y se hizo una necropsia para examinar las lesiones groseras de la bolsa. Se midieron el peso de la bolsa y el peso corporal y se realizó el estudio histopatológico en la bolsa. Las lesiones histológicas de la bolsa se clasificaron de 0 a 5 de acuerdo con la siguiente escala: 0 – sin lesión, bolsa normal; 1 - 1% a 25% de los folículos muestran depleción linfóide (es decir, menos de 50% de depleción en 1 folículo afectado), influjo de heterófilos en lesiones; 2 - 26% a 50% de los folículos mostraron una depleción linfóide casi completa (es decir, con más del 75% de depleción en 1 folículo afectado), los folículos afectados muestran lesiones de necrosis y puede detectarse influjo severo de heterófilos; 3 - 51% a 75% de los folículos muestran depleción linfóide; los folículos afectados muestran lesiones y se detecta influjo severo de heterófilos; 4 - 76% a 100% de los folículos muestran depleción linfóide casi completa; se detecta hiperplasia y estructuras de quistes; los folículos afectados muestran lesiones de necrosis y se detecta influjo severo de heterófilos; y 5 - 100% de los folículos muestran depleción linfóide casi completa; pérdida completa de estructura folicular; epitelio engrosado y plegado; fibrosis del tejido de la bolsa. Se consideró a las aves protegidas si no mostraron signos clínicos después del desafío y si su clasificación histológica fue ≤ 2 .

Hubo algunas mortalidades tempranas en la primera semana de este lote de pollos parrilleros probablemente debido a colibacilosis. La dosis de las vacunas probadas fue menor que lo esperado (2000PFU). Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 11. Se indujo una protección parcial mediante la vacunación que muestra que la de vHVT310 es mayor que la de vHVT306 y la de vHVT309.

Tabla 11 Eficacia de IBD inducida por diferentes construcciones dobles de HVT-IBD+ND en pollos parrilleros después del desafío en el D28 con la cepa vvIBDV

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Media de proporción en peso de bolsa/cuerpo (*1000)	Protección en base a puntuación de histopatología
1	-	-	0,75	0%
2	vHVT306	955	1,07	20%
3	vHVT309	741	0,89	20%
4	vHVT310	708	1,38	53%
5	vHVT13*	2000	1,99	80%

vHVT13*: usado como control.

Ejemplo 6 Eficacia de ND inducida por vHVT306, vHVT309 & vHVT310 contra un desafío con NDV velogénico en el D42 en pollos parrilleros

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de tres construcciones recombinantes de HVT (vHVT306, vHVT309 & vHVT310) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV administrados a pollos parrilleros de un día de vida contra un desafío con NDV velogénico llevado a cabo en el D42.

Los pollos parrilleros de un día de vida (línea Hubbard JA957) se asignaron a 4 grupos como se muestra en la Tabla 12. Todas las aves de los grupos 2 a 4 (entre 16 y 20 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones HVT-IBD+ND a la dosis indicada. Doce aves del grupo 1 se dejaron sin vacunar. Cuarenta y dos días después de la vacunación (en el D42), se desafiaron todas las aves con la cepa de NDV velogénico Herts 33 por vía intramuscular (IM) ($10^{5,0}$ EID₅₀ en 0,2 mL/ave). Se observó a todas las aves para ver los signos clínicos durante 14 días después del desafío. Se consideró a las aves protegidas cuando las mismas no morían ni mostraban signos clínicos de ND.

Hubo algunas mortalidades tempranas en la primera semana de este lote de pollos parrilleros probablemente debido a colibacilosis. La dosis de las vacunas probadas fue menor que lo esperado (2000PFU). Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 12. Las mejores protecciones fueron inducidas por la vacunación con vHVT309 & vHVT310, seguida por vHVT306.

Tabla 12 Eficacia de ND inducida por diferentes construcciones dobles de HVT-IBD+ND en pollos parrilleros después del desafío en el D42 con la cepa de NDV velogénico

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Protección contra mortalidad	Protección contra mortalidad & morbilidad
1	-	-	8,3%	0%
2	vHVT306	955	68,8%	62,5%
3	vHVT309	741	85%	85%
4	vHVT310	708	85%	80%

Ejemplo 7 Eficacia de ND inducida por vHVT306, vHVT309 & vHVT310 contra un desafío con NDV velogénico en el D42 en pollos parrilleros

El objetivo del estudio fue re evaluar la eficacia de tres construcciones recombinantes de HVT (vHVT306, vHVT309 & vHVT310) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV administradas a pollos parrilleros de un día de vida contra un desafío con NDV velogénico llevado a cabo en el D42.

Los pollos parrilleros de un día de vida (línea Hubbard JA957) se asignaron a 4 grupos como se muestra en la Tabla 13. Todas las aves de los grupos 2 a 4 (entre 16 y 20 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones HVT-IBD+ND a 2000 PFU. Diecinueve aves del grupo 1 se dejaron sin vacunar. Cuarenta y dos días después de la vacunación (en el D42), se desafiaron todas las aves con la cepa de NDV velogénico Herts 33 por vía intramuscular (IM) ($10^{5,0}$ EID₅₀ en 0,2 mL/ave). Se observó a todas las aves para ver los signos clínicos durante 14 días después del desafío. Se consideró a las aves protegidas cuando las mismas no morían ni mostraban signos clínicos de ND.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 13. Globalmente, los niveles de protección fueron mayores que en el estudio previo (véase el Ejemplo 6), pero siguen la misma tendencia: las mejores protecciones fueron inducidas por la vacunación con vHVT309 & vHVT310, seguida por vHVT306.

Los resultados mostraron que el vHVT309 es más eficaz que el vHVT306 contra los desafíos con ND en SPF así como también el pollos parrilleros (Tablas 12 & 13), lo que sugiere que la inserción de polinucleótidos

heterólogos en un *locus* tiene menos impacto negativo sobre el estado global del virus en comparación con la inserción en múltiples loci.

Tabla 13 Eficacia de ND inducida por diferentes construcciones dobles de HVT-IBD+ND en pollos parrilleros después del desafío en el D42 con la cepa de NDV velogénico

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Protección contra mortalidad	Protección contra mortalidad & morbilidad
1	-	-	0%	0%
2	vHVT306	955	75%	75%
3	vHVT309	741	94%	89%
4	vHVT310	708	94%	94%

Ejemplo 8 Eficacia de IBD inducida por vHVT306, vHVT309 & vHVT310 contra un desafío estándar con IBDV en el D14 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de tres construcciones recombinantes de HVT (vHVT306, vHVT309 & vHVT310) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV administrados a pollos SPF de un día de edad contra un desafío estándar con IBDV llevado a cabo en el D14.

Los pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad se asignaron a 4 grupos como se muestra en la Tabla 14. Todas las aves de los grupos 1 a 3 (21-22 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones HVT-IBD+ND a la dosis indicada. Las 22 aves del grupo 4 se dejaron sin vacunar. Catorce días después de la vacunación (en el D14), se desafiaron todas las aves con la cepa STC clásica

del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) por vía intraocular (IO) ($10^{1.4}$ EID₅₀ en 0,03 mL/ave). Cuatro días después del desafío (en el D18) se sacrificaron todas las aves y se hizo una necropsia para examinar las lesiones groseras de la bolsa.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 14. Se indujeron niveles similares de protección contra la IBD mediante las 3 vacunas experimentales, mientras que todas las aves control, menos una, estuvo infectada.

Tabla 14 Eficacia de IBD inducida por diferentes construcciones dobles de HVT-IBD+ND en pollos SPF después del desafío en el D14 con la cepa STC de IBDV

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	protección contra IBD STC después de desafío en D14 infectados/total)
1	vHVT306	2061	68,2% (7/22)
2	vHVT309	1476	76,2% (5/21)
3	vHVT310	1970	68,2% (7/22)
4	-	-	4,5% (21/22)

Ejemplo 9 Eficacia de IBD inducida por vHVT306, vHVT309 & vHVT310 en pollos SPF después de desafío con variante de IBD en el D14

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de tres construcciones recombinantes de HVT (vHVT306, vHVT309 & vHVT310) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV administrados a pollos SPF de un día de edad contra el desafío con variante de IBD llevado a cabo en el D14.

Los pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad se asignaron a 5 grupos como se muestra en la Tabla 15. Todas las aves de los grupos 1 a 3 (20 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones HVT-IBD+ND a la dosis indicada. Las aves del grupo 4 y grupo 5 (19-20 aves/grupo) se dejaron sin vacunar. Al D14, todas las aves de los grupos 1 a 4 se desafiaron con la cepa E variante Delaware del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) por vía intraocular (IO) ($10^{2,2}$ EID₅₀ en 0,03 mL/ave). Las aves del grupo 5 se dejaron sin desafiar. Al D25, se midió el peso corporal y el peso de la bolsa de todas las aves. Se calcularon las proporciones B/B (proporción de peso de la bolsa/peso corporal x100) para todos los grupos.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 15. Se indujo una protección parcial en el D14 mediante las 3 vacunas, en donde la protección es mayor con el vHVT309 que con el vHVT310.

El vHVT306 y el vHVT309 recombinantes tienen dos casetes de expresión recombinantes (dos ARNm). Las construcciones que expresan dos genes a través de un IRES o P2A (por ejemplo, vHVT310, vHVT317, vHVT311, vHVT316, vHVT322) no están en un solo sitio de inserción, sino que los genes también se expresan a partir de un ARNm individual. Comparando todos los datos que se presentan en las Tablas 11 a 19, se ve que los vHVT309 y vHVT310 recombinantes en un sitio de inserción son más eficaces que el vHVT306 recombinante en dos sitios de inserción, indicando que los HVT recombinantes que portan más de un polinucleótido heterólogo en un *locus* de inserción son biológicamente mejores que los HVT recombinantes que portan polinucleótidos heterólogos en múltiples loci de inserción. Más aún,

sorprendentemente, la expresión de más de un polinucleótido heterólogo a partir de un ARNm individual expresado a través de un IRES tiene menos impacto negativo sobre la eficacia contra la IBD, en particular en los pollos parrilleros (véanse los resultados de la Tabla 11).

Tabla 15 Eficacia de IBD inducida por diferentes construcciones dobles de HVT-IBD+ND en pollos SPF después del desafío en el D14 con la cepa de IBDV variante E

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Número de aves	Desafío con IBDV en el D14	Media de proporción en peso de B/B
1	vHVT306	2061	20	Si	0,18
2	vHVT309	1476	20	Si	0,33
3	vHVT310	1970	20	Si	0,27
4	-	-	19	Si	0,13
5	-	-	20	No	0,64

Ejemplo 10 Eficacia de IBD inducida por vHVT306, vHVT309 & vHVT310 contra un desafío estándar con IBDV en el D28 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de tres construcciones recombinantes de HVT (vHVT306, vHVT309 & vHVT310) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV administrados a pollos SPF de un día de edad contra un desafío estándar con IBDV llevado a cabo en el D28.

Los pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad se asignaron a 4 grupos como se muestra en la Tabla 16. Todas las aves de los grupos 1 a 3 (20-22 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2

mL de las diferentes construcciones HVT-IBD+ND a la dosis indicada. Las 22 aves del grupo 4 se dejaron sin vacunar. Veintiocho días después de la vacunación (en el D28), se desafiaron todas las aves con la cepa STC clásica del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) por vía intraocular (IO) ($10^{2,0}$ EID₅₀ en 0,03 mL/ave). Cuatro días después del desafío (en el D32) se sacrificaron todas las aves y se hizo una necropsia para examinar las lesiones groseras de la bolsa.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 16. Se indujo una protección completa mediante el vHVT310 mientras que solo unas pocas aves no estuvieron protegidas por los otros candidatos de vacuna.

Tabla 16 Eficacia de IBD inducida por diferentes construcciones dobles de HVT-IBD+ND en pollos SPF después del desafío en el D28 con la cepa STC de IBDV

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	protección contra IBD STC después del desafío en el D28 infectados/total
1	vHVT306	2061	86,4% (3/22)
2	vHVT309	1476	95,0% (1/20)
3	vHVT310	1970	100% (0/22)
4	-	-	4,5% (21/22)

Ejemplo 11 Eficacia de IBD inducida por vHVT306, vHVT309 & vHVT310 en pollos SPF después de desafío con variante de IBD en el D28

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de tres construcciones recombinantes de HVT (vHVT306, vHVT309 & vHVT310) que expresan el gen

VP2 del IBDV y el gen F del NDV administrados a pollos SPF de un día de edad contra el desafío con variante de IBD llevado a cabo en el D28.

Los pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad se asignaron a 5 grupos como se muestra en la Tabla 17. Todas las aves de los grupos 1 a 3 (20 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones HVT-IBD+ND a la dosis indicada. Las aves del grupo 4 y grupo 5 (18-19 aves/grupo) se dejaron sin vacunar. Al D28, todas las aves de los grupos 1 a 4 se desafiaron con la cepa E variante Delaware del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) por vía intraocular (IO) ($10^{2,2}$ EID₅₀ en 0,03 mL/ave). Las aves del grupo 5 se dejaron sin desafiar. Al D39, se midió el peso corporal y el peso de la bolsa de todas las aves. Se calcularon las proporciones B/B (proporción de peso de la bolsa/peso corporal x100) para todos los grupos.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 17. La proporción de B/B para el grupo 5 (grupo no desafiado) no se pudo obtener debido a que este grupo fue inesperadamente infectado con la cepa de IBDV STC. La protección inducida por el vHVT310 fue mayor que la inducida por el vHVT306 y el vHVT309.

Tabla 17 Eficacia de IBD inducida por diferentes construcciones dobles de HVT-IBD+ND en pollos SPF después del desafío en el D28 con la cepa de IBDV variante E

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Número de aves	Desafío con IBDV en el D28	Media de proporción en peso de B/B
1	vHVT306	2061	20	Si	0,21

2	vHVT309	1476	20	Si	0,26
3	vHVT310	1970	20	Si	0,37
4	-	-	19	Si	0,11
5	-	-	20	No	ND*

* No realizado debido a exposición a IBDV estándar en este grupo

Ejemplo 12 Eficacia de la enfermedad de Newcastle (ND) inducida en el D21 y el D28 mediante vHVT306, vHVT309 & vHVT310 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de tres construcciones recombinantes de HVT (vHVT309, vHVT310 & vHVT311) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV administrados a pollos SPF de un día de edad contra desafíos con enfermedad de Newcastle (cepa Texas GB) llevados a cabo en el D21 y el D28.

Los pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad se asignaron a 4 grupos como se muestra en la Tabla 18. Todas las aves de los grupos 1 a 3 (50 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones HVT-IBD+ND a la dosis indicada. Las 30 aves del grupo 4 se dejaron sin vacunar. Veintiún (D21) días después de la vacunación, 20 aves de los grupos 1-3 y 15 aves del grupo 4 se desafiaron con NDV cepa Texas GB por vía intramuscular (IM) ($10^{4,2}$ dosis de huevos infecciosos al 50% (EID50) en 0,1 mL/ave). Veintiocho (D28) días después de la vacunación, 30 aves de los grupos 1 a 3 y 15 aves del grupo 4 se desafiaron con NDV cepa Texas GB por vía intramuscular (IM) ($10^{4,3}$ dosis de huevos infecciosos al 50% (EID50) en 0,1 mL/ave). Se observaron las aves para ver signos clínicos durante 14 días después del desafío. Las aves que no mostraron ningún signo clínico de ND (incluyendo signos nerviosos centrales o

respiratorios y/o muerte) hasta los 14 días después del desafío se consideraron como protegidas.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 18. Todas las aves control del grupo 4 murieron después del desafío. La protección inducida por el vHVT310 fue la mejor, seguida por el vHVT306 y el vHVT309.

Tabla 18 Eficacia de ND en el D21 y D28 inducida por diferentes construcciones dobles de HVT-IBD+ND en pollos SPF

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Protección contra ND después de desafío en el D21 (protegidas/total)	Protección contra ND después de desafío en el D28 (protegidas/total)
1	vHVT306*	2248	80% (16/20)	90% (27/30)
2	vHVT309	1765	60% (12/20)	86,2% (25/29)
3	vHVT310	2106	85% (17/20)	100% (29/29)
4	-	-	0% (0/15)	0% (0/15)

vHVT306*: usado como control

Ejemplo 13 Eficacia de enfermedad de la Marek (MD) inducida por el vHVT306, el vHVT309 & el vHVT310 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de tres construcciones recombinantes de HVT (vHVT309, vHVT310 & vHVT311) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV administrados a pollos SPF de un día de edad contra desafíos de la enfermedad de Marek (cepa GA, 2 lotes & 2 diluciones).

Los pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad se asignaron a 4 grupos como se muestra en la Tabla 19. Todas las aves de los

grupos 1 a 3 (20 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones HVT-IBD+ND a la dosis indicada. Las 20 aves del grupo 4 se dejaron sin vacunar. Cuatro días después de la vacunación (D4), 18-20 aves de los grupos 1-4 se desafiaron con dos diluciones (1:5 y 1:640) de dos lotes diferentes (#1 y #2) del vMDV cepa GA22 a través de ruta SC. Se observaron las aves para ver signos clínicos atribuibles a la enfermedad de Marek entre 46 y 50 días después de la eclosión. Al D46-D50, todas las aves restantes se sometieron a necropsia y se verificaron para ver lesiones de la enfermedad de Marek. Las aves que no mostraron ningún signo clínico o lesiones de MD se consideraron como protegidas.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 19. La infectividad en las aves control del grupo 4 varió entre 75 y 90%. Globalmente, la protección inducida por el vHVT310 fue la mejor seguido de cerca por el vHVT306 y luego el vHVT309.

Tabla 19 Eficacia de MD inducida por diferentes construcciones dobles de HVT-IBD+ND en pollos SPF contra desafío con 2 lotes diferentes de GA22 diluidos 1:5 o bien 1:640

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Protección contra MD. GA22 lote #1 dilución 1:5.	Protección contra MD. GA22 lote #1 dilución 1:640.	Protección contra MD. GA22 lote #2 dilución 1:5.	Protección contra MD. GA22 lote #2 dilución 1:640.
1	vHVT306*	2420	75%	85%	26,3%	70%

			(15/20)	(17/20)	(5/19)	(14/20)
2	vHVT309	1893	50% (10/20)	72,2% (13/18)	55% (11/20)	70% (14/20)
3	vHVT310	2127	80% (16/20)	84,2% (16/19)	40% (8/20)	90% (18/20)
4	-	-	25% (5/20)	10% (2/20)	10% (2/20)	20% (4/20)

vHVT306*: usado como control

Ejemplo 14 Eficacia de IBD inducida por vHVT306 y vHVT407 contra un desafío con IBDV clásico en el D21 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de dos construcciones recombinantes de HVT, una (vHVT306) que expresa el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV y la otra (vHVT407) que expresa el gen VP2 del IBDV y el gen gD de ILTV administradas a pollos SPF de un día de edad contra un desafío con IBDV clásico llevado a cabo en el D21.

Los pollos SPF de cuarenta y un días de edad (Leghorn blancos) se asignaron a 3 grupos como se muestra en la Tabla 20. Todas las aves de los grupos 2 & 3 (aproximadamente 15 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de construcción vHVT306 o vHVT407 a la dosis indicada. Diez aves del grupo 1 se dejaron sin vacunar. Veintiún días después de la vacunación (en el D21), se desafiaron todas las aves con la cepa de IBDV clásico 52/70 Faragher por vía intraocular (IO) ($10^{2.0}$ EID₅₀ en 0,05 mL/ave). Once días después del desafío (en el D32) se sacrificaron todas las aves y se hizo una necropsia para examinar las lesiones groseras de la bolsa. Se midieron el peso de la bolsa y el peso corporal para calcular la proporción de

peso de la bolsa a corporal. Se consideró a las aves protegidas si las mismas no mostraban signos clínicos o lesiones de la bolsa después del desafío.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 20. Se indujo una protección completa contra la IBD mediante la vacunación con vHVT306 o vHVT407.

Tabla 20 Eficacia de IBD inducida por dos construcciones de HVT que expresan dos genes en pollos SPF después del desafío en el D21 con el IBDV cepa Faragher

Grupo	Vacuna	Dosis (log10 PFU)	Signos clínicos # de muertes/# de enfermas/total	Media de proporción en peso de bolsa/cuerpo (*1000)	% con lesión grosera de la bolsa
1	-	-	3/4/10	1,6 ± 0,7**	100%
2	vHVT306*	3,1	0/0/15	6,1 ± 1,1	0%
3	vHVT407	3,1	0/0/15	6,3 ± 1,1	0%

vHVT306*: usado como control. ** media ± desviación estándar

Ejemplo 15 Eficacia de ILT inducida por vHVT407 contra un desafío con ILTV en el D21 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de dos construcciones recombinantes de vHVT407 que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen gD de ILTV administradas a pollos SPF de un día de edad contra un desafío con ILTV llevado a cabo en el D21.

Veinticuatro pollos SPF de un día de edad (Leghorn blancos) se asignaron a 2 grupos como se muestra en la Tabla 21. Todas las aves

(aproximadamente 12 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de vHVT13 (usado como control negativo) o con la construcción vHVT407 a la dosis indicada. Veintiún días después de la vacunación (en el D21), se desafiaron todas las aves con la cepa de ILTV ILT-96-3 por vía intratraqueal (IT) ($10^{3,6}$ EID₅₀ en 0,5 mL/ave). Se observaron las aves para ver signos clínicos durante 11 días después del desafío. En los días de estudio 25-29 y 32 se observaron todas las aves para ver signos clínicos como patrón de respiración, conjuntivitis, depresión y mortalidad. En el Día de Estudio 32, se sacrificaron todas las aves restantes. Se consideró a las aves protegidas si las mismas no mostraban signos clínicos de ILT tales como distrés respiratorio asociado con tos, estornudos, estertor, depresión, soplos y/o exudados de mucus con sangre, incluyendo mortalidad.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 21. Se indujo una protección significativa de ILT inducida por la vacunación con vHVT407 en estas condiciones de desafío.

Tabla 21 Eficacia de ILT inducida por la construcción vHVT407 en pollos SPF después del desafío en el D21 con la cepa de ILTV ILT-96-3

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Signos clínicos # de muertes/# de enfermas/total	Protección clínica
1	vHVT13*	3420	6/2/11	27%
2	vHVT407	2880	2/0/12	83%

vHVT13*: usado como control negativo.

Ejemplo 16 Eficacia de ILT inducida por vHVT407, un HVT-ILT comercial y una vacuna comercial de origen embrionario de pollo (CEO) contra un desafío con ILTV en el D21 en pollos parrilleros

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de construcciones recombinantes de vHVT407 que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen gD de ILTV administradas a pollos parrilleros de un día de vida en comparación con una vacuna comercial de HVT-ILT (INNOVAX® ILT) contra un desafío con ILTV llevado a cabo en el D21.

Cuarenta y ocho pollos parrilleros comerciales de un día de edad se asignaron a 3 grupos como se muestra en la Tabla 22. Todas las aves (aproximadamente 12 aves/grupo) de los grupos 1-3 se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las construcciones vHVT13 (usado como control negativo), vHVT407 o INNOVAX® ILT (usado como control positivo) a la dosis indicada. Veintiún días después de la vacunación (en el D21), se desafiaron todas las aves con la cepa de ILTV ILT-96-3 por vía intratraqueal (IT) ($10^{4,2}$ EID₅₀ en 0,5 mL/ave). Se observaron las aves para ver signos clínicos durante 12 días después del desafío. En los días de estudio 25-29 y 32-33 se observó a todas las aves y se calificaron sus signos clínicos incluyendo patrón de respiración, conjuntivitis, depresión y mortalidad. En el Día de Estudio 34, se sacrificaron todas las aves restantes. Se consideró a las aves protegidas si las mismas no mostraban signos clínicos de ILT tales como distrés respiratorio asociado con tos, estornudos, estertor, depresión, soplos y/o exudados de mucus con sangre, incluyendo mortalidad.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 22. Se indujo protección contra ILT mediante la vacunación con vHVT407, la cual fue mayor que la inducida por INNOVAX ILT.

Tabla 22 Eficacia de ILT inducida por las construcciones vHVT407 e INNOVAX ILT en pollos parrilleros después del desafío en el D21 con la cepa de ILTV ILT-96-3

Grupo	Vacuna	Dosis	Signos clínicos # de muertes/# de enfermas/total	Protección clínica
1	vHVT13*	2200 PFU	5/7/12	0%
2	vHVT407	1860 PFU	1/4/11	55%
3	INNOVAX ILT**	2240 PFU	0/10/12	17%

vHVT13*: usado como control negativo. **INNOVAX® ILT usado como control positivo

Ejemplo 17 Eficacia de la enfermedad de Newcastle (ND) inducida en el D14, D21 y D32 por vHVT310 & vHVT316 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue comparar el inicio de la inmunidad contra la ND de dos construcciones recombinantes de HVT (vHVT310 & vHVT316) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV administrados a pollos SPF de un día de edad contra desafíos con enfermedad de Newcastle (cepa Texas GB) llevados a cabo en el D14, D21 y D32.

Los pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad se asignaron a 3 grupos como se muestra en la Tabla 23. Todas las aves de los grupos 1 a 2 (59-70 aves/grupo; véase de la tabla) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones HVT-IBD+ND a

la dosis indicada. Las 45 aves del grupo 3 se dejaron sin vacunar. Al D14, D21 y D32, entre 15 y 30 aves (véase la tabla) de los grupos 1-3 se desafiaron con NDV cepa Texas GB por vía intramuscular (IM) ($10^{4.0}$ EID₅₀/ave) en 0,1 mL/ave). Se observaron las aves para ver signos clínicos durante 14 días después del desafío. Las aves que no mostraron ningún signo clínico de ND (incluyendo signos nerviosos centrales o respiratorios y/o muerte) hasta los 14 días después del desafío se consideraron como protegidas.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 23. Todas las aves control del grupo 3 murieron después del desafío. Los niveles de protección inducidos por vHVT310 y vHVT316 fueron similares, con un posible inicio más temprano de la inmunidad inducido por vHVT316.

Tabla 23 Eficacia de ND en el D14, D21 y D32 inducida por diferentes construcciones dobles de HVT-IBD+ND en pollos SPF

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Protección contra ND después de desafío en D14 (protegidas/total)	Protección contra ND después de desafío en el D21 (protegidas/total)	Protección contra ND después de desafío en el D32 (protegidas/total)
1	vHVT310	2473	30% (6/20)	80% (16/20)	97% (29/30)
2	vHVT316	2367	45% (9/20)	80% (16/20)	100% (19/19)
3	-	-	0% (0/15)	0% (0/15)	0% (0/15)

Ejemplo 18 Eficacia de ILTV inducida por vectores HVT que expresan gD de ILTV y VP2 de IBDV o que expresan gD de ILTV y F de NDV

El objetivo del estudio es evaluar la eficacia de las construcciones recombinantes de HVT que expresan los genes gD de ILTV y VP2 de IBDV (tales como vHVT317 y vHVT407) o que expresan los genes gD de ILTV y F de NDV (tales como vHVT308 y vHVT322) administradas a pollos contra desafíos con ILTV.

Se asignan los pollos a los diferentes grupos. Se vacunan las aves por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones de HVT. Las aves de un grupo se dejan sin vacunar. Se desafían las aves con ILTV por vía intratraqueal (IT) o a través del seno intraorbital. Se observan las aves para ver signos clínicos durante 11 a 14 días después del desafío. Las aves que no muestran ningún signo clínico de ILTV (incluyendo distrés respiratorio asociado con tos, estornudos, estertor, depresión, soplidos y/o exudados de mucus con sangre y/o muerte) hasta los 14 días después del desafío se consideran como protegidas.

Los resultados muestran que los vectores de HVT proveen protección contra la infección por ILTV.

Ejemplo 19 Eficacia de IBD inducida por vectores de HVT que expresan gD de ILTV y VP2 de IBDV

El objetivo del estudio es evaluar la eficacia de las construcciones recombinantes de HVT que expresan gD de ILTV y VP2 de IBDV (tales como vHVT317 y vHVT407) administradas a pollos contra desafíos por IBD.

Se asignan los pollos a los diferentes grupos. Se vacunan las aves por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones de HVT. Las aves de un grupo se dejan sin vacunar. Se desafían las aves con IBD por vía intraocular (IO). Se observan las aves para ver signos clínicos durante 4 a 10 días después del desafío. Las aves que no muestran ningún signo clínico de IBD (incluyendo depresión y/o muerte) y que no muestran lesiones de la bolsa y/o atrofia hasta los 10 días después del desafío, se consideran como protegidas.

Los resultados muestran que los vectores de HVT proveen protección contra la infección por IBD.

Ejemplo 20 Eficacia de NDV inducida por vectores de HVT que expresan gD de ILTV and F de NDV

El objetivo del estudio es evaluar la eficacia de las construcciones recombinantes de HVT que expresan los genes gD de ILTV y F de NDV (tales como vHVT308 t vHVT322) administradas a pollos contra desafíos por NDV.

Se asignan los pollos a los diferentes grupos. Se vacunan las aves por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de las diferentes construcciones de HVT. Las aves de un grupo se dejan sin vacunar. Se desafían las aves con NDV por vía intramuscular (IM). Se observan las aves para ver signos clínicos durante 14 días después del desafío. Las aves que no muestran ningún signo clínico de ND (incluyendo signos nerviosos centrales o respiratorios y/o muerte) hasta los 14 días después del desafío se consideran como protegidas.

Los resultados muestran que los vectores de HVT proveen protección contra la infección por NDV.

Ejemplo 21 Eficacia de IBD inducida por vHVT316 & vHVT317 contra un desafío estándar con IBDV en el D28 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de dos construcciones recombinantes de HVT (vHVT316 & vHVT317) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV (vHVT316) o bien el gen VP2 del IBDV y el gen gD de ILTV (vHVT317) administradas a pollos SPF de un día de edad contra un desafío estándar con IBDV llevado a cabo en el D28.

Los pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad se asignaron a 3 grupos como se muestra en la Tabla 24. Todas las aves de los grupos 1 & 2 (15 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de vHVT316 & vHVT317 a la dosis indicada. Las 15 aves del grupo 3 se dejaron sin vacunar. Veintiocho días después de la vacunación (en el D28), se desafiaron todas las aves con la cepa STC clásica del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) por vía intraocular (IO) ($10^{2,0}$ EID₅₀ en 0,03 mL/ave). Cuatro días después del desafío (en el D32), se sacrificaron todas las aves y se hizo una necropsia para examinar las lesiones groseras de la bolsa.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 24. Se indujeron 100% y 80% de protección mediante vHVT316 y vHVT317, respectivamente; sin embargo, la dosis administrada de vHVT317 fue casi 3 veces inferior que la de vHVT316.

Tabla 24 Eficacia de IBD inducida por las construcciones dobles HVT-IBD+ND (vHVT316) y HVT-IBD+ILT (vHVT317) en pollos SPF después del desafío en el D28 con la cepa STC de IBDV

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	protección contra IBD STC después del desafío en el
-------	--------	-------------	---

			D28 (infectados/total)
1	vHVT316	2910	100% (0/15)
2	vHVT317	1030	80,0% (3/15)
3	-	-	6,7% (14/15)

Ejemplo 22 Eficacia de IBD inducida por vHVT310, vHVT316 & vHVT317 en pollos SPF después de desafío con variante de IBD en el D28

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de tres construcciones recombinantes de HVT (vHVT310, vHVT316 & vHVT317) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV (vHVT310 & vHVT316) o bien el gen VP2 del IBDV y el gen gD de ILTV (vHVT317) administradas a pollos SPF de un día de edad contra el desafío con variante de IBD llevado a cabo en el D28.

Los pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad se asignaron a 5 grupos como se muestra en la Tabla 25. Todas las aves de los grupos 1 a 3 (15 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de vHVT310, vHVT316 & vHVT317 a la dosis indicada. Las aves del grupo 4 y grupo 5 (15 aves/grupo) se dejaron sin vacunar. Al D28, todas las aves de los grupos 1 a 4 se desafiaron con la cepa E variante Delaware del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) por vía intraocular (IO) ($10^{3,0}$ EID₅₀ en 0,03 mL/ave). Las aves del grupo 5 se dejaron sin desafiar. Al D39, se midió el peso corporal y el peso de la bolsa de todas las aves. Se calcularon las proporciones B/B (proporción de peso de la bolsa/peso corporal x100) para todos los grupos.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 25. Se observó protección en todos los grupos vacunados. La protección con vHVT317 fue

levemente más alta que la inducida por vHVT310 y vHVT316 a pesar de su menor dosis.

Tabla 25 Eficacia de IBD inducida por las diferentes construcciones de HVT con insertos dobles en pollos SPF después del desafío en el D28 con la cepa de IBDV variante E

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Número de aves	Desafío con IBDV en el D28	Media de proporción en peso de B/B
1	vHVT310	2260	15	Si	0,34
2	vHVT316	2910	15	Si	0,33
3	vHVT317	1030	15	Si	0,40
4	-	-	15	Si	0,12
5	-	-	15	No	0,43

Ejemplo 23 Eficacia de ILT inducida por vHVT317 contra un desafío por ILTV en el D28 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de la construcción recombinante vHVT317 que expresa el gen VP2 del IBDV y el gen gD de ILTV administrada a pollos SPF de un día de edad contra un desafío con ILTV llevado a cabo en el D28.

Treinta y seis pollos SPF de un día de edad (Leghorn blancos) se asignaron a 2 grupos como se muestra en la Tabla 26. Todas las aves (aproximadamente 18 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de vHVT317 o se dejaron sin vacunar. Veintiocho días después de la vacunación (en el D28), se desafiaron todas las aves con la cepa de ILTV ILT-

96-3 por vía intratraqueal (IT) ($10^{3,0}$ EID₅₀ en 0,2 mL/ave). Se observaron las aves para ver signos clínicos y mortalidad en el D32, D36 & D39. Los signos clínicos incluyeron patrón de respiración, conjuntivitis, depresión y mortalidad. En el Día de Estudio 32, se sacrificaron todas las aves restantes. La evaluación de la protección se hizo usando 3 criterios diferentes: (1) cualquier ave que muestre algún signo clínico durante tres días consecutivos o que muera después del desafío se considera como positiva para ILT; (2) cualquier ave que exhiba algún signo clínico moderado o severo en cualquier categoría en cualquier día o que muera después del desafío se considera como positiva para ILT; y (3) cualquier ave que exhiba algún signo clínico moderado o severo en cualquier categoría durante dos días consecutivos o que muera después del desafío se considera como positiva para ILT.

Los resultados de la protección en base a los 3 criterios diferentes se muestran en la Tabla 26. El desafío por ILT fue severo debido a que mató (o se sacrificaron las aves cuando mostraron signos clínicos muy severos por razones éticas) el 86,7% de las aves no vacunadas. Se indujeron altos niveles de protección contra ILT mediante la vacunación con vHVT317 en estas condiciones de desafío.

Tabla 26 Eficacia de ILT inducida por la construcción vHVT317 en pollos SPF después del desafío en el D28 con la cepa de ILTV ILT-96-3

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Número de aves	% de mortalidad	% de Protección en base a los criterios 1 / 2 / 3
1	vHVT317	1030	15	0%	100% / 86,7% / 100%
2	-	-	15	86,7%	6,7% / 6,7% / 6,7%

Ejemplo 24 Eficacia de ILT inducida por vHVT317, un HVT-ILT comercial y una vacuna comercial de origen embrionario de pollo (CEO) contra un desafío con ILTV en el D21 en pollos parrilleros

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de la construcción recombinante vHVT317 que expresa el gen VP2 del IBDV y el gen gD de ILTV administrada a pollos parrilleros de un día de vida en comparación con una vacuna comercial de HVT-ILT (INNOVAX® ILT, Merck Animal Health) contra un desafío con ILTV llevado a cabo en el D28.

Cincuenta y un pollos parrilleros comerciales de un día de edad se asignaron a 3 grupos como se muestra en la Tabla 27. Todas las aves (17 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de vHVT317 o con INNOVAX® ILT (usado como control positivo) a la dosis indicada o se dejaron sin vacunar. Al D26, se redujo el número de aves por grupo a 15 y se pesó cada ave. Veintiocho días después de la vacunación (en el D28), se desafiaron todas las aves con el ILTV cepa 63140 por ruta infraorbital ($10^{4,3}$ EID₅₀ en 0,2 mL/ave). En los días de estudio 31 a 35, y en el día de estudio 38, se observó individualmente a todas las aves para ver signos clínicos. En el Día de Estudio 38, todas las aves restantes se pesaron individualmente y se sacrificaron. La evaluación de la protección se llevó a cabo usando 3 criterios diferentes: (1) cualquier ave que muestre algún signo clínico durante tres días consecutivos o que muera después del desafío se considera como positiva para ILT; (2) cualquier ave que exhiba algún signo clínico moderado o severo en cualquier categoría en cualquier día o que muera después del desafío se considera como positiva para ILT; y (3) cualquier ave que exhiba algún signo

clínico moderado o severo en cualquier categoría durante dos días consecutivos o que muera después del desafío se considera como positiva para ILT. También se comparó el peso corporal en el D26 y el D38.

Los resultados de la protección usando los 3 criterios se muestran en la Tabla 27. Todos los controles se consideraron no protegidos para los 3 criterios. Ambas vacunas probadas indujeron una protección contra ILT alta y similar. No hubo diferencia significativa entre el peso corporal en el D26 (antes del desafío); sin embargo, después del desafío, los pesos corporales de las aves vacunadas fueron significativamente ($p < 0,0001$) mayores que los de las aves no vacunadas, indicando una protección contra la pérdida de peso.

Tabla 27 Eficacia de ILT inducida por las construcciones vHVT317 e INNOVAX ILT (control positivo) en pollos parrilleros después del desafío en el D28 con la cepa de ILTV 63140

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Número de aves	% Protección en base a los criterios 1 / 2 / 3	Peso corporal en el D26*	Peso corporal en el D38*
1	vHVT317	3820	15	86,7% / 86,7% / 86,7%	1544 ± 61	2931 ± 63
1	INNOVAX	3700	15	100% / 93,3% / 93,3%	1491 ± 61	2839 ± 61
2	-	-	15	0% / 0% / 0%	1461 ± 61	2433 ± 63

*media ± desviación estándar en g

Ejemplo 25 Eficacia de IBD inducida por la administración *in ovo* de vHVT317 después de desafío con variante de IBD a los 28 días de edad en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de vHVT317 expresando el gen VP2 del IBDV y el gen gD de ILTV administrado *in ovo* a embriones de entre 18 y 19 días de edad de pollos SPF contra el desafío con variante de IBD llevado a cabo a los 28 días de edad (31 días después de la vacunación).

Se asignaron embriones de entre 18 y 19 días de edad de pollos libres de patógenos específicos (SPF) a 3 grupos como se muestra en la Tabla 28. Todas las aves de los grupos 1 & 2 (aproximadamente 30 huevos/grupo) se vacunaron por la ruta *in ovo* (SC) con 0,05 mL de vHVT317 a la dosis indicada. Los huevos embrionados del grupo 3 se inocularon como control con 0,05 mL de diluyente para vacuna Marek. Con la eclosión, se conservaron 22 pollos por grupo y, antes del desafío, los 3 grupos se redujeron a 20 aves. Treinta y un días después de la vacunación (a los 28 días de edad), las aves de los 3 grupos se desafiaron con la cepa E variante Delaware del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) por vía intraocular (IO) (dosis blanco de $10^{3,0}$ EID₅₀ en 0,03 mL/ave). Las aves del grupo 5 se desafiaron como control con TPB (caldo triptosa fosfato, 0,03 mL/ave). Once días después del desafío, se midió el peso corporal y el peso de la bolsa de todas las aves. Se calcularon las proporciones B/B (proporción de peso de la bolsa/peso corporal x100) para todos los grupos.

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 28. Se observó una clara atrofia de la bolsa en todas las aves desafiadas no vacunadas. Se

observó protección en los grupos vacunados con vHVT317 a las 2 dosis ensayadas.

Tabla 28 Eficacia de IBD inducida por vHVT317 administrado *in ovo* después del desafío a los 28 días de edad con la cepa de IBDV variante E en pollos SPF

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Número de aves	Desafío con IBDV	Media de proporción en peso de B/B
1	vHVT317	2250	20	Si	0,41
2	vHVT317	3225	20	Si	0,60
3	-	-	20	Si	0,13
4	-	-	20	No	0,69

Ejemplo 26 Eficacia de ILT inducida por vHVT317 administrado a través de la ruta *in ovo* contra un desafío con ILTV en el D28 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de la construcción recombinante vHVT317 que expresa el gen VP2 del IBDV y el gen gD de ILTV administrada por la ruta *in ovo* a embriones de entre 18 y 19 días de edad contra un desafío con ILTV llevado a cabo en el D28 (a los 25 días de edad) en pollos SPF.

Se asignaron embriones de entre 18 y 19 días de edad de pollos libres de patógenos específicos (SPF) a 2 grupos como se muestra en la Tabla 29. Todas las aves del grupo 1 (aproximadamente 30 huevos/grupo) se vacunaron por la ruta *in ovo* (SC) con 0,05 mL de vHVT317 a la dosis indicada. Los huevos embrionados del grupo 2 se inocularon como control con 0,05 mL de

diluyente para vacuna Marek. Con la eclosión, se conservaron 22 pollos por grupo y, un día antes del desafío, ambos grupos se redujeron a 20 aves. Veinticinco días después de la vacunación (en el D28), las aves de ambos grupos se desafiaron con la cepa 63140 de ILTV administrada en el seno infraorbital ($10^{4.7}$ EID₅₀ en 0,2 mL/ave). Se observaron las aves para ver signos clínicos y mortalidad entre el D28 y D38. En el Día de Estudio 38, se sacrificaron todas las aves restantes. Se determinó la eficacia contra el desafío con ILT mediante la ausencia de signos clínicos de ILT típica tales como: depresión, distrés respiratorio asociado con tos, estornudos, estertor, soplidos con cuello extendido, con o sin descarga sanguinolenta y/o mucosa; disnea y respiración por boca; hinchamiento de senos infraorbitales, con o sin drenaje; y/o conjuntiva hinchada con cierre parcial o completo de los ojos. Cualquier mortalidad después del desafío, excepto debido a trauma, o cualquier condición clara que excluye al ave del estudio, se consideraron positiva para ILT.

Los resultados de protección contra ILT se muestran en la Tabla 29. Los resultados mostraron que la mayoría de las aves vacunadas con vHVT317 resultaron protegidas.

Tabla 29 Eficacia de ILT inducida por vHVT317 administrada por la ruta *in ovo* después del desafío en seno infraorbital en el D28 con la cepa 63140 de ILTV en pollos SPF

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Número de aves	% Protección (número protegidas/total)
1	vHVT317	2300	20	85% (17/20)
2	-	-	20	5% (1/20)

Ejemplo 29 Eficacia de ND inducida por vHVT309 & vHVT310 contra un desafío con NDV velogénico en el D21 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de dos construcciones recombinantes de HVT (vHVT309 & vHVT310) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV administrados a pollos SPF de un día de edad contra un desafío con NDV velogénico llevado a cabo en el D21.

Se asignaron pollos SPF de un día de edad (Leghorn blancos) a 3 grupos de aves como se muestra en la Tabla 30. Todas las aves de los grupos 2 y 3 se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de vHVT309 (14 aves; grupo 2) o vHVT310 (15 aves; grupo 3) a una dosis blanco de 2000 PFU. Las aves del grupo 1 (5 aves) se dejaron sin vacunar. Dos aves del grupo 2 murieron en el D5 por razones desconocidas. Veintiún días después de la vacunación (en el D21), se recolectó la sangre de 10 aves del grupo 3 para estudio de serología; luego, todas las aves de los 3 grupos se desafiaron con la cepa de NDV velogénico Herts 33 por vía intramuscular (IM) ($10^{5,0}$ EID₅₀ en 0,2 mL/ave). Se observó a todas las aves para ver los signos clínicos durante 14 días después del desafío. Se consideró a las aves protegidas cuando las mismas no morían ni mostraban signos clínicos de ND.

Los resultados de la protección se resumen en la Tabla 30. Todas las aves no vacunadas del grupo 1 murieron después del desafío; todas las aves vacunadas resultaron protegidas. La construcción vHVT310 indujo anticuerpos significativos anti-NDV (media de $3,7 \pm 0,3$ (desviación estándar) log₁₀ por ELISA (kit indirecto para enfermedad de Newcastle ID Screen de ID-VET) y media de $3,9 \pm 0,7$ log₂ por ensayo de HI) y anti-IBDV (media de $3,7$ log₁₀ $\pm$

0,2 log₁₀ por ELISA (kit de ELISA ProFLOK IBD Plus de Zoetis) en los 10 sueros de aves G3 muestreadas en el D21.

Tabla 30 Eficacia de ND inducida por diferentes construcciones dobles de HVT-IBD+ND en pollos parrilleros después del desafío en el D21 con la cepa de NDV velogénico

Grupo	Vacuna	Dosis (PFU)	Número de aves	Número de Aves muertas & enfermas	Protección
1	-	-	5	5 & 0	0%
2	vHVT309	2000	12	0 & 0	100%
3	vHVT310	2000	15	0 & 0	100%

Ejemplo 28 Eficacia de IBD inducida por vHVT309 y vHVT310 contra un desafío con IBDV clásico en el D21 en pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de dos construcciones recombinantes de HVT (vHVT309 & vHVT310) que expresan el gen VP2 del IBDV y el gen F del NDV administradas a pollos SPF de un día de edad contra un desafío con IBDV clásico llevado a cabo en el D21.

Se asignaron pollos SPF de un día de edad (Leghorn blancos) se asignaron a 3 grupos como se muestra en la Tabla 31. Todas las aves de los grupos 2 & 3 (aproximadamente 15 aves/grupo) se vacunaron por vía subcutánea (SC) con 0,2 mL de la construcción vHVT309 (grupo 2) o vHVT310 (grupo 3) a una dosis blanco de 2000 PFU. Diez aves del grupo 1 se dejaron

sin vacunar. Se registraron dos muertes tempranas no especificadas en el grupo 2. Veintiún días después de la vacunación (en el D21), se desafiaron todas las aves con la cepa de IBDV clásico 52/70 Faragher por vía intraocular (IO) ($10^{2,0}$ EID₅₀ en 0,05 mL/ave). Once días después del desafío (en el D32) se sacrificaron todas las aves y se hizo una necropsia para examinar las lesiones groseras de la bolsa. Se midieron el peso de la bolsa y el peso corporal para calcular la proporción de peso de la bolsa a corporal. Luego se almacenó la bolsa en formaldehído para el estudio de la histología. Las lesiones histológicas de la bolsa se clasificaron de acuerdo con la escala presentada en la Tabla 32. La severidad del desafío se validó si (1) por lo menos 50% de los controles del desafío murieron o mostraron signos característicos de la enfermedad, especialmente apatía/plumas erizadas durante más de 2 días o postración, y (2) 100% de los controles del desafío que sobrevivieron mostraron clasificación de histología de la bolsa de Fabricio ≥ 3 . La eficacia de los candidatos para vacuna se demostró si por lo menos 90% de los pollos resultaron protegidos. Los pollos se consideraron protegidos si (1) sobrevivieron y no mostraron signos clínicos notables de la enfermedad, especialmente sin apatía/plumas erizadas durante más de 2 días o ausencia de postración, y (2) mostraron una clasificación de histología de la bolsa de Fabricio < 3 .

Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 31. Todos los controles resultaron positivos para la infección por IBD. Se indujo una protección completa contra la IBD por vacunación con vHVT309 o vHVT310.

Tabla 31 Eficacia de IBD inducida por dos construcciones de HVT que expresan dos genes en pollos SPF después del desafío en el D21 con el IBDV cepa Faragher

Grupo	Vacuna	Dosis (log10 PFU)	Signos clínicos # de muertes/# de enfermas/total	Media de proporción en peso de bolsa/cuerpo (*1000)	Protección
1	-	-	4/1/10	1,7 ± 0,6**	0%
2	vHVT309	3,3	0/0/14	5,4 ± 1,2	100%
3	vHVT310	3,3	0/0/15	5,5 ± 0,7	100%

** media ± desviación estándar

Tabla 32 Escala de clasificación de lesiones histológicas de la bolsa of Fabricio*

Clasificación	Observaciones/lesiones histológicas
0	Sin lesión, bolsa normal
1	Entre 1% y 25% de los folículos mostraron depleción linfoide (es decir menos del 50% de depleción en 1 folículo afectado), influjo de heterófilos en lesiones
2	Entre 26% y 50% de los folículos mostraron depleción linfoide casi completa (es decir más del 75% de depleción en 1 folículo afectado), los folículos afectados mostraron necrosis pudo detectarse influjo severo de heterófilos
3	Entre 51% y 75% de los folículos mostraron depleción linfoide; los folículos afectados mostraron lesiones de necrosis y un se

	detectó influjo severo de heterófilos
4	Entre 76% y 100% de los folículos mostraron depleción linfoide casi completa; se detecta hiperplasia y estructuras de quistes; folículos afectados muestran necrosis y se detecta influjo severo de heterófilos
5	100% de los folículos muestran depleción linfoide casi completa; pérdida completa de estructura folicular, epitelio engrosado y plegado, fibrosis del tejido de la bolsa

* obtenido de la Monografía No. 04/2013:0587 de la Farmacopea Europea
“vacuna para la enfermedad infecciosa de la bolsa aviar (viva)

Ejemplo 29 Impacto de la administración *in ovo* de vHVT317 en la eclosionabilidad de pollos SPF

El objetivo del estudio fue evaluar la seguridad de vHVT317 en la eclosionabilidad cuando se administra por la ruta *in ovo*.

Los resultados son una compilación de datos de varios estudios incluyendo aquellos descritos en los ejemplos 23, 24, 25 y 26. Se inocularon huevos embrionados de entre 18 y 19 días de incubación con vHVT317 a una dosis blanco de 2000 o 3000 PFU o con diluyente para vacuna para la enfermedad de Marek. El porcentaje de eclosionabilidad se evaluó para cada grupo. Los resultados se resumen en la Tabla 33 y mostraron niveles excelentes de eclosionabilidad en los huevos vacunados.

Tabla 33 Eclosionabilidad después de la administración *in ovo* de vHVT317

Grupo	Vacuna	Dosis blanco (PFU)	Número de huevos vacunados	Número de huevos eclosionados	% eclosionabilidad
1	Diluyente	-	150	149	99,3%
2	vHVT317	2000	139	135	97,1%
3	vHVT317	3000	80	78	97,5%

Ejemplo 30 Eficacia de ILT inducida por vHVT406 contra desafíos con ILTV

Ejemplo 30.1 Eficacia de ILT inducida por vHVT406 contra un desafío con ILTV en el D28

El objetivo del estudio es evaluar y comparar la eficacia de construcción de vHVT406 recombinante que expresa el gen gD de ILTV y una vacuna con vector comercial HVT-ILT contra el desafío con ILT.

Se asignaron doce (12) aves SPF de un día de edad a cada grupo. Las aves en los grupos 1-2 se vacunaron SQ con 0,2 ml por ave. Después de la vacunación, todas las aves se colocaron en sus respectivas unidades. En el día 28, todas las aves se desafiaron por la ruta intratraqueal (IT) con virus de laringotraqueítis infecciosa (ILT), ILT-93-3 EP2. Todas las aves se observaron durante 11 días después del desafío para evaluar los signos clínicos debido al desafío. En el día 32, se recolectaron hisopados de tráquea y de conjuntiva de todas las aves remanentes. Los hisopados se procesaron para análisis por q-PCR. En el día 39, se terminaron todas las aves restantes.

Los resultados se muestran en la Tabla 34 a continuación. Los resultados mostraron que todas las aves vacunadas con vHVT406 resultaron

protegidas. Sorprendentemente, los resultados también mostraron que se obtuvo una buena protección (100% de protección) en el grupo vHVT406 cuando se usó una dosis menor (6.960 pfu/0,2 ml) en comparación con la dosis más alta (10.340 pfu/0,2 ml) usada para el producto comercial Innovax HVT-ILT.

Tabla 34 Número de aves positivas para ILT y porcentaje positivo por grupo¹

Grupo	Vacuna	Dosis/SQ ²	# de aves	# aves positivas /# total	% de protección (% de infección)	% de encontradas muertas	% de mortalidad total
1	vHVT406	6.960 pfu/0,2 ml de HVT	11 ³	0/11	100	0	0
2	Innovax HVT-ILT ⁴	10.340 pfu/0,2 ml de HVT	12	0/12	100	0	0

¹Las aves se consideraron positivas si mostraron signos clínicos durante tres días consecutivos, incluyendo mortalidad o mortalidad después del hisopado.

²Administración subcutánea (SQ) de unidades formadoras de placa (pfu); 0,20 ml por dosis.

³Un ave en el grupo vHVT406 se excluyó del estudio debido a parálisis.

⁴Producto comercial de MSD Animal Health

Ejemplo 30.2 Eficacia de ILT inducida por vHVT406 contra un desafío con ILTV en el D21

El objetivo del estudio es evaluar y comparar la eficacia de vHVT406 y de dos vacunas con vector comercial HVT-ILT contra el desafío con ILT.

Se asignaron doce (12) aves SPF de un día de edad a cada grupo. La separación al azar también asignó las unidades de aislamiento en las cuales se colocaron las aves (12 aves por unidad, una unidad por grupo). Las aves en los grupos 1-3 se vacunaron SQ con 0,2 ml por ave. En el día 21, todas las aves en los grupos 1-2 se desafiaron mediante la ruta intratraqueal (IT) con el virus de laringotraqueítis infecciosa (ILT), ILT-96-3 EP2. Las aves se observaron durante 11 días después del desafío para evaluar los signos clínicos debido al desafío. En el día 25, se recolectaron los hisopados de tráquea y conjuntiva en las aves remanentes. Las muestras de hisopado se procesaron para q-PCR. En el día 32, se terminaron todas las aves restantes.

Los resultados se muestran en la Tabla 35 a continuación. Los resultados mostraron que todas las aves vacunadas con vHVT406 menos una resultaron protegidas. Sorprendentemente, los resultados también mostraron que se obtuvo una buena protección (91,7% de protección) en el grupo vHVT406 cuando se usó una dosis menor (810 pfu/0,2 ml) en comparación con la dosis mayor (1590 pfu/0,2 ml) usada para el producto comercial Innovax HVT-ILT para alcanzar el mismo nivel de protección (91,7%). Además, vHVT406 proveyó una mejor protección (91,7%) cuando se usó a una dosis

menor respecto al producto comercial Vectormune HVT-ILT que solo proveyó un 75% de protección.

Tabla 35 Número de aves positivas para ILT y porcentaje positivo por grupo¹

Grupo	Vacuna	Dosis/SQ ²	# de aves	# de aves positivas/ # total	% de protección (% de infección)	% de encontradas muertas	
1	vHVT406	810 pfu/0,2 ml	12	1/12	91,7	0	0
2	Innovax HVT-ILT	1590 pfu/0,2 ml	12	1/12	91,7	0	0
3	Vectormune HVT-ILT ³	39,000 pfu/0,2 ml	12	3/12	75	25	25

¹Las aves se consideraron positivas si mostraron signos clínicos durante tres días consecutivos, incluyendo mortalidad o mortalidad después del hisopado.

²Administración subcutánea (SQ) de unidades formadoras de placa (pfu); 0,20 ml por dosis.

³Producto comercial de Ceva

Habiendo descrito de esta manera con detalle las formas de realización preferidas de la presente invención, se debe comprender que la invención definida por los ejemplos precedentes no se limita a los detalles particulares indicados en la memoria descriptiva precedente ya que muchas variaciones

evidentes de los mismos son posibles sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención.

Todos los documentos citados o referidos en la presente ("documentos citados en la presente"), y todos los documentos citados o referidos en los documentos citados en la presente, junto con cualquier instrucción, descripción, especificaciones de productos, y hojas del producto del fabricante de cualquiera de los productos mencionados en la presente o en cualquier documento incorporado a la presente a modo de referencia, se incorporan a la presente a modo de referencia, y pueden emplearse en la práctica de la invención.