

VACUNA SUBUNITARIA CONTRA ADENOVIRUS AVIAR Y MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE LA MISMA

Campo de la invención

5 El campo de la presente invención se refiere a vacuna de subunidades de fibra de adenovirus aviar (FAdV, por sus siglas en inglés) y métodos para su producción.

Los FAdV, de la familia Adenoviridae, género Aviadenovirus, son virus de ADN bicatenario sin envoltura clasificados en cinco especies (aviadenovirus de aves de corral A al aviadenovirus de aves de corral E, FAdV-A al FAdV-E) en función de las características genómicas y 12 serotipos subordinados
10 (FAdV-1 al -8a, -8b al -11) definidos por neutralización cruzada (Harrach *et al.*, 2012; Hess, 2020).

Las enfermedades de las aves asociadas a FAdV, el síndrome de hepatitis-hidropericardio (HHS, por sus siglas en inglés) y la hepatitis por cuerpos de inclusión (IBH, por sus siglas en inglés) comparten mecanismos patógenos e inmunitarios característicos, siendo en general muy distintas a las de la erosión de molleja por adenovirus (AGE, por sus siglas en inglés). Una de las razones subyacentes parece ser una
15 relación molecular más estrecha entre los tipos causales de HHS (FAdV-4, especie FAdV-C) e IBH (FAdV-2/-11, FAdV-D; FAdV-8a y -8b, FAdV-E) en comparación con el FAdV-1 genéticamente separado (especies FAdV-A) responsable de AGE (Schachner *et al.*, 2018; Hess, 2020).

Tanto HHS como IBH se caracterizan por hemorragias y cambios necrobióticos distróficos en el hígado y los riñones, acompañados de cuerpos de inclusión intranuclear. Un síntoma patológico
20 característico es el hígado dilatado, distrófico, de color amarillento y textura desmenuzable. Más raramente, se podrían detectar focos necróticos macroscópicamente visibles en el hígado. Los riñones están agrandados, pálidos y moteados con múltiples hemorragias. A veces, se puede notar una atrofia de la bolsa de Fabricio. A menudo se observan equimosis y hemorragias estriadas en los músculos esqueléticos. Microscópicamente, se detectan cambios distróficos extensos y necrosis del parénquima hepático. En los
25 núcleos de los hepatocitos se detectan cuerpos de inclusión basófilos o eosinófilos.

El diagnóstico se basa en las lesiones macroscópicas comunes y los registros de antecedentes. En varios casos, las lesiones dominantes son las hemorragias prominentes moteadas o estriadas del hígado. Además de esas lesiones, el HHS se caracteriza por un líquido de color pajizo amarillento en el hidropericardio. Los brotes se encuentran principalmente en pollos de tipo cárnico, más comúnmente a la
30 edad de 1-8 semanas. En comparación con HHS, se informan varios serotipos, predominantemente serotipos 2-11, en la causa de los brotes de IBH.

Los signos clínicos se pueden observar ya varias horas antes de la ocurrencia de la muerte. Consisten en peine pálido y barbas, depresión y apatía. La IBH se caracteriza por un inicio repentino y una tasa de mortalidad bruscamente aumentada que alcanza los valores máximos entre el 3er y el 4to día y
35 regresa dentro del rango normal entre el 6to y el 7mo día. La tasa total de mortalidad suele ser inferior al 10 %, pero puede alcanzar hasta el 30 %, con hasta el 70 % en el caso de HHS.

A pesar de la distribución mundial y el grave impacto económico de las enfermedades asociadas a FAdV, las estrategias de inmunización disponibles en el mercado se basan principalmente en el uso de

vacunas autógenas. Los productos con licencia están disponibles principalmente para proteger a las aves contra el HHS, desarrollado después de su primera aparición. En Australia, ya se desarrolló una vacuna viva basada en FAdV-8b en 1989 para controlar la IBH (Steer *et al.* 2011). En los últimos años, la escasez de vacunas disponibles se ha abordado mediante el desarrollo experimental de antígenos de vacunación alternativos, incluidos ciertos vivos e inactivados (Schonewille *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2018; Popowich *et al.* 2018; Steer-Cope *et al.* 2019; Grafl *et al.*, 2020), así como vacunas de subunidades (Shah *et al.*, 2012; Schachner *et al.*, 2014; Wang *et al.* 2018; Schachner *et al.*, 2018; Wang *et al.* 2019). En la mayoría de los estudios, las proteínas estructurales de la cápside de FAdV se utilizaron para la formulación de vacunas de subunidades, en función de su potencial inmunogénico y su función en la concesión de antigenicidad del virus (Norrby, 1969). En términos particulares, la base de pentona recombinante y la fibra, obtenida a partir de FAdV-4, demostraron ser exitosas para proteger a los pollos contra la enfermedad asociada, HHS (Shah *et al.*, 2012; Schachner *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Finalmente, la fibra-2 se integró en el virus recombinante de la enfermedad de Newcastle que podría usarse para proteger a las aves del HHS, aunque sólo después de la vacunación intramuscular (Tian *et al.* 2020).

El documento WO 2015/024932 A1 describe una vacuna de subunidades que comprende proteína fibra-2 de FAdV-C o un fragmento inmunogénico de la misma. Esta vacuna se puede utilizar para prevenir el HHS en aves.

El documento WO 2015/024929 A2 describe una vacuna de subunidades que comprende una proteína de fibra, seleccionada a partir de la proteína de fibra-2 del FAdV-C, la proteína de fibra-2 del FAdV-A, la proteína de fibra del FAdV-B, FAdV-D y FAdV-E, o un fragmento inmunogénico de las mismas. Esta vacuna se puede utilizar para prevenir por HHS, IBH o erosión de la molleja en las aves.

El documento CN 109 721 642 B se refiere a una vacuna de subunidades FAdV bivalente y su método de preparación. El documento describe el uso de las proteínas de fibra de cadena completa del FAdV serotipo 4 y serotipo 8 a manera de inmunógenos para la preparación de vacunas de subunidades bivalentes.

Sin embargo, aún se necesitan vacunas con un espectro de protección extendido debido a la incidencia simultánea e infecciones mixtas con diversas cepas de FAdV en el campo (Gomis *et al.*, 2006; Mittal *et al.*, 2014; Schachner *et al.*, 2016; Niu *et al.* 2018).

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar vacunas FAdV con un espectro de protección extendido. Además, estas vacunas deben ser producibles con complejidad reducida y/o mayor eficiencia en comparación con las vacunas FAdV en el estado de la técnica, en particular en condiciones de buenas prácticas de fabricación (GMP, por sus siglas en inglés).

La presente invención proporciona una vacuna de subunidades FAdV (para aves, preferentemente aves de corral, especialmente pollos), que comprende al menos una proteína de fibra FAdV quimérica y un adyuvante (inmunitariamente efectiva).

Esta vacuna es preferentemente para usarse en la mejora o prevención de AGE, IBH o HHS en aves, preferentemente en aves de corral, especialmente en pollos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para vacunar a un ave contra una infección por FAdV, que comprende los pasos de obtener la vacuna de la invención y administrar la vacuna al ave.

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una vacuna de subunidades FAdV, que comprende los pasos de expresar una proteína de fibra quimérica de FAdV en un sistema de expresión, purificar la proteína de fibra y combinar la proteína de fibra con un adyuvante (y preferentemente componentes de vacuna adicionales, tales como vehículos farmacéuticamente aceptables y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, en particular como se describe en la presente) para obtener la vacuna de subunidades del FAdV.

En el curso de la presente invención, de manera inesperada resultó que las vacunas de subunidades de FAdV con proteínas de fibra quiméricas son suficientemente inmunogénicas para ofrecer un espectro de protección extendido (por ejemplo, cuando se comparan con una vacuna de subunidades de FAdV basada en una sola cepa de FAdV). El uso de proteínas de fibra quiméricas tiene la ventaja adicional de simplificar la fabricación de la vacuna en comparación con la expresión y combinación de varias proteínas de diferentes fibra recombinantes (por ejemplo, de múltiples serotipos) en una única vacuna, ya que la expresión de proteína de fibra quimérica es fácilmente posible en una única línea celular (que alberga el gen de fibra quimérica) en un único biorreactor, la cantidad de etapas de mezcla durante la elaboración se puede reducir y la estequiometría 1:1 se puede controlar estrechamente (la fibra quimérica se expresa comúnmente de forma recombinante a partir de un único gen). Esta ventaja tiene una importancia particular cuando la vacuna FAdV se produce a escala industrial y/o en condiciones GMP (que se requiere para los medicamentos veterinarios en la mayoría de los países).

Las enfermedades FAdV, con cuadros clínicos discretos causados por serotipos particulares, son una carga económica para la industria avícola a escala mundial. Una creciente conciencia de los tipos de FAdV antigénicamente diversos que circulan conjuntamente en el campo, y la demanda de su control, explica por qué se ha dedicado mucha investigación últimamente a dilucidar la amplia protección de los antígenos candidatos, con resultados menos prometedores hasta ahora. Como paradigma general, la inmunidad desarrollada contra un tipo específico de FAdV no confiere protección contra otros tipos, una conclusión respaldada por los cambios observados hacia brotes con otros tipos virales después de la implementación de una pauta de vacunación contra los previamente dominantes (Steer *et al.*, 2011; Venne, 2013; Wang *et al.*, 2018; Bertran *et al* 2021; Mo 2021).

La fibra de FAdV es un antígeno de superficie que presenta elevados niveles de diversificación entre especies y serotipos de FAdV. El ejemplo 1 demuestra la protección cruzada entre diferentes serotipos que causan IBH con la introducción de una proteína de fibra quimérica novedosa que fusiona epítomos putativos de fibra FAdV-8a y -8b. En el ejemplo 2, se creó una novedosa fibra quimérica que retiene las características moleculares de FAdV-4 y -11 (denominada "crecFib-4/11"). Luego, el nuevo el constructo se probó *in vivo* para determinar su eficacia para inmunizar pollos contra diferentes enfermedades asociadas a FAdV, tales como HHS e IBH, y se desempeñó bien.

No relacionado con el presente contexto, las proteínas de fibra quiméricas basadas en proteínas

de fibra de adenovirus humano (HAdV) se describen en US 7,741,099. Dichas proteínas de fibra de HAdV quiméricas tienen un propósito completamente diferente, a saber, eludir la inmunidad antiadenovírica preexistente en hospederos humanos cuando se usan cápsides de HAdV quiméricas como vectores, por ejemplo, para terapia génica. Este propósito es, por supuesto, opuesto al propósito de la vacuna inventiva, a saber, inducir inmunidad antiadenovírica en el hospedero (es decir, ave). Por consiguiente, dichas proteínas de fibra de HAdV quiméricas en el estado de la técnica no se utilizan ni como una vacuna de subunidades ni junto con un adyuvante inmunoefectiva, y mucho menos ambos.

De acuerdo con una modalidad preferida, la proteína de fibra FAdV quimérica comprende un fragmento de proteína de fibra del extremo N-terminal de un primer serotipo FAdV y un fragmento de proteína de fibra del extremo C-terminal de un segundo serotipo FAdV (es decir, diferente).

Para un espectro de protección aún más amplio, se prefiere que el primer serotipo de FAdV y el segundo serotipo de FAdV pertenezcan a diferentes especies de FAdV (por ejemplo, el primer serotipo de FAdV que pertenece a FAdV-C, es decir, que es FAdV-4, y el segundo serotipo de FAdV que pertenece a FAdV-D, o viceversa).

Se prefiere especialmente que el primer serotipo FAdV pertenezca a la especie FAdV FAdV-C y el segundo serotipo FAdV pertenezca a una especie FAdV seleccionada de FAdV-B, FAdV-D y FAdV-E (por ejemplo, FAdV-E), o viceversa.

En otra modalidad, se prefiere que el primer serotipo FAdV pertenezca a la especie FAdV FAdV-A y el segundo serotipo FAdV pertenezca a una especie FAdV seleccionada de FAdV-B, FAdV-D y FAdV-E, o viceversa.

En aún otra modalidad, se prefiere que el primer serotipo FAdV pertenezca a la especie FAdV FAdV-C y el segundo serotipo FAdV pertenezca a la especie FAdV FAdV-A, o viceversa.

En otra modalidad preferida, se prefiere que el primer serotipo FAdV pertenezca a una especie FAdV seleccionada a partir de FAdV-B, FAdV-D y FAdV-E (en particular FAdV-E) y el segundo serotipo FAdV pertenezca a una especie FAdV seleccionada a partir de FAdV-B, FAdV-D y FAdV-E (en particular FAdV-E), o viceversa, preferentemente en donde se seleccionan dos especies diferentes.

De acuerdo con otra modalidad preferida, el primer serotipo de FAdV es FAdV-4 y el segundo serotipo de FAdV se selecciona de FAdV-2, FAdV-11, FAdV-8a y FAdV-8b (en particular FAdV-11), o viceversa.

En otra modalidad, se prefiere que el primer serotipo FAdV sea FAdV-1 y el segundo serotipo FAdV se seleccione de FAdV-2, FAdV-11, FAdV-8a y FAdV-8b, o viceversa.

En incluso otra modalidad, se prefiere que el primer serotipo de FAdV sea FAdV-4 y el segundo serotipo de FAdV sea FAdV-1, o viceversa.

De acuerdo con aún otra modalidad preferida, el primer serotipo FAdV se selecciona a partir de FAdV-2, FAdV-11, FAdV-8a y FAdV-8b (en particular FAdV-8b) y el segundo serotipo FAdV se selecciona a partir de FAdV-2, FAdV-11, FAdV-8a y FAdV-8b (en particular FAdV-8a), o viceversa, preferentemente con la condición de que se seleccionen dos serotipos FAdV diferentes.

La vacuna de la presente invención es por lo general de protección cruzada, es decir, induce

protección inmunitaria (al menos parcial) contra al menos dos serotipos de FAdV (de la misma o diferente especie de FAdV) en un ave, preferentemente en aves de corral, más preferentemente en un pollo.

Se prefiere altamente que tanto el fragmento de proteína de fibra del extremo N-terminal como el fragmento de proteína de fibra del extremo C-terminal de la proteína de fibra FAdV quimérica sean
5 inmunogénicos en un ave tal como un pollo.

Con este fin, es muy preferible que el fragmento de proteína de fibra del extremo N-terminal comprenda al menos uno, preferentemente al menos dos, especialmente al menos tres epítomos (células B) y el fragmento de proteína de fibra del extremo C-terminal comprenda al menos uno, preferentemente al menos dos, especialmente al menos tres epítomos (células B). Dichos epítomos se pueden confirmar
10 experimentalmente o predecir con métodos conocidos en la materia, por ejemplo, con el *software* DiscoTope 2.0 (Vindahl Kringelum *et al*, 2012).

En el curso de la presente invención, resultó que las proteínas de fibra FAdV quiméricas que tienen el "interruptor de especificidad" dentro del dominio de perilla de fibra (ver ejemplos 1 y 2, y en particular la Figura 1) fueron particularmente adecuadas para los fines de la presente invención. Por lo tanto, en otra
15 modalidad preferida, el fragmento de proteína de fibra del extremo N-terminal comprende un dominio de eje de fibra y una parte del extremo N-terminal de un dominio de perilla de fibra, en donde el fragmento de proteína de fibra del extremo C-terminal comprende una parte del extremo C-terminal de un dominio de perilla de fibra.

Para la presente invención, un fragmento de proteína de fibra (en particular fibra-2) de FAdV-C o
20 FAdV-A o de proteína de fibra de FAdV-B, FAdV-D o FAdV-E se puede utilizar como fragmento de proteína de fibra (por ejemplo, fragmento de proteína de fibra del extremo N-terminal o C-terminal) de la proteína de fibra FAdV quimérica. Varias secuencias de proteínas de fibra FAdV son conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, de las cepas de referencia KR5 (HE608152) o CFA20 (AF160185) o la cepa ON1 (GU188428 = NC_015323) o cualquier otro aislado de campo FAdV-C, por ejemplo, aislados IV37, K99-
25 97, K388-95, K88-95, K31, Peru53, Peru54, c344, K1013, AG234, C2B, 09-584, 09-8846, 09-2602, 922-1, Da60, K1013QT e INT4 (como se describe por Marek *et al.*, 2012)); y CELO (FAdV-A; Q64787) 340 (FAdV-B), A2-A (FAdV-D; AC000013), HG (FAdV-E; GU734104); correspondiente a las entradas H8WG65 de UniProt, H8WG69, H8WG72, H8WG77, H8WG70, H8WG73, H8WG66, H8WG76, H8WG60, H8WG61, H8WG62, H8WG75, H8WG67, H8WG78, H8WG63, H8WG68, H8WG64, H8WG74, H8WG71, H8WQZ7,
30 H8WQZ2, H8WQW9, Q0GH78, O55281, y F2VJI5. Otros ejemplos de proteínas de fibra FAdV se enumeran, por ejemplo, en la Tabla 3 de WO 2015/024929 A2 y las Figuras 5a-5i de WO 2015/024929 A2.

En particular, cualquiera de los fragmentos de fibra de FAdV descritos en los ejemplos 1 y 2 se puede utilizar para la presente invención (más específicamente, la secuencia de aminoácidos traducida a partir de esta), preferentemente en la combinación y el orden descritos en estos ejemplos.

Por consiguiente, se prefiere que el fragmento de proteína de fibra del extremo N-terminal
35 comprenda una secuencia de aminoácidos al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 %, incluso más preferentemente al menos 95 % o incluso 97.5 %, especialmente 99 % o incluso completamente idéntica a cualquiera de las siguientes secuencias:

Fragmento de fibra del extremo N-terminal FAdV-8a (SEQ ID NO: 1):

MATSTPHAFSFGQIGSRKRPAGGDGERDASKVPMQTPAPSATANGNDELDELVYPFWLQNGSTGGGG
GGGSGGNPSLNPPFLDPNGPLTVQNNLLKVNTTAPIAVTNKALTSFDAESLELTNQQLAVKIDPEGPLK
ATTEGIQLSVDPTTLEVDVDWELTVNLDPNGPLDSSATGITVRVDDTLLIDDDGSGQGKELGVHLNPDG
5 PITADQNGLDLEIDNQTLKITPGSAGGVLSVQLKPQGGLNSQSDGIQVVTQNSIEVDNGALDVKVWANGPL
STTPNGLTLNYDTGDFTVNAGTSLILRNPSLVANAYLTSGARTLQQFTAKGENSSQFSFPCAYYLQQWLS
DGLIFSSLYLKLDRTFTGMSSDPSYQNARYFTFWVGGAAMNLSQLSTPTITPSTTEWTAFAFALNYSG
APAFVYDANPVFTIYFQPNTGR

Fragmento de fibra del extremo N-terminal FAdV-8b (SEQ ID NO: 2):

10 MATSTPHAFSFGQIGSRKRPAGGDGERDASKVPMQTPAPSATANGNDELDELVYPFWLQNGSTGGGG
GGGSGGNPSLNPPFLDPNGPLTVQNNLLKVNTTAPIAVTNKALTAYESDSLELTNQQLAVKIDPEGPLK
ATTEGIQLSVDPTTLEVDVDWELTVKLDPDGPLDSSATGITVRVDETLIEDDGSGQGKELGVNLNPTGP
ITADDQGLDLEIDNQTLKVNSVTGGGVLAQLKSQGGTLAQTDGIQVNTQNSITVTNGALDVKVAANGPLE
STDGTGLTLNYDPGDFTVNAGTSLIIRDPALVANAYLTSGASTLQQFTAKSENSSQFSFPCAYYLQQWLS
15 LIFSSLYLKLDRAQFTNMPTGANYQNARYFTFWVGAGTSFNLSTLTEPTITPNTTQWNAFAPALDYSGAPP
FIYDASSVVTIYFEPTSGR

Fragmento de fibra-2 del extremo N-terminal de FAdV-4 (SEQ ID NO: 3):

MLRAPKRRHSENGQPESEAGPSPAPIKRAKRMVRASQLDLVYPFDYVADPVGGLNPPFLGGSGPLVDQ
GGQLTLNVTDPIIKNRSVDLAHDPSLDVNAQGGQLAVAVDPEGALDITPDGLDVKVDGVTVMVNDDWELA
20 VKVDPSGGLDSTAGGLGVSVDDTLLVDQGELGVHLNQGPITADSSGIDLEINPNMFTVNTSTGSGVLEL
NLKAQGGIQAGSSGVSVDESLEIVNNTLEV KPDPSGPLTVSANGLGKLYDSNTLAVTAGALTVVGGGS
VSTPIATFVSGPSLNTYNATIVNSSSHPFSCAYYLQQWNVQGLLFTSLYVKLDSTTMGTRPGDNSSANA
KWFTFWVSAYLQQCNPSGIQAGTVSPSTAALADFEPMANRSVSSPWYTSANAYYQPSSG

Fragmento de fibra del extremo N-terminal FAdV-11 (SEQ ID NO: 4):

25 MAKSTPFTFSMGQHSSRKRPADSENTQNASKVAKTQTSATRAGVDGNDDLNLVYPFWLQNSTSGGGG
GGSGGNPSLNPPFIDPNGPLYVQNSLLYVKTAPIEVENKSLALAYDSSLVDVAQNQLQV/KVDAEGPIRIS
PDGLDIAVDPSTLEVDDWELTVKLDPA GPISSSSAGINIRVDDTLLIEDDDTAQVKELGVHLNPNGPITAD
QDGLDLEVDPQTLTVTTSGATGGVLGVLLKPSGGLQTNIQIGIVAVADTLTSSNTVEVKTDPNGSIGSSS
NGIAVVTDPA GPLTTSSNGLSLKLT PNGSIQSSSTGLSVQTDPA GPITSGANGLSLSYDTSDFTVSQGMLSI
30 IRNPSTYPDAYLESGTNLLNNYTAYAENSSNYKFNCAYFLQSWYSNGLVTSSLYLKINRDNLSLPSGQLS
ENAKYFTFWPTYESMNLSNVATPTITPSSVPWGAFLPAQNCTSNPAFKYYLTQPPSIYFEPESG

Alternativamente, o además de esto, se prefiere que el fragmento de proteína de fibra del extremo
C-terminal comprenda una secuencia de aminoácidos al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %,
35 más preferentemente al menos 90 %, incluso más preferentemente al menos 95 % o incluso 97.5 %,
especialmente 99 % o incluso completamente idéntica a cualquiera de las siguientes secuencias:

Fragmento de fibra del extremo C-terminal de FAdV-8a (SEQ ID NO: 5):

VDTYLPVLTGDWKTSSYNP GTITLVVRNATIQLQSQSTFTTSVCYNFRCQNSGIFNNNATSGTLTLGPIFY

SCPALSTADV

Fragmento de fibra del extremo C-terminal de FAdV-8b (SEQ ID NO: 6):

LESYLPVLTDNWSQTYNPGTVTLCVKTVRVQLRSQGTSTLVCYNFRCQNTGIFNSNATAGMTLGPIFF
SCPALSTANAP

5 Fragmento de fibra del extremo C-terminal de FAdV-11 (SEQ ID NO: 7):

SVQTFQPVLTDGWDNTYNPGTVQVCILPQTVVGGQSTFVNMTTCYNFRCQNPQIFKVAASSGTFTIGPIF
YSCPTNKLTP

Fragmento de fibra-2 del extremo C-terminal de FAdV-4 (SEQ ID NO: 8):

EFQVFTPVVTGAWNPGNIGIRVLPVPVTASGDRYTLCLYSLQCTNSSIFNPANSGTMIVGPVLYSCPAASV

10 P

En una modalidad particularmente preferida, la proteína de fibra FAdV quimérica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 %, incluso más preferentemente al menos 95 % o incluso 97.5 %, especialmente 99 % o incluso completamente idéntica a cualquiera de las siguientes secuencias:

15 Quimera FAdV-8a/8b (SEQ ID NO: 9):

MATSTPHAFSFGQIGSRKRPAGGDGERDASKVPMQTPAPSATANGNDELVLVYFWLQNGSTGGGG
GGGSGGNPSLNPPFLDPNGPLTVQNNLLKVNTTAPIAVTNKALTLSFDAESLELTNQQLAVKIDPEGPLK
ATTEGIQLSVDPPTTLEVDDVDWELTVNLDPNGPLDSSATGITVRVDDTLLIDDDGSGQGKELGVHLNPDG
PITADQNGLDLEIDNQTLKITPGSAGGVLSVQLKPQGGGLNSQSDGIQVVTQNSIEVDNGALDVKVWANGPL
20 STTPNGLTLNYDTGDFTVNAGTSLILRNPSLVANAYLTSGARTLQQTAKGENSSQFSFPCAYYLQQWLS
DGLIFSSLYLKLDRTFTGMSSDPSYQNARYFTFWVGGAAMNLSQLSTPTITPSTTEWTAFAFALNYSG
APAFVYDANPVFTIYFQNTGRLESYLPVLTDNWSQTYNPGTVTLCVKTVRVQLRSQGTSTLVCYNFRC
QNTGIFNSNATAGMTLGPIFFSCPALSTANAP

Quimera FAdV-8b/8a (SEQ ID NO: 10):

25 MATSTPHAFSFGQIGSRKRPAGGDGERDASKVPMQTPAPSATANGNDELVLVYFWLQNGSTGGGG
GGGSGGNPSLNPPFLDPNGPLTVQNNLLKVNTTAPIAVTNKALTLAYESDSLELTNQQLAVKIDPEGPLK
ATTEGIQLSVDPPTTLEVDDVDWELTVKLDPDGPLDSSATGITVRVDETLIEDDGSGQGKELGVNLNPTGP
ITADDQGLDLEIDNQTLKVNSVTGGGVLAQLKSQGGGLTAQTDGIQVNTQNSITVTNGALDVKVAANGLE
STDTGLTLNYPGDFTVNAGTSLIIRDPALVANAYLTSGASTLQQTAKSENSSQFSFPCAYYLQQWLS
30 LIFSSLYLKLDRAQFTNMPTGANYQNARYFTFWVGAGTSFNLSTLTEPTITPNTTQWNAFAPALDYSGAPP
FIYDASSVVTIYFEPTSGRVDTYLPVLTGDWKTSSSTYNPGTITLVVRNATIQLQSQSTFTTSVCYNFRCQNS
GIFNNNATSGTLTGPIFYSCPALSTADV

quimera FAdV-4/11 (SEQ ID NO: 11):

35 MLRAPKRRHSENGQPESEAGPSPAPIKRAKRMVRASQLDLVYFPDYVADPVGGLNPPFLGGSGPLVDQ
GGQLTLNVTDPPIIKNRSVDLAHDPSLDVNAQGGQLAVAVDPEGALDITPDGLDVKVDGVTVMVNDDWELA
VKVDPSGGLDSTAGGLGVSVDDTLLVDQGELGVHLNQGGPITADSSGIDLEINPNMFTVNTSTGSGVLEL
NLKAQGGIQAGSSGVSVDESLEIVNNTLEVKPDPSGPLTVSANGGLKYDSNTLAVTAGALTVVGGGS
VSTPIATFVSGSPSLNTYNATIVNSSSHPFSCAYYLQQWNVQGLLFTSLYVKLDSTTMGTRPGDNSSANA

KWFTFWVSAYLQQCNPSGIQAGTVSPSTAALADFEPMANRSVSSPWYTYSANAYYQPSSGSGVQTFQPVL
TGDWDTNTYNPGTVQVCILPQTVVGGQSTFVNMTCYNFRCQNPQIFKVAASSGTFTIGPIFYSCPTNKL
QP

quimera FAdV-11/4 (SEQ ID NO: 12):

5 MAKSTPFTFSMGQHSSSRKRPADSENTQNASKVAKTQTSATRAGVDGNDDLNLVYPFWLQNSTSGGGG
GGSGGNPSLNPPFIDPNGPLYVQNSLLYVKTAPIEVENKSLALAYDSSLDVDAQNQLQV/KVDAEGPIRIS
PDGLDIAVDPSTLEVDEWELTVKLDPAGPISSSSAGINIRVDDTLIEDDDTAQVKELGVHLNPNGPITAD
QDGLDLEVPQTLTVTSGATGGVLGVLLKPSGGLQTNIQGIGVAVADTLTSSNTVEVKTDPNGSIGSSS
10 NGIAVVTDPAGPLTTSSNGLSLKLTPNGSIQSSSTGLSVQTDPAGPITSGANGLSLSYDTSDFTVSQGMLSI
IRNPSTYPDAYLESGTNLLNNYTAYAENSSNYKFNCAYFLQSWYSNGLVTSSLYLKINRDNLNSLP
ENAKYFTFWVPTYESMNLNVATPTITPSSVPWGAFLPAQNCTSNPAFKYYLTQPPSIYFEPESGEFQVFT
PVVTGAWNPGNIGIRVLPVPVTASGDRYTLLCYSLQCTNSSIFNPANSGTMIVGPVLYSCPAASVP

15 La vacuna de acuerdo con la presente invención comprende una (cantidad inmunoefectiva de un
adyuvante, preferentemente seleccionado a partir del grupo que consiste en adyuvante completo de
Freund, adyuvante incompleto de Freund, hidróxido de aluminio, Bordetella pertussis, saponina, dipéptido
de muramilo, copolímero de etileno y acetato de vinilo, aceite, un aceite vegetal o un aceite mineral, en
particular aceite de cacahuete o aceite de silicona, y combinaciones de los mismos.

20 Los adyuvantes son sustancias que mejoran la respuesta inmunitaria a los inmunógenos
(específicamente, la proteína quimérica de la fibra FAdV). Los adyuvantes pueden incluir hidróxido de
aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, por ejemplo, Quil A, emulsión de agua en aceite, emulsión de
aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión puede basarse en particular en aceite
de parafina líquido ligero (tipo Farmacopea Europea); aceite isoprenoide tal como escualano o escualeno;
25 aceite resultante de la oligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos
o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más particularmente aceites vegetales, oleato de etilo,
di(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres
de ácidos grasos ramificados o alcoholes, en particular ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se utiliza
combinado con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferentemente
30 tensioactivos no iónicos, en particular ésteres de sorbitán, de manida (por ejemplo, oleato de
anhidromanitol), de glicerol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico o
hidroxisteárico, que están opcionalmente etoxilados, y bloques de copolímero de polioxipropileno-
polioxietileno, en particular los productos Pluronic(R), especialmente L121. Por ejemplo, la vacuna que
contiene adyuvante se prepara de la siguiente manera: 50 a 90 v/v de fase acuosa que comprende el
35 inmunógeno se emulsionan en 1 a 10 % p/v de oleato de anhidromanitol, 1 a 10 % p/v de ácido oleico
etoxilado con 11 óxido de etileno (EO) y 5 a 40 % v/v de aceite de parafina líquido ligero (tipo Farmacopea
Europea) con la ayuda de un turbomezclador emulsionante. Un método alternativo para preparar la
emulsión consiste en emulsionar, mediante pases a través de un homogeneizador de alta presión, una
mezcla de 1 a 10 % p/v de escualeno, 1 a 10 % p/v de Pluronic(R) L121, 0.05 a 1 % p/v de un éster de

ácido oleico y de anhidrosorbitol etoxilado con 20 EO, 50 a 95 % v/v de la fase acuosa que comprende el inmunógeno. También es posible formular con polímeros sintéticos (por ejemplo, homo- y copolímeros de ácido láctico y glicólico, que se han utilizado para producir microesferas que encapsulan inmunógenos, por ejemplo, microesferas biodegradables). Un ejemplo adicional de un adyuvante es un compuesto elegido de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno. Los compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con éteres polialquénicos de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen con el término carbómero, por ejemplo, polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferentemente no más de 8, los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos se reemplazan por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son aquellos que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener por sí mismos otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol(R) (BF Goodrich, Ohio, EUA) son particularmente apropiados. Se reticulan con una sacarosa de alilo o con pentaeritritol de alilo. Entre ellos, se pueden mencionar Carbopol(R) 974P, 934P y 971P. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno, se prefieren los copolímeros EMA(R) (Monsanto) que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno, lineales o reticulados, por ejemplo, reticulados con éter divinílico. La disolución de estos polímeros en agua conduce a una disolución ácida que se neutralizará, preferentemente a pH fisiológico, con el fin de proporcionar la solución adyuvante en la que se incorporará la propia composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna. Los grupos carboxilo del polímero están entonces parcialmente en forma de COO⁻.

En otra modalidad, se prepara una solución de adyuvante en agua destilada, preferentemente en presencia de cloruro de sodio, estando la solución obtenida a pH ácido. Esta solución madre se diluye agregándola a la cantidad deseada (para obtener la concentración final deseada), o una parte sustancial de la misma, de agua cargada con NaCl, preferiblemente solución salina fisiológica (NaCl 9 g/L) de una vez en varias porciones con neutralización concomitante o posterior (pH 7.3 a 7.4), preferiblemente con NaOH. Esta solución a pH fisiológico se utilizará tal cual, para la mezcla con el inmunógeno, que puede almacenarse especialmente en forma liofilizada, líquida o congelada.

La vacuna de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente un diluyente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en agua para inyección, solución salina fisiológica, medio de cultivo tisular, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, especialmente aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo.

La vacuna inventiva es preferentemente para usarse en mejorar o prevenir AGE, IBH o HHS en aves, preferentemente en aves de corral, especialmente en pollos.

En otras palabras, la vacuna inventiva es preferentemente para usarse en la inmunización de aves, preferentemente aves de corral, especialmente pollos contra una infección por FAdV (en particular, una infección con el primer y/o segundo serotipo de FAdV).

Para el uso o método profiláctico de la invención, la vacuna es administrable a las aves en una

cantidad efectiva en un momento adecuado. Las formas comunes de administración son intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, in-ovo, intranasal, colirio o administración intracloacal. Preferentemente, la vacunación en pollo se efectúa hasta la semana 19.

De acuerdo con otra modalidad preferida, la vacuna se administra a las aves al menos dos veces.

- 5 Resultó que un refuerzo es particularmente útil para aumentar los anticuerpos contra la proteína de fibra quimérica.

La proteína de fibra FAdV quimérica se puede producir mediante cualquier sistema de expresión adecuado. Preferentemente, la producción se efectúa en un sistema de expresión eucariota. Los sistemas de expresión específicamente preferidos son un sistema de expresión de baculovirus, sistemas de expresión bacterianos tales como un sistema de expresión de *E. coli* o un sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Sin embargo, prácticamente cualquier sistema o vector de expresión adecuado se puede utilizar en la producción de la vacuna proporcionada por la presente invención. A modo de ilustración, dichos sistemas de expresión o vector adecuados se pueden seleccionar, de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso específico, de plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YAC, por sus siglas en inglés), cromosomas artificiales de bacterias (BAC, por sus siglas en inglés), cromosomas artificiales basados en bacteriófago P1 (PAC, por sus siglas en inglés), cósmidos o virus, que pueden tener además un origen de replicación heterólogo, por ejemplo, bacteriano o de levadura, de modo que se pueda amplificar en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferentes del gen o genes de interés. Estos sistemas o vectores de expresión se pueden obtener mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Tras la expresión, la proteína de fibra FAdV quimérica se puede purificar mediante cualquier método de purificación de proteínas adecuado conocido en la materia, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad, en caso de que la proteína de fibra FAdV quimérica tenga una etiqueta His u otra etiqueta de afinidad. Dicha etiqueta de afinidad se puede escindir antes de formular la forma de dosificación final de la vacuna.

La vacuna de acuerdo con la presente invención se puede producir en cantidades industriales; la dosis de vacuna individual administrada a los animales puede estar en los intervalos también aplicados para otras vacunas. Preferentemente, la proteína de fibra FAdV quimérica está contenida en la vacuna en una cantidad de 0.1 µg/mL a 10 mg/mL, preferentemente de 1 µg/mL a 1 mg/mL, especialmente de 10 a 100 µg/mL.

La vacuna de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente un diluyente farmacéuticamente aceptable, especialmente si se proporciona como producto de vacuna vendido comercialmente. Los vehículos adecuados pueden ser tanto acuosos como no acuosos. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo.

De acuerdo con una modalidad preferida, la vacuna de acuerdo con la presente invención se formula como una forma de dosis, es decir, ya está formulada para administrarse sin etapas adicionales de partición/formulación/separación.

La vacuna de la presente invención por lo general no contiene ácidos nucleicos y/o por lo general no contiene ningún vector viral (es decir, está libre de vector) o cápsides virales.

En el presente documento, "UniProt" se refiere al Recurso Universal de Proteínas. UniProt es un recurso completo para la secuencia de proteínas y los datos de anotación. UniProt es una colaboración entre el Insituo Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI, por sus siglas en inglés), el Insituo Suizo de Bioinformática (SIB, por sus siglas en inglés) y el Fuente de Información de Proteínas (PIR, por sus siglas en inglés). En los tres institutos, más de 100 personas participan a través de diferentes tareas, como la curación de bases de datos, el desarrollo de software y el soporte. Sitio web: <http://www.uniprot.org/>

Las entradas en las bases de datos UniProt se identifican por sus códigos de acceso (denominados en el presente documento, por ejemplo, "código de acceso UniProt" o brevemente "UniProt" seguido del código de acceso), generalmente un código de seis letras alfanuméricas (por ejemplo, "H8WG77"). Si no se especifica otra cosa, los códigos de acceso utilizados en la presente se refieren a entradas en la Base de Conocimiento de Proteínas (UniProtKB) de UniProt. Si no se indica lo contrario, el estado de la base de datos UniProt para todas las entradas a las que se hace referencia en este documento (o en WO 2015/024929 A2) será del 10 de febrero de 2021 (Versión 2021_01 de UniProt/UniProtKB).

En el contexto de la presente solicitud, las variantes de secuencia (designadas como "variante natural" en UniProt) se incluyen expresamente cuando se hace referencia a una entrada de base de datos UniProt.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia aminoacídica" o "X % idéntico" (tal como "70 % idéntico") con respecto a una secuencia de polipéptido o proteína de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando un software informático disponible públicamente tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, MegAlign (DNASTAR) o la aplicación de alineación de secuencia por pares "Needle" del paquete de software EMBOSS. Los técnicos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para obtener el alineamiento máximo sobre toda la longitud de las secuencias comparadas. Sin embargo, para los fines de la presente, los valores del % de identidad de secuencias de aminoácidos se calculan utilizando la alineación de secuencias del programa informático "Needle" del paquete de software EMBOSS (disponible públicamente en European Molecular Biology Laboratory; Rice *et al.*, 2000).

Se puede acceder al programa "needle" en el sitio web http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ o descargarlo para su instalación local como parte del paquete EMBOSS desde <http://emboss.sourceforge.net/>. Se ejecuta en muchos sistemas operativos Unix ampliamente utilizados, como Linux.

Para alinear dos secuencias de proteínas, el programa Needle se ejecuta preferentemente con los

siguientes parámetros:

Línea de instrucción: `needle -auto -stdout -asequence SEQUENCE_FILE_A -bsequence SEQUENCE_FILE_B -datafile EBLOSUM62 -gapopen 10.0 -gapextend 0.5 -endopen 10.0 -endextend 0.5 -aformat3 pair -sprotein1 -sprotein2 (Align_format: pair Report_file: stdout)`

El % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada con respecto o en contra de una secuencia de aminoácidos B determinada (que puede expresarse alternativamente como una secuencia de aminoácidos A determinada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto o en contra de una secuencia de aminoácidos B determinada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

en donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos calificados como coincidencias idénticas por el programa Needle de alineación de secuencias en la alineación de A y B de ese programa, y en donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. En los casos en que "la secuencia de A sea más de N % idéntica a la secuencia completa de B", Y es la longitud de secuencia completa de B (es decir, la cantidad completa de residuos de aminoácidos en B). A menos que se indique específicamente otra cosa, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en la presente se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático Needle.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin estar restringida a los mismos.

Figura 1. (a) El dominio de perilla *crcFib*, representado esquemáticamente como un modelo de cinta bidimensional (adaptado de El Bakkouri *et al.*, 2008). Las flechas representan hebras β (designadas A-J, en orden lineal desde el extremo N- al extremo C-terminal de la secuencia de perillas) conectadas por líneas que representan los bucles intermedios. Las estructuras codificadas por secuencias de serotipos discriminados se muestran en diferentes colores opuestos al sitio de intercambio quimérico (el "interruptor de especificidad", indicado por la línea discontinua en el extremo izquierdo de la cadena G). (b) Coordenadas de las cadenas β de la perilla de fibra (barras negras), epítomos candidatos (barras azules, epítomos predichos por DiscoTope 2.0; barra roja, un epítomo informado previamente por Wang *et al.*, 2018) y el interruptor de especificidad, anotado en un gráfico de Wu-Kabat de la secuencia de fibra FAdV-E. El grado de variabilidad, indicado por el tamaño de la barra para cada posición de residuo, se ha calculado como el índice de Wu-Kabat a partir de fibra disponibles que representan todos los tipos de especies (N=29). Las posiciones de aminoácidos de la alineación de secuencias múltiples se anotan a lo largo del eje horizontal. Los epítomos candidatos se ajustan bien a los residuos menos conservados, mientras que el interruptor de especificidad se encuentra en un sitio de consenso entre especies. (c) Comparaciones de las dos perillas *crcFib* (8a/8b y 8b/8a) en el modelado de similitud de la secuencia de aminoácidos (A y B) y su electrostática de superficie predicha en los paneles inferiores, con la molécula mostrada en vista

lateral. En el panel superior, sólo una cadena del trímero de fibra está coloreada con tonos anaranjados para la porción de secuencia derivada de FAdV-8a y tonos verdes para la porción de secuencia de FAdV-8b; los tonos apagados indican los tres epítomos predichos en este estudio. Los mismos epítomos se resaltan con cuadrados negros en las imágenes de carga superficial electrostática con transiciones de color de rojo (carga negativa) a azul (carga positiva), y se comparan con los sitios correspondientes en las perillas nativas afines de FAdV-8a y -8b (C).

Figura 2. Desarrollo de anticuerpos después de la inmunización con constructos de *crecFib*. El encabezado de cada panel indica el constructo utilizado para la inmunización, que también corresponde al antígeno de recubrimiento del Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés) para la determinación de densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés) semanales de 1-8 semanas después de la vacunación (wpv, por sus siglas en inglés). Los títulos de neutralización medios, si son detectables, se grafican con los colores respectivos para los virus contra los que se probaron los sueros (incluido el molde quimérico y las cepas de exposición de este estudio de FAdV-8a y -8b).

Figura 3. Análisis de *Western Blot* para evaluar la reactividad de los constructos de *crecFib* lado a lado con fibra control monoespecíficas de los tipos FAdV-8a, FAdV-8b y FAdV-7 (todas las especies FAdV-E). El orden de los antígenos es el mismo en todas las membranas, como se marca para la primera membrana: 1, Fib-8a; 2, Fib-8b; 3, *crecFib*-8a/8b; 4, *crecFib*-8b/8a; 5, Fib-7. Sin embargo, cada membrana se incubó con un antisuero diferente especificado en el encabezado de cada membrana, con el serotipo correspondiente entre paréntesis. Los tamaños de peso molecular se indican mediante el estándar en el primer carril en (a); en todas las transferencias posteriores solo se marca el rango relevante de 50 kDa a 70 kDa. Las señales que están presentes, pero son difíciles de distinguir del fondo, están enmarcadas. (a) Confirmación de fibra monoméricas a través de la etiqueta de poli-histidina. (b) Detección de *crecFib* por antisueros producidos contra las cepas constitutivas de FAdV-8a y -8b, y FAdV-7 como tipo atípico. (c) Detección de *crecFib* por antisueros de aves vacunadas con el mismo, así como el constructo de orden inverso. Los antisueros *CrecFib* también reconocen todas las fibra control monoespecíficas. (d) Detección de *crecFib* y fibra control mediante antisueros contra aislados de campo, incluidas las dos cepas de exposición de este estudio, una cepa naturalmente recombinante y cepas ejemplares de especies externas FAdV-E con uno (FAdV-B) o dos genes de fibra (FAdV-A).

Figura 4. Diseño experimental de los estudios de Protección 1 y 2. Los procedimientos (vacunación, refuerzo, exposición) realizados en las aves se indican en las líneas de tiempo (como días de vida y días posteriores a la exposición = (dpc, por sus siglas en inglés)). A continuación, se especifican los esquemas de tratamiento individuales de cada grupo. Los asteriscos indican muestreo de sangre, los símbolos cruzados indican asesinatos secuenciales, con necropsia y muestreo de órganos.

Figura 5. Desarrollo de anticuerpos antes de la exposición en el estudio de protección 1 (vacunación de sensibilización-refuerzo con *crecFib*-8a/8b o *crecFib*-8b/8a). (a) Valores medios de OD para cada tratamiento (se agruparon los grupos que recibieron el mismo tratamiento), medidos mediante ELISA *crecFib*-8a/8b (A) y ELISA *crecFib*-8b/8a (B) a los 21 (18 dpv), 28 (7 dpb) y 35 (14 dpb) días de vida. (b) Títulos de anticuerpos neutralizantes a los 35 días de vida (14 dpb = exposición inmediatamente anterior)

contra FAdV-8a (cepas TR59 y 11-16629) y FAdV-8b (cepas 764 y 13-18153).

Figura 6. Criterios de valoración de la protección, evaluados después de la exposición con FAdV-8b en el estudio de protección 1 (a 3, 5 y 7 dpc). (i) Proporciones de peso corporal (BW, por sus siglas en inglés) para el hígado (A) y el bazo (B). Las letras minúsculas sobre las barras indican diferencias significativas (frente al control con resultado negativo, "a"; frente al control de exposición, "b"). (ii) Asparto aminotransferasa (AST) plasmática (significativamente diferente frente al control negativo, "a"; significativamente diferente frente al control de exposición, "b"). (iii) Carga viral en hígado (A) y páncreas (B). Las diferencias significativas frente al control de exposición se indican con asteriscos.

Figura 7. Desarrollo de anticuerpos (ELISA y VNT) en el estudio de protección 2 (comparando las pautas posológicas $V^{8b/8a}$ y $VV^{8b/8a}$ con respecto a la exposición con FAdV-8a o -8b) inmediatamente antes (21 d) y después de la exposición (7 y 14 dpc). Sólo los grupos que recibieron la misma exposición se compararon entre sí, con un resumen de aves expuestas a FAdV-8a (cepa 11-16629) en (A) y aves expuestas a FAdV-8b (cepa 13-18153) en (B). Los paneles superiores muestran la neutralización contra el tipo de virus utilizado para la exposición, mientras que los paneles inferiores muestran la neutralización contra el tipo de virus heterólogo respectivo.

Figura 8. Criterios de valoración de la protección en el estudio de protección 2 (evaluado a 3, 5, 7 y 14 dpc). Los grupos se designan con V o VV, de acuerdo con una pauta única o de sensibilización-refuerzo con *crcFib-8b/8a*, y C seguido del virus de la respectiva exposición (FAdV-8a o FAdV-8b); N designa el control con resultado negativo. (i) Proporciones de peso corporal de órganos (BW) para hígado (A), bazo (B) y bolsa de Fabricio (C). Las letras minúsculas sobre las barras indican diferencias significativas (frente al control negativo, "a"; frente al correspondiente control de exposición, "b"). (ii) AST plasmática (significativamente diferente frente al control negativo, "a"; significativamente diferente frente al control de exposición, "b"). (iii) Carga viral en hígado (A), páncreas (B), bazo (C) y bolsa de Fabricio (D). Las diferencias significativas frente al control de exposición correspondiente se indican con asteriscos. Los datos excluyen la pauta de vacunación única a 7 y 14 dpc debido al bajo tamaño de la muestra (marcado con §).

Figura 9. Valores medios de órgano:BW después de la exposición. La media y la desviación estándar de la proporción hígado-BW (A), la proporción bazo-BW (B), la proporción *bursa*-BW (C) y la proporción timo-BW (D) para cada grupo experimental en el período de tiempo posterior a la exposición. La diferencia significativa frente al control negativo se indica con la letra "a", mientras que la diferencia significativa frente al control de la respectiva exposición se indica con la letra "b". La significancia se determinó a $p \leq 0.05$. No se observaron diferencias significativas para el timo-BW en el sistema FAdV-11 en ningún punto temporal medido.

Figura 10. Valores medios de AST después de la exposición. Media y desviación estándar de la AST plasmática para cada grupo experimental en el período de tiempo posterior a la exposición. La diferencia significativa frente al control negativo se indica con la letra "a", mientras que la diferencia significativa frente al control de la respectiva exposición se indica con la letra "b". La significancia se determinó a $p \leq 0.05$.

Figura 11. Carga viral en principales órganos blanco posteriores a la exposición. Media y desviación estándar de la carga viral (expresada en log₁₀) para cada grupo experimental en el período de tiempo posterior a la exposición en hígado (A), bazo (B) y bolsa de Fabricio (C). Los asteriscos indican una diferencia significativa en comparación con el respectivo control de exposición. La significancia se determinó a $p \leq 0.05$.

Figura 12. Desarrollo de anticuerpos después de la vacunación. Títulos medios (OD) para grupos experimentales probados en ELISA *crecFib*-4/11 a lo largo del estudio de protección. Los valores dados para el punto de tiempo previo a la exposición (14 y 21d) son acumulativos para los tres grupos vacunados (I, II, III) y los dos grupos control de la exposición (IV, V). El valor de corte está marcado en rojo.

Figura 13. Desarrollo de anticuerpos neutralizantes después de la vacunación. Media y desviación estándar de los títulos de VNT (log₂) antes de la exposición (21d) y a 5-7 dpc: grupos vacunados y control de la exposición a FAdV-4 contra la cepa de la exposición a FAdV-4 (A) y vacuna (B); grupos vacunados y control de la exposición a FAdV-11 contra la cepa de la exposición a FAdV-11 (C) y vacuna (D). Los encabezados muestran el número de aves que exhiben nAb (algunas personas no pudieron someterse a la prueba debido a la falta de volumen de suero). No se observaron nAb para el grupo de solo vacuna en ningún punto temporal cuantificado.

Ejemplos

Ejemplo 1: Vacuna de subunidades de protección cruzada con fibra quimérica basada en dos serotipos FAdV-E

El control de IBH, una enfermedad de importancia económica para la producción de pollos en todo el mundo, se complica por una etiología que involucra múltiples tipos de FAdV divergentes. La proteína de fibra es eficaz para inducir anticuerpos protectores en pollos vacunados.

En este estudio, diseñamos proteínas quiméricas, intercambiando porciones de fibra distal N y C, cada una con epítomos putativos, entre serotipos divergentes FAdV-8a y -8b.

Inesperadamente, la vacuna de fibra quimérica indujo respuestas protectoras en pollos contra las infecciones de ambos serotipos.

Materiales y métodos

Diseño *in silico* para fibra quiméricas expresadas de forma recombinante ("*crecFib*")

El marco de lectura abierto de fibra FAdV se dividió en un segmento amino (N)- y un segmento carboxilo (C)-distal, se amplificó por separado de diferentes cepas de molde y se fusionó sin problemas mediante clonación de ensamblaje Gibson para reconstituir una nueva fibra de cadena completa, en lo sucesivo denominada "*crecFib*" (Figura 1A, 1B). Como resultado, los constructos de *crecFib* contienen un cruce entre secuencias heterólogas de los serotipos FAdV-8a y -8b en la unión de los segmentos N y C-distales. La unión (denominada "interruptor de especificidad") se diseñó en las posiciones de residuos de consenso aa441-442 en la alineación de secuencias por pares de las fibra FAdV-8a y FAdV-8b, mapeando dentro del dominio de cabezal de fibra propuesto ("perilla"). Al acomodar epítomos predichos *in silico* a ambos lados, se anticipó que esta estrategia combinaría la especificidad antigénica de ambos serotipos constitutivos en un solo antígeno. Al diseñar el interruptor de especificidad dentro de la perilla, también

buscamos mantener la integridad de la secuencia en el presunto límite entre el eje y la perilla, que representa un elemento importante para la trimerización de la fibra (Hong *et al.*, 1996).

Los epítomos candidatos se (i) dedujeron de un epítomo previamente informado en la fibra-2 de FAdV-4 (FAdV-C) (Wang P *et al.*, 2018), y (ii) predicción *in silico* con el software DiscoTope 2.0 (Vindahl Kringelum *et al.*, 2012), por lo que la perilla de fibra relacionada más cercano para el que actualmente se dispone de un modelo molecular, la fibra-2 de la cepa de referencia CELO de FAdV-1 (FAdV-A) (El Bakkouri, 2008), sirvió para el modelado de homología. Las homologías posicionales entre diferentes miembros de tipo se determinaron mediante múltiples alineaciones de secuencias creadas con el software MegAlign (DNASTAR, Madison, WI, EUA). También se utilizó el modelado de homología para asignar dominios estructurales (cola, eje, perilla) de la fibra FAdV en función de la información existente (Hess *et al.*, 1995).

Secuencias de constructos crecFib

CrecFib-8a/8b:

Extremo N-terminal:

nt1-1323 a partir de cepa de referencia FAdV-8a ((TR59) KT862810)

ATGGCGACCTCGACTCCTCACGCCTTCTCCTTTGGCCAAATCGGCTCCAGAAAACGCCCTGCGGGC
GGCGATGGCGAGCGAGACGCCTCCAAAGTGCCGAAAATGCAGACCCCCGCTCCGAGCGCGACCGC
CAACGGAAATGACGAGCTGGACCTGGTCTACCCCTTTTGGCTCCAAAACGGCTCCACCGGAGGAGG
CGGCGGCGGCGGTTCCGGTGAAACCCGTCCTCAACCCGCCGTTTTTGGACCCCAACGGACCCCT
GACCGTCCAAAACAACCTCCTGAAGGTCAATACCACGGCCCCCATCGCCGTACCAATAAGGCCCTG
ACACTCTCCTTTGACGCGGAGAGTCTCGAGCTCACTAACCAACAGCAACTGGCGGTCAAATCGACC
CCGAAGGACCTCTGAAAGCCACTACCGAGGGAATACAGCTGTGCGGTGACCCCTACGACGTTGGAGG
TTGATGACGTGCGACTGGGAGTTAACCGTGAACCTCGACCCCAACGGCCCCCTAGATTCCTCAGCCAC
AGGAATCACGGTCAGAGTCGATGACACCTTGCTCATCGATGATGACGGTTCGGGTCAAGGCAAAGAA
CTGGGCGTACATCTTAACCCCGACGGACCCATTACGGCAGACCAAAACGGTCTCGACCTGGAAATC
GACAACCAGACTCTTAAATACCCCCGGCTCGGCGGGCGGTGTTCTTTCCGTACAGCTGAAACCG
CAGGGAGGTCTGAATTCCCAATCCGATGGTATCCAGGTGGTAACCCAGAACAGTATCGAAGTTGATA
ACGGCGCACTCGATGTTAAGGTAGTCGCTAACGGTCCACTGTCTACAACTCCCAACGGTCTTACCCT
AAACTACGATACCGGTGACTTCACCGTAAATGCCGGGACCTTAAGTATACTTCGGAACCCCTCTCTC
GTCGCCAATGCCTATCTTACGTCCGGGGCAAGAACACTGCAACAGTTCACCGCTAAAGGGGAAAAC
CTAGTCAGTTTTCTTTCCATGTGCTTATTATCTTCAACAGTGTTATCGGATGGACTCATTTTCAGTT
CCCTCTACCTAAAGTTAGATAGGACGCGCTTCACAGGGATGTCCAGCGATCCCTCCTATCAAAACGC
CAGATATTTACGTTCTGGGTAGGGGGCGGCGCGGCTATGAATCTGTCCCAGTTAAGTACACCGACG
ATTACCCCACTACTACCGAGTGGACTGCATTTGCTCCCGCCCTAACTACTCCGGTGCGCCCGCCT
TCGTTTATGATGCCAATCCAGTATTTACAATCTATTTCCAACCAACACCGGGCGA

Extremo C-terminal: nt1324-1569 de la cepa de referencia FAdV-8b ((764) KT862811)

CTGGAAAGCTATCTCCCGTCCTTACCGATAACTGGAGCCAAACCTACAACCCCGGCACCGTCACCC
TGTGTGTAAAAACGGTAAGGGTTCAATTGAGATCACAAGGAACCTTCAGCACTCTAGTCTGTTACAAT

TTCCGCTGTCAGAACACGGGCATTTTTAACAGCAACGCTACAGCGGGAACCATGACACTTGGACCTA
TCTTCTTTAGTTGTCCTGCCTTAAGCACCGCCAACGCTCCTTAA

Secuencia completa:

ATGGCGACCTCGACTCCTCACGCCTTCTCCTTTGGCCAAATCGGCTCCAGAAAACGCCCTGCGGGC
5 GGCGATGGCGAGCGAGACGCCTCCAAAGTGCCGAAAATGCAGACCCCCGCTCCGAGCGCGACCGC
CAACGGAAATGACGAGCTGGACCTGGTCTACCCCTTTTGGCTCCAAAACGGCTCCACCGGAGGAGG
CGGCGGCGGCGGTTCCGGTGGAACCCGTCCTCAACCCGCCGTTTTTGGACCCCAACG GACCCCT
GACCGTCCAAAACAACCTCCTGAAGGTCAATACCACGGCCCCCATCGCCGTACCAATAAGGCCCTG
ACACTCTCCTTTGACGCGGAGAGTCTCGAGCTACTAACCAACAGCAACTGGCGGTCAAAATCGACC
10 CCGAAGGACCTCTGAAAGCCACTACCGAGGGAATACAGCTGTGCGGTGACCCCTACGACGTTGGAGG
TTGATGACGTGCGACTGGGAGTTAACCGTGAACCTCGACCCCAACGGCCCCCTAGATTCTCAGCCAC
AGGAATCACGGTCAGAGTCGATGACACCTTGCTCATCGATGATGACGGTTCGGGTCAAGGCAAAGAA
CTGGGCGTACATCTTAACCCCGACGGACCCATTACGGCAGACCAAAACGGTCTCGACCTGGAAATC
GACAACCAGACTCTTAAAAATCACCCCGGCTCGGCGGGCGGTGTTCTTTCGGTACAGCTGAAACCG
15 CAGGGAGGTCTGAATTCCCAATCCGATGGTATCCAGGTGGTAACCCAGAACAGTATCGAAGTTGATA
ACGGCGCACTCGATGTTAAGGTAGTCGCTAACGGTCCACTGTCTACAACTCCCAACGGTCTTACCCT
AAACTACGATACCGGTGACTTCACCGTAAATGCCGGGACCTTAAGTATACTTCGGAACCCCTCTCTC
GTCGCCAATGCCTATCTTACGTCCGGGGCAAGAACTGCAACAGTTCACCGCTAAAGGGGAAAACCT
CTAGTCAGTTTTCTTTCCATGTGCTTATTATCTTCAACAGTGTTATCGGATGGACTCATTTTCAGTT
20 CCCTCTACCTAAAGTTAGATAGGACGCGCTTCACAGGGATGTCCAGCGATCCCTCCTATCAAAACGC
CAGATATTTACGTTCTGGGTAGGGGGCGGCGCGGCTATGAATCTGTCCCAGTTAAGTACACCGACG
ATTACCCCACTACTACCGAGTGGACTGCATTTGCTCCCGCCCTAACTACTCCGGTGCGCCCGCCT
TCGTTTATGATGCCAATCCAGTATTTACAATCTATTTCCAACCAAAACACCGGGCGACTGGAAAGCTAT
CTCCCGTCTTACCGATAACTGGAGCCAAACCTACAACCCCGGCACCGTCACCTGTGTGTAAAAA
25 CGGTAAGGGTTCAATTGAGATCACAAGGAACCTTCAGCACTCTAGTCTGTTACAATTTCCGCTGTCAG
AACACGGGCATTTTTAACAGCAACGCTACAGCGGGAACCATGACACTTGGACCTATCTTCTTTAGTTG
TCCTGCCTTAAGCACCGCCAACGCTCCTTAA

CrecFib-8b/8a:

Extremo N-terminal:

30 nt1-1323 de la cepa de referencia FAdV-8b (764) KT862811)
ATGGCGACCTCGACTCCTCACGCCTTCTCCTTTGGTCAAATCGGCTCCAGAAAACGCCCTGCGGGC
GGCGATGGCGAGCGAGACGCCTCCAAAGTGCCGAAAATGCAGACCCCCGCTCCGAGCGCGACCGC
CAACGGAAATGACGAGCTGGACCTGGTCTACCCCTTTTGGCTCCAAAACGGCTCTACCGGAGGAGG
AGGCGGCGGCGGTTCCGGTGGAACCCGTCCTCAACCCGCCGTTTTTGGACCCCAACG GACCCCT
35 GACCGTCCAAAACAACCTCCTGAAGGTCAATACCACGGCGCCCATCGCCGTACCAATAAGGCCCT
GACACTCGCCTATGAATCGGACAGTCTCGAGCTACTAACCAGCAGCAACTGGCGGTCAAAATCGAC
CCCGAAGGACCTCTGAAAGCCACTACCGAGGGAATACAGTTGTGCGTCCGCTACGACGTTGGAG
GTTGATGACGTGCGACTGGGAGTTGACGGTGAAACTCGACCCCGACGGCCCCCTGGATTCTCAGCC

ACAGGAATCACGGTCAGAGTCGATGAGACCTTGCTCATCGAGGATGATGGGTCCGGTCAGGGCAAA
 GAACTCGGAGTCAATCTCAACCCACCGGACCGATTACGGCCGATGACCAGGGTCTGGACTTAGAA
 ATAGACAACCAGACGCTCAAGGTCAACAGTGTTACCGGCGGGGGCGTCCTAGCTGTACAACTCAAAT
 CCCAAGGTGGTCTTACCGCACAGACTGACGGTATCCAAGTGAACACTCAGAACAGCATCACCGTTAC
 5 AAACGGAGCTCTGGACGTGAAAGTAGCCGCCAACGGACCTTTGGAGTCAACCGACACCGGGCTCAC
 ACTCAACTATGACCCCGGAGACTTCACAGTTAATGCGGGCACGTTGAGCATTATCAGGGATCCGGCT
 CTCGTGGCCAATGCGTACCTCACATCCGGCGCCTCCACCCTTCAGCAATTTACAGCTAAGAGTGAAA
 ATTCCAGTCAATTTTCTTTCCCATGCGCATACTATCTGCAACAGTGCGCTTTCCGATGGGTTGATTTTA
 GCTCCCTCTATCTGAAGCTCGACAGAGCACAGTTCACGAACATGCCAACGGGTGCAAATTATCAGAA
 10 CGCCAGGTACTTTACCTTCTGGGTTGGAGCGGGCACTTCATTTAATCTTTCTACCCTTACCGAACCCA
 CTATTACACCCAACACCACACAATGGAATGCATTGCCCCCTGCCCTTGATTACTCAGGTGCTCCTCCC
 TTCATCTACGACGCGTCTTCCGTAGTTACGATTTATTTGAACCCACCAGTGGTCTGA

Extremo C-terminal:

nt1324-1575 a partir de cepa de referencia FAdV-8a ((TR59) KT862810)

15 GTGGACACATACCTGCCGTTCTCACCGGCGACTGGAAAACCTTCTCCACTTACAATCCAGGAACAA
 TAACACTCGTCGTAAGGAACGCTACGATCCAGCTGCAATCACAGAGCACGTTACAAACAGTGTGTG
 TTACAACTTCCGATGTCAAAACTCTGGGATTTTCAACAACAACGCCACCTCGGGAACGCTCACCTAG
 GTCCGATCTTTTACAGTTGTCCGGCCCTAAGTACTGCGGACGTGTCATAA

Secuencia completa:

20 ATGGCGACCTCGACTCCTCACGCCTTCTCCTTTGGTCAAATCGGCTCCAGAAAACGCCCTGCGGGC
 GGCGATGGCGAGCGAGACGCCTCCAAAGTGCCGAAAATGCAGACCCCGCTCCGAGCGCGACCGC
 CAACGGAAATGACGAGCTGGACCTGGTCTACCCCTTTTGGCTCCAAAACGGCTCTACCGGAGGAGG
 AGGCGGCGGCGGTTCCGGTGGAACCCGTCCTCAACCCGCCGTTTTTGGACCCCAACGGACCCCT
 GACCGTCCAAAACAACCTCCTGAAGGTCAATACCACGGCGCCCATCGCCGTACCAATAAGGCCCT
 25 GACACTCGCCTATGAATCGGACAGTCTCGAGCTACTAACCAGCAGCAACTGGCGGTCAAAATCGAC
 CCCGAAGGACCTCTGAAAGCCACTACCGAGGGGAATACAGTTGTGGTTCGACCCTACGACGTTGGAG
 GTTGATGACGTCGACTGGGAGTTGACGGTGAAACTCGACCCCGACGGCCCCCTGGATTCCTCAGCC
 ACAGGAATCACGGTCAGAGTCGATGAGACCTTGCTCATCGAGGATGATGGGTCCGGTCAGGGCAAA
 GAACTCGGAGTCAATCTCAACCCACCGGACCGATTACGGCCGATGACCAGGGTCTGGACTTAGAA
 30 ATAGACAACCAGACGCTCAAGGTCAACAGTGTTACCGGCGGGGGCGTCCTAGCTGTACAACTCAAAT
 CCCAAGGTGGTCTTACCGCACAGACTGACGGTATCCAAGTGAACACTCAGAACAGCATCACCGTTAC
 AAACGGAGCTCTGGACGTGAAAGTAGCCGCCAACGGACCTTTGGAGTCAACCGACACCGGGCTCAC
 ACTCAACTATGACCCCGGAGACTTCACAGTTAATGCGGGCACGTTGAGCATTATCAGGGATCCGGCT
 CTCGTGGCCAATGCGTACCTCACATCCGGCGCCTCCACCCTTCAGCAATTTACAGCTAAGAGTGAAA
 35 ATTCCAGTCAATTTTCTTTCCCATGCGCATACTATCTGCAACAGTGCGCTTTCCGATGGGTTGATTTTA
 GCTCCCTCTATCTGAAGCTCGACAGAGCACAGTTCACGAACATGCCAACGGGTGCAAATTATCAGAA
 CGCCAGGTACTTTACCTTCTGGGTTGGAGCGGGCACTTCATTTAATCTTTCTACCCTTACCGAACCCA
 CTATTACACCCAACACCACACAATGGAATGCATTGCCCCCTGCCCTTGATTACTCAGGTGCTCCTCCC

TTCATCTACGACGCGTCTCCGTAGTTACGATTTATTTTGAACCCACCAGTGGTTCGAGTGGACACATA
 CCTGCCGGTTCTCACCGGCGACTGGAAACTTCTTCCACTTACAATCCAGGAACAATAACACTCGTC
 GTAAGGAACGCTACGATCCAGCTGCAATCACAGAGCACGTTTACAACCAGTGTGTGTTACAACCTTCC
 GATGTCAAACTCTGGGATTTTCAACAACAACGCCACCTCGGGAACGCTCACCTTAGGTCCGATCTT
 5 TTACAGTTGTCCGGCCCTAAGTACTGCGGACGTGTCATAA

Clonación y expresión de constructos crecFib

Con base en las cepas de referencia FAdV, seleccionadas como moldes de expresión, los
 segmentos de fibra distal N y C definidos anteriormente se amplificaron utilizando pares de cebadores que
 presentaban salientes con la secuencia flanqueadora del vector de expresión pFAST BAC digerido con
 10 Ehel/Stul (Invitrogen, Viena, Austria) y entre los dos segmentos mismos. La ligación en el vector pFAST
 BAC linealizado se realizó con la Gibson Assembly Master Mix (NEB, Ipswich, MA) de acuerdo con las
 instrucciones del fabricante. Se generaron dos constructos para cada combinación química, con orden
 de especificidad recíproco, designadas en consecuencia como crecFib-8a/8b y crecFib-8b/8a.

La inserción correcta de los segmentos en el vector se confirmó mediante secuenciación Sanger a
 15 través del sitio de clonación múltiple (LGC Genomics, Berlín, Alemania).

Las proteínas recombinantes se expresaron en células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* y se
 purificaron mediante la etiqueta de polihistidina en columnas de cromatografía de afinidad como se
 describió anteriormente (Schachner *et al*, 2014), y su concentración se determinó mediante ensayo de
 Bradford (Thermo Fisher Scientific, Viena, Austria).

20 Evaluación del espectro de inmunogenicidad y reactividad *in vitro* de crecFib

Los pollos sin patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés) (Valo BioMedia GmbH,
 Osterholz-Scharmbeck, Alemania), incubados y alojados en nuestras instalaciones, se inmunizaron por vía
 intramuscular (i.m.) con crecFib-8a/8b (n=5) o crecFib-8b/8a (n=5). Tres aves de cada grupo recibieron 50
 µg, dos aves 100 µg de proteína recombinante mezclada 1:1 con adyuvante GERBU P (GERBU Biotechnik
 25 GmbH, Heidelberg, Alemania). Los sueros posteriores a la inmunización se recolectaron en intervalos
 semanales para el monitoreo paralelo mediante ELISA y la prueba de neutralización de virus.

Se proporcionaron sueros inmunes adicionales para fines comparativos. En resumen, estos sueros
 se derivaron de pollos SPF inyectados con virus completo o inmunizados i.m. con fibra de FAdV
 mono específicas (es decir, fibras expresadas de forma recombinante basadas en la secuencia de un
 30 serotipo singular). El virus completo para la producción de antisuero se purificó en placa 3 veces y se
 caracterizó al menos por un análisis parcial de los genes de hexón y fibra, pero en la mayoría de los casos
 por secuenciación del genoma completo y prueba de neutralización cruzada, como se describió
 anteriormente (Schachner *et al.*, 2016). Siempre que estuvo disponible, nuestro entorno de prueba incluyó
 sueros contra FAdV inactivado y adyuvado (preparado con formaldehído al 1 %, administrado en una
 35 mezcla 1:1 con adyuvante GERBU) y virus vivos, con el fin de evaluar un reconocimiento posiblemente
 diferencial de antígeno desnaturalizado en la inmunotransferencia.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) basado en crecFib

Los sueros de aves inmunizadas con cada tipo de crecFib se probaron en placas ELISA recubiertas

con el correspondiente *crcFib*, siguiendo el protocolo descrito por Feichtner *et al.*, 2018.

Prueba (cruzada) de neutralización de virus (VN, por sus siglas en inglés)

Los anticuerpos neutralizantes (nAb, por sus siglas en inglés) en sueros se determinaron en un ensayo de microtitulación en células primarias de hígado de embrión de pollo (CEL, por sus siglas en inglés). Las diluciones de suero de 2 veces en serie (1:8 – 1:16,384) se incubaron con 100 TCID₅₀ de virus. Los antisueros *crcFib* se probaron contra las cepas de referencia FAdV-8a y -8b (molde de expresión) y dos aislados de campo de cada serotipo que sirvieron como cepas de la exposición en el estudio de protección. Con fines comparativos, se incluyeron sueros antifibrosos con especificidad de monotipo (suero Fib-8a y Fib-8b) en ciertos entornos. Además, cada placa de microtitulación incluyó pocillos control positivos (células + virus) y negativos (sólo células). Después de cinco días a 37 °C en CO₂ al 5 %, los pocillos se investigaron para determinar el efecto citopático (CPE, por sus siglas en inglés), con el título definido por la mayor dilución de suero que inhibe el CPE.

Tinción de inmunofluorescencia (IF, por sus siglas en inglés)

Después de una prueba de neutralización cruzada de virus contra las cepas de referencia FAdV-8a y -8b, como se describió anteriormente, las células se fijaron agregando metanol helado durante 5 min. Después de los pasos de lavado en serie y el bloqueo con albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) al 3 % durante 1 h, se agregó α -FAdV de conejo policlonal generado internamente (diluido 1:500 en amortiguador de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés)) a cada pocillo durante la noche. Después de la eliminación del antisuero de conejo y el lavado, las placas se incubaron con anti-IgG de conejo conjugado de burro con Alexa Fluor 488 diluido 1:200 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) en la oscuridad durante 1 h. Después de otro lavado, las células se tiñeron con solución de 4'6-diamidino-2-fenilindol 1:1000 ((DAPI, por sus siglas en inglés); Roche Diagnostics GmbH, Viena, Austria) durante 5 min, se sometieron a un lavado final y se cubrieron con PBS.

La internalización de partículas virales se examinó y documentó con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 M (Zeiss, Jena, Alemania), acoplado a una cámara FLEXACAM C1 y al Leica Application Suite X (LAS X) (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).

Western Blot

Los constructos de *crcFib* se examinaron lado a lado con las fibras mono específicas expresadas internamente relacionadas más cercanas (Fib-8a/cepa TR59, Fib-8b/cepa 764 y Fib-7/cepa YR36, los representantes de tipo de referencia de FAdV-E) utilizando sueros inmunes policlonales. Con el fin de minimizar las variaciones en la proporción de reactivos, la concentración de proteína recombinante cargada por carril se ajustó a 7.5 μ g, y se utilizaron sueros de detección con títulos ELISA similares ($2.5 \leq OD \leq 3.0$) contra fibra recombinante del tipo homólogo y, si corresponde, se utilizaron títulos de neutralización en el intervalo de log₂ 11-12. En resumen, las proteínas purificadas recombinantes se separaron mediante SDS-PAGE al 12 % y se transfirieron a una membrana de transferencia BioTrace PVDF (Pall, Viena, Austria) con el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, Viena, Austria). Después de bloquear con leche desnatada al 3 % (p/v), las membranas se incubaron por separado con sueros policlonales, se preabsorbieron con polvo de células Sf9 al 1 % y se diluyeron 1:2000. Como control para la presencia y el

tamaño de las fibras monoméricas, se incubó una membrana con anticuerpo anti-polihistidina (Sigma-Aldrich, Viena, Austria). Después de la incubación con conejo-anti-pollo-IgG-HRP secundario (Sigma-Aldrich, Viena, Austria) o cabra-anti-ratón-IgG (H + L)-HRP (Bio-Rad, Viena, Austria) para controles, y lavados intermedios, se desarrollaron transferencias con sustrato *Clarity Western ECL* (Bio-Rad, Viena, Austria). La visualización se realizó con el ChemiDoc Imager (Bio-Rad, Viena, Austria).

Estudios de protección con constructos crecFib

Se realizaron dos ensayos de la exposición a la vacunación para abordar secuencialmente si (i) los constructos de crecFib confieren protección *in vivo*, y (ii) la protección inducida por crecFib es susceptible de una amplia cobertura del complejo IBH. Una descripción general de ambos diseños experimentales se resume en la Figura 4.

Ensayo clínico 1: Eficacia protectora de crecFib-8a/8b y crecFib-8b/8a

En el primer estudio, dos grupos de pollos de engorde SPF (n=12) fueron vacunados con refuerzo de sensibilización con crecFib-8a/8b o crecFib-8b/8a de orden inverso, seguido de la exposición a FAdV-8b en cada caso. Los pollos de engorde SPF se obtuvieron del Servicio de Salud Animal (Deventer, Países Bajos) y se alojaron en unidades aisladoras separadas (HM2500, Montair, Países Bajos). La vacunación consistió en 50 µg del respectivo crecFib formulado en una fase adyuvante basada en aceite de antígeno al 40 % (p/v), administrada i.m., mientras que la exposición se llevó a cabo i.m. con 106.2 TCID₅₀ FAdV-8b (cepa 13-18153). Otros grupos sirvieron como control de la exposición, inyectados con una mezcla de PBS/adyuvante en lugar de vacunación, y testigo con resultado negativo, administrado solo PBS estéril de acuerdo con el mismo esquema. Se recolectó sangre semanalmente desde el refuerzo hasta la exposición, y a los 3, 5 y 7 días posteriores a la exposición (dpc). Se eutanasiaron cuatro aves por grupo y se sometieron a necropsia a 3 y 5 dpc, de forma análoga a las aves restantes a 7 dpc. Los puntos finales de protección incluyeron signos clínicos, evaluados diariamente en el período de tiempo posterior a la exposición, relaciones de peso corporal (BW) para hígado y bazo, contenido de aspartato transaminasa (AST) en plasma como se describió anteriormente (Matos *et al.*, 2016), así como cuantificación de carga viral en hígado y páncreas mediante un protocolo de qPCR adaptado de Günes *et al.*, 2012.

Ensayo clínico 2: Amplia eficacia protectora de crecFib-8b/8a aplicando diferentes pautas de vacunación

En este contexto, procedimos con solo una de las quimeras, crecFib-8b/8a, esta vez probando su eficacia protectora contra la exposición a ambos tipos virales de interés (FAdV-8a o FAdV-8b). Además, se comparó una pauta de vacunación de sensibilización-refuerzo con una pauta de inyección única, utilizando grupos de 20 pollos de engorde SPF. Cada vacunación contenía 50 µg de crecFib-8b/8a formulado en una fase adyuvante basada en aceite de antígeno al 40 % (p/v), administrada i.m. La exposición se llevó a cabo i.m. con 106.2 TCID₅₀ de FAdV-8a (cepa 11-16629) o FAdV-8b (cepa 13-18153), mientras que las aves control con resultado negativo nuevamente recibieron PBS en su lugar.

Se extrajo sangre semanalmente desde la segunda semana de vida hasta la exposición, luego en cada uno de los siguientes puntos de tiempo de muestreo: 3, 5, 7 y 14 dpc. Hasta cinco aves/grupo fueron sacrificadas y sometidas a necropsia a 3, 5, 7 y 14 dpc junto con individuos que murieron debido a la infección.

Los puntos finales de protección incluyeron relaciones órgano:BW para hígado, bazo y bolsa de Fabricio, el contenido de AST plasmática y la carga viral en hígado, páncreas, bazo y bolsa de Fabricio.

El análisis estadístico de los conjuntos de datos se llevó a cabo mediante la prueba de Shapiro-Wilk junto con una inspección visual de los histogramas y las gráficas Q-Q normales para verificar el supuesto de distribución normal. Los valores medios para las relaciones órgano-BW, la AST plasmática y la carga viral en los órganos blanco de los grupos vacunados se compararon con el control con resultado negativo y sus correspondientes grupos control de exposición mediante la prueba t de Student no pareada. Los conjuntos de datos que no cumplieron con los supuestos de normalidad se analizaron mediante comparaciones por pares con la prueba U de Mann-Whitney. En cada caso, los valores $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS Versión 26 (IBM SPSS Statistics; IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Resultados

Diseño *in silico* y expresión recombinante de constructos crecFib

El análisis de epítomos *in silico* de los botones de fibra TR59 y 746 sugirió sitios que, según el modelado de homología, se asignaron al bucle CD (G.SSD, N.PTG), al bucle F/FG de cadena β (V.DANP, I.DASS) y al bucle HI de la perilla (QSQ, RSQ). De acuerdo con los modelos tridimensionales creados sobre la base de las secuencias de los botones quiméricos, todos los epítomos predichos se localizaron externamente, así como apicalmente en la molécula (Figura 1 C). Además, los dos sitios en el bucle F/FG de cadena β y el bucle HI, aunque no contiguos en la secuencia primaria, estaban conformacionalmente en contacto, revelando un parche de superficie coherente formado por residuos codificados N y C distalmente de la unión quimérica.

Ambas proteínas quiméricas se recuperaron con éxito de la fracción soluble de células Sf9 infectadas, como se confirmó mediante bandas con el tamaño de monómero apropiado en *Western Blot*. Los rendimientos de fibra quiméricas purificadas fueron de aproximadamente 13,4 (crecFib-8a/8b) y 14,8 mg por litro de cultivo de células Sf9 (crecFib-8b/8a).

Espectro de inmunogenicidad y reactividad *in vitro* de crecFib

Inducción de anticuerpos crecFib detectada mediante ELISA

Con base en el antígeno homólogo ELISA, las aves inmunizadas con crecFib-8a/8b mostraron un aumento plano en la magnitud de la OD, con solo la aparición esporádica de OD>1 en un solo individuo en tres puntos de tiempo sucesivos de 5-7 semanas después de la vacunación (wpv). Todas las demás aves no superaron la OD 0.5 en ningún momento durante un período de monitoreo de 8 semanas (Figura 2). Por el contrario, las aves inmunizadas con el orden inverso crecFib-8b/8a desarrollaron un fuerte aumento en la OD en el antígeno ELISA homólogo tan pronto como 2 wpv, en el que 5/5 aves ya presentaban OD cercanas a 3 (OD media 3.00 ± 0.18), independientemente de la dosis de antígeno (50 respecto a 100 μ g). Los OD de crecFib-8b/8a se mantuvieron en un nivel constante en los cinco individuos hasta el final del período de monitoreo a 8 wpv, con OD semanales medias en el intervalo de 2.76 ± 0.29 a 3.39 ± 0.12 .

Actividad neutralizante de los antisueros crecFib

En los antisueros crecFib-8b/8a, la neutralización estuvo presente por primera vez a 2 wpv, y todas

las aves mostraron títulos de bajos a moderados ($\log_2 4-7$) contra al menos uno de los tipos constitutivos (Figura 2). De hecho, ya 4/5 individuos habían desarrollado nAb bilaterales contra ambos tipos en este momento. Los títulos neutralizantes de los antisueros crecFib-8b/8a aumentaron continuamente durante el período de monitoreo; a partir de 5 wpv en adelante, todas las aves tuvieron títulos $\geq \log_2 6$ contra el conjunto completo de cepas analizadas, alcanzando un ave el máximo del rango medido ($\log_2 14$) contra FAdV-8b. A nivel de aves individuales, las respuestas neutralizantes mostraron una distribución general equilibrada, con títulos similares contra ambos tipos, independientemente de si el virus correspondiente era un molde (referencia) o una cepa de campo.

La tinción inmunofluorescente de un entorno de neutralización de virus, que comparó directamente el antisuero crecFib-8b/8a lado a lado con sueros antifibra contra Fib-8a o Fib-8b en la misma placa de microtitulación, demostró que solo el suero quimérico podría inhibir eficientemente la infección de FAdV-8a (cepa TR59) y -8b (cepa 764) *in vitro*. Si bien los antisueros monoespecíficos Fib-8a y Fib-8b ejercieron actividad neutralizante contra sus serotipos afines a títulos similares en comparación con el antisuero crecFib, ninguno de ellos pudo inhibir el serotipo opuesto.

Reconocimiento de fibra en inmunoelectrotransferencia

Todas las fibras recombinantes investigadas, independientemente de su fondo genético y su composición monoespecífica o quimérica, fueron detectadas por sueros inmunes que representan el espectro completo de tipos de FAdV, definidos por la especificidad de la fibra (Figura 3).

El reconocimiento mutuo fue incluso posible entre compañeros de reacción con expresión diferencial de fibra (fibra-1, fibra-2 de FAdV-A y FAdV-C respecto a fibra singular de las especies de FAdV restantes), y entre contrapartes quiméricas con orden de molde inverso (por ejemplo, el antisuero crecFib-8b/8a fue capaz de reconocer el crecFib-8a/8b).

Cabe destacar que no se observaron diferencias entre los antisueros producidos contra FAdV vivo (nativo) y las preparaciones de virus inactivados, formulados con adyuvante, así como los sueros dirigidos a subunidades, en su capacidad para reconocer el monómero de fibra en *Western Blot*.

Ensayos clínicos

Ensayo clínico 1: Eficacia protectora de crecFib-8a/8b y crecFib-8b/8a

En la Figura 4 se proporciona una descripción general de los diseños experimentales *in vivo*. Un grupo designado $VV^{8a/8b}C^{8b}$, de acuerdo con los tratamientos realizados, se vacunó dos veces con crecFib-8a/8b a los 3 y 21 días de vida, seguido de la exposición a FAdV-8b a los 36 días de vida (=15 días después del refuerzo, dpb). Un segundo grupo designado $VV^{8b/8a}C^{8b}$ se vacunó en los mismos puntos de tiempo con el orden inverso crecFib-8b/8a, y luego también se expuso a FAdV-8b. El control de la exposición, vacunado de forma simulada con una mezcla de PBS/adyuvante antes de la exposición a FAdV-8b, se designa como C^{8b} , y el control con resultado negativo, administrado solo PBS estéril en cada ocasión, como N.

El inicio del desarrollo de anticuerpos inducido por la vacuna no se detectó por ELISA hasta después del refuerzo (7 dpb=28 días de vida), aunque solo a un nivel bajo que indica un aumento inicial en aves de $VV^{8a/8b}$ (OD media 0.51 ± 0.65), mientras que ya se alcanzaron niveles máximos detectables en $VV^{8b/8a}$ (3.14 ± 0.73) (Figura 5). En comparación, las aves de N y C^{8b} (antes de la exposición) nunca

excedieron la OD 0.07 ± 0.01 . Inmediatamente antes de la exposición (14 dpb), VV^{8a/8b} alcanzó DO moderadas (1.45 ± 0.95), pero ninguno de los sueros exhibió actividad neutralizante (títulos de SN $\leq \log_2 8$). En VV^{8b/8a}, los niveles de OD se mantuvieron bastante constantes (2.60 ± 0.85) y, con excepción de un solo ave, todos los sueros exhibieron actividad neutralizante, que van desde títulos bajos contra al menos uno de los serotipos probados (en 3 aves) hasta títulos en el extremo más alto del rango medido ($\log_2 14$) contra ambos serotipos (virus de referencia y de exposición FAdV-8a y -8b) en las aves restantes. Como tendencia general, se observaron títulos más altos (y un inicio más temprano, basado en aquellos sueros con solo neutralización unilateral) contra FAdV-8a; además, los nAb contra FAdV-8b nunca divergieron en más de 3 niveles de título entre la cepa de referencia y de exposición, mientras que los nAb contra FAdV-8a divergieron hasta 5 niveles de título con una reactividad más pronunciada contra la exposición, en comparación con la cepa de referencia.

Después de la exposición, se registró una depresión leve (inapetencia, apiñamiento, plumaje erizado) en dos aves de C^{8b} a 4-5 dpc. Durante la necropsia en este punto de tiempo, los mismos individuos habían aumentado significativamente las proporciones de hígado:BW. También se registró un aumento de las relaciones hígado:BW en VV^{8a/8b}C^{8b} y VV^{8b/8a}C^{8b}, pero ocurrió con retraso a 7 dpc (Figura 6). El grupo C^{8b} experimentó adicionalmente un aumento significativo del bazo:BW (7 dpc), que estuvo ausente en VV^{8b/8a}C^{8b}, mientras que moderado, pero no significativo, en VV^{8a/8b}C^{8b}.

La AST plasmática más alta se registró en C^{8b} a 3 y 5 dpc, siendo significativa a 5 dpc, mientras que VV^{8a/8b}C^{8b} y VV^{8b/8a}C^{8b} permanecieron comparables a N (Figura 6). A 7 dpc, los valores de AST plasmática ya no eran distinguibles entre los grupos.

Se observó una reducción de la carga viral hepática respecto a C^{8b} tanto en VV^{8a/8b}C^{8b} como en VV^{8b/8a}C^{8b} en todos los puntos de tiempo investigados, con valores y significancia consistentemente más bajos a 5 dpc en VV^{8b/8a}C^{8b} (Figura 6). En el páncreas, el ADN viral estaba completamente ausente en VV^{8b/8a}C^{8b} a 3 dpc y se redujo significativamente a 5 y 7 dpc. En VV^{8a/8b}C^{8b} la carga viral pancreática se redujo significativamente a 5 dpc.

Ensayo clínico 2: Amplia eficacia protectora de crecFib-8b/8a aplicando diferentes pautas de vacunación

Se administró una pauta de vacunación de sensibilización-refuerzo al día de edad y 7 dpv a dos grupos, uno de los cuales fue desafiado a los 22 días de edad con FAdV-8a (designado VV^{8b/8a}C^{8a}), el otro con FAdV-8b (VV^{8b/8a}C^{8b}). Además, esto se comparó con una pauta de vacunación única a la edad de un día (grupos V^{8b/8a}C^{8a}, V^{8b/8a}C^{8b}). Se incluyeron grupos control de la exposición vacunados de forma simulada para cada tipo de la exposición (C^{8a}, C^{8b}) y un grupo control con resultado negativo (N) que recibió PBS de forma análoga al régimen de sensibilización-refuerzo.

A los 21 días de vida, inmediatamente antes de la exposición, las aves de cada régimen de vacunación habían desarrollado niveles de anticuerpos detectables por ELISA. Sin embargo, el grupo de sensibilización-refuerzo (VV^{8b/8a}) tuvo OD más altas con solo 1/40 individuos con OD < 3 (OD media 3.3 ± 0.1), mientras que la pauta de vacuna única (V^{8b/8a}) tuvo títulos generales más bajos y distribuidos de manera más desigual (2.65 ± 0.79) (Figura 7). Después de la exposición e independientemente del tipo de virus de la exposición, las OD entre V^{8b/8a} y VV^{8b/8a} ya no eran distinguibles, ya que alcanzaron (y luego

permanecieron en) el criterio de valoración cuantificable más alto. Por el contrario, las aves control de la exposición no vacunadas mostraron una inclinación constante de los títulos a 2.15 ± 1.02 hasta 14 dpc (C^{8a}), o un aumento abrupto a 2.02 ± 0.95 a 7 dpc permaneciendo estables al respecto (C^{8b}).

En 36/40 aves $VV^{8b/8a}$, los Abs de preexposición tuvieron actividad neutralizante contra FAdV-8a y -8b, mientras que las cuatro aves restantes mostraron solo actividad neutralizante unilateral contra uno de los serotipos. En comparación, las aves $V^{8b/8a}$ vacunadas individualmente mostraron una presencia más infrecuente de nAb previos a la exposición, con 11/40 aves con nAb unilaterales y siete aves con ausencia completa de nAb. Además, los niveles de titulación fueron más bajos en $V^{8b/8a}$ en comparación con $VV^{8b/8a}$, aunque las pautas posológicas fueron similares en la obtención de una neutralización más fuerte contra FAdV-8a ($\log_2 3.28 \pm 3.22$ en $V^{8b/8a}$ con respecto a $\log_2 5.58 \pm 2.00$ en $VV^{8b/8a}$ contra FAdV-8a, $\log_2 2.88 \pm 2.44$ en $V^{8b/8a}$ con respecto a $\log_2 4.30 \pm 3.13$ en $VV^{8b/8a}$ contra FAdV-8b).

La exposición con FAdV-8a dio como resultado un aumento relativamente abrupto de nAb en aves sin tratamiento previo (C^{8a}), alcanzando niveles más altos en comparación con cualquiera de los grupos vacunados a los 7 dpi. En $VV^{8b/8a}C^{8a}$ se encontraron títulos generales más altos contra FAdV-8b que FAdV-8a, mientras que la tendencia inversa se observó en $V^{8b/8a}C^{8a}$; por 14 dpc las aves de los tres grupos alcanzaron títulos medios comparables contra FAdV-8a. La exposición a FAdV-8b indujo títulos medios similares en aves sin tratamiento previo (C^{8b}) que la exposición a FAdV-8a a 7 dpc ($\log_2 10.70 \pm 1.34$), pero no excedió significativamente los títulos medios de aves vacunadas ($V^{8b/8a}C^{8b}$, $VV^{8b/8a}C^{8b}$). Aunque $V^{8b/8a}C^{8b}$ y $VV^{8b/8a}C^{8b}$ continuaron desarrollando nAbs contra FAdV-8a, los títulos medios contra FAdV-8b fueron siempre más altos.

Como punto de referencia para el efecto clínico después de la exposición, se registró una depresión leve en una (C^{8a}) y cuatro aves (C^{8b}) entre 2-5 dpc, y un ave muerta adicional a 4 dpc en C^{8b} . Entre todas las aves de los grupos vacunados, solo se produjo un caso de depresión transitoria a 2-3 dpc, menos inesperadamente en un individuo de $V^{8b/8a}C^{8b}$ que carecía de nAbs previos a la exposición.

Las relaciones medias de hígado y bazo:BW fueron las más afectadas a 3 y 5 dpc con un aumento significativo en ambos controles de la exposición (Figura 8). A pesar de estabilizarse, este efecto persistió para el bazo a 7 dpc en C^{8a} , y para el hígado a 14 dpc tanto en C^{8a} como en C^{8b} . Por el contrario, las relaciones hígado y bazo:BW de los grupos vacunados/expuestos permanecieron comparables al control con resultado negativo (N) durante todo el experimento, excepto por el hígado de $V^{8b/8a}C^{8b}$ en un punto temporal (14 dpc). Las proporciones de *Bursa*:BW fueron las más afectadas a 5 dpc, con una reducción significativa respecto a N en todos los grupos, excepto para $V^{8b/8a}C^{8b}$ en el que la misma tendencia se cambió a 14 dpc.

Además, C^{8a} y C^{8b} tuvieron los niveles plasmáticos de AST más altos de todos los grupos de 3-7 dpc; se encontraron diferencias significativas con dos de los grupos vacunados ($VV^{8b/8a}C^{8b}$ y $V^{8b/8a}C^{8a}$). Además, los grupos vacunados mostraron cargas virales consistentemente más bajas en los órganos blanco en comparación con sus controles de la exposición, mientras que la vacunación incluso previno la infección detectable en varios puntos temporales. Con pocas excepciones, las muestras de hígado, páncreas y bazo de C^{8a} y C^{8b} fueron positivas en todos los puntos temporales (solo un hígado a 7 dpc, y

páncreas y bazo de otro pájaro a 14 dpc en C^{8a} fueron negativos; así como dos hígados a 14 dpc en C^{8b}); en contraste, el ADN viral se detectó solo en el hígado de un pájaro a 5 dpc, y en el hígado y páncreas de otro pájaro a 14 dpc en VV^{8b/8a}C^{8a}, con cargas virales significativamente reducidas de 3-7 dpc. Se lograron resultados similares en V^{8b/8a}C^{8a} entre 3-5 dpc, con solo el páncreas y el bazo de un ave positivos en el punto de tiempo más temprano (3 dpc). En VV^{8b/8a}C^{8b}, las cargas virales medias se redujeron significativamente a 5-7 dpc en el hígado y en todos los puntos temporales en el páncreas y el bazo; de hecho, todos los órganos blanco permanecieron incluso completamente negativos a 5 y 14 dpc. En V^{8b/8a}C^{8b}, se produjo una reducción significativa de la carga viral en el bazo a 3-5 dpc, y en el hígado y el páncreas a 5 dpc. La bolsa de Fabricio fue el órgano con la carga viral media más baja, aunque todavía se encontraron positivos en todas menos dos muestras en C^{8a}, y en 4, 3 y 1 muestra(s) en C^{8b} de 3-7 dpc. De todos los vacunados, solo tres individuos, que no tenían nAb previos a la exposición y que estaban expuestos a FAdV-8b, dieron resultados positivos a 3 dpc. A 14 dpc, el ADN viral generalmente ya no era detectable en la *bursa*.

Ejemplo 2: La vacunación con una proteína de fibra quimérica FAdV protege simultáneamente a los pollos contra HHS e IBH

En las últimas décadas, las enfermedades relacionadas con FAdV se han convertido en una preocupación creciente para la industria avícola en todo el mundo. Se han investigado experimentalmente varias estrategias de inmunización contra FAdV, con un enfoque particular en las vacunas de subunidades contra HHS, causadas por FAdV serotipo 4, e IBH, causadas por los serotipos 2, 8a, 8b y 11. En este estudio, ampliamos el concepto innovador de proteínas de fibra quiméricas recombinantes para diseñar una nueva quimera que retiene epítomos de serotipos pertenecientes tanto a FAdV-4 como a -11, e investigamos su eficiencia para proteger simultáneamente a los pollos contra HHS e IBH. Los pollos libres de patógenos específicos se vacunaron con la nueva fibra quimérica y posteriormente se expusieron a una cepa causante de HHS o IBH. El desarrollo de anticuerpos neutralizantes fue limitado contra FAdV-11 y ausente contra FAdV-4. Sin embargo, inesperadamente, las aves vacunadas mostraron una reducción de los signos clínicos, hepatomegalia limitada y niveles más bajos de AST en comparación con los controles respectivos de la exposición tras la exposición viral. Además, la vacuna previno la atrofia de los órganos linfoides afectados por HHS, como el timo y la bolsa de Fabricio, y la carga viral en los órganos blanco se redujo significativamente. La protección clínica se asoció con un alto nivel de anticuerpos medidos en placas ELISA previos a la exposición recubiertas con el antígeno de vacunación. En conclusión, demostramos que el concepto de vacunas de fibra quimérica puede extenderse más allá de los límites de las especies virales. Nuestra vacuna representa la primera vacuna de subunidades FAdV capaz de lograr una protección integral contra diferentes enfermedades asociadas a FAdV.

Materiales y métodos

Diseño y expresión de fibra quimérica

En este estudio se diseñó una proteína de fibra quimérica que retiene epítomos de FAdV-4 (fib-2) y FAdV-11. En resumen, el marco de lectura abierto de fibra (ORF, por sus siglas en inglés) se dividió en un segmento amino (N) y un segmento carboxilo (C)-distal, se amplificó por separado de diferentes cepas de

molde y se fusionó sin problemas mediante clonación de unidad de Gibson para reconstituir una nueva fibra de cadena completa. Al representar un cruce entre secuencias heterólogas de serotipos discretos, la unión de los segmentos N y C distales se denomina en lo sucesivo cambio de especificidad. El interruptor se diseñó en un motivo de consenso intertipo correspondiente a las posiciones aa441-442 o aa491-492 en las alineaciones de secuencia por pares de fibra FAdV-4-2 y fibra FAdV-11, que se asignan a la cadena G propuesta dentro del dominio del cabezal de fibra ("perilla"). Al acomodar supuestos epítomos de células B en ambos lados, esta estrategia permitió la incorporación de regiones epitópicas de ambos serotipos constitutivos en el producto quimérico final. Además, la modificación interna de la perilla también podría conciliarse con el mantenimiento de la integridad de la secuencia en el presunto límite de la perilla del eje que tiene una función informada en la trimerización de la fibra (Hong & Engler, 1996). Los epítomos candidatos se infirieron a partir de un epítomo informado anteriormente en la fibra-2 de FAdV-4 (Wang *et al.*, 2018) y la predicción *in silico* con el software DiscoTope 2.0 (Vindahl Kringelum *et al.*, 2012) utilizando la fibra relacionada más cercana para la que actualmente se dispone de un modelo molecular, la fibra-2 de la cepa de referencia FAdV-1 CELO (El Bakkouri *et al.*, 2008). Posteriormente, se determinaron las homologías posicionales entre diferentes miembros de tipo en función de múltiples alineaciones de secuencias creadas con el software MegAlign (DNASTAR, Madison, WI, EUA). También se utilizó el mapeo de homología para asignar dominios estructurales (cola, eje, perilla) de la fibra FAdV en función de la información existente (Hess *et al.*, 1995). Con base en las cepas de referencia FAdV seleccionadas como moldes de expresión, los segmentos de fibra distal N y C, como se definió anteriormente, se amplificaron utilizando pares de cebadores que presentaban salientes con la secuencia flanqueadora del vector de expresión pFAST BAC digerido con *EheI/StuI* (Invitrogen, Viena, Austria) y entre los dos segmentos mismos. En la Tabla 1 se proporciona información detallada sobre la estrategia de clonación. La ligación en el vector pFAST BAC linealizado se realizó con la Gibson Assembly Master Mix (NEB, Ipswich, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el constructo resultante se denominó *crecFib -4/11*.

Tabla 1. Proteína de fibra quimérica de FAdV utilizada en este estudio. Los salientes en los extremos 5' de las secuencias de cebadores con la secuencia flanqueadora del vector (cebadores FP1 y RP2) o con la secuencia de molde homóloga (cebadores RP1 y FP2) están representados por nucleótidos subrayados.

5	Designación del constructo quimérico	Fragmento (posición en la secuencia de molde)	Cepa de molde (número de acceso de GenBank)	Secuencias de cebadores	Vector de expresión (sitios de restricción utilizados para la clonación)
10	crecFib-4/11	I (nt1-1221 ^a)	KR5, FAdV-4 cepa DE referencia (HE608152)	FP1-KR5: 5' - <u>AAA CCT GTA TTT TCA</u> <u>GGG CAT GCT CCG AGC CCC TA</u> -3' RP1-KR5: 5' - <u>AAG TTT GCA CGG</u> <u>ATC CGC TGG ATG GTT GAT AGT</u> AT-3'	<u>pFAST BAC</u> <u>HTb</u> (<i>EheI/StuI</i>)
15		II (nt1468-1713)	13/14796, FAdV-11 Cepa de campo	FP2-13/14796: 5' - <u>TCC AGC GGG TCC</u> GTG CAA ACT TTC CAA CCC GTA TT-3' RP2-13/14796: 5' - <u>GTG AGC TCG</u> <u>TCG ACG TAG GTT AGG GTT GTG</u> TTA AT	

^aposición se refiere al gen de fibra-2

20 La inserción correcta de los segmentos en el vector se confirmó mediante secuenciación Sanger a través del sitio de clonación múltiple (LGC Genomics, Berlín, Alemania).

La proteína recombinante se expresó en células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* y se purificó mediante la etiqueta de polihistidina en columnas de cromatografía de afinidad como se describió anteriormente (Schachner *et al.*, 2014), y su concentración se determinó mediante ensayo de Bradford

25 Secuencias del constructo crecFib

crecFib-4/11 (para FAdV-4, se utilizó fibra-2)

Extremo N-terminal:

nt1-1221 de la cepa de referencia FAdV-4 (KR5) (HE608152)

30 ATGCTCCGAGCCCCTAAAAGAAGACATTCCGAAAACGGGCAGCCCGAGTCCGAAGCGGGACCTTCC
CCGGCTCCAATCAAGCGCGCGAAACGCATGGTGAGAGCATCCCAGCTTGACCTGGTTTATCCTTTTCG
ATTACGTGGCCGACCCCGTCGGAGGGCTCAACCCGCCTTTTTTGGGCGGCTCCGGACCCCTAGTGG
ACCAGGGCGGTGACGCTTACGCTCAACGTCACCGATCCCATCATCATCAAGAACAGATCGGTGGACTT
GGCCACGATCCCAGTCTCGATGTCAACGCCCAAGGTCAACTGGCGGTGGCCGTTGACCCCGAAGG
35 GGCCCTGGACATCACCCCGATGGACTGGACGTCAAGGTGACGGAGTAACCGTGATGGTCAACGA
TGACTGGGAAGTGGCCGTAAAAGTCGACCCGTCCGGCGGATTGGATTCCACTGCGGGCGGACTGG
GGGTCAGCGTGGACGACACCTTGCTCGTGGATCAGGGAGAACTGGGCGTACACCTCAACCAACAAG
GACCCATCACTGCCGATAGCAGTGGTATCGACCTCGAGATCAATCCTAACATGTTACGGTCAACAC

CTCGACCGGAAGCGGAGTGCTGGAACCTAACCTAAAAGCGCAGGGAGGCATCCAAGCCGGCAGTTC
 GGGAGTGGGCGTTTCCGTGGATGAAAGCCTAGAGATTGTCAACAACACGCTGGAAGTGAAACCGGA
 TCCCAGCGGACCGCTTACGGTCTCCGCCAATGGCCTAGGGCTGAAGTACGACAGCAATACCCTGGC
 GGTGACCGCGGGCGCTTTGACCGTAGTAGGAGGGGGAAGCGTCTCCACACCCATCGCTACTTTTGT
 5 CTCGGGAAGTCCCAGCCTCAACACCTACAATGCCACGATCGTCAATTCCAGCTCGCACCCCTTCTCT
 TGTGCCTACTACCTTCAACAGTGGAACGTACAAGGGCTCCTTTTACCTCCCTCTACGTGAAACTGGA
 CAGCACCACCATGGGGACTCGCCCTGGGGACAACAGCTCCGCCAATGCCAAATGGTTCACCTTTTG
 GGTGTCCGCCTATCTCCAGCAATGCAACCCCTCCGGGATTCAAGCGGGAACGGTCAGCCCCTCCAC
 CGCCGCCCTCGCGGACTTTGAACCCATGGCCAATAGGAGCGTGTCCAGCCCATGGACGTACTCGGC
 10 CAATGCATACTATCAACCATCCAGCGGA

Extremo C-terminal:

nt1468-1713 de la cepa de campo FAdV-11 (cepa 13/14796)

TCCGTGCAAACCTTCCAACCCGTATTGACAGGAGATTGGGATACCAACACCTACAACCCAGGAACCG
 TTCAAGTCTGCATACTGCCTCAAACCGTTGTGGGAGGCCAGTCGACCTTTGTTAACATGACATGTTAT
 15 AACTTCCGGTGTCAAAATCCTGGAATATTCAAGGTTGCTGCTAGTAGCGGCACATTCACTATCGGACC
 CATTTTCTACTCCTGTCCAACCAACAAATTAACACAACCCTAA

Secuencia completa:

ATGCTCCGAGCCCCTAAAAGAAGACATTCCGAAAACGGGCAGCCCGAGTCCGAAGCGGGACCTTCC
 CCGGCTCCAATCAAGCGCGCGAAACGCATGGTGAGAGCATCCAGCTTGACCTGGTTTATCCTTTTCG
 20 ATTACGTGGCCGACCCCGTCGGAGGGCTCAACCCGCCTTTTTTGGGCGGCTCCGGACCCCTAGTGG
 ACCAGGGCGGTGAGCTTACGCTCAACGTCACCGATCCCATCATCATCAAGAACAGATCGGTGGACTT
 GGCCACGATCCAGTCTCGATGTCAACGCCCAAGGTCAACTGGCGGTGGCCGTTGACCCCGAAGG
 GGCCCTGGACATCACCCCGATGGACTGGACGTCAAGGTCGACGGAGTAACCGTGATGGTCAACGA
 TGA CTGGGA ACTGGCCGTAAAAGTCGACCCGTCCGGCGGATTGGATTCCACTGCGGGCGGACTGG
 25 GGGTCAGCGTGGACGACACCTTGCTCGTGGATCAGGGAGAACTGGGCGTACACCTCAACCAACAAG
 GACCCATCACTGCCGATAGCAGTGGTATCGACCTCGAGATCAATCCTAACATGTTACGGTCAACAC
 CTCGACCGGAAGCGGAGTGCTGGAACCTAACCTAAAAGCGCAGGGAGGCATCCAAGCCGGCAGTTC
 GGGAGTGGGCGTTTCCGTGGATGAAAGCCTAGAGATTGTCAACAACACGCTGGAAGTGAAACCGGA
 TCCCAGCGGACCGCTTACGGTCTCCGCCAATGGCCTAGGGCTGAAGTACGACAGCAATACCCTGGC
 30 GGTGACCGCGGGCGCTTTGACCGTAGTAGGAGGGGGAAGCGTCTCCACACCCATCGCTACTTTTGT
 CTCGGGAAGTCCCAGCCTCAACACCTACAATGCCACGATCGTCAATTCCAGCTCGCACCCCTTCTCT
 TGTGCCTACTACCTTCAACAGTGGAACGTACAAGGGCTCCTTTTACCTCCCTCTACGTGAAACTGGA
 CAGCACCACCATGGGGACTCGCCCTGGGGACAACAGCTCCGCCAATGCCAAATGGTTCACCTTTTG
 GGTGTCCGCCTATCTCCAGCAATGCAACCCCTCCGGGATTCAAGCGGGAACGGTCAGCCCCTCCAC
 35 CGCCGCCCTCGCGGACTTTGAACCCATGGCCAATAGGAGCGTGTCCAGCCCATGGACGTACTCGGC
 CAATGCATACTATCAACCATCCAGCGGATCCGTGCAAACCTTCCAACCCGTATTGACAGGAGATTGG
 GATACCAACACCTACAACCCAGGAACCGTTCAAGTCTGCATACTGCCTCAAACCGTTGTGGGAGGCC
 AGTCGACCTTTGTTAACATGACATGTTATAACTTCCGGTGTCAAAATCCTGGAATATTCAAGGTTGCTG

CTAGTAGCGGCACATTCACTATCGGACCCATTTTCTACTCCTGTCCAACCAACAAATTAACACAACCC
TAA

Preparación del virus

Los aislamientos de campo AG234 y 08-18926 (núm. de acceso de GenBank MK572849 y MK572871) se analizaron a través de la prueba de secuenciación y neutralización de virus (VNT) de próxima generación y, por lo tanto, se identificaron como miembros de los tipos FAdV-4 y -11, respectivamente (Schachner *et al.*, 2019), para usarse como cepas de exposición durante los estudios de protección. Las cepas se purificaron en placa 3 veces y se propagaron en células primarias de hígado de embrión de pollo (CEL) (Schat y Sellers, 2008); los títulos virales se determinaron mediante titulación de punto final (Reed y Muench, 1938).

Ensayo clínico

Se incubaron ciento veinte polluelos SPF, se etiquetaron individualmente y se dividieron en seis grupos (n = 20) bajo la siguiente designación: sólo vacuna, vacuna respecto a FAdV-4, vacuna respecto a FAdV-11, control de la exposición a FAdV-4, control de la exposición a FAdV-11 y control con resultado negativo (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño del experimento con animales.

Grupo	Designación	vacunación	Cepa de exposición
I	solo vacuna	crecFib-4/11	- ^a
II	vacuna frente al FAdV-4	crecFib-4/11	AG234 (FAdV-4)
III	vacuna frente al FAdV-11	crecFib-4/11	08-18926 (FAdV-11)
IV	Control de exposición FAdV-4	solo adyuvante	AG234 (FAdV-4)
V	Control de exposición FAdV-11	solo adyuvante	08-18926 (FAdV-11)
VI	control negativo	-	-

^ano aplicable

Cada grupo se alojó por separado en unidades aisladoras (HM2500, Montair, Países Bajos). La vacunación consistió en una inyección de 0.5 mL en el *Musculus tibialis lateralis* que contenía 50 µg de crecFib-4/11 homogeneizado en un adyuvante a base de aceite y se llevó a cabo en aves de un día de edad de los grupos de vacunación, mientras que a las aves de los controles de la exposición se les inyectó solución salina amortiguada con fosfato (PBS) mezclada con adyuvante, y a las aves control con resultado negativo se les administró PBS estéril solamente. Se administró una inyección de refuerzo de la misma manera a los 7 días de vida (6 dpv) en los tres grupos vacunados, y las aves de la exposición y los controles con resultado negativo recibieron una inyección de adyuvante mezclado con PBS y PBS solo, respectivamente, como se describió anteriormente. Se extrajo sangre en intervalos semanales desde la segunda semana de vida hasta la exposición, luego en cada uno de los siguientes puntos de tiempo de muestreo: 3, 5, 7 y 14 dpc. Las aves se expusieron a los 22 días de vida (15 dpb) usando la cepa AG234 de FAdV-4 (vacuna de grupos respecto a FAdV-4, control de la exposición a FAdV-4) y la cepa 08-18926

de FAdV-11 (vacuna de grupos respecto a FAdV-11, control de la exposición a FAdV-11). En el período de tiempo posterior a la exposición, las aves se monitorearon diariamente para detectar signos clínicos. Se eutanasiaron hasta cinco aves por grupo y se sometieron a necropsia a 3, 5, 7 y 14 dpc, y los individuos que fueron sacrificados debido a una afección clínica grave fueron sometidos a necropsia y se les obtuvo muestras inmediatamente.

Química clínica

Inmediatamente antes de la eutanasia, se recogió sangre de la vena yugular de cada ave de los grupos infectados y el control con resultado negativo en tubos de heparina (VACUETTE®, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) para investigar el contenido de aspartato transaminasa (AST) en plasma como se describió anteriormente (Matos *et al.*, 2016).

Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR) de tejidos de órganos blanco

Se recogieron muestras de tejido para la cuantificación de la carga viral, incluyendo hígado, bazo y bolsa de Fabricio, de aves de los grupos infectados y control con resultado negativo, y se almacenaron a -20 °C hasta el procesamiento. La extracción de ADN se realizó con DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante, y el ADN se analizó posteriormente con un ensayo de qPCR adaptado basado en el gen 52K (Günes *et al.*, 2012).

Ensayo inmunoabsorbente ligado A enzimas de fibra quimérica (ELISA) y prueba de neutralización del virus (VNT)

Los sueros recogidos durante los experimentos se probaron en placas ELISA recubiertas con crecFib-4/11 siguiendo el protocolo descrito por Feichtner *et al.* (2018); el valor de OD de corte se calculó a partir de los sueros de las aves control con resultado negativo calculando la media aritmética más tres veces la desviación estándar. Las muestras de aves de 21, 27 y 29 días de edad (respectivamente: pre-exposición, 5 dpc y 7 dpc) también se investigaron para detectar anticuerpos neutralizantes (nAb) como se describió anteriormente (Schachner *et al.*, 2014), con VNT contra las cepas que sirvieron como molde para la expresión de fibra (cepas de vacuna) y los aislados de campo utilizados como cepas de la exposición durante los estudios de protección (cepas de la exposición).

Análisis estadísticos

Se llevó a cabo un análisis preliminar de los conjuntos de datos utilizando la prueba de Shapiro-Wilk junto con una inspección visual de los histogramas y las gráficas Q-Q normales para verificar el supuesto de distribución normal. Los valores medios de las relaciones órgano:BW, la AST plasmática y la carga viral en los órganos blanco de los grupos vacunados se compararon con el control con resultado negativo y su respectivo grupo control de la exposición a través de la prueba *t* de Student no emparejada. Se utilizó la prueba *U* de Mann-Whitney para los conjuntos de datos que no cumplían con los supuestos de normalidad. En cada caso, los valores $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete de software SPSS Versión 26 (IBM SPSS Statistics; IBM Corp., Armonk, Nueva York, EUA).

Resultados

Ensayo clínico

En el control de la exposición a FAdV-4, los signos clínicos comenzaron a 2 dpc con depresión leve en dos aves, y progresaron en todo el grupo con 13 aves afectadas a 3 dpc, tres de las cuales mostraban depresión grave; a 4 dpc había nueve aves afectadas, y dos de ellas tuvieron que ser sacrificadas debido a su incapacidad para moverse y alimentarse; a 5 dpc, tres aves seguían mostrando signos clínicos más leves (Tabla 3). En el control de la exposición a FAdV-11, solo un ave se vio afectada con depresión leve a 4 dpc. Entre los grupos vacunados, sólo un individuo desafiado con FAdV-4 mostró signos de depresión a 3 dpc. No se registraron signos clínicos en los grupos de sólo vacuna y control con resultado negativo a lo largo de todo el experimento. Los parámetros registrados para las aves sacrificadas a 4 dpc se incluyeron en los grupos de 5 dpc para análisis estadísticos.

Tabla 3. Signos clínicos diarios para cada grupo experimental en el periodo de tiempo posterior a la exposición. La cantidad de personas afectadas se indica entre paréntesis. No se registraron signos clínicos antes del 2 dpc y después del 5 dpc.

Grupo	Designación	Puntuaciones clínicas			
		2 dpc	3 dpc	4 dpc	5 dpc
I	solo vacuna	- ^a	-	-	-
II	vacuna frente al FAdV-4	-	depresión (n = 1)	-	-
III	vacuna frente al FAdV-11	-	-	-	-
IV	Control de exposición FAdV-4	depresión leve (n = 2)	depresión leve (n = 9)	depresión leve (n = 5)	depresión leve (n = 2)
V	Control de exposición FAdV-11	-	depresión (n = 1)	depresión (n = 2) grave depresión, ave incapaz de pararse o tomar alimento (n = 2)*	depresión leve (n = 1)
VI	control negativo	-	-	-	-

^a sin signos clínicos observados

*las aves se sometieron a eutanasia

La proporción media del peso corporal (BW, por sus siglas en inglés)-hígado aumentó significativamente de 3 a 7 dpc para el control de exposición a FAdV-4 en comparación con el control con resultado negativo, y de 3 a 5 dpc para la vacuna frente al grupo FAdV-4, mientras que la proporción del bazo-BW permaneció afectada hasta 7 dpc en ambos grupos (Figura 9A, 10B). El control de prueba de la exposición a FAdV-4 también mostró una disminución significativa en la proporción órgano:BW de la bolsa de Fabricio, en comparación con el control con resultado negativo, a 3 y 5 dpc, y de la proporción timo-BW

a 5 y 7 dpc, a diferencia del respectivo grupo vacunado (Figura 9C, 10D). El control de la exposición a FAdV-11 mostró un aumento significativo de la relación hígado-BW a 3 y 7 dpc, y de la proporción bazo-BW de 3 a 7 dpc, mientras que el grupo de vacuna respecto a FAdV-11 solo mostró una afección significativa de la proporción bazo-BW a 5 dpc.

5 AST en plasma

La AST plasmática aumentó significativamente en comparación con el control con resultado negativo de 3 a 7 dpc para el control de la exposición a FAdV-4, y de 3 a 5 dpc para la vacuna frente al grupo de FAdV-4, aunque los valores de las aves vacunadas fueron significativamente más bajos en comparación con el control de la exposición a FAdV-4 en estos puntos de tiempo (Figura 10). A 7 dpc, el control de la exposición a FAdV-11 aumentó significativamente en comparación con el control con resultado negativo, mientras que la vacuna frente al grupo de FAdV-11 aumentó significativamente a 14 dpc.

Carga viral en órganos blanco

Dentro del sistema FAdV-4, la carga viral media de las aves vacunadas fue de manera considerable menor que el control de exposición en el hígado a 5 dpc, en el bazo a 3 dpc y en la bolsa de Fabricio en ambos puntos temporales (Figura 11). No se registraron diferencias significativas en los órganos analizados entre los grupos infectados con FAdV-11 en ningún momento. A 14 dpc fue posible detectar ADN viral exclusivamente en el bazo de aves de grupos infectados con FAdV-4.

Respuesta a los anticuerpos: ELISA y VNT

El valor del umbral de corte para ELISA crecFib-4/11 se calculó en OD 0.12. A los 14 días de edad (7 dpb), la DO media de la totalidad de las aves vacunadas ($n = 60$) fue $DO\ 0.48 \pm 0.48$, con el 81.7 % (49/60) de las aves por encima del límite (Figura 12). El día antes de la exposición (21 días de edad, 14 dpb), el valor medio de OD de las aves vacunadas aumentó hasta 2.43 ± 0.87 , estando todas las aves por encima del límite. Las aves inyectadas con adyuvante ($n = 40$) tuvieron valores medios de OD de 0.07 ± 0.03 y 0.05 ± 0.01 a los 14 y 21 días de edad, respectivamente. La OD media del grupo de vacuna sola sufrió una disminución a 3 dpc (1.70 ± 1.09) antes de aumentar continuamente a lo largo del experimento, alcanzando $OD\ 3.46 \pm 0.01$ a los 36 días de edad (29 dpb). Después de la exposición, la DO media de la vacuna frente al grupo FAdV-4 se elevó a 3.09 ± 0.42 a 3 dpc y alcanzó el extremo más alto de los valores cuantificables a 5 dpc (3.32 ± 0.28), permaneciendo luego constante en su meseta hasta el final del experimento. En comparación, se observó un fuerte aumento en los anticuerpos medidos por ELISA en las aves control de la exposición a FAdV-4 de 5 a 14 dpc (OD media de 0.25 ± 0.15 a 2.57 ± 0.44), aunque permanecieron más bajos que el grupo vacunado. Las aves vacunadas expuestas a FAdV-11 también lograron rápidamente la meseta después de la infección (OD media 3.24 ± 0.13 a 3 dpc a 3.39 ± 0.13 a 14 dpc), mientras que el control de la exposición a FAdV-11 mostró bajos niveles de desarrollo de anticuerpos (pico a 14 dpc con OD media 0.28 ± 0.13). Los sueros de las aves control con resultado negativo permanecieron por debajo del valor de corte durante todo el experimento.

El día anterior a la exposición, solo cuatro aves vacunadas mostraron algún grado de nAb contra FAdV-11, una de ellas reaccionó tanto contra la vacuna como contra la cepa de la exposición (títulos: 3 y 8 $\log_2$ respectivamente), uno solo contra la cepa de vacuna (títulos: 5 $\log_2$), y dos contra la cepa de

exposición (títulos: 3 y 9 log₂) (Figura 13). Por el contrario, no hubo actividad neutralizante contra ninguna de las cepas de FAdV-4, y el grupo de vacuna sola no vio desarrollo de nAb en ninguno de los puntos de tiempo probados. El aumento de nAb contra FAdV-4 comenzó después de la exposición en las aves infectadas, con el grupo vacunado y el control de la exposición mostrando valores similares contra la cepa de la exposición (título medio: 5.07±2.09 log₂ respecto a 4.57±1.83 log₂ a 5 dpc, y 7.56±1.51 log₂ respecto a 6.90±0.99 log₂ a 7 dpc) y la cepa de vacuna (2.53±2.56 log₂ respecto a 3.64±2.37 log₂ a 5 dpc, y 6.67±1.87 log₂ respecto a 6.10±0.99 log₂ a 7 dpc). Los grupos experimentales infectados con FAdV-11 mostraron un patrón similar contra la cepa de exposición, aunque las titulaciones en las aves vacunadas fueron ligeramente más bajas que en el control de exposición (media: 3.79±2.78 log₂ respecto a 5.36±2.68 log₂ a 5 dpc, y 5.90±1.10 log₂ respecto a 7.00±1.63 log₂ a 7 dpc), y los títulos medios fueron generalmente más bajos contra la cepa de vacuna (0.29±1.07 log₂ respecto a 2.80±2.10 log₂ a 5 dpc, y 0.50±1.29 log₂ respecto a 2.30±2.11 log₂ a 7 dpc). Curiosamente, un pequeño número de aves vacunadas que se infectaron con FAdV-4 desarrollaron nAb contra FAdV-11 después de la exposición, con tres individuos que mostraron nAb contra ambas cepas y uno solo contra la cepa de la vacuna entre 5 y 7 dpc. Los datos sobre la cantidad de individuos que exhiben nAbs para cada grupo se muestran en la Figura 13.

Conclusiones

La vacuna con proteína de fibra quimérica crecFib-4/11 fue capaz de prevenir los signos clínicos tras la infección por FAdV-4 en todas las aves inmunizadas, excepto una, a diferencia del control de la exposición, donde varias aves se vieron afectadas en varios momentos, incluida la depresión grave que condujo a la eutanasia de dos individuos. A pesar de que la hepatomegalia estaba presente en ambos grupos infectados con FAdV-4 en la fase temprana de la infección, el grupo vacunado experimentó una recuperación más rápida una semana después de la exposición. Esta tendencia se reflejó en los análisis de AST plasmática, otro indicador de la salud hepática, así como en la caída significativa de la carga viral en el hígado de las aves vacunadas en comparación con el control de la exposición a FAdV-4 en el mismo período de tiempo. Por el contrario, la esplenomegalia se registró tanto en aves vacunadas como no vacunadas; sin embargo, al considerar este parámetro, se debe tener en cuenta el doble papel del bazo como órgano linfoide y objetivo de la infección, ya que la magnitud de la respuesta inmune puede haber jugado un papel en influir en el tamaño esplénico de las aves vacunadas. De hecho, la carga viral en el bazo fue generalmente menor en el grupo vacunado. Además, la vacuna previno la atrofia causada por HHS de otros órganos linfoides importantes, como el timo y la bolsa de Fabricio, posiblemente al limitar la propagación viral, respaldada por una carga viral significativamente menor en la bolsa del grupo vacunado en comparación con el control de la exposición a FAdV-4.

La infección por IBH con FAdV-11 tuvo en general un efecto más leve que el HHS. Solo un ave del control de la exposición, entre todas las infectadas con FAdV-11, mostró signos de depresión leve. Sin embargo, el efecto perjudicial del virus fue evidente con un aumento significativo de la proporción hígado y bazo-BW en el grupo control de la exposición, ocasionalmente emparejado con un aumento patológico de AST, un daño que fue prevenido consistentemente por la vacuna crecFib-4/11, con la única excepción de esplenomegalia observada en el grupo vacunado a 5 dpc.

La protección clínica proporcionada por crecFib-4/11 contra HHS e IBH se relacionó con la inducción de niveles altos y uniformes de anticuerpos sistémicos contra el antígeno de vacunación medido con ELISA de fibra interno inmediatamente antes de la exposición, y todas las aves vacunadas desarrollaron valores de OD por encima del límite calculado. Los niveles generales de ambos grupos vacunados/expuestos alcanzaron el extremo más alto de los valores cuantificables justo después de la exposición y se estabilizaron hasta el final del experimento. La inclusión de un grupo de sólo vacuna permitió monitorear el desarrollo de anticuerpos durante todo el período de tiempo y mostró que los anticuerpos medidos por ELISA de aves vacunadas/no expuestas se superponían con los valores de los grupos vacunados/expuestos, lo que confirma que dicha respuesta humoral eficiente no se debió necesariamente al efecto de refuerzo con el virus vivo. De hecho, los anticuerpos dirigidos contra crecFib-4/11 nunca alcanzaron los OD cuantificables más altos en los controles de la exposición. Sin embargo, se observó una falta constante de anticuerpos neutralizantes (nAb) en los grupos vacunados antes de la exposición, ya que un número muy pequeño de aves exhibió neutralización contra FAdV-11 y ninguna contra FAdV-4. La neutralización contra FAdV-11 también apareció en algunas aves vacunadas después de la infección con FAdV-4, lo que indica un retraso en el desarrollo de nAbs de la vacuna o un posible efecto de refuerzo del virus. Por el contrario, las aves control de la exposición mostraron consistentemente actividad neutralizante contra el virus de infección respectivo después de la exposición, y todos los individuos sobrevivientes exhibieron nAb una semana después de la infección.

En conjunto, la vacunación de subunidades con crecFib-4/11 protegió a los pollos de los signos clínicos y el resultado grave de HHS, mientras que al mismo tiempo limitó la afección patológica tanto de HHS como de IBH. Por lo tanto, se confirmó nuevamente que las fibras quiméricas representan una estrategia de protección eficiente para proporcionar una amplia cobertura contra FAdV, no solo a nivel heterotípico, como se demostró previamente en el Ejemplo 1, sino también a través del límite de la especie.

Referencias no relacionadas con patentes

Bertran K, *et al* (2021) A 10-Year retrospective study of inclusion body hepatitis in meat-type chickens in Spain (2011-2021). *Viruses* 13:2170

Chen L, *et al* (2018) Immunogenicity and protective efficacy of recombinant fiber-2 protein in protecting SPF chickens against fowl adenovirus 4. *Vaccine* 36:1203-1208

De Luca C, *et al* (2020) Fowl adenovirus (FAdV) fiber-based vaccine against inclusion body hepatitis (IBH) provides type-specific protection guided by humoral immunity and regulation of B and T cell response. *Vet Res* 51:143

El Bakkouri M, *et al* (2008) Structure of the C-terminal head domain of the fowl adenovirus type 1 short fibre. *Virology* 378:169–176

Feichtner F, *et al* (2018) Development of sensitive indirect enzyme-linked immunosorbent assays for specific detection of antibodies against fowl adenovirus serotypes 1 and 4 in chickens. *Avian Pathol* 47:73-82

Gomis S, *et al* (2006) Inclusion body hepatitis as a primary disease in broilers in Saskatchewan, Canadá. *Avian Dis* 50:550-555

Grafl B, *et al* (2020) Successful reproduction of adenoviral gizzard erosion in 20-week-old SPF layer-type chickens and efficacious prophylaxis due to live vaccination WiFi apathogenic fowl adenovirus serotype 1 strain (CELO). *Vaccine* 38:143-149

Günes A, *et al* (2012) Real-time PCR assay for universal detection and quantitation of all five species of fowl adenoviruses (FAdV-A to FAdV-E). *J Virol Methods* 183:147-153

Gupta A, *et al* (2017) Immunogenicity and protective efficacy of virus-like particles and recombinant fiber proteins in broiler-breeder vaccination against fowl adenovirus (FAdV)-8b. *Vaccine* 35:2716-2722

Gupta A, *et al* (2018) Inactivated and live bivalent fowl adenovirus (FAdV8b + FAdV11) breeder vaccines provide broad-spectrum protection in chicks against inclusion body hepatitis (IBH). *Vaccine* 36:744-750

Harrach B, *et al*, Family Adenoviridae. En: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 9a ed. Elsevier Academic Press, San Diego

Henry Dunand CJ, *et al* (2016) Both neutralizing and non-neutralizing human H7N9 influenza vaccine-induced monoclonal antibodies confer protection. *Cell Host Microbe* 19:800-813

Hess M, *et al* (1995) The avian adenovirus penton: two fibres and one base. *J Mol Biol* 252:379–385

Hess M (2020) Aviadenovirus infections. En: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL (eds) *Diseases of Poultry*, 14va ed. Wiley-Blackwell, Hoboken

Hong JS, *et al* (1996) Domains required for assembly of adenovirus type 2 fiber trimers. *J Virol* 70:7071–7078

Hu Z, *et al* (2020) Hemagglutinin-specific non-neutralizing antibody is esculentina for protection provirus by inactivante and viral-deflector H7N9 Avian Influenza vaccines in chickens. *Front Vet Sci* 6:482

Kim M, *et al* (2014) An inactivante oil-emulsion fowl adenovirus serotype 4 vaccine provides broad cross-protection against various serotypes of fowl adenovirus. *Vaccine* 32:3564-3568

Marek *et al* (2012) Two fiber genes of nearly equal lengths are a common and distinctive feature of fowl adenovirus C members. *Vet. Microbiol.* 156: 411-417)

Matos M, *et al* (2016) Selected clinical chemistry analytes correlate WiFi the pathogenesis of inclusion body hepatitis experimentally induced by fowl aviadenoviruses. *Avian Pathol* 45:520-529

Mittal D, *et al* (2014) Characterization of fowl adenoviruses associated WiFi hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in broiler chickens. *Virusdisease* 25:114-119

Mo J (2021) Historical investigation of fowl adenovirus outbreaks in South Korea from 2007 to 2021: A comprehensive review. *Viruses* 13:2256

Norby E (1969) The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. IV. Immunological complexity of soluble components. *Virology* 37:565–576

Pallister JA, *et al* (1993) Serological relationships within the group E fowl adenoviruses. *Intervirology* 36:84-90

Popowich S, *et al* (2018) Broad spectrum protection of broiler chickens against inclusion body

hepatitis by immunizing their broiler breeder parents WiFi a bivalent live fowl adenovirus vaccine. *Res Vet Sci* 118:262-269

Reed LJ, Muench H (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27:493-497

5 Schachner A, *et al* (2014) Recombinant FAdV-4 fiber-2 protein protects chickens against hepatitis-hydropericardium syndrome (HHS). *Vaccine* 32:1086-1092

Schachner A, *et al* (2016) Detailed molecular analyses of the hexon loop-1 and fibers of fowl aviadenoviruses reveal new insights into the antigenic relationship and confirm that specific genotypes are involved in field outbreaks of inclusion body hepatitis. *Vet Microbiol* 186:13-20

10 Schachner A, *et al* (2018) Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control – a review on the current global situation. *Avian Pathol* 47:111-126

Schachner A, *et al* (2019) Fowl adenovirus (FAdV) recombination WiFi intertypic crossovers in genomes of FAdV-D and FAdV-E, displaying hybrid serological phenotypes. *Viruses* 11:1094

15 Schat K, *et al* (2008) Cell culture methods. En: Dufour-Zavala L, Swayne DE, Glisson JR, Pearson JE, Reed WM, Jackwood MW, Woolcock PR (eds) A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 5a ed. OmniPress Inc, Madison

Schonewille E, *et al* (2010) Specific-pathogen-free chickens vaccinated WiFi a live FAdV-4 vaccine are fully protected against a severe challenge even in the absence of neutralizing antibodies. *Avian Dis* 54:905-10

20 Shah MS, *et al* (2012) A subunit vaccine against hydropericardium syndrome using adenovirus penton capsid protein. *Vaccine* 30:7153-7156

Steer PA, *et al* (2011) Application of high-resolution melting curve analysis for typing of fowl adenovirus in field cases of inclusion body hepatitis. *Aust Vet J* 89:184-192

25 Steer-Cope PA, *et al* (2019) Vaccination WiFi FAdV-8a induces protection against inclusion body hepatitis caused by homologous and heterologous strains. *Avian Pathol* 48:396-405

Tian KY, *et al* (2020) Protection of chickens against hepatitis-hydropericardium syndrome and Newcastle disease WiFi a recombinant Newcastle disease virus vaccine expressing the fowl adenovirus serotype 4 fiber-2 protein. *Vaccine* 38:1989-1997

30 Venne D (2013) Field data of the changing clinical picture over time of inclusion body hepatitis in Canada WiFi an emphasis on diagnosis, prevention and trials on supportive treatments. En: Proceedings of the 24th Annual Australian Poultry Science Symposium, Sydney, New South Wales, Australia, Febrero de 2013. The Poultry Research Foundation and the World's Poultry Science Association, pp 222-229

Vindahl Kringelum J, *et al* (2012) Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput Biol*, doi 10.1371/journal.pcbi.1002829

35 Wang J, *et al* (2018) Variant serotypes of fowl adenovirus isolated from commercial poultry between 2007 and 2017 in some regions of China. *Avian Dis* 62:171-176

Wang X, *et al* (2018b) Immune protection efficacy of FAdV-4 surface proteins fiber-1, fiber-2, hexon and penton base. *Virus Res* 245:1-6

Wang P, *et al* (2018) A novel monoclonal antibody efficient blocks the infection of serotype 4 fowl adenovirus by targeting fiber-2. *Vet Res* 49:29; doi 10.1186/s13567-018-0525-y

Wang X, *et al* (2019) Penton-dodecahedron of fowl adenovirus serotype 4 as a vaccine candidate for the control of related diseases. *Vaccine* 37:839-47

5

10

15

20

25

30

35