

VECTORES DE HVT AIV Y USOS DE LOS MISMOS

LISTADO DE SECUENCIAS

[0001] Esta solicitud contiene un Listado de secuencias bajo 37 C.F.R. 1,821 – 1,825. El Listado de secuencias asociado con esta solicitud se presenta en formato electrónico como un archivo XML, en cumplimiento de la Norma ST.26 de WIPO. El archivo XML, con el título “23-0046-US-2.xml”, fue creado el 19 de julio de 2024 y tiene un tamaño de 82.194 bytes, se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención se relaciona con vectores virales del herpesvirus de pavo (HVT) recombinante que comprende un gen extraño del virus de la gripe aviar (AIV), el gen de hemaglutinina H9 (AIV H9-HA). Los vectores virales recombinantes son adecuados para utilizar en composiciones y vacunas inmunogénicas, y pueden proporcionar protección contra el AIV y otros patógenos de aves, en particular el virus de la enfermedad de Marek (MDV) así como el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) y el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] El virus de la H9N2 de la gripe aviar es considerado como un virus de baja patogenicidad que es endémico en las poblaciones de aves de corral. La gripe aviar de baja patogenicidad tiene efectos adversos en la producción de aves de corral y representa una significativa transmisión cruzada entre especies y una amenaza zoonótica. Por lo tanto, sería beneficioso el desarrollo de una vacuna contra el virus de la gripe muy eficaz para aves de corral, tanto para la salud humana como veterinaria.

[0004] El virus de la enfermedad de Marek (MDV) pertenece a la familia Alphaherpesviridae y al género Mardivirus. Entre los serotipos del MDV se encuentra el serotipo 1 de MDV (MDV1) y el serotipo 2 de MDV (MDV2), ambos patógenos de las aves de corral, en tanto el serotipo 3 de MDV (MDV3) no es patógeno. En algunos casos, el MDV3 se denomina: herpesvirus de Meleagrid 1, herpesvirus de pavo y/o herpesvirus de pavos (HVT).

[0005] Se han usado diferentes cepas de MDV3 (es decir, HVT), tal como PB1 o FC-126, para la vacunación de aves (por ejemplo, pollos) contra la MD causada por MDV1 y/o MDV2. También se han desarrollado y licenciado varios vectores de HVT recombinantes que expresan antígenos de diversos patógenos (Patentes de los EEUU N°: 5.980.906, 5.853.733, 6.183.753 y 5.187.087). Además, en el arte se han hecho esfuerzos por desarrollar vectores de HVT recombinantes que expresan antígenos de dos patógenos diferentes (vectores de HVT recombinantes multivalentes), tal como por medio de la inserción de transgenes que codifican antígenos del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) y del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) en múltiples sitios diferentes del genoma del vector de HVT (WO 2013/144355). De manera similar, han habido algunos intentos preliminares para proveer vectores de HVT recombinantes que codifican un antígeno AIV H9N2 heterólogo, en combinación con un antígeno NDV y/o IBDV, todos los cuales han empleado la misma estrategia recombinante de utilizar múltiples sitios de inserción diferentes dentro del genoma del vector del HVT (WO 2022/079160, WO 2021/123104).

[0006] El desarrollo de vacunas muy eficaces contra el virus de la gripe para aves de corral sería beneficioso tanto para la salud humana como

veterinaria. También sería beneficioso el desarrollo de vacunas eficaces contra MDV, NDV e IBDV. En particular, sería beneficioso proporcionar una vacuna combinada contra MDV y AIV, así como un patógeno adicional, tal como IBDV o NDV. Sería beneficioso proporcionar dichas vacunas además de cualquiera de los esfuerzos por obtenerlas en el arte. Sin embargo, no siempre es sencillo predecir cuán exitoso será una estrategia recombinante particular en el contexto de un vector de HVT-AIV H9 multivalente, en especial en el contexto de un vector de HVT-AIV H9 que debe expresar un antígeno heterólogo adicional. Específicamente, no es sencillo predecir si el uso de múltiples sitios de inserción o de un solo sitio de inserción en el genoma del HVT será exitoso para expresar un antígeno AIV H9 y por lo menos un antígeno adicional. Tampoco es sencillo predecir si las secuencias reguladoras, tales como secuencias IRES o P2A, funcionarán apropiadamente en estas circunstancias. En particular, no es sencillo predecir si dichas nuevas combinaciones de estas selecciones de diseño y antígenos dará como resultado construcciones con una estabilidad favorable, una expresión favorable de los genes heterólogos insertados y el suministro de una protección heteróloga favorable contra el AIV, NDV y/o IBDV.

[0007] La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no es un reconocimiento de que dicho documento constituya un tema del arte anterior para la presente invención.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0008] La invención provee, en general, vectores de HVT recombinantes que comprenden un antígeno de hemaglutinina H9 de la gripe aviar (AIV) (AIV H9-HA, también denominado AIV H9 en la presente), así como por lo menos un

antígeno aviar adicional de un patógeno aviar. Los vectores virales recombinantes se pueden utilizar en composiciones y vacunas inmunogénicas para proveer protección a los animales contra la gripe aviar y el MDV. Los vectores recombinantes incluyen antígenos adicionales de organismos patógenos para aves distintos de la gripe aviar, tal como el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) y el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), para ayudar en la protección contra patógenos adicionales, más allá de la gripe aviar.

[0009] En un primer aspecto, la presente invención provee un vector de herpesvirus de pavos (HVT) recombinante que comprende un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar y un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar, en donde el primer y segundo polinucleótido heterólogo se insertan en el mismo sitio no esencial en el genoma del vector de HVT recombinante, y en donde el primer o segundo antígeno es un antígeno del subtipo de hemaglutinina H9 (AIV H9-HA) del virus de la gripe aviar (AIV). En la presente, el antígeno aviar que no es el antígeno AIV H9-HA se puede denominar “antígeno aviar adicional”. Más preferiblemente, el segundo antígeno que se define en la presente invención es el antígeno AIV H9-HA. Más preferiblemente, el primer antígeno que se define en la presente invención es el antígeno aviar adicional.

[0010] En un segundo aspecto, la presente invención provee una molécula de ácido nucleico que comprende el vector de HVT recombinante de la invención.

[0011] En un tercer aspecto, la presente invención provee un casete de expresión de antígenos que comprende los siguientes elementos:

- (a) opcionalmente, un promotor de mCMV IE;
 - (b) un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar;
 - (c) opcionalmente, una secuencia IRES o P2A;
 - (d) un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar; y
 - (e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40;
- en donde el primer o segundo antígeno aviar es un antígeno AIV, preferiblemente un antígeno AIV H9-HA.

[0012] Como alternativa, o además, en un tercer aspecto, la presente invención provee un casete de expresión de antígenos que comprende en el siguiente orden, en dirección 5' a 3':

- (a) opcionalmente, un promotor de mCMV IE;
- (b) un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar;
- (c) opcionalmente, una secuencia IRES o P2A;
- (d) un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar que es un antígeno AIV, preferiblemente un antígeno AIV H9-HA; y
- (e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40.

[0013] En un cuarto aspecto, la presente invención provee una célula que comprende el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico o el casete de expresión de la invención.

[0014] En un quinto aspecto, la presente invención provee una composición que comprende el vector de HVT recombinante, la molécula de

ácido nucleico, el casete de expresión o la célula de la invención.

[0015] En un sexto aspecto, la presente invención provee el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión, la célula o la composición de la invención, para usar en un método de inducción de una respuesta inmunológica protectora contra el AIV, que es el patógeno del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero) y/o el MDV en un ave.

[0016] En un séptimo aspecto, la presente invención provee un método de inducción de una respuesta inmunológica protectora contra el AIV, que es el patógeno del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero) y/o el MDV en un ave, que comprende administrar el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión, la célula o la composición de la invención al ave.

[0017] En un octavo aspecto, la presente invención provee el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión, la célula o la composición de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para inducir una respuesta inmunológica protectora contra el AIV, donde el patógeno aviar del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero) y/o el MDV en un ave.

[0018] En un noveno aspecto, la presente invención provee el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión, la célula o la composición de la invención, para usar en un método para reducir la diseminación del AIV en un ave.

[0019] En un décimo aspecto, la presente invención provee un método para reducir la diseminación del AIV en un ave, que comprende administrar el

vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión, la célula o la composición de la invención a dicha ave.

[0020] En un undécimo aspecto, la presente invención provee el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión, la célula o la composición de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para reducir la diseminación del AIV en un ave.

[0021] En un duodécimo aspecto, la presente invención provee un método de elaboración del vector de HVT recombinante de la invención, en donde dicho método comprende:

- a) proveer un ácido nucleico que codifica un vector de HVT;
- b) proveer uno o más casetes de expresión que comprenden secuencias que codifican un primer antígeno aviar, y un segundo antígeno aviar, en donde el primer o el segundo antígeno aviar es un antígeno AIV H9-HA; y
- c) combinar de manera recombinante el ácido nucleico que codifica un vector de HVT y dichos uno o más casetes de expresión, de manera tal que las secuencias que codifican el primer antígeno aviar y el segundo antígeno aviar están comprendidos en el mismo sitio no esencial del genoma del vector de HVT.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0022] En la Figura 1 se muestra un diagrama para la construcción del plásmido pSaH9optIRESVP2 donante del Ejemplo 1.

[0023] En la Figura 2 se muestra la ubicación de los cebadores para PCR en el mapa vHVT513.

[0024] En las Figuras 3A-3B se muestra un ensayo de

inmunofluorescencia dual. Las imágenes representativas son del pasaje pre-MSV (Figura 3A) y del pasaje pre-MSV+13 (Figura 3B).

[0025] En la Figura 4 se muestra un diagrama para la construcción del plásmido pFwtIRESSaH9opt donante del Ejemplo 2.

[0026] En las Figuras 5A-5B se muestra un ensayo de inmunofluorescencia dual. Las imágenes representativas son del pasaje pre-MSV (Figura 5A) y del pasaje pre-MSV+13 (Figura 5B).

[0027] En la Figura 6 se muestran dispersiones de los puntajes clínicos globales individuales por grupos. G1: vHVT513; G2: vHVT514; G3: controles. Los grupos se compararon con CTL según el criterio “GCS” usando una prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. El valor de GCS era significativamente menor en los grupos HVT que en el grupo CTL. Los trazados de cajas representan el mini, el cuartil menor, la mediana, el cuartil superior y el maxi.

[0028] En la Figura 7 se muestra la diseminación de H9N2 después del desafío. Panel izquierdo: excreción promedio de ARN H9N2 orofaríngeo por grupos expresada como equivalente $\log_{10}$ EID₅₀/mM; el límite de detección era 2,09 $\log_{10}$ equivalente de EID₅₀/ml. Panel derecho: porcentaje de aves positivas para la diseminación en los tres puntos de tiempo. Dpi = día de posinfección (desafío).

[0029] En la Figura 8 se muestran las dispersiones de AUC individuales de ARN viral por grupos; los trazados de cajas representan el mini, el cuartil inferior, la mediana, el cuartil superior y el maxi.

[0030] En la Figura 9 se muestran las dispersiones de títulos de HAI individuales contra el antígeno IRAK el D20 por grupos ($\log_{10}$ de títulos HAI); los trazados de cajas representan el mini, el cuartil inferior, la mediana, la

media (cruz), el cuartil superior y el maxi. G1: vHVT513; G2: vHVT514; G3: controles El grupo CTL permaneció negativo el D21. Se observó la versión Serocon en los grupos HVT.

[0031] La Figura 10 es un gráfico del puntaje clínico diario promedio para vHVT513, vHVT514, inactivados y controles entre los 21 y 31 días de posvacunación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0032] Los vectores de HVT recombinantes de la invención se pueden utilizar en composiciones y vacunas inmunogénicas para proveer protección a los animales contra la gripe aviar y MDV. En particular, los vectores de HVT recombinantes de la presente invención proveen una vacuna de un vector AIV (un vector de HVT recombinante que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica un antígeno AIV H9-HA) que es sorprendentemente eficaz aún en condiciones clínicas severas, con un nivel de eficacia y estabilidad inesperada al tiempo que proporciona protección contra los signos clínicos. Debido a la presencia de un polinucleótido heterólogo adicional (por ejemplo, el primero), los vectores de HVT recombinantes de la presente invención también pueden proporcionar protección contra un patógeno heterólogo aviar adicional, tal como IBVDV o NDV, al tiempo que de manera simultánea provee protección contra el AIV. Los beneficios de los vectores virales de la invención incluyen la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora contra MDV, AIV así como dichos patógenos aviares adicionales, inclusive una reducción de los signos clínicos y un nivel alto de estabilidad viral. Ahora los inventores de la presente han demostrado sorprendentemente que la protección simultánea contra tales patógenos se puede lograr cuando se inserta un polinucleótido

heterólogo que codifica un antígeno AIV H9-HA en el mismo sitio que otro polinucleótido heterólogo o cuando la expresión de un polinucleótido heterólogo que codifica un antígeno AIV H9-HA se une a otro polinucleótido heterólogo, por ejemplo mediante una secuencia IRES o P2A.

Vectores de HVT recombinantes

[0033] En un primer aspecto, la presente invención provee un vector de herpesvirus de pavos (HVT) recombinante que comprenden un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar y un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar, además, en donde el primer y segundo polinucleótido heterólogo se insertan en el mismo sitio no esencial en el genoma del vector de HVT recombinante, y en donde el primer o segundo antígeno es un antígeno del subtipo de hemaglutinina H9 (AIV H9-HA) del virus de la gripe aviar (AIV). Preferiblemente, AIV H9-HA es el segundo antígeno. En la presente, el antígeno aviar que no es el antígeno AIV H9-HA, por ejemplo el antígeno aviar que es el primer antígeno aviar cuando el antígeno AIV H9-HA es el segundo antígeno, se puede denominar el “antígeno aviar adicional”. Preferiblemente, el antígeno aviar adicional es el primer antígeno que se define en la presente con respecto a la presente invención.

[0034] En la presente, se comprenderá que toda referencia a un “antígeno aviar” se refiere a un antígeno derivado de un patógeno aviar, es decir, un antígeno derivado de un patógeno capaz de infectar a una o más especies de aves. Por consiguiente, se comprenderá que un “antígeno aviar” tal como se define en la presente no es necesariamente, por ejemplo, un antígeno derivado de la propia ave. Por lo tanto, en una forma de realización cada antígeno aviar es un antígeno que puede derivar de un patógeno aviar.

En una forma de realización preferida, cada antígeno aviar es un antígeno que puede derivar de un patógeno aviar diferente. En una forma de realización, cada antígeno aviar no es un antígeno que puede derivar de una célula de un ave, tal como una célula de ave no infectada, por ejemplo SPF.

[0035] En una forma de realización, el primer polinucleótido heterólogo está ligado operativamente a un promotor, preferiblemente a un promotor fuerte que sea funcional en células eucariotas. Los promotores incluyen, pero en un sentido no taxativo, un promotor inmediato temprano de citomegalovirus (CMV), un promotor de CMV de cobayo, un promotor SV40, tal como el promotor de la glicoproteína X, un promotor del virus Herpes Simplex 1, tal como el promotor alfa 4. Otros promotores pueden incluir los promotores de los virus de la enfermedad de Marek (inclusive MDV-1, MDV-2 y HVT), tales como los que dirigen la expresión de las glicoproteínas gC, gB, gE o gI, los promotores del virus de la laringotraqueítis infecciosa tales como los de los genes de la glicoproteína gB, gE, gI, gD u otros promotores de herpesvirus.

[0036] En las formas de realización, los vectores recombinantes comprenden un promotor. En las formas de realización, el promotor se selecciona entre un promotor de citomegalovirus de murino (mCMV), un promotor H6 del virus Vaccinia y un promotor T7. En las formas de realización, el promotor es un promotor de CMV. En las formas de realización, el promotor es un promotor de mCMV. En las formas de realización, el promotor es un promotor inmediato temprano (IE) de mCMV. En las formas de realización, el primer polinucleótido heterólogo de la invención está ligado operativamente a un promotor, y la expresión del antígeno aviar codificado por el primer polinucleótido heterólogo está regulado por el promotor. En las formas de

realización, el polinucleótido que codifica el antígeno H9-HA de la gripe aviar y el polinucleótido heterólogo adicional que codifica un antígeno aviar adicional están ligados operativamente al promotor, y ambos productos de expresión están regulados por el promotor. El antígeno AIV H9-HA puede ser el primer antígeno o el segundo antígeno. Preferiblemente, AIV H9-HA es el segundo antígeno. En las formas de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno H9-HA de la gripe aviar y el polinucleótido heterólogo adicional que codifica un antígeno aviar adicional están ligados operativamente, de manera independiente, a diferentes promotores, y sus productos de expresión están regulados por cada promotor respectivo.

[0037] La presente invención también abarca la posibilidad de cambiar el orden de los polinucleótidos heterólogos que codifican los antígenos, es decir, el primer polinucleótido heterólogo que codifica el primer antígeno aviar se puede ubicar segundo, y el segundo polinucleótido heterólogo que codifica el segundo antígeno aviar – es decir, preferiblemente el antígeno AIV-H9-HA – se puede ubicar primero.

[0038] En una forma de realización particularmente preferida, el primer polinucleótido heterólogo está ligado operativamente a un promotor inmediato temprano de citomegalovirus de murino (mCMV IE). El término “ligado operativamente” tiene el significado que habitualmente se le atribuye en el arte, con referencia a la relación funcional entre el promotor y el polinucleótido heterólogo que da como resultado la transcripción del polinucleótido heterólogo, por ejemplo de ADN en ARN. Por consiguiente, en una forma de realización, la transcripción del primer polinucleótido heterólogo se encuentra bajo el control de un promotor. Además, en una forma de realización preferida,

la transcripción del primer polinucleótido heterólogo se encuentra bajo el control de un promotor de mCMV IE (también conocido como el promotor de mCMV IE1 o el promotor de mCMV MIE). En una forma de realización, el primer polinucleótido heterólogo se transcribe a partir de un promotor, preferiblemente un promotor de mCMV IE, preferiblemente un promotor de mCMV IE1. Aunque el promotor es responsable de la transcripción del polinucleótido heterólogo, el control del promotor también se puede definir con relación al proceso de transcripción y traducción como un todo (producción de proteínas o expresión del polinucleótido heterólogo). Por consiguiente, en una forma de realización, la expresión del primer polinucleótido heterólogo se encuentra bajo el control de un promotor, preferiblemente un promotor de mCMV IE, preferiblemente un promotor de mCMV IE1. En una forma de realización típica, el término “ligado operativamente” significa que el promotor forma parte del mismo casete de expresión que comprende el promotor y la secuencia del polinucleótido heterólogo. En una forma de realización particularmente preferida, ambos primer y segundo polinucleótido heterólogo están ligados operativamente al mismo promotor. En una forma preferida de esta forma de realización, el promotor se ubica 5' con respecto al primer polinucleótido en el casete de expresión, y el segundo polinucleótido está ligado al primer polinucleótido por medio de una secuencia IRES o P2A. En una forma preferida de esta forma de realización, el primer polinucleótido y la secuencia de IRES/P2A están ubicados entre el segundo polinucleótido y el promotor en el casete de expresión. En una forma preferida de esta forma de realización, el promotor está ubicado 5' con respecto al primer polinucleótido en el casete de expresión, la secuencia IRES/P2A está ubicada 3' con respecto al primer polinucleótido en el casete de

expresión, y el segundo polinucleótido está ubicado 3' con respecto a la secuencia IRES/P2A en el casete de expresión.

[0039] En una forma de realización, el primer polinucleótido heterólogo está ligado operativamente a un promotor que comprende una secuencia de nucleótidos que presenta por lo menos un 80% de identidad con la SEQ ID N°: 8 o un fragmento de la misma y que tiene una actividad equivalente a la misma. En una forma de realización, una actividad equivalente a la misma significa que el polinucleótido heterólogo se transcribe a un nivel equivalente al nivel de transcripción cuando está ligado operativamente al promotor de la SEQ ID N°: 8. En una forma de realización, una actividad equivalente a la misma significa que el polinucleótido heterólogo se expresa a un nivel equivalente al nivel de expresión cuando está ligado operativamente al promotor de la SEQ ID N°: 8. En una forma de realización en donde el primer polinucleótido heterólogo codifica un antígeno de un patógeno aviar, la actividad equivalente a la misma significa que la protección heteróloga provista contra dicho patógeno se encuentra en un nivel equivalente al nivel de protección heteróloga provista cuando está ligado operativamente al promotor de la SEQ ID N°: 8. En una forma de realización, en este contexto “equivalente” significa que es funcionalmente similar, no sustancialmente diferente o igual que.

[0040] En una forma de realización, el promotor de mCMV IE comprende o consiste en una secuencia que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 8 o un fragmento de la misma.

[0041] En una forma de realización, el polinucleótido que codifica el

antígeno AIV H9-HA comprende una secuencia de polinucleótidos que presenta por lo menos un 80% de identidad con la SEQ ID N°: 9, y/o el antígeno AIV H9-HA comprende una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos un 80% de identidad con la SEQ ID N°: 1. En una forma de realización, el antígeno AIV H9-HA es un antígeno H9-HA de la cepa Arabia Saudita. En una forma de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno AIV H9-HA es un polinucleótido H9-HA de la cepa Arabia Saudita. En algunas formas de realización, el polinucleótido H9 de la gripe aviar es de la cepa A/aviar/Arabia Saudita/910135/2006 (H9N2), y codifica un polipéptido definido mediante el acceso de GenBank N°: ACY80655.1, que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. En una forma de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno AIV H9-HA comprende una secuencia de polinucleótidos que presenta por lo menos un 80% de identidad con la SEQ ID N°: 9 o un fragmento de la misma, y/o el antígeno AIV H9-HA comprende una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos un 80% de identidad con la SEQ ID N°: 1 o un fragmento de la misma.

[0042] En una forma de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno AIV H9-HA comprende o consiste en una secuencia que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 9 o un fragmento de la misma. En una forma de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno AIV H9-HA comprende o consiste en una secuencia de codones optimizados para la expresión en un huésped aviar, preferiblemente pollos, que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de

identidad con la SEQ ID N°: 9 o un fragmento de la misma.

[0043] En una forma de realización, el antígeno AIV H9-HA comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 1 o un fragmento de la misma.

[0044] En una forma de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno AIV H9-HA es de codones optimizados para la expresión en un huésped aviar. En la presente, la “optimización de codones” tiene el significado que se le atribuye en el arte, y es un aspecto general bien conocido de los polinucleótidos y fácilmente llevado a la práctica por el especialista. La optimización de codones comprende el reemplazo de codones en una secuencia de polinucleótidos por codones equivalentes (es decir, que codifican el mismo aminoácido) más favorecidos para su expresión en un huésped particular, tal como un huésped aviar, proporcionando de esa manera un nivel de expresión mayor del polinucleótido en dicho huésped. La optimización de codones con respecto a un polinucleótido también se relaciona con las diferencias estructurales y funcionales claras que se pueden observar con relación a una versión de codones no optimizados de la secuencia de polinucleótidos, de manera tal que el especialista puede distinguirlas fácilmente. Por ejemplo, la optimización de codones de una secuencia de polinucleótidos heteróloga para la expresión en un huésped aviar incluye el reemplazo de codones por codones alternativos más favorecidos para su expresión en un huésped aviar, y por ello da como resultado una secuencia de polinucleótidos diferente. A modo de ejemplo adicional, el nivel de expresión de

un polinucleótido cuyos codones han sido optimizados para que la expresión en un huésped aviar sea sustancial y mensurable mayor que el nivel de expresión del polinucleótido equivalente de codones no optimizados. Por consiguiente, en una forma de realización, sustancialmente todos, tal como todos, los codones comprendidos en el polinucleótido que codifica el antígeno AIV H9-HA son los codones más favorecidos para la expresión en un huésped aviar. En una forma de realización, la expresión del polinucleótido que codifica el antígeno AIV H9-HA es sustancialmente mayor que la expresión del antígeno AIV H9-HA equivalente de codones no optimizados en un huésped aviar. Preferiblemente, el huésped es un pollo. En las formas de realización, los vectores recombinantes pueden comprender un elemento de secuencia que permita iniciar la traducción de una manera independiente de cap (caperuza), tal como un sitio interno de entrada a ribosomas (IRES) o una secuencia que codifica un péptido (P2A) del Teschovirus-1 2A autoescindible porcino o del virus de la enfermedad de fiebre aftosa (FMDV). En una forma de realización preferida, el elemento es una secuencia IRES. En las formas de realización, el elemento de secuencia que permite iniciar la traducción de una manera independiente de cap (caperuza) se puede insertar entre dos polinucleótidos heterólogos. En una forma de realización, el elemento de secuencia se inserta entre el primer polinucleótido heterólogo que codifica el primer antígeno aviar y el segundo polinucleótido heterólogo que codifica el antígeno AIV H9-HA.

[0045] En una forma de realización, el primer polinucleótido heterólogo está ligado o unido por medio de una secuencia IRES o P2A al segundo polinucleótido heterólogo. En una forma de realización, “ligado” significa que está ligado de manera funcional. En una forma de realización, la transcripción

del segundo polinucleótido heterólogo se encuentra bajo el control de un promotor que está ligado operativamente al primer polinucleótido, preferiblemente un promotor de mCMV IE. En una forma de realización, la transcripción del segundo polinucleótido heterólogo se encuentra bajo el control de un promotor que está ligado operativamente al primer polinucleótido, preferiblemente un promotor de mCMV IE, y la traducción del segundo polinucleótido heterólogo se encuentra bajo el control (por ejemplo, se inicia a partir de) de IRES o P2A. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante de la invención comprende, en el siguiente orden, la primera secuencia de polinucleótidos heteróloga, la IRES y la segunda secuencia de polinucleótidos heteróloga. En una forma de realización, el segundo polinucleótido heterólogo está ligado operativamente por medio de IRES o P2A al promotor que está ligado operativamente al primer polinucleótido heterólogo. Las secuencias IRES son conocidas en el arte y pueden comprender cualquier secuencia interna (por ejemplo, entre la primera y la segunda secuencia de polinucleótidos heterólogas) que permita la entrada a ribosomas (por ejemplo, el inicio de la traducción del segundo polinucleótido heterólogo). En una forma de realización, el primer polinucleótido heterólogo está ligado por medio de una secuencia IRES o P2A al segundo polinucleótido heterólogo de manera tal que el primer y segundo polinucleótido heterólogo se pueden transcribir o se transcriben juntos, es decir, en la misma molécula de ARN(m). Por consiguiente, en una forma de realización, la transcripción de los polinucleótidos heterólogos da como resultado la producción de una sola molécula de ARN que comprende tanto el transcripto del primer polinucleótido heterólogo como el transcripto del segundo polinucleótido heterólogo. En una

forma de realización, el primer polinucleótido heterólogo está ligado por medio de una secuencia IRES o P2A al segundo polinucleótido heterólogo de manera tal que ambos polinucleótidos heterólogos se pueden expresar o se expresan a partir de la misma molécula de ARN.

[0046] En una forma de realización, la secuencia IRES comprende o consiste en una secuencia que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 12 o un fragmento de la misma.

[0047] En una forma de realización, la secuencia P2A comprende o consiste en una secuencia que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 14 o un fragmento de la misma.

[0048] En una forma de realización, el primer antígeno aviar es diferente del segundo antígeno aviar. En una forma de realización, el primer antígeno aviar no es un antígeno AIV H9-HA. En una forma de realización, el primer antígeno aviar deriva de un patógeno que no es del tipo H9 (por ejemplo, H9N2) AIV. En una forma de realización, el primer antígeno aviar deriva de un patógeno aviar distinto de AIV. En una forma de realización, el primer antígeno aviar deriva del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) o del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). En una forma de realización, el primer antígeno aviar es un antígeno VP2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV VP2) o un antígeno de la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F).

[0049] En una forma de realización, el primer antígeno aviar deriva de IBDV. En una forma de realización, el primer antígeno aviar es un antígeno

IBDV VP2. En una forma de realización, el antígeno IBDV VP2 comprende una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos un 80% de identidad con la SEQ ID N°: 2. En una forma de realización, el antígeno IBDV VP2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 2 o un fragmento de la misma. En una forma de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno IBDV VP2 comprende o consiste en una secuencia que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 10 o un fragmento de la misma.

[0050] En una forma de realización, el primer antígeno aviar deriva de NDV. En una forma de realización, el primer antígeno aviar es un antígeno NDV-F. En una forma de realización, el antígeno NDV-F comprende una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos un 80% de identidad con la SEQ ID N°: 5. En una forma de realización, el antígeno NDV F es un antígeno NDV F del genotipo VIIId del NDV. En una forma de realización, el antígeno NDV F comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 5 o un fragmento de la misma. En una forma de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno NDV F comprende o consiste en una secuencia que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 11 o un fragmento de la misma.

[0051] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende además una señal de poliadenilación. En una forma de realización preferida, el vector de HVT recombinante comprende además una señal de poliadenilación SV40. En una forma de realización, la señal de poliadenilación (por ejemplo, SV40) está ubicada 3' con respecto al segundo polinucleótido heterólogo, con relación a la dirección de expresión del segundo polinucleótido heterólogo. En una forma de realización, la señal de poliadenilación (por ejemplo, SV40) está ligada operativamente al segundo polinucleótido heterólogo. En una forma de realización, la señal de poliadenilación que está ligada operativamente significa que la señal de poliadenilación está ligada de manera funcional al segundo polinucleótido heterólogo. En las formas de realización, la señal poliA es una cola poliA del virus 40 de simio (SV40) (SV40). En las formas de realización, la expresión del antígeno H9 de la gripe aviar está influenciada por la señal poliA. En las formas de realización, la señal poliA está ubicada corriente abajo del polinucleótido que codifica el antígeno H9 de la gripe aviar. En las formas de realización, la señal poliA está ubicada corriente abajo con respecto al primer polinucleótido heterólogo que codifica al primer antígeno. En las formas de realización, la expresión del antígeno aviar codificado por el primer polinucleótido heterólogo está influenciada por la señal poliA. En las formas de realización, los vectores recombinantes no comprenden una señal poliA que afecta la expresión del antígeno H9 de la gripe aviar y/o del primer antígeno aviar.

[0052] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos:

- (a) el primer polinucleótido heterólogo; y

(b) el segundo polinucleótido heterólogo;

en donde uno de los polinucleótidos heterólogos codifica un antígeno AIV H9-HA y el otro polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar adicional.

[0053] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos:

(a) opcionalmente, un promotor, preferiblemente un promotor de mCMV IE;

(b) el primer polinucleótido heterólogo;

(c) opcionalmente, una secuencia IRES o P2A;

(d) el segundo polinucleótido heterólogo; y

(e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40;

en donde uno de los polinucleótidos heterólogos codifica un antígeno AIV H9-HA y el otro polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar adicional.

[0054] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos:

(a) opcionalmente, un promotor, preferiblemente un promotor de mCMV IE;

(b) el primer polinucleótido heterólogo;

(c) una secuencia IRES o P2A;

(d) el segundo polinucleótido heterólogo; y

(e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40;

en donde uno de los polinucleótidos heterólogos codifica un antígeno AIV H9-HA y el otro polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar

adicional.

[0055] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos:

- (a) un promotor, preferiblemente un promotor de mCMV IE;
- (b) el primer polinucleótido heterólogo;
- (c) una secuencia IRES o P2A;
- (d) el segundo polinucleótido heterólogo; y
- (e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40;

en donde uno de los polinucleótidos heterólogos codifica un antígeno AIV H9-HA y el otro polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar adicional.

[0056] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos:

- (a) un promotor de mCMV IE;
- (b) el primer polinucleótido heterólogo;
- (c) el segundo polinucleótido heterólogo; y
- (d) una señal de poliadenilación SV40;

en donde uno de los polinucleótidos heterólogos codifica un antígeno AIV H9-HA y el otro polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar adicional.

[0057] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión que además comprende una secuencia IRES o P2A entre el primer y el segundo polinucleótido heterólogo.

[0058] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos:

- (a) un promotor de mCMV IE;
- (b) el primer polinucleótido heterólogo;
- (c) una secuencia IRES;
- (d) el segundo polinucleótido heterólogo; y
- (e) una señal de poliadenilación SV40;

en donde uno de los polinucleótidos heterólogos codifica un antígeno AIV H9-HA y el otro polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar adicional.

[0059] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos:

- (a) un promotor de mCMV IE;
- (b) el primer polinucleótido heterólogo;
- (c) una secuencia P2A;
- (d) el segundo polinucleótido heterólogo; y
- (e) una señal de poliadenilación SV40;

en donde uno de los polinucleótidos heterólogos codifica un antígeno AIV H9-HA y el otro polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar adicional.

[0060] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos en el siguiente orden:

- (a) el primer polinucleótido heterólogo; y
- (b) el segundo polinucleótido heterólogo;

en donde el segundo polinucleótido heterólogo codifica un antígeno AIV H9-HA y el primer polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar

adicional.

[0061] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos en el siguiente orden:

- (a) opcionalmente, un promotor, preferiblemente un promotor de mCMV IE;
- (b) el primer polinucleótido heterólogo;
- (c) opcionalmente, una secuencia IRES o P2A;
- (d) el segundo polinucleótido heterólogo; y
- (e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40;

en donde el segundo polinucleótido heterólogo codifica un antígeno AIV H9-HA y el primer polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar adicional.

[0062] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos en el siguiente orden:

- (a) opcionalmente, un promotor, preferiblemente un promotor de mCMV IE;
- (b) el primer polinucleótido heterólogo;
- (c) una secuencia IRES o P2A;
- (d) el segundo polinucleótido heterólogo; y
- (e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40;

en donde el segundo polinucleótido heterólogo codifica un antígeno AIV H9-HA y el primer polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar adicional.

[0063] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos en el siguiente orden:

- (a) un promotor, preferiblemente un promotor de mCMV IE;
- (b) el primer polinucleótido heterólogo;
- (c) una secuencia IRES o P2A;
- (d) el segundo polinucleótido heterólogo; y
- (e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40;

en donde el segundo polinucleótido heterólogo codifica un antígeno AIV H9-HA y el primer polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar adicional.

[0064] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos en el siguiente orden:

- (a) un promotor de mCMV IE;
- (b) el primer polinucleótido heterólogo;
- (c) el segundo polinucleótido heterólogo; y
- (d) una señal de poliadenilación SV40;

en donde el segundo polinucleótido heterólogo codifica un antígeno AIV H9-HA y el primer polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar adicional.

[0065] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión que además comprende una secuencia IRES o P2A entre el primer y el segundo polinucleótido heterólogo.

[0066] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante

comprende un casete de expresión con los siguientes elementos en el siguiente orden:

- (a) un promotor de mCMV IE;
- (b) el primer polinucleótido heterólogo;
- (c) una secuencia IRES;
- (d) el segundo polinucleótido heterólogo; y
- (e) una señal de poliadenilación SV40;

en donde el segundo polinucleótido heterólogo codifica un antígeno AIV H9-HA y el primer polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar adicional.

[0067] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante comprende un casete de expresión con los siguientes elementos en el siguiente orden:

- (a) un promotor de mCMV IE;
- (b) el primer polinucleótido heterólogo;
- (c) una secuencia P2A;
- (d) el segundo polinucleótido heterólogo; y
- (e) una señal de poliadenilación SV40;

en donde el segundo polinucleótido heterólogo codifica un antígeno AIV H9-HA y el primer polinucleótido heterólogo codifica un antígeno aviar adicional.

[0068] Se comprenderá que en la presente el “otro” antígeno aviar, o “adicional”, puede ser ya sea un antígeno IBDV, preferiblemente un antígeno IBDV VP2 o un antígeno NDV, preferiblemente un antígeno NDV-F.

[0069] En dichas formas de realización y en general cuando se hace

referencia a los elementos recombinantes del vector de HVT recombinante o el casete de expresión comprendido en el mismo (por ejemplo, el casete de expresión de la presente invención), el “orden” se refiere al orden relativo de los elementos recombinantes solos. Por consiguiente, en una forma de realización, el orden es en la dirección 5’ a 3’ dentro del casete de expresión, desde al primer elemento recombinante (es decir, un elemento no HVT o heterólogo), tal como el promotor de mCMV IE, hasta el último elemento recombinante, tal como la señal de poliadenilación SV40, tal como es especificado. En una forma de realización, el orden de los elementos recombinantes sigue la dirección de transcripción del primer polinucleótido heterólogo.

[0070] En otro sentido, se comprenderá que en la presente el “orden” de los elementos recombinantes no se relaciona necesariamente con la dirección 5’ a 3’ de la hebra sentido (+) del genoma del vector de HVT. Se comprenderá que los elementos recombinantes/casete de expresión del vector de HVT recombinante de la presente invención se pueden insertar en cualquier dirección en el genoma del HVT. Por consiguiente, en una forma de realización, los elementos recombinantes se insertan en dirección 5’ a 3’ con relación a la hebra sentido del genoma del vector de HVT, y en dirección 3’ a 5’ con relación a la hebra antisentido del genoma del vector de HVT. En una forma de realización, los elementos recombinantes se insertan en dirección 5’ a 3’ con relación a la hebra antisentido del genoma del vector de HVT, y en dirección 3’ a 5’ con relación a la hebra sentido del genoma del vector de HVT. En una forma de realización ejemplificada en la presente, el vector de HVT recombinante comprende los elementos recombinantes 5’ a 3’ con relación a la hebra antisentido del genoma del vector de HVT recombinante.

[0071] Por lo tanto, en una forma de realización el "orden" de los elementos es el orden de los elementos 5' a 3' dentro del casete de expresión, por ejemplo la hebra sentido del casete de expresión. Por lo tanto, en una forma de realización el "orden" de los elementos es el orden de los elementos 5' a 3' dentro de la hebra antisentido del genoma del vector de HVT recombinante. En dichas formas de realización, la hebra antisentido del genoma del vector de HVT recombinante se puede definir como la hebra a partir de la cual no se expresan los genes que flanquean al casete de expresión, por ejemplo los genes HVT endógenos que flanquean al casete de expresión. Por lo tanto, en una forma de realización el "orden" de los elementos es el orden de los elementos comenzando a partir de la dirección de transcripción del primer polinucleótido heterólogo. En dichas formas de realización, la transcripción se puede definir como aquella capaz de expresar el primer antígeno aviar.

[0072] En la presente, se comprenderá que, a menos que se especifique de otra manera, cada referencia a un polinucleótido heterólogo, secuencia de polinucleótidos, secuencia de nucleótidos, ácido nucleico o términos equivalentes no solo abarca la secuencia de nucleótidos *per se*, sino también el complemento de dicha secuencia de nucleótidos, la inversa de dicha secuencia de nucleótidos y la inversa del complemento de dicha secuencia de nucleótidos. Dichas referencias abarcan además el ARN equivalente de dicha secuencia de nucleótidos, el complemento de ARN (o transcripto) de dicha secuencia de nucleótidos, la inversa del equivalente de ARN de dicha secuencia de nucleótidos y la inversa del complemento de ARN (o transcripto) de dicha secuencia de nucleótidos. A menos que se indique de otra manera,

dichas referencias abarcan además cualquier modificación o rutina o variación no sustancial de cualquiera de dichas secuencias, que son bien conocidas en el arte y que también se describen en la presente.

[0073] El término sitio “no esencial” es bien conocido en el arte de los vectores de HVT recombinantes, de los cuales hay muchos ejemplos específicos conocidos en el arte. En una forma de realización, un sitio no esencial incluye cualquier locus en el genoma del vector de HVT que no se encuentra dentro de una secuencia expresada (marco de lectura abierto, ORF) lo cual se requiere para la replicación viral. En una forma de realización, un sitio no esencial no se encuentre dentro de un ORF. Sin embargo, el especialista comprenderá que en una forma de realización puede haber un sitio no esencial dentro de un ORF que no es requerido para la replicación viral, tal como (sin considerar una teoría particular) dentro de los ORF US10, SORF3 o US2 de la región corta única (U_s) del genoma del vector de HVT. En una forma de realización, el sitio no esencial se selecciona entre cualquiera de: el locus UL44 (gC), el sitio ubicado entre los ORF UL44 y UL45, el sitio ubicado entre los ORF UL45 y UL46, el locus IG1, el locus IG2, el locus US2, el sitio ubicado entre los ORF US2 y SORF3, el locus SORF3, el sitio ubicado entre los ORF SORF3 y US10 o el locus US10. En una forma de realización preferida, el sitio de inserción se encuentra en una región intergénica del genoma del vector de HVT.

[0074] En una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, el sitio de inserción es un sitio IG1. En una forma de realización, el sitio se encuentra en la región intergénica 1 del genoma del vector de HVT. En una forma de realización, el sitio de inserción se encuentra

en un locus IG1 del genoma del vector de HVT. En una forma de realización, el locus IG1 se define como la región del genoma del vector de HVT entre el ATG del ORF UL55 y la unión de UL (la región larga única) con la región de repetición adyacente (como se describe en US 5.980.906).

[0075] En la presente, el primer y segundo polinucleótido que se insertan en el “mismo” sitio no esencial significa, como comprenderá el especialista, que el primer y segundo polinucleótido se insertan en el mismo sitio de inserción definido en el locus o la región, por ejemplo ambos polinucleótidos se insertarán en un sitio IG1 del genoma del vector de HVT. El especialista comprenderá bien y podrá tener en cuenta que la inserción de secuencias heterólogas puede dar como resultado la inserción o supresión de uno o más nucleótidos del genoma del vector de HVT o que no son del genoma del vector de HVT, que no representan variaciones significativas comprendidas en la presente invención. En una forma de realización, la primera y segunda secuencia de polinucleótidos se insertan en el mismo sitio de inserción en el sentido que la segunda secuencia de polinucleótidos está ligada operativamente al mismo promotor que la primera secuencia de polinucleótidos, tal como por medio de una secuencia IRES o P2A. En una forma de realización, la primera y segunda secuencia de polinucleótidos se insertan en el mismo sitio de inserción en el sentido que la segunda secuencia de polinucleótidos está ligada la primera secuencia de polinucleótidos, tal como por medio de una secuencia IRES o P2A. En una forma de realización, la primera y segunda secuencia de polinucleótidos se insertan en el mismo sitio de inserción en el sentido que no hay sustancialmente ADN genómico del vector de HVT entre la primera y la segunda secuencia de polinucleótidos

heteróloga.

[0076] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante tiene la capacidad para expresar el primer y segundo antígeno aviar (por ejemplo, el antígeno adicional y el antígeno AIV H9-HA, respectivamente). En una forma de realización, “que expresan de manera estable” significa que ambos antígenos aviares todavía se expresan aún después de efectuar pasajes, tal como pasajes celulares *in vitro*. En una forma de realización, “que expresan de manera estable” significa que ambos antígenos aviares todavía se expresan después de varios pasajes, por ejemplo por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14 o por lo menos 15 pasajes. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante es estable durante por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14 o por lo menos 15 pasajes de pasajes celulares *in vitro*.

[0077] En una forma de realización, “que expresan de manera estable” significa que el nivel de expresión de ambos antígenos aviares permanece esencialmente sin cambios. En una forma de realización, “que expresan de manera estable” significa que el nivel de expresión de ambos antígenos aviares es esencialmente el mismo que el nivel de expresión antes de (cualquier) pasaje. En una forma de realización, “que expresan de manera estable” significa que el nivel de expresión de ambos antígenos aviares tienen la capacidad para inducir una protección heteróloga *in vivo* (por ejemplo, en un ave, tal como un pollo) contra los patógenos aviares de los cuales derivan los antígenos.

[0078] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora contra el AIV y contra el patógeno del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero). En una forma de realización, el patógeno del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero) es NDV. En una forma de realización, el patógeno del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero) es IBDV. Tal como se ha mencionado en toda la presente, el antígeno aviar adicional preferiblemente es el primer antígeno aviar codificado por el primer polinucleótido heterólogo definido en la presente.

[0079] El vector de HVT recombinante de la invención se puede usar como una vacuna contra ambos MDV y AIV, que se puede administrar a un ave para inducir protección contra el MDV (por medio de la presencia del genoma del vector de HVT) y protección heteróloga contra el AIV. En una forma de realización del vector de HVT recombinante de la invención, dicho vector de HVT recombinante tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora contra el AIV. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora contra un patógeno heterólogo adicional. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora contra NDV. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora contra IBDV. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora contra el AIV y también contra NDV o IBDV. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante tiene la capacidad para inducir una

respuesta inmunológica protectora contra MDV, AIV y también contra NDV o IBDV. En una forma de realización, la respuesta inmunológica protectora comprende una reducción de los signos clínicos causados por MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV. En una forma de realización, los signos clínicos son signos respiratorios. En una forma de realización, la respuesta inmunológica protectora comprende reducir la diseminación causada por AIV en un ave. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante de la invención tiene la capacidad para reducir la diseminación causada por AIV en un ave. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante de la invención tiene la capacidad para reducir la diseminación causada por AIV en un ave después de una infección por AIV o un desafío con el mismo. En una forma de realización, la respuesta inmunológica protectora comprende reducir los signos clínicos causados por MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV, así como reducir la diseminación causada por AIV. En una forma de realización, la reducción se relaciona con los signos clínicos de un ave equivalente no vacunado, tal como un ave que no ha recibido una vacuna con MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV y que ha sido infectado o sometido a un desafío con NDV y/o AIV y/o IBDV o NDV.

[0080] En la presente, en una forma de realización, se comprenderá que “MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV” se refieren al vector de HVT recombinante que proporciona protección etc. contra MDV debido a la presencia del genoma del vector de HVT y protección heteróloga contra el AIV debido a la presencia del antígeno AIV (es decir, AIV H9-HA), así como protección heteróloga contra un patógeno aviar adicional del cual deriva el antígeno codificado por el polinucleótido heterólogo adicional (por ejemplo, el primero) (por ejemplo, que puede ser IBDV o NDV). Por consiguiente, en la presente “MDV y/o AIV y/o

IBDV o NDV” se utiliza indistintamente con “MDV y/o AIV y/o el patógeno aviar del cual deriva el antígeno codificado por el polinucleótido heterólogo adicional (por ejemplo, el primero)”.

[0081] En una forma de realización del vector de HVT recombinante de la invención, una dosis del vector de HVT recombinante tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora contra MDV y/o AIV y/o NDV o IBDV. En una forma de realización, esto significa que se inducirá una respuesta inmunológica protectora contra MDV y/o AIV y/o NDV o IBDV en un ave que (solo) ha recibido una única administración del vector de HVT recombinante de la invención. En una forma de realización, esto significa que se inducirá una respuesta inmunológica protectora contra MDV y/o AIV y/o NDV o IBDV en un ave que (solo) ha recibido una única administración de cualquier vacuna o antígeno MDV y/o AIV y/o NDV o IBDV, en donde dicha administración única comprende el vector de HVT recombinante de la invención. Por consiguiente, se comprenderá que en una forma de realización una sola dosis del vector recombinante tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora contra MDV y/o AIV y/o NDV o IBDV. En una forma de realización, se comprenderá que la respuesta inmunológica protectora es inducida (solo) cuando se ha administrado una única dosis del vector de HVT recombinante de la invención. En una forma de realización, “una dosis” significa que no es necesario una segunda dosis o una dosis adicional del vector de HVT recombinante de la invención para la inducción de la respuesta inmunológica protectora. En una forma de realización, “una dosis” significa que no es necesario una segunda dosis o una dosis adicional de cualquier vacuna o antígeno MDV y/o AIV y/o NDV o IBDV para la inducción de la respuesta

inmunológica protectora. En una forma de realización “una dosis” significa que el ave no ha sido cebado contra el o los mismos patógenos aviares con los cuales se relaciona la invención. Por ejemplo, el ave no ha sido cebado con la mismas vacuna, vector o antígeno con los cuales se relaciona la invención, o con cualquier otro tipo de antígeno (por ejemplo, vacuna muerta, vacuna de subunidades, etc.). En una forma de realización, dicha una dosis comprende aproximadamente $6,0 \log_{10}$ EID₅₀ o 2500 PFU o $3,4 \log_{10}$ PFU.

[0082] En una forma de realización del vector de HVT recombinante de la invención, el vector de HVT recombinante tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora contra MDV y/o AIV y/o NDV o IBDV cuando es administrado a un ave de seis o menos días de vida, cinco o menos días de vida, cuatro o menos días de vida, tres o menos días de vida, dos o menos días de vida, uno o menos días de vida o de un día de vida. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante de la invención tendrá la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora contra MDV y/o AIV y/o NDV o IBDV, aún cuando es administrado a un ave de un día de vida.

[0083] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante de la invención tiene la capacidad para inducir o induce una respuesta inmunológica protectora contra IBDV a las 3 semanas de posvacunación. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante de la invención tiene la capacidad para inducir o induce una respuesta inmunológica protectora contra IBDV a las 4 semanas de posvacunación. En formas de realización preferidas de este tipo, el vector de HVT recombinante comprende un primer polinucleótido heterólogo que codifica un antígeno IBDV, preferiblemente un antígeno IBDV VP2.

[0084] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante de la

invención tiene la capacidad para inducir o induce una protección completa contra NDV. En una forma de realización, una protección completa significa que ningún desafío o infección por NDV subsiguiente induce cualquier signo clínico. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante de la invención tiene la capacidad para inducir o induce un 100% de protección contra un desafío o infección por NDV a los 21 días después de la vacunación. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante de la invención tiene la capacidad para inducir o induce un 100% de protección contra un desafío o infección por NDV con la cepa MALAYSIAN MAL04-01 a los 21 días después de la vacunación. En formas de realización preferidas de este tipo, el vector de HVT recombinante comprende un primer polinucleótido heterólogo que codifica un antígeno NDV, preferiblemente un antígeno NDV F.

[0085] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante de la invención es vHVT513. En una forma de realización, el vHVT513 se define como un vector de HVT recombinante que comprende un primer polinucleótido heterólogo que codifica un antígeno IBDV VP2 y un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un antígeno AIV H9-HA, en donde el primer polinucleótido heterólogo está ligado operativamente a un promotor de mCMV IE, el segundo polinucleótido heterólogo está ligado por una secuencia IRES al primer polinucleótido heterólogo, y ambos primer y segundo polinucleótido heterólogo están comprendidos en el mismo sitio en el genoma del vector de HVT que es un sitio IG1. En una forma de realización, el vHVT513 se define como un vector de HVT recombinante que comprende una secuencia recombinante que comprende o que consiste en una secuencia que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 3 o un fragmento de la misma. En una forma de realización, el vHVT513 se define como un vector de HVT recombinante que comprende o que consiste en una secuencia que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 4 o un fragmento de la misma.

[0086] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante de la invención es vHVT514. En una forma de realización, el vHVT514 se define como un vector de HVT recombinante que comprende un primer polinucleótido heterólogo que codifica un antígeno NDV F y un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un antígeno AIV H9-HA, en donde el primer polinucleótido heterólogo está ligado operativamente a un promotor de mCMV IE, el segundo polinucleótido heterólogo está ligado por una secuencia IRES al primer polinucleótido heterólogo, y ambos primer y segundo polinucleótido heterólogo están comprendidos en el mismo sitio en el genoma del vector de HVT que es un sitio IG1. En una forma de realización, el vHVT514 se define como un vector de HVT recombinante que comprende una secuencia recombinante que comprende o que consiste en una secuencia que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 6 o un fragmento de la misma. En una forma de realización, el vHVT514 se define como un vector de HVT recombinante que comprende o que consiste en una secuencia que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 7 o un fragmento de la misma.

[0087] En una forma de realización, la señal de poliadenilación SV40 al que se hace referencia en la presente comprende o consiste en una secuencia que presenta un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 13 o un fragmento de la misma.

[0088] Los vectores recombinantes de la invención comprenden un polinucleótido que codifica un antígeno aviar adicional de un organismo patógeno distinto de la gripe aviar. En las formas de realización, el polinucleótido adicional codifica un antígeno NDV o un antígeno del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV). En las formas de realización, los vectores recombinantes comprenden un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína de fusión NDV (NDV-F). En las formas de realización, los vectores recombinantes comprenden un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína de la cápside IBDV VP2 (IBDV VP2).

[0089] En las formas de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno NDV-F comprende por lo menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID N°: 11 que codifica la proteína NDV-F, o cualquier fragmento de la misma. En las formas de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno NDV-F codifica un polipéptido NDV-F que comprende por lo menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID N°: 5, o cualquier fragmento de la misma.

[0090] En las formas de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno IBDV VP2 comprende por lo menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID N°: 10 que codifica la proteína de la cápside IBDV VP2, o cualquier fragmento de la misma. En las formas de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno IBDV VP2 codifica un polipéptido IBDV VP2 que comprende por lo menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID N°: 2, o cualquier fragmento de la misma.

[0091] En las formas de realización, los vectores recombinantes comprenden un vector de esqueleto HVT. En las formas de realización, el esqueleto del vector es de una cepa FC126 HVT (Igarashi, T., et al., "Restriction enzyme map of herpesvirus of turkey DNA and its collinear relationship with Marek's disease virus DNA"; Virology 157.2 (1987): 351-358).

Otras formas específicas

[0092] En un segundo aspecto, la presente invención provee una molécula de ácido nucleico que comprende el vector de HVT recombinante de la invención.

[0093] En un tercer aspecto, la presente invención provee un casete de expresión de antígenos que comprende los siguientes elementos:

- (a) opcionalmente, un promotor de mCMV IE;
- (b) un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar;
- (c) opcionalmente, una secuencia IRES o P2A;
- (d) un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar; y

(e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40;

en donde el primer o segundo antígeno aviar es un antígeno AIV, preferiblemente un antígeno AIV H9-HA.

[0094] En una forma de realización, la presente invención provee un casete de expresión de antígenos que comprende los siguientes elementos:

(a) opcionalmente, un promotor de mCMV IE;

(b) un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar;

(c) opcionalmente, una secuencia IRES o P2A;

(d) un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar que es un antígeno AIV, preferiblemente un antígeno AIV H9-HA; y

(e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40.

[0095] En una forma de realización, la presente invención provee un casete de expresión de antígenos que comprende los siguientes elementos:

(a) un promotor de mCMV IE;

(b) un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar;

(c) opcionalmente, una secuencia IRES o P2A;

(d) un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar que es un antígeno AIV, preferiblemente un antígeno AIV H9-HA; y

(e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40.

[0096] En una forma de realización, la presente invención provee un casete de expresión de antígenos que comprende los siguientes elementos:

- (a) un promotor de mCMV IE;
- (b) un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar;
- (c) opcionalmente, una secuencia IRES o P2A;
- (d) un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar que es un antígeno AIV, preferiblemente un antígeno AIV H9-HA; y
- (e) una señal de poliadenilación SV40.

[0097] Como alternativa, o además, en un tercer aspecto, la presente invención provee un casete de expresión de antígenos que comprende en el siguiente orden, en dirección 5' a 3':

- (a) opcionalmente, un promotor de mCMV IE;
- (b) un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar;
- (c) opcionalmente, una secuencia IRES o P2A;
- (d) un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar que es un antígeno AIV, preferiblemente un antígeno AIV H9-HA; y
- (e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40.

[0098] En una forma de realización, la presente invención provee un casete de expresión de antígenos que comprende en el siguiente orden, en dirección 5' a 3':

- (a) un promotor de mCMV IE;
- (b) un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar;

- (c) opcionalmente, una secuencia IRES o P2A;
- (d) un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar que es un antígeno AIV, preferiblemente un antígeno AIV H9-HA; y
- (e) opcionalmente, una señal de poliadenilación SV40.

[0099] En una forma de realización, la presente invención provee un casete de expresión de antígenos que comprende en el siguiente orden, en dirección 5' a 3':

- (a) un promotor de mCMV IE;
- (b) un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar;
- (c) opcionalmente, una secuencia IRES o P2A;
- (d) un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar que es un antígeno AIV, preferiblemente un antígeno AIV H9-HA; y
- (e) una señal de poliadenilación SV40.

[00100] En una forma de realización, la presente invención provee un casete de expresión de antígenos que comprende en el siguiente orden, en dirección 5' a 3':

- (a) un promotor de mCMV IE;
- (b) un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar;
- (c) una secuencia IRES;
- (d) un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar que es un antígeno AIV, preferiblemente un antígeno AIV H9-

HA; y

- (e) una señal de poliadenilación SV40.

[00101] En una forma de realización, la presente invención provee un casete de expresión de antígenos que comprende en el siguiente orden, en dirección 5' a 3':

- (a) un promotor de mCMV IE;
- (b) un primer polinucleótido heterólogo que codifica un primer antígeno aviar;
- (c) una secuencia P2A;
- (d) un segundo polinucleótido heterólogo que codifica un segundo antígeno aviar que es un antígeno AIV, preferiblemente un antígeno AIV H9-HA; y
- (e) una señal de poliadenilación SV40.

[00102] Tal como se ha mencionado en la presente, el "orden" 5' a 3' se relaciona con el orden de los elementos recombinantes en el casete de expresión, y no es necesariamente con relación a la dirección 5' a 3' de la hebra sentido del genoma del vector de HVT. En una forma de realización, el casete tiene la capacidad para expresar dos antígenos aviares. En una forma de realización, el casete solo tiene la capacidad para expresar dos antígenos aviares. Se comprenderá que en la presente los dos antígenos aviares son aquellos codificados por el primer polinucleótido heterólogo (por ejemplo un antígeno IBDV VP2 o NDV F) y aquellos codificados por el segundo polinucleótido heterólogo (por ejemplo, un antígeno AIV o un antígeno AIV H9-HA).

[00103] En un cuarto aspecto, la presente invención provee una

célula que comprende el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico o el casete de expresión de la invención.

Composiciones

[00104] En un quinto aspecto, la presente invención provee una composición que comprende el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión o la célula de la invención.

[00105] La presente invención también provee composiciones y vacunas inmunogénicas que comprenden cualquiera de los vectores recombinantes que se describen en la presente. En las formas de realización, los vectores virales recombinantes de la presente invención se pueden utilizar en composiciones y vacunas inmunogénicas para generar una respuesta inmunológica contra, y/o proveen animales con protección contra, MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV.

[00106] En algunas formas de realización, las composiciones inmunogénicas son eficaces para generar, inducir y/o estimular una respuesta inmunológica en un animal, tal como un ave, cuando son administradas a dicho animal. En las formas de realización, las composiciones inmunogénicas de la presente invención se formulan de manera tal que son seguras y eficaces para generar inmunidad contra MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV cuando son administradas a un animal.

[00107] En algunas formas de realización, las vacunas son eficaces para generar, inducir y/o estimular una respuesta inmunológica protectora en un animal, tal como un ave, cuando son administradas a dicho animal. En las formas de realización, las vacunas de la presente invención se formulan de manera tal que son seguras y eficaces para generar inmunidad

protectora contra MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV cuando son administradas a un animal.

[00108] En las formas de realización, las composiciones y vacunas inmunogénicas comprenden un vehículo, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente o veterinariamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente o veterinariamente aceptables adecuados incluyen una solución al 0,9% de NaCl (por ejemplo, salina), solución amortiguadora con fosfato, poli-(L-glutamato), diluyente para inyectables de Ringer lactato (cloruro de sodio, lactato de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio) y polivinilpirrolidona. Los ejemplos de adyuvantes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables incluyen, (1) polímeros de acrílico o ácido metacrílico, anhídrido maleico y polímeros derivados de alqueno, (2) secuencias inmunoestimulantes (ISS), tales como secuencias de oligodeoxirribonucleótidos que tienen una o más unidades de CpG no metiladas, (3) una emulsión de aceite en agua, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, por ejemplo, citoquinas DDA (5), (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio y/o (7) saponina.

[00109] En las formas de realización, las composiciones y vacunas inmunogénicas se formulan para su administración a un animal, tal como un ave. En las formas de realización, las composiciones y vacunas inmunogénicas se formulan para su administración por una o más de las siguientes rutas: aerosol (pulverizador), ocular, nasal, oculonasal, oral, inyección subcutánea y/o inyección intramuscular. En una forma de realización preferida, las composiciones y vacunas inmunogénicas se formulan para su administración mediante inyección subcutánea.

[00110] En las formas de realización, las composiciones y vacunas inmunogénicas pueden contener un título de vector recombinante de entre 10^2 y 10^3 , entre 10^3 y 10^4 , entre 10^4 y 10^5 , entre 10^5 y 10^6 , entre 10^6 y 10^7 , entre 10^7 y 10^8 , entre 10^8 y 10^9 , entre 10^9 y 10^{10} , entre 10^3 y 10^8 , entre 10^4 y 10^8 o entre 10^5 y 10^7 , por dosis. El vector recombinante se puede titular basado en cualquier método de titulación de virus que incluyen, pero en un sentido no taxativo, FFA (Ensayo de formación de focos) o FFU (Unidad formadora de focos), TCID₅₀ (dosis infectiva de 50% del cultivo celular), EID₅₀ (dosis infectiva del 50% de huevos), PFU (Unidades formadoras de placas) y FAID₅₀ (dosis infecciosa con anticuerpos fluorescentes al 50%). En las formas de realización, los volúmenes de las dosis pueden ser de entre 0,01 y 10 ml, entre 0,01 y 5 ml, entre 0,01 y 1 ml o entre 0,01 y 0,5 ml.

Métodos, aplicaciones y usos

[00111] En un sexto aspecto, la presente invención provee el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión, la célula o la composición de la invención, para usar en un método de inducción de una respuesta inmunológica protectora contra el AIV, que es el patógeno del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero) y/o el MDV en un ave.

[00112] Como alternativa en un sexto aspecto, la presente invención provee el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, la célula o la composición de la invención, para usar en un método de inducción de una respuesta inmunológica protectora contra el AIV, el patógeno del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero) y/o MDV en un ave.

[00113] En un séptimo aspecto, la presente invención provee un método de inducción de una respuesta inmunológica protectora contra el AIV, que es el patógeno del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero) y/o el MDV en un ave, que comprende administrar el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión, la célula o la composición de la invención al ave.

[00114] Como alternativa en un séptimo aspecto, la presente invención provee un método de inducción de una respuesta inmunológica protectora contra el AIV, el patógeno del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero) y/o MDV en un ave, que comprende administrar el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, la célula o la composición de la invención al ave.

[00115] En un octavo aspecto, la presente invención provee el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión, la célula o la composición de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para inducir una respuesta inmunológica protectora contra el AIV, donde el patógeno aviar del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero) y/o el MDV en un ave.

[00116] Como alternativa en un octavo aspecto, la presente invención provee el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, la célula o la composición de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para inducir una respuesta inmunológica protectora contra el AIV, el patógeno del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero) y/o MDV en un ave.

[00117] En una forma de realización, la inducción de una respuesta

inmunológica protectora comprende reducir los signos clínicos asociados con una infección por AIV, el patógeno del cual deriva el antígeno aviar adicional (por ejemplo, el primero) y/o MDV en un ave. En una forma de realización, los signos clínicos son signos clínicos respiratorios.

[00118] En un noveno aspecto, la presente invención provee el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión, la célula o la composición de la invención, para usar en un método para reducir la diseminación del AIV en un ave.

[00119] Como alternativa en un noveno aspecto, la presente invención provee el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, la célula o la composición de la invención, para usar en un método para reducir la diseminación del AIV en un ave.

[00120] En un décimo aspecto, la presente invención provee un método para reducir la diseminación del AIV en un ave, que comprende administrar el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión, la célula o la composición de la invención a dicha ave.

[00121] Como alternativa en un décimo aspecto, la presente invención provee un método para reducir la diseminación del AIV en un ave, que comprende administrar el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, la célula o la composición de la invención a dicha ave.

[00122] En un undécimo aspecto, la presente invención provee el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, el casete de expresión, la célula o la composición de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para reducir la diseminación del AIV en un ave.

[00123] Como alternativa en un undécimo aspecto, la presente invención provee el vector de HVT recombinante, la molécula de ácido nucleico, la célula o la composición de la invención, para usar en la elaboración de un medicamento para reducir la diseminación del AIV en un ave.

[00124] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante se administra una vez. En una forma de realización, esto significa que el vector de HVT recombinante solo se administra una vez. En una forma de realización, esto significa que no se realiza una segunda/otra administración del vector de HVT recombinante. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante se administra una vez y la respuesta inmunológica protectora se obtiene después de dicha administración única. En otra forma de realización, esto significa que la administración inicial del vector de HVT recombinante solo comprende una dosis para inducir una respuesta inmunológica protectora, pero que no se excluya la administración de una o más administraciones de refuerzo que comprenden dosis adicionales en una fecha sustancialmente posterior. En una forma de realización, dicha una dosis comprende aproximadamente $6,0 \log_{10}$ EID₅₀ o 2500 PFU o $3,4 \log_{10}$ PFU.

[00125] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante se administra a un ave a los seis o menos días de vida, cinco o menos días de vida cuatro o menos días de vida, tres o menos días de vida, dos o menos días de vida, uno o menos días de vida o un día de vida. En una forma de realización, el vector de HVT recombinante de la invención se administra a un ave de uno día de vida e induce una respuesta inmunológica protectora contra MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV.

[00126] En una forma de realización preferida, el vector de HVT

recombinante se administra por vía subcutánea.

[00127] En una forma de realización, el vector de HVT recombinante se administra a un ave, tal como a un pollo, que es positivo para anticuerpos anti-AIV H9-HA adquiridos de manera pasiva. En una forma de realización, los anticuerpos anti-AIV H9-HA adquiridos de manera pasiva derivan de anticuerpos derivados por vía materna (MDA). En una forma de realización, el vector de HVT recombinante tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora contra el subtipo H9 de AIV en un ave que es positivo para los anticuerpos anti-AIV H9-HA adquiridos de manera pasiva, tales como AIV H9-HA MDA. En una forma de realización, sustancialmente no hay evidencia de interferencia inmunológica entre los anticuerpos anti-AIV H9 HA adquiridos de manera pasiva en el ave y la respuesta inmunológica protectora generada por el vector de HVT recombinante de la invención. En una forma de realización, el nivel promedio de H9-HA MDA el día de la vacunación D0 es de por lo menos 2,00 log₁₀, 2,50 log₁₀, 2,75 log₁₀, 3,00 log₁₀, 3,25 log₁₀, 3,50 log₁₀, 3,75 log₁₀, que fue evaluado usando la prueba HI (basado, por ejemplo, en Kaufmann, L *et al.*, JoVE 130: e55833 (2017)) con el antígeno A/pollo/Irak/AV1342/2011 (Irak). En una forma de realización, el nivel promedio de H9-HA MDA el día de la vacunación D0 es de 2,00 log₁₀, 2,50 log₁₀, 2,75 log₁₀, 3,00 log₁₀, 3,25 log₁₀, 3,50 log₁₀, 3,75 log₁₀, que se evaluó usando la prueba HI con el antígeno A/pollo/Irak/AV1342/2011 (Irak).

[00128] La presente invención también provee métodos de inmunización, métodos para generar una respuesta inmunológica y métodos para generar una respuesta inmunológica protectora en un animal usando cualquiera entre los vectores recombinantes, las composiciones inmunogénicas

y/o las vacunas que se describen en la presente. En las formas de realización, el animal es un ave. En las formas de realización, el animal es un pollo.

[00129] En las formas de realización, los métodos comprenden administrar a un animal un vector recombinante de acuerdo con la presente invención.

[00130] En las formas de realización, los métodos comprenden administrar a un animal una composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención. En las formas de realización, los métodos son eficaces para generar, inducir y/o estimular una respuesta inmunológica contra MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV en un animal.

[00131] En las formas de realización, los métodos comprenden administrar a un animal una vacuna que comprende una cantidad eficaz de un vector recombinante de acuerdo con la presente invención. En las formas de realización, el animal está vacunado/inmunizado contra MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV. En las formas de realización, los métodos son eficaces para generar, inducir y/o estimular una respuesta inmunológica protectora contra MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV en un animal, y de esa manera reducir y/o prevenir los signos clínicos asociados con una exposición infección, desafío y/o enfermedad subsiguiente a MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV, en el animal, con relación a un animal control de la misma especie no vacunada. En las formas de realización, la respuesta inmunológica protectora es eficaz para proveerle al animal protección contra una subsiguiente infección o desafío por MDV y/o AIV y/o IBDV o NDV, y la enfermedad y los signos clínicos asociados con los mismos.

[00132] En las formas de realización, los vectores recombinantes, las composiciones inmunogénicas y/o las vacunas se pueden administrar *in*

ovo entre 1 y 4 días antes de la eclosión. En las formas de realización, los vectores recombinantes, las composiciones inmunogénicas y/o las vacunas se pueden administrar a un pollo de 1 día de vida, 2 días de vida, 3 días de vida, 4 días de vida, 5 días de vida, 6 días de vida, 7 días de vida, 8 días de vida, 9 días de vida, 10 días de vida, 11 días de vida, 12 días de vida, 13 días de vida, 14 días de vida, 15 días de vida, 16 días de vida, 17 días de vida, 18 días de vida, 19 días de vida, 20 días de vida o 21 días de vida. Se puede utilizar una variedad de rutas de administración tales como aerosol (pulverización), ocular, nasal, oculonasal, oral, inyección subcutánea e inyección intramuscular. En una forma de realización, las rutas de administración se utilizan en pollos de 1 día de vida.

[00133] En una forma de realización, los animales a quienes se administran los vectores de HVT recombinantes de la invención son pollos. En una forma de realización, los animales son pollos SPF. En una forma de realización, los animales son pollos SPF de 1 día de vida.

Métodos de elaboración

[00134] En un duodécimo aspecto, la presente invención provee un método de elaboración del vector de HVT recombinante de la invención, en donde dicho método comprende:

- a) proveer un ácido nucleico que codifica un vector de HVT;
- b) proveer uno o más casetes de expresión que comprenden secuencias que codifican un primer antígeno aviar, y un segundo antígeno aviar, en donde el primer o segundo antígeno aviar es un antígeno AIV H9-HA;
- y
- c) combinar de manera recombinante el ácido nucleico que codifica

un vector de HVT y dichos uno o más casetes de expresión, de manera tal que las secuencias que codifican el primer antígeno aviar y el segundo antígeno aviar están comprendidos en el mismo sitio no esencial en el genoma del vector de HVT.

[00135] Para evitar toda duda, en una forma de realización, los pasos del método a), b) y c) típicamente se encuentran en este orden (paso a) seguido por el paso b) seguido por el paso c)).

[00136] En una forma de realización, el paso c) comprende combinar de manera recombinante un genoma del vector de HVT con un primer casete de expresión que comprende una secuencia que codifica un primer antígeno aviar y un segundo casete de expresión que comprende una secuencia que codifica un segundo antígeno aviar.

[00137] En una forma de realización, el paso c) comprende combinar de manera recombinante un genoma del vector de HVT recombinantes con un primer casete de expresión que comprende una secuencia que codifica un primer antígeno aviar y un segundo casete de expresión que comprende una secuencia que codifica un segundo antígeno aviar.

[00138] En una forma de realización, el paso c) comprende combinar de manera recombinante un genoma del vector de HVT con un casete de expresión que comprende una secuencia que codifica un primer antígeno aviar que codifica un primer antígeno aviar, que además comprende una secuencia que codifica un segundo antígeno aviar.

[00139] En una forma de realización, el paso c) comprende combinar de manera recombinante un vector de HVT recombinante que

comprende una secuencia que codifica un primer antígeno aviar con un casete de expresión que comprende una secuencia que codifica un segundo antígeno aviar.

[00140] En una forma de realización, el paso c) comprende combinar de manera recombinante un genoma del vector de HVT recombinante que comprende una secuencia que codifica un segundo antígeno aviar con un casete de expresión que comprende una secuencia que codifica un primer antígeno aviar.

[00141] En una forma de realización preferida de este aspecto y estas formas de realización, el primer antígeno aviar es diferente del segundo antígeno aviar. Preferiblemente, el segundo antígeno aviar es el antígeno AIV H9-HA.

[00142] En las formas de realización, los métodos comprenden insertar un polinucleótido que codifica un antígeno H9 de la gripe aviar en un vector con esqueleto HVT. En las formas de realización, el antígeno H9 es de la cepa A/aviar/Arabia Saudita/910135/2006(H9N2). En las formas de realización, el polinucleótido que codifica el antígeno H9 es de codones optimizados.

[00143] En las formas de realización, los métodos comprenden además insertar un promotor en el esqueleto del vector. En las formas de realización, el polinucleótido que codifica el primer antígeno aviar está ligado operativamente a un promotor, y la expresión del primer antígeno aviar está regulada por el promotor. En las formas de realización, el promotor es un promotor de mCMV IE.

[00144] En las formas de realización, los métodos comprenden

además insertar una secuencia IRES o P2A en el esqueleto del vector. En las formas de realización, la secuencia IRES o P2A une al polinucleótido que codifica el primer antígeno aviar con el polinucleótido que codifica el segundo antígeno aviar.

[00145] En las formas de realización, los métodos comprenden además insertar una señal de poliadenilación (poliA) en el esqueleto del vector. En las formas de realización, la señal poliA es una cola poliA del virus 40 de simio (SV40) (SV40). En las formas de realización, la señal poliA se inserta corriente abajo del polinucleótido que codifica el segundo antígeno aviar.

Definiciones generales

[00146] A menos que se los defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se emplean en la presente tienen el mismo significado que comúnmente les dan los especialistas en el arte de la invención. Los términos en singular “un”, “uno/una” y “el/la” incluyen las referencias en plural, a menos que del contexto surja claramente lo contrario. De manera similar, se pretende que la palabra “o” incluya “y” a menos que el contexto claramente indique lo contrario.

[00147] Se hace notar que esta divulgación puede contener los términos “que comprende”, “que consiste esencialmente en” y “que consiste en”, y variantes de los mismos, y que estos términos tienen el significado que se les atribuye en la Ley de Patentes de los EEUU. Se comprenderá que siempre que en la presente las formas de realización se describan con la frase “que comprende”, también se proveen formas de realización análogas que se describen en términos de “que consiste esencialmente en” y/o “que consiste en”.

[00148] Tal como se usa en la presente, el término "aproximadamente" significa cerca de, en el ámbito de, más o menos o alrededor de. Cuando el término "aproximadamente" se usa junto con un rango numérico, modifica dicho rango extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "aproximadamente" se usa en la presente para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido con una variación del 10%. Por ello, aproximadamente 50 significa en el rango de 45-55. Los rangos numéricos indicados en la presente por los puntos extremos incluyen todos los números y las fracciones incluidos dentro de dicho rango (por ejemplo, entre 1 y 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,90, 4 y 5).

[00149] Tal como se usa en la presente, un "adyuvante" es una sustancia que puede favorecer o amplificar la cascada de eventos inmunológicos, que en última instancia conduce a una mejor respuesta inmunológica (por ejemplo, la respuesta corporal integrada a un antígeno). En general, no se requiere un adyuvante para que tenga lugar la respuesta inmunológica, pero favorece o amplifica esta respuesta.

[00150] Tal como se usa en la presente, los términos "antígeno" o "inmunógeno" se refieren a una sustancia que induce una respuesta inmunológica específica en un huésped animal (por ejemplo, una respuesta inmunológica de tipo humoral y/o celular dirigida contra el antígeno). El antígeno puede ser un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o porción de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una porción o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmunológica luego de su presentación en un

animal huésped; un polipéptido, un epítopo, un hapteno y semejantes.

[00151] Tal como se usa en la presente, el término “aviar” incluye, por ejemplo, un pollo, pollito, pollo de engorde, capón, pato, ganso, pavo, urogallo, codorniz, cisne, pichón, paloma, faisán, loro, pinzón, halcón, cuervo, avestruz, emú y casuario. El término “ave” también incluye un ave individual en todas las etapas del desarrollo, inclusive las etapas embrionaria y fetal. En una forma de realización preferida, un ave es un pollo.

[00152] Tal como se usa en la presente, el término “vehículo” se refiere a un solvente o diluyente en el cual se formula y/o administra un vector recombinante. Los vehículos farmacéuticamente y veterinariamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y/o aceites. Los ejemplos de vehículos a base de aceite adecuados pueden incluir aceites de petróleo, aceites animales, aceites vegetales y aceites de origen sintético (por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, etc.). Los ejemplos de vehículos acuosos adecuados pueden incluir agua y soluciones acuosas (por ejemplo, solución salina acuosa, solución de dextrosa acuosa, solución de glicerol, etc.).

[00153] Se comprenderá que en la presente los “fragmentos de los mismos” se relacionan con secuencias de polipéptidos o polinucleótidos que tienen una función equivalente a la secuencia de polipéptidos o polinucleótidos con respecto al definido por el SEQ ID NO. En una forma de realización, una función equivalente significa que un fragmento de polinucleótido codifica un antígeno AIV H9-HA. En una forma de realización con respecto a las secuencias del antígeno AIV H9-HA, la función equivalente significa que un fragmento de polipéptido comprende un antígeno AIV H9-HA. En una forma de

realización, un antígeno AIV H9-HA se define como una secuencia que tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica, preferiblemente una respuesta inmunológica protectora, contra el AIV, preferiblemente H9N2 AIV. En una forma de realización con respecto a las secuencias promotoras del mCMV IE, la función equivalente significa que el fragmento de polipéptido comprende un fragmento promotor funcional. En una forma de realización, un fragmento promotor funcional se define como una secuencia que tiene la capacidad para inducir un nivel de expresión similar o equivalente al nivel del promotor de mCMV IE. En una forma de realización con respecto a las secuencias del antígeno IBDV VP2, la función equivalente significa que un fragmento de polipéptido comprende un antígeno IBDV VP2. En una forma de realización, un antígeno IBDV VP2 se define como una secuencia que tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica, preferiblemente una respuesta inmunológica protectora, contra IBDV. En una forma de realización con respecto a las secuencias del antígeno NDV F, la función equivalente significa que un fragmento de polipéptido comprende un antígeno NDV F. En una forma de realización, un antígeno NDV F se define como una secuencia que tiene la capacidad para inducir una respuesta inmunológica, preferiblemente una respuesta inmunológica protectora, contra NDV.

[00154] Tal como se usa en la presente, el término “gen” se usa en un sentido amplio para hacer referencia a cualquier segmento de polinucleótido asociado con una función biológica.

[00155] Tal como se usa en la presente, el término “genoma” se refiere a la información genética heredable de un organismo huésped. El genoma contemplado en la presente invención se refiere al ADN o ARN de un

virus u organismo patógeno. El ARN puede ser un ARN de hebra positiva o de hebra negativa. En una forma de realización con respecto al HVT, el genoma es ADNhd.

[00156] Tal como se usa en la presente, el término "heterólogo", significa que deriva de una entidad genéticamente distinta del resto de la entidad con la cual se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido se puede ubicar mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector que deriva de una fuente diferente y es un polinucleótido heterólogo. Un promotor que fue separado de su secuencia codificante nativa y ligada operativamente a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es un promotor heterólogo.

[00157] Tal como se usa en la presente, los términos "identidad" e "identidad de secuencia" se refieren a la relación entre dos o más secuencias, a saber, una secuencia de referencia y una secuencia dada que se comparará con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina mediante comparación de la secuencia dada con la secuencia de referencia después de haber alineado las secuencias de manera óptima para producir el mayor grado de similitud de secuencia, determinada por la coincidencia entre las hebras de dichas secuencias. Tras dicho alineamiento, se determina la identidad de secuencia en una base de posición-a-posición, por ejemplo, las secuencias son "idénticas" en una posición particular si, en dicha posición, los nucleótidos/aminoácidos son idénticos. El número total de dichas identidades de posición se divide luego por el número total de nucleótidos/aminoácidos en la más corta de las dos secuencias para obtener el % de identidad de secuencia. La identidad de secuencia se puede calcular fácilmente mediante

métodos conocidos que incluyen, pero en un sentido no taxativo, los que se describen en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia están diseñados para obtener la mayor coincidencia posible entre las secuencias evaluadas. Los métodos para determinar la identidad de secuencia también están codificados en programas para computadora disponibles al público que permiten determinar la identidad de secuencia entre secuencias dadas.

[00158] Tal como se usa en la presente, el término “composición inmunogénica” se refiere a una composición que comprende por lo menos un antígeno que genera una respuesta inmunológica en un huésped a quien se le administra la composición inmunogénica.

[00159] Tal como se usa en la presente, una “respuesta inmunológica protectora” comprende una “respuesta inmunológica” a una composición o vacuna que es el desarrolla en el huésped de una respuesta inmunológica celular y/o mediada por anticuerpo a una composición o vacuna de interés. Habitualmente, una “respuesta inmunológica” incluye, pero en un sentido no taxativo, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T ayudantes y/o células T citotóxicas, dirigidas

específicamente a uno o más antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped expresará una respuesta inmunológica protectora o terapéutica de manera tal que mejorará la resistencia a una infección nueva y/o se reducirá la severidad clínica de una enfermedad subsiguiente. Dicha protección se puede demostrar mediante una reducción de los signos clínicos de la enfermedad con relación a los que habitualmente expresa un huésped infectado, una falta de signos clínicos de la enfermedad con relación a los que habitualmente expresa un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido con relación al que habitualmente presenta un huésped infectado y/o un recuento de patógenos disminuido con relación al que habitualmente se observa en un huésped infectado.

[00160] Tal como se usa en la presente, los términos “ácido nucleico” y “polinucleótido” se refieren a ARN, ADN y derivados de los mismos.

[00161] Tal como se usa en la presente, el término “codones optimizados” se refiere a un polinucleótido que se modifica genéticamente para aumentar la expresión de proteínas a partir del polinucleótido en una especie dada.

[00162] Tal como se usa en la presente, los términos “farmacéuticamente aceptable” y “veterinariamente aceptable” se usan como adjetivos para indicar que el sustantivo modificado es apropiado para usar en un producto farmacéutico o veterinario. Cuando se usa, por ejemplo, para describir un excipiente en una vacuna farmacéutica o veterinaria, caracteriza al excipiente como compatible con los demás ingredientes de la composición y no perjudicial para el receptor pretendido.

[00163] Tal como se usa en la presente, los términos “polipéptido”

y “proteína” se usan indistintamente para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos consecutivos.

[00164] Tal como se usa en la presente, el término “protección” no implica una protección completa contra cualquier indicación de infección. Por ejemplo, la protección puede significar que, después de un desafío, los signos clínicos de la infección subyacente por lo menos se han reducido, y/o que se ha reducido y/o eliminado una o más de las causas o mecanismos celulares, fisiológicos o bioquímicos subyacentes que provocan dichos signos clínicos. Se comprenderá que el término reducido, tal como se usa en este contexto, con relación al estado de la infección, significa que incluye el estado molecular de la infección, no solo el estado fisiológico de la infección.

[00165] Tal como se usa en la presente, el término “recombinante” en el contexto de un polinucleótido o una proteína se refiere a un polinucleótido o una proteína de origen semisintético o sintético que no se encuentra en la naturaleza o que está ligado a otro polinucleótido o proteína en un ordenamiento que no se encuentra en la naturaleza. Un polinucleótido o proteína recombinante se puede elaborar modificando, alterando o manipulando un polinucleótido o proteína en su forma o estructura nativa para obtener una forma o estructura no nativa. La modificación, alteración o manipulación de un polinucleótido o proteína puede incluir, por ejemplo, la supresión de uno o más nucleótidos o aminoácidos, la sustitución de uno o más nucleótidos o aminoácidos y/o la inserción de uno o más nucleótidos o aminoácidos.

[00166] Tal como se usa en la presente, una “vacuna” es una composición inmunogénica que es adecuada para su administración a un

animal que tras la administración al animal, induce una respuesta inmunológica suficientemente fuerte como para ayudar en la protección contra una enfermedad clínica que se origina a partir de una infección con un microorganismo patógeno de tipo salvaje (por ejemplo, suficientemente fuerte como para ayudar a curar, aliviar, proteger y/o prevenir una enfermedad clínica y/o los signos clínicos asociados con la misma).

[00167] A continuación la presente invención se describirá con referencia a los siguientes ejemplos no taxativos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Construcción del vHVT513 que expresa IBDV VP2 y AIV H9

[00168] En este ejemplo se describe la construcción y estabilidad de un virus herpesvirus de pavo (HVT) recombinante que contiene un promotor IE de citomegalovirus de murino (mCMV), una secuencia que codifica una proteína de la cápside VP2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV), un sitio interno de entrada a ribosomas (IRES), una secuencia que codifica una proteína hemaglutinina (H9) y una cola poli A del virus 40 de simio (SV40) en el sitio Intergénico I del fragmento BamHI I (vHVT513).

A. Genes para insertar en el vector de HVT

[00169] Proteína hemaglutinina H9: Una proteína hemaglutinina H9 Arabia Saudita sintética de codones optimizados (Genbank, N° Acceso ACY80655.1). La proteína tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 1 y está codificada por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 9.

[00170] Proteína de la cápside VP2 del IBDV: Una proteína de la cápside VP2 estructural sintética del virus de la enfermedad de bursitis

infecciosa. La proteína tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 2 y está codificada por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 10.

B. Descripción del plásmido pSaH9optIRESVP2 donante

[00171] Esqueleto del plásmido: Un plásmido ordenado de manera sintética (pFIREVP2) que contiene el brazo Intergénico I derecho de vHVT013 (Vaxxitek HVT+IBD), una cola poli A SV40, una proteína de fusión de Newcastle, IRES y una proteína de la cápside del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, donde la proteína de fusión de Newcastle se reemplazó por la proteína de hemaglutinina H9.

[00172] Promotor: el promotor de mCMV IE del virus vHVT013 parental.

[00173] Genes de resistencia a antibióticos: Ampicilina

C. Construcción del plásmido pSaH9optIRESVP2 donante

[00174] Diagrama de la construcción del plásmido y del plásmido: En la Figura 1 se muestra un diagrama de la construcción del plásmido y del pSaH9optIRESVP2.

[00175] Descripción detallada de la construcción del plásmido: Se digirió el pFIREVP2 con HindIII y Sall. El vector de 5 kb se extrajo en gel. El Hind/SalH9opt Arabia Saudita en el pUC57 también se digirió con HindIII y Sall. El inserto de 2,2 kb se extrajo en gel. El vector de 5 kb y el inserto de 2,2 kb se ligaron entre sí y se transformaron en células competentes Top Ten. Los plásmidos resultantes fueron cribados mediante una digestión con EcoRI. El pSaH9optIRESVP2 se verificó mediante análisis de secuencia y tiene la secuencia de acuerdo con la SEQ ID N°: 3.

D. Descripción del vHVT513 recombinante

[00176] Virus parental: Se extrajo el ADN genómico del vHVT013 y se usó como virus parental para la recombinación homóloga *in vitro*.

[00177] Locus de inserción: El mismo que vHVT013 denominado locus intergénico I ubicado en el fragmento BamHI-I (Bublot et al., 1999).

[00178] Plásmido donante: pSaH9optIRESVP2.

[00179] Células para la recombinación *in vitro*: Fibroblastos embrionarios secundarios de pollo (2° CEF).

[00180] Método de selección recombinante: Inmunofluorescencia usando suero de hemaglutinina H9 policlonal de pollo y PCR.

E. Materiales y métodos para la construcción del vHVT513 recombinante

[00181] Descripción detallada de la generación del recombinante: El vHVT513 recombinante se obtuvo mediante recombinación *in vitro* entre el plásmido pSaH9optIRESVP2 y vHVT013 como se describió con anterioridad (Darteil et al., 1995 *Virology* 211, 481-490). Brevemente, se cotransfectaron CEF con los ADN del plásmido pSaH9optIRESVP2 y del vHVT013. Se identificaron las placas que expresan H9 mediante IFA y además se purificó en placa mediante dilución limitante en placas de 96 pocillos. Después la duplicación de 96 pocillos, el virus de un pocillo de una placa que presentaba un 100% de las placas que expresan H9 y que era negativo para el vHVT013 parental se amplificó mediante PCR en varios pasajes en los CEF. El lote de virus se denominó vHT513 pre-MSV. El lote preMSV fue sometido a 13 pasajes en los CEF y el lote resultante se denominó vHVT513 pre-MSV+13.

[00182] Análisis mediante PCR del recombinante: Se extrajo ADN de vHVT513 pre-MSV y de vHVT513 pre-MSV+13 mediante extracción en

fenol/cloroformo, se precipitó con etanol y se resuspendió en HEPES 20 mM. Los cebadores para la PCR fueron diseñados para identificar de manera específica la presencia de H9 Arabia Saudita de codones optimizados, IBDV VP2, el promotor de mCMV IE, la cola poli A de SV40, así como la pureza del virus recombinante a partir del vHVT013 virus parental (Tabla 1). La PCR se llevó a cabo usando 200 ng de molde de ADN junto con los pares de cebadores específicos indicados en la Tabla 1. Las condiciones de los ciclos de PCR son como sigue: 94 °C – 2 min; 30 ciclos de 94 °C – 30 seg, 60 °C – 45 seg, 68 °C – 3 o 5 min; 68 °C – 5 o 7 min (los tiempos de alineamiento y extensión se ajustaron de acuerdo con el tamaño de producto esperado).

[00183] Análisis de la expresión del recombinante: La prueba de inmunofluorescencia se llevó a cabo usando vHVT513 pre-MSV y vHVT513 pre-MSV+13. Los materiales pre-MSV y pre-MSV+13 se diluyeron 1:100 en medio. Se agregaron 50 µl del virus diluido a 10 ml de DMEM + 2% de FBS con 1×10^7 CEF y luego se dividieron en alícuotas en una placa de 96 pocillos (100 µl/pocillo). Las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C + 5% de CO₂ hasta que las placas virales fueran visibles. Las placas se fijaron con 95% de acetona helada durante tres minutos y se lavaron tres veces con agua. Las placas fueron evaluadas por la expresión dual de HVT y de IBDV-VP2 usando un anticuerpo monoclonal L-78 HVT (Lee *et al.*, 1983 *J Immunol* 130, 1003-6) a razón de 1:3000 y antisuero de pollo contra el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (Charles Rivers Laboratory) a razón de 1:500. Las placas también fueron evaluadas por la expresión dual de IBDV-VP2 y de H9 de la gripe aviar usando un anticuerpo monoclonal IBDV-VP2 (1C6 Darteil *et al.*, 1995 *Virology* 211, 481-90) a razón de 1:2000 y antisuero de pollo contra H9 de

la gripe aviar (Charles Rivers Laboratory) a razón de 1:300. Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 45 minutos. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS y se agregó FITC anti-pollo (N° cat. F8888, Sigma) a razón de 1:500 junto con anticuerpo anti-ratón de burro conjugado con Alexa Fluor 568 (IgG) (N° cat. A10037, Life Technologies) a razón de 1:300. Las placas se incubaron nuevamente a 37 °C durante 45 minutos. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS. Se agregó una pequeña cantidad de PBS para impedir que se secase la monocapa. Luego, las células se visualizaron con microscopio de fluorescencia usando filtros tanto de isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) como de isocianato de fluoresceína (FITC).

[00184] Análisis genómico del recombinante: El análisis del ADN genómico pre-MSV y pre-MSV+13 se llevó a cabo mediante amplificación por PCR. Se usaron los cebadores 110P-1 y 309P18 para amplificar el casete completo, así como más allá de los brazos flanqueadores usados en la generación de vHVT013. Las condiciones de los ciclos de la PCR fueron como sigue: 94 °C – 2 min; 30 ciclos de 94 °C – 30 seg, 60 °C – 45 seg, 68 °C – 8 min; 68 °C – 10 min. Se purificó en gel un producto de la PCR de 7,7 kb usando el kit de extracción en gel de Qiagen y se secuenció el fragmento completo usando los cebadores de secuenciación que se enumeran en la Tabla 3.

F. Resultados del análisis del vHVT513 recombinante

[00185] Análisis mediante PCR del recombinante: El análisis mediante PCR de vHVT513 pre-MSV y pre-MSV+13 se llevó a cabo usando los cebadores para PCR que se enumeran en la Tabla 1 y que se muestran en el

mapa vHVT513 en la Figura 2. Se confirmó que los tamaños de los productos de la PCR después de electroforesis en gel correspondían a los pocillos con los tamaños y los patrones de bandas esperados. Las reacciones de PCR con todos los pares de cebadores dieron como resultado los productos de PCR y patrones de bandas esperados. No hubo evidencia del virus parental vHVT013 en el vHVT513

Tabla 1: Secuencias de los cebadores y tamaños esperados de vHVT513 (en pares de bases) de los fragmentos amplificados por PCR usando diferentes pares de cebadores con el molde de ADN ya sea de vHVT013 o de vHVT513.

Cebador	Secuencias de los cebadores 5' --> 3'	Juego de cebadores	vHVT013	vHVT513
MB080	CGA ACA AAC TTC ATC GCT ATG C (SEQ ID N°: 15)	MB080+MB081	3350	5598
MB081	TAA CTC AAA TGC GAA GCG TTG C (SEQ ID N°: 16)	MB080+SAH9F.3	---	808
SAH9F,3	CTC TGA AGT TGA AAC CCG TC (SEQ ID N°: 17)	MB080+VP2.F	405	2653
VP2.F	AGA TTG CAG GAG CAT TTG GCT (SEQ ID N°:	SV40poliA.R1+mCM VF	2959	5195

	18)			
SV40poliA .R1	ATG CAA TTG TTG TTA ACT (SEQ ID Nº: 19)			
mCMVF	AAC TCC GCC CGT TTT ATG (SEQ ID Nº: 20)			

[00186] Análisis de la expresión del recombinante: Las placas virales recombinantes VHVT513 se visualizaron usando ambos filtros de TRITC y FITC para la tinción doble. Para ambos pre-MSV y pre-MSV+13, el TRITC presentó expresión de HVT o del anticuerpo monoclonal IBDV-VP2 y el FITC presentó expresión del antisuero pollo de VP2 o H9. Debido a los pocillos pequeños de las placas de 96 pocillos, cada pocillo se registró contando primero las placas con el filtro de TRITC y luego se volvieron a contar con el filtro de FITC. Se contaron 389 placas comparando las placas que expresan HVT TRITC y VP2 FITC y se contaron 411 placas comparando las placas que expresan VP2 TRITC y AIV-H9 FITC para el pre-MSV. Todas las placas fueron positivas para ambos TRITC y FITC en ambas placas (refiérase a las Figuras 3A-3B). Se realizó lo mismo para el pre-MSV+13. Para comparar HVT con VP2, se contaron 351 placas y para comparar VP2 y AIV-H9, se contaron 314 placas. Todas las placas fueron positivas para ambos TRITC y FITC en ambas placas (refiérase a las Figuras 3A-3B). En la Tabla 2 se muestra un resumen de estos datos.

Tabla 2: Número de placas verificadas para la expresión doble de HVT y IBDV VP2 y de IBDV VP2 y AIV H9.

Tinción doble	vHVT513 pre-MSV	vHVT513 pre-MSV+13
HVT / IBDV VP2	389 / 389	351 / 351
IBDV VP2 / AIV H9	411 / 411	314 / 314

[00187] Análisis genómico del recombinante: El análisis del ADN genómico de vHVT513 pre-MSV y vHVT513 pre-MSV+13 se llevó a cabo mediante amplificación por PCR. Se alinearon los resultados de secuenciación obtenidos del vHVT513 pre-MSV. El alineamiento creado coincidió exactamente con la secuencia de vHVT513 esperada. Se alinearon los resultados de secuenciación obtenidos del vHVT513 pre-MSV+13. El alineamiento coincidía con la secuencia exacta igual que vHVT513 pre-MSV.

[00188] Con referencia a los cebadores 110P-1 y 309P18 en la Tabla 3, estos cebadores se usaron para amplificar los casetes completos, así como, más allá de los brazos de recombinación flanqueadores usados en el plásmido donante y los brazos de recombinación del vHVT013. El producto de PCR de 7,7kb obtenido se purificó en gel y se secuenció todo el fragmento usando los cebadores de secuenciación que se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3: Cebadores de secuenciación y ubicación del vHVT513.

Cebador	Secuencia 5' - > 3'	Cebador	Secuencia 5' - > 3'
110P-1	TCT TTG TTC CTT GAA ATG CCG ACA (SEQ ID N°: 21)	309P6	ACT GAG TGA GAG GGA CCG TC (SEQ ID N°: 32)
110P1	TCA TGT CGA TGA AAT GTT ATG (SEQ ID N°: 22)	SAH9R	ATC AGG CTA ATT GGT TCC AT (SEQ ID N°: 33)
110P2	TGC GTC GAT AAG ACT	SAH9F	ATG GAA CCA ATT

	TTG GT (SEQ ID N°: 23)		AGC CTG AT (SEQ ID N°: 34)
119P1	TTA GTT TGC ATT TCT TAG GG (SEQ ID N°: 24)	SAH9F,1	ATC TTC CCG GAC ACC ATC TG (SEQ ID N°: 35)
119P2	TGA ATA TTT GCA ACC AAT GC (SEQ ID N°: 25)	SAH9F,2	ACG TTC TGT CTG GTG AAT CT (SEQ ID N°: 36)
mCMVP 1	TCA GCA CGG TCA TGC ACT CT (SEQ ID N°: 26)	SAH9F,3	CTC TGA AGT TGA AAC CCG TC (SEQ ID N°: 17)
309P1	ATG TAC TTT CCC ACC ATT GAC G (SEQ ID N°: 27)	309P15 R	ACA CGC GCC GTT GAG TAT (SEQ ID N°: 37)
309P2	AGG CGG CCG CTC TAG AAC (SEQ ID N°: 28)	309P15	ATA CTC AAC GGC GCG TGT (SEQ ID N°: 38)
309P3	ACC GGC CAG CTA CAA CTA (SEQ ID N°: 29)	309P16	ATC CGA AGA AGA AGG CGT (SEQ ID N°: 39)
309P4	ATG CGA CAG CAG TGA CAG (SEQ ID N°: 30)	309P18	ACC GCC AGA TAT CCA AAG TA (SEQ ID N°: 40)
309P5	AGA TAA CCC AGC CAA TCA		

	(SEQ ID N°: 31)		
--	-----------------	--	--

[00189] Los contigs de la secuenciación se ensamblaron a partir de las reacciones de secuenciación con los cebadores indicados en la Tabla 3. El vHVT513 tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 4.

G. Conclusión del análisis del vHVT513 recombinante

[00190] En base a los análisis por PCR, de inmunofluorescencia y de secuencia del vHVT513 no hay evidencia de vHVT013 parental remanente. Los datos demuestran que vHVT513 es un HVT recombinante que expresa el gen VP2 del IBDV y un gen de H9 Arabia Saudita de codones optimizados de la gripe aviar bajo el control de un promotor de mCMV IE y una secuencia IRES. Los datos también demuestran que vHVT513 es genéticamente y fenotípicamente estable después de 13 pasajes *in vitro* más allá de pre-MSV.

EJEMPLO 2: Construcción del vHVT514 que expresa NDV-F y AIV H9

[00191] En este ejemplo se describe la construcción y estabilidad de un virus herpesvirus de pavo (HVT) recombinante que contiene un promotor IE de citomegalovirus de murino (mCMV), una secuencia que codifica una proteína de la cápside VP2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV), un sitio interno de entrada a ribosomas (IRES), una secuencia que codifica una proteína hemaglutinina (H9) y una cola poli A del virus 40 de simio (SV40) en el sitio Intergénico I del fragmento BamHI I (vHT514).

A. Genes para insertar en el vector de HVT

[00192] Proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle: Se usó una proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-F) sintética correspondiente a una secuencia de tipo salvaje consenso de formas aisladas del genotipo VIId como uno de los insertos. Es un

99,6% (551/553 aminoácidos) idéntica y un 99,8% (552/553) similar a una cepa velogénica de ganso (ganso/Jiangsu/JSG0210/2002) que fue aislada en China (Genbank, N° Acceso AEM55586.1). La secuencia de aminoácidos F se modificó en el sitio de escisión F2/F1 de un sitio velogénico (GRRQKR/F) a un sitio lentogénico (GGKQGR/L). La proteína tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 5 y está codificada por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 11.

[00193] Proteína hemaglutinina H9: Otro inserto utilizado es una proteína hemaglutinina H9 Arabia Saudita sintética de codones optimizados (Genbank, N° Acceso ACY80655.1). La proteína tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 1 y está codificada por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID N°: 9.

B. Descripción de plásmido donante pFwtIRESSaH9opt

[00194] Esqueleto del plásmido: Un plásmido (pFwtIRESgD) creado previamente que contiene el brazo derecho Intergénico I del vHVT013, la proteína de fusión de Newcastle, IRES, la glicoproteína D del virus de la enfermedad de laringotraqueítis infecciosa, cola poli A de SV40 y el brazo izquierdo Intergénico I del vHVT013. La glicoproteína D del virus de la enfermedad de laringotraqueítis se reemplazó por la proteína hemaglutinina H9. El plásmido se puede insertar en el sitio Intergénico I (IG1).

[00195] Promotores: promotor de mCMV IE.

[00196] Genes de resistencia a antibióticos: Ampicilina

C. Construcción del plásmido pFwtIRESSaH9opt donante

[00197] Diagrama de la construcción del plásmido y del plásmido: En la Figura 4 se muestra un diagrama de la construcción del plásmido y del

pFwtlRESSaH9opt.

[00198] Descripción detallada de la construcción del plásmido: Se digirió el pFwtlRESgD con HindIII y Sall. El vector de 8,2 kb se extrajo en gel. El Hind/SalH9opt Arabia Saudita en el pUC57 también se digirió con HindIII y Sall. El inserto de 2,2 kb se extrajo en gel. El vector de 8,2 kb y el inserto de 2,2 kb se ligaron entre sí y se transformaron en células competentes Top Ten. Los plásmidos resultantes fueron cribados mediante una digestión con EcoRI/HindIII. El pFwtlRESSaH9opt se verificó mediante análisis de secuencia y tiene la secuencia de acuerdo con la SEQ ID N°: 6.

D. Descripción del vHVT514 recombinante

[00199] Virus parental: Se extrajo el ADN genómico del vHVT013 y se usó como virus parental para la recombinación homóloga *in vitro*.

[00200] Locus de inserción: Locus intergénico I ubicado en el fragmento BamHI-I (Bublot et al., 1999).

[00201] Plásmido donante: pFwtlRESSaH9opt (proteína de fusión de la enfermedad de Newcastle-IRES-proteína hemaglutinina H9 Arabia Saudita de la gripe aviar -cola poli A de SV40).

[00202] Células para la recombinación *in vitro*: Fibroblastos embrionarios secundarios de pollo (2° CEF).

[00203] Método de selección recombinante: Inmunofluorescencia usando suero de hemaglutinina H9 policlonal de pollo y PCR.

E. Materiales y métodos para la construcción del vHVT514 recombinante

[00204] Descripción detallada de la generación del recombinante: El vHVT514 recombinante se obtuvo mediante recombinación *in vitro* entre el plásmido pFwtlRESSaH9opt y vHVT013 como se describió con anterioridad

(Darteil et al., 1995 *Virology* 211, 481-490). Brevemente, se cotransfectaron CEF con los ADN del plásmido pFwtIRESSaH9opt y del vHVT013. Se identificaron las placas que expresan H9 mediante IFA y además se purificó en placa mediante dilución limitante en placas de 96 pocillos. Después la duplicación de 96 pocillos, el virus de un pocillo de una placa que presentaba un 100% de las placas que expresan H9 y que era negativo para el vHVT013 parental se amplificó mediante PCR en varios pasajes en los CEF. El lote de virus se denominó vHT514 pre-MSV. El lote preMSV fue sometido a 13 pasajes en los CEF y el lote resultante se denominó vHVT514 pre-MSV+13.

[00205] Análisis mediante PCR del recombinante: Se extrajo ADN de vHVT514 pre-MSV y de vHVT514 pre-MSV+13 mediante extracción en fenol/cloroformo, se precipitó con etanol y se resuspendió en HEPES 20 mM. Los cebadores para la PCR fueron diseñados para identificar de manera específica la presencia de H9 Arabia Saudita de codones optimizados, NDV-F, el promotor de mCMV IE, la cola poli A de SV40, así como la pureza del virus recombinante a partir del vHVT013 (Vaxxitek, virus parental, Tabla 4). La PCR se llevó a cabo usando 200 ng de molde de ADN junto con los pares de cebadores específicos indicados en la Tabla 4. Las condiciones de los ciclos de PCR son como sigue: 94 °C – 2 min; 30 ciclos de 94 °C – 30 seg, 60 °C – 45 seg, 68 °C – 3 o 5 min; 68 °C – 5 o 7 min (los tiempos de alineamiento y extensión se ajustaron de acuerdo con el tamaño de producto esperado).

[00206] Análisis de la expresión del recombinante: La prueba de inmunofluorescencia se llevó a cabo usando vHVT514 pre-MSV y vHVT514 pre-MSV+13. Los materiales pre-MSV y pre-MSV+13 se diluyeron 1:100 en medio. Se agregaron 50 µl del virus diluido a 10 ml de DMEM + 2% de FBS

con 1×10^7 CEF y luego se dividieron en alícuotas en una placa de 96 pocillos (100 µl/pocillo). Las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C + 5% de CO₂ hasta que las placas virales fueran visibles. Las placas se fijaron con 95% de acetona helada durante tres minutos y se lavaron tres veces con agua. Las placas fueron evaluadas por la expresión dual de HVT y de NDV-F usando un anticuerpo monoclonal L-78 HVT (072103, Merial) a razón de 1:3000 y antisuero de pollo contra el virus de la enfermedad de Newcastle (Charles Rivers Laboratory) a razón de 1:500. Las placas también fueron evaluadas por la expresión dual de NDV-F y H9 de la gripe aviar usando fluido ascético de NDV (1C3, Meulemans et al., 1987 *Arch Virol*, 92, 55-62) a razón de 1:1000 y antisuero de pollo contra la H9 de la gripe aviar (Charles Rivers Laboratory) a razón de 1:300. Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 45 minutos. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS y se agregó FITC anti-pollo (N° cat. F8888, Sigma) a razón de 1:500 junto con anticuerpo anti-ratón de burro conjugado con Alexa Fluor 568 (IgG) (N° cat. A10037, Life Technologies) a razón de 1:300. Las placas se incubaron nuevamente a 37 °C durante 45 minutos. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS. Se agregó una pequeña cantidad de PBS para impedir que se secase la monocapa. Luego, las células se visualizaron con microscopio de fluorescencia usando filtros tanto de isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) como de isocianato de fluoresceína (FITC).

[00207] Análisis genómico del recombinante: El análisis del ADN genómico pre-MSV y pre-MSV+13 se llevó a cabo mediante amplificación por PCR. Los cebadores 110P-1 y 309P18 se usaron para amplificar el casete completo, así como más allá de los brazos flanqueadores usados en la

creación de vHVT013. Las condiciones de los ciclos de la PCR fueron como sigue: 94 °C – 2 min; 30 ciclos de 94 °C – 30 seg, 60 °C – 45 seg, 68 °C – 8 min; 68 °C – 10 min. Se purificó en gel un producto de la PCR de 8 kb usando el kit de extracción en gel de Qiagen y se secuenció el fragmento completo usando los cebadores de secuenciación que se enumeran en la Tabla 6.

F. Resultados del análisis del vHVT514 recombinante

[00208] Análisis mediante PCR del recombinante: El análisis mediante PCR de vHVT514 pre-MSV y pre-MSV+13 se llevó a cabo usando los cebadores para PCR que se enumeran en la Tabla 4. Se confirmaron los tamaños de los productos de la PCR. Las reacciones de PCR con todos los pares de cebadores dieron como resultado los productos de PCR y patrones de bandas esperados. No hubo evidencia del virus parental vHVT013 en el vHVT514

Tabla 4: Secuencias de los cebadores y tamaños esperados de vHVT514 (en pares de bases) de los fragmentos amplificados por PCR usando diferentes pares de cebadores con el molde de ADN ya sea de vHVT013 o de vHVT514.

Cebador	Secuencias de los cebadores 5' --> 3'	Juego de cebadores	vHVT013	vHVT514
MB080	CGA ACA AAC TTC ATC GCT ATG C (SEQ ID N°: 15)	MB080+MB081	3350	5873
MB081	TAA CTC AAA TGC GAA GCG TTG C	MB080+SAH9F,3	---	799

	(SEQ ID N°: 16)			
SAH9F,3	CTC TGA AGT TGA AAC CCG TC (SEQ ID N°: 17)	MB080+312P6	---	2854
312P6	CGT CAA CAA TTC AAT CAG CA (SEQ ID N°: 41)	SV40poliA.R1+mC MVF	3021	5482
SV40poliA .R1	ATG CAA TTG TTG TTA ACT (SEQ ID N°: 19)			
mCMVF	AAC TCC GCC CGT TTT ATG (SEQ ID N°: 20)			

[00209] Análisis de la expresión del recombinante: Las placas virales recombinantes vHVT514 se visualizaron usando ambos filtros de TRITC y FITC para la tinción doble. Para ambos pre-MSV y pre-MSV+13, el TRITC presentó expresión de HVT o del anticuerpo monoclonal NDV-F y el FITC presentó expresión del antisuero pollo de NDV o H9. Debido a los pocillos pequeños de las placas de 96 pocillos, cada pocillo se registró contando primero las placas con el filtro de TRITC y luego se volvieron a contar con el filtro de FITC. Se contaron 405 placas comparando las placas que expresan HVT TRITC y NDV FITC y se contaron 361 placas comparando las placas que expresan NDV TRITC y AIV-H9 FITC para el pre-MSV. Todas las placas fueron positivas para ambos TRITC y FITC en ambas placas (refiérase a las Figuras 5A-5B). Se realizó lo mismo para el pre-MSV+13. Para comparar HVT

con NDV, se contaron 405 placas y para comparar NDV y AIV-H9, se contaron 401 placas. Todas las placas fueron positivas para ambos TRITC y FITC en ambas placas (refiérase a las Figuras 5A-5B). En la Tabla 5 se muestra un resumen de estos datos.

Tabla 5: Número de placas verificadas para la expresión doble de HVT y NDV-F, y de NDV F y AIV-H9.

Tinción doble	vHVT514 pre-MSV	vHVT514 pre-MSV+13
HVT / NDV-F	405 / 405	405 / 405
NDV-F / AIV-H9	361 / 361	401 / 401

[00210] Análisis genómico del recombinante: El análisis del ADN genómico de vHVT514 pre-MSV y vHVT514 pre-MSV+13 se llevó a cabo mediante amplificación por PCR. Con referencia a los cebadores 110P-1 y 309P18 en la Tabla 6, estos cebadores se usaron para amplificar los casetes completos, así como, más allá de los brazos de recombinación flanqueadores usados en el plásmido donante y los brazos de recombinación del vHVT013. El producto de PCR de 8 kb obtenido se purificó en gel y se secuenció todo el fragmento usando los cebadores de secuenciación que se enumeran en la Tabla 6. Se alinearon los resultados de secuenciación obtenidos del vHVT514 pre-MSV. El alineamiento creado coincidió exactamente con la secuencia de vHVT514 esperada. Se alinearon los resultados de secuenciación obtenidos del vHVT514 pre-MSV+13. El alineamiento coincidía con la secuencia exacta igual que vHVT514 pre-MSV.

Tabla 6: Cebadores de secuenciación y ubicación del vHVT514.

Cebador	Secuencia 5' - > 3'	Cebador	Secuencia 5' - > 3'
110P-1	TCT TTG TTC CTT GAA	312P6	CGT CAA CAA TTC AAT

	ATG CCG ACA (SEQ ID N°: 21)		CAG CA (SEQ ID N°: 41)
110P1	TCA TGT CGA TGA AAT GTT ATG (SEQ ID N°: 22)	SAH9R	ATC AGG CTA ATT GGT TCC AT (SEQ ID N°: 33)
110P2	TGC GTC GAT AAG ACT TTG GT (SEQ ID N°: 23)	SAH9F	ATG GAA CCA ATT AGC CTG AT (SEQ ID N°: 34)
119P1	TTA GTT TGC ATT TCT TAG GG (SEQ ID N°: 24)	SAH9F,1	ATC TTC CCG GAC ACC ATC TG (SEQ ID N°: 35)
119P2	TGA ATA TTT GCA ACC AAT GC (SEQ ID N°: 25)	SAH9F,2	ACG TTC TGT CTG GTG AAT CT (SEQ ID N°: 36)
mCMVP 1	TCA GCA CGG TCA TGC ACT CT (SEQ ID N°: 26)	SAH9F,3	CTC TGA AGT TGA AAC CCG TC (SEQ ID N°: 17)
309P1	ATG TAC TTT CCC ACC ATT GAC G (SEQ ID N°: 27)	309P15 R	ACA CGC GCC GTT GAG TAT (SEQ ID N°: 37)
312P2	TAT GCC CAG GGA TAA GGA GG (SEQ ID N°: 42)	309P15	ATA CTC AAC GGC GCG TGT (SEQ ID N°: 38)
312P3R	ACT TCA TGC ACA GCT TCA	309P16	ATC CGA AGA AGA AGG CGT

	(SEQ ID N°: 43)		(SEQ ID N°: 39)
312P4	CTG GTG GCA ATA TGG ATT (SEQ ID N°: 44)	309P18	ACC GCC AGA TAT CCA AAG TA (SEQ ID N°: 40)
312P5R	ATG TGT TGC CGC TCA AAC AG (SEQ ID N°: 45)		

[00211] Los contigs de la secuenciación se ensamblaron a partir de las reacciones de secuenciación con los cebadores indicados en la Tabla 6. El vHVT514 tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 7.

G. Conclusión del análisis del vHVT514 recombinante

[00212] En base a los análisis por PCR, de inmunofluorescencia y de secuencia del vHVT514 no hay evidencia de vHVT013 parental remanente. Los datos demuestran que vHVT514 es un HVT recombinante que expresa el gen de fusión del NDV y un gen de H9 Arabia Saudita de codones optimizados de la gripe aviar bajo el control de un promotor de mCMV IE y una secuencia IRES. Los datos también demuestran que vHVT514 es genéticamente y fenotípicamente estable a los 13 pasajes más allá de pre-MSV.

EJEMPLO 3: Estudio del desafío con AIV

[00213] En este ejemplo se describe una evaluación de la eficacia de varias vacunas HVT recombinantes candidato que expresan la H9 de la H9N2 de la gripe aviar, administradas a pollos SPF de un día de vida contra un desafío virulenta con H9N2 de la gripe aviar (Arabia Saudita, 2010) que se realizó a los 21 días después de la vacunación.

A. Objetivo, diseño del estudio, vacunas y vacunación

[00214] El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de varias vacunas recombinantes candidato que expresan la H9 de la H9N2 de la gripe aviar, cuando se administran a pollitos SPF de un día de vida, contra un desafío virulento con H9N2 (cepa Arabia Saudita 2010) que se realizó a los 21 días de posvacunación. Para alcanzar este objetivo, se monitorearon los siguientes parámetros después del desafío: (i) síntomas respiratorios y oculares (monitoreo clínico); y (ii) excreción viral orofaríngeo (evaluada mediante qRT-PCR).

[00215] El D0, se identificaron pollitos SPF de un día de vida, asignados aleatoriamente a diferentes grupos (12 aves por grupo) y se trataron con diferentes vacunas HVT candidato todas las cuales expresan el gen H9 de la cepa A/aviar/Arabia Saudita/910135/2006, tal como se indica en la siguiente Tabla 7:

Tabla 7: Constitución y tratamiento de los grupos

Grupo	Vacuna	Dosis	Ruta de admin.	Volumen
G1	vHVT513	3,4 log ₁₀ PFU	SC	0,2 ml
G2	vHVT514	3,4 log ₁₀ PFU	SC	0,2 ml
G3	-	-		-

[00216] La generación de vHVT513 y vHVT514 se describió en los ejemplos precedentes. Las dosis de las vacunas se muestran en la Tabla 7. Ambos vHVT513 y vHVT514 se administraron por la ruta subcutánea (SC) después de su dilución en el diluyente de vacuna de Marek.

B. Serología

[00217] Se tomaron muestras de sangre el D20 para evaluar la respuesta serológica inducida por las vacunas candidatas. Se usó la prueba de

inhibición de hemaglutinación (HI) (basada, por ejemplo, en Kaufmann, L *et al.*, JoVE 130: e55833 (2017)) para evaluar los anticuerpos anti-H9 usando un antígeno H9N2 (A/pollo/Irak/AV1342/2011 H9N2).

[00218] Las dispersiones de los títulos individuales de HAI el D20 por grupos se muestran en la Figura 9.

[00219] El D20, todos los animales control eran seronegativos. En la misma fecha, todos los animales de los grupos G1 y G2 se habían seroconvertido.

C. *Desafío con H9N2 y protección clínica*

[00220] No se registraron signos clínicos desde D0 hasta D21 en los grupos G1, G2 y G3 como parte de la observación diaria. El D21, las aves fueron sometidas a un desafío con la H9N2 A/pollo/Arabia Saudita/WNB9510/2010, también denominada Arabia Saudita 2010 en la presente. La cepa del desafío se diluyó in solución salina fisiológica amortiguada (PBS) pH: 7,1 para obtener una suspensión de desafío con un título de 9,0 log₁₀ EID₅₀/ml (que es 8,54 log₁₀ EID₅₀/0,35 ml). Todos los animales de los grupos G1, G2 y G3 fueron sometidos a un desafío con 0,35 ml de la solución de desafío mediante nebulización. Con mayor detalle, los animales del mismo grupo fueron reunidos en una cámara de nebulización y fueron nebulizados con 4,2 ml durante aproximadamente 20 minutos. Los animales se mantuvieron en contacto estrecho en la cámara de nebulización durante aproximadamente 3 a 5 minutos y después se volvieron a colocar en sus aisladores. Los pollos de todos los grupos fueron monitoreados diariamente desde el D21 (antes del desafío) hasta el D31. Para este monitoreo, se presentó particular atención a los síntomas respiratorios y oculares. Asimismo,

se registraron todos los demás signos clínicos observados. Los síntomas respiratorios y oculares fueron calificados como se indica con detalle en la Tabla 8.

Tabla 8: Descripción y calificación de los signos clínicos respiratorios y oculares. Si un animal era hallado muerto o era sacrificado por razones éticas después del desafío, se le atribuyó una calificación de 6 por día hasta el final del estudio, cuando los signos clínicos o el resultado de la necropsia se podían asociar con el desafío con H9N2.

Signos clínicos		Puntaje
Tipo	Descripción	
Respiratorio	Leves: estertor leve, estornudos	1
	Leve: estertor severo, tos, taquipnea (aumento de la frecuencia respiratoria)	2
	Severo: dificultad respiratoria	3
Ocular	Leves: conjuntivitis con edema de los párpados y ojos excesivamente llorosos	1
	Leve: conjuntivitis con edema de los párpados y ojos excesivamente llorosos + edema periorbital	2
	Severo: conjuntivitis con edema de los párpados y ojos excesivamente llorosos + edema periorbital + exudado espeso amarillo	3

[00221] Para cada animal, se calculó el puntaje clínico diario mediante adición de los puntajes asociados con los síntomas respiratorios y oculares (véase la Tabla 8) desde D22 hasta D31. Para cada animal, se calculó

el puntaje clínico global mediante adición de todos los puntajes clínicos diarios. Cada grupo se comparó con el grupo control según el criterio de “Puntaje clínico global” usando la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. El D31, todos los animales que habían sobrevivido fueron sacrificados de manera humanitaria.

[00222] Las dispersiones de los puntajes clínicos globales individuales por grupos se muestran en la Figura 6. Después del desafío el D21, se registraron fundamentalmente los signos respiratorios leves en los diferentes grupos. A veces los estertores estaban asociados con crepitaciones y sibilancias. El inicio de los signos clínicos se produjo a los 2 días de posdesafío (dpc) en el grupo control y 4 dpc en los grupos G1 y G2. Con mayor detalle: (i) seis de 12 animales presentaron signos clínicos en el grupo G1 (vHVT513); (ii) ocho de 12 animales presentaron signos clínicos en el grupo G2 (vHVT514) y (iii) 11 de 12 animales presentaron signos clínicos en el grupo G3 (controles).

[00223] Los puntajes clínicos globales en los grupos G1 y G2 fueron significativamente inferiores que los del grupo control ($p = 0,0005$ y $p = 0,0010$, respectivamente).

D. Diseminación de H9N2

[00224] Los D25, D27 y D29 (4, 6 y 8 días de posdesafío), se realizó un hisopado orofaríngeo en todos los pollitos. La carga viral orofaríngea de H9N2 fue evaluada mediante qRT-PCR. Cuando se detectó excreción viral en un grupo, se determinó el área bajo la curva (AUC) para la excreción orofaríngea de H9N2 desde el D25 hasta el D29 de cada animal de acuerdo con el método del trapecio.

[00225] Los grupos excretores de virus se compararon con el grupo

control según el criterio “AUC” usando la prueba T de Student (asumiendo homogeneidad de las varianzas (prueba de Fisher-Snedecor). Para el análisis de las excreciones virales (cálculo de AUC), a los animales hallados muertos durante el período de desafío se les atribuyó el último valor viral excretado para los subsiguientes puntos de tiempo analizados en caso que faltaran.

[00226] Las evoluciones de los títulos virales promedio en los hisopados orofaríngeos y los porcentajes de aves positivas por grupos se muestran en la Figura 7. Las dispersiones de las AUC para la excreción viral individual por grupos se muestran en la Figura 8.

[00227] El D25 (4 días de posdesafío) y el D27 (6 días de posdesafío), los animales de todos los grupos excretaron virus observándose títulos virales más altos el D25 que el D27. El D29 (8 días de posdesafío), no se observó excreción viral en los grupos G1 y G2, en tanto los animales del grupo control G3 continuaron excretando virus. Todos los grupos vacunados mostraron reducción del porcentaje de hisopados positivos en los tres puntos de tiempo que eran mayores a los 6 y 8 días de posdesafío. El nivel de diseminación y el porcentaje de positivos más bajos se observaron en G1 (vHVT513).

[00228] El AUC de excreción viral en los grupos vacunados G1 y G2 era significativamente inferior que el del grupo control G3 ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$, respectivamente). La mejor reducción de diseminación evaluada mediante el AUC era vHVT513, seguido por vHVT514.

E. Conclusión

[00229] La administración de los candidatos vHVT513 y vHVT514 a pollitos SPF de un día de vida dio como resultado una seroconversión del

100% a H9N2, y después del desafío con H9N2 el D21, una disminución significativa tanto de los signos clínicos respiratorios como la excreción viral.

EJEMPLO 4: Estudio de desafío con AIV en pollos de engorde con MDA

[00230] En este ejemplo se describen los efectos protectores de vHVT513 y de vHVT514 contra el desafío con la H9N2 de la gripe aviar (AI H9N2) en pollos de engorde con anticuerpos anti-H9N2 derivados por vía materna (MDA) en comparación con una vacuna contra H9N2 inactivada.

A. Objetivos, diseño del estudio, vacunas y vacunación

[00231] El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de dos vacunas con vectores HVT candidatos (vHVT513 y vHVT514) contra un desafío con H9N2 en pollos de engorde con los H9N2 MDA en comparación con una vacuna inactivada. El diseño del experimento se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Diseño del estudio.

Grupo	Vacuna	Dosis	Día de la vacunación	Día del desafío
G1	vHVT513	3,4 log ₁₀ PFU	D0	D21
G2	vHVT514	3,4 log ₁₀ PFU	D0	D21
G3	H9N2 inact.	0,2 ml	D7	D21
G4	-	-	-	D21

[00232] En el estudio se usaron pollos de engorde Cobb 500 de un día de vida con los H9N2 MDA (10 por grupo). Se vacunaron aves de los grupos G1 y G2 con vHVT513 y vHVT514 por la ruta SC el D0. Las aves del grupo G3 se vacunaron con una vacuna contra la H9N2 inactivada (GE208) también contiene un antígeno NDV inactivado por la ruta SC.

B. Serología

[00233] Se tomó una muestra de sangre de 8 aves el D0 para evaluar el nivel de los MDA y de todas las aves de G1 a G4 el D20 para evaluar la disminución de los MDA y los anticuerpos inducidos por la vacunación.

[00234] Los anticuerpos anti-H9N2 fueron evaluados usando la prueba HI con el antígeno A/pollo/Irak/AV1342/2011 (Irak) y usando un kit de ELISA comercial (ELISA ID Screen® Influenza H9 Antibody Competition de ID-Vet). Los anticuerpos anti-NDV fueron evaluados usando la prueba HI con el antígeno La Sota y usando un kit de ELISA comercial que reconoce anticuerpos anti-F (ID-Vet). Los anticuerpos anti-IBDV fueron evaluados usando dos ensayos de ELISA PROFLOK IBD y PROFLOK PLUS IBD (Zoetis), donde el último permite detectar anticuerpos anti-VP2.

[00235] Los niveles promedio de H9N2 MDA el D0 eran de $3,75 \log_{10} \pm 0,89$ usando la prueba HI con el antígeno Irak.

[00236] Los resultados de la serología el D20 se muestran en la Tabla 10. La mayoría de las aves de los grupos vacunados indujeron títulos de H9N2 HI.

Tabla 10: Resultados de la serología el D20. Títulos promedio como valores de $\log_{10} \pm$ desviación estándar (número de positivos/totales).

Grupos	H9N2 HI
G1 (vHVT513)	$4,4 \pm 2,6$ (8/8)
G2 (vHVT514)	$4,4 \pm 5,3$ (9/10)
G3 (H9 inact.)	$5,3 \pm 1,9$ (9/10)

G4 (control)	1,0 ± 0,0 (0/10)
--------------	---------------------

C. *Desafío con H9N2 y protección clínica*

[00237] El D21, todos los pollitos fueron sometidos a un desafío con la cepa A/pollo/Arabia Saudita/WNB9510/2010 H9N2, también denominada Arabia Saudita 2010 en la presente. El diluyente para la cepa del desafío era solución amortiguadora salina fisiológica (PBS) pH: 7,1. Esta cepa de desafío con H9N2 se descongeló y se diluyó en PBS para obtener una suspensión de desafío con un título de 5,5 log₁₀ DIO50/0,35 ml. Todas las aves fueron sometidas a un desafío con 0,35 ml de la solución de desafío mediante nebulización. Con mayor detalle, todos los animales del mismo grupo se reunieron en una cámara de nebulización (cajón de plástico, tamaño [L50/l39,5/h33 cm]) y se nebulizaron durante aproximadamente 20 minutos con un nebulizador 347-CN003. Los animales se mantuvieron en contacto estrecho en la cámara de nebulización durante aproximadamente 3 a 5 minutos y después se volvieron a colocar en sus aisladores.

[00238] Los pollos de todos los grupos fueron monitoreados diariamente desde el D21 (antes del desafío) hasta el final del estudio (que era el D31). Para este monitoreo, se presentó particular atención a los síntomas respiratorios y oculares. Asimismo, se registraron todos los demás signos clínicos observados. Los síntomas respiratorios y oculares fueron calificados como se indica con detalle en la Tabla 8.

[00239] Los resultados de los puntajes clínicos se muestran en la Figura 10 (cinética de los puntajes clínicos promedio por grupo después del desafío con H9N2). Dos aves del grupo control (G4) murieron o fueron

sacrificados por razones éticas el D27, 5 días de posdesafío. Los puntajes promedio de G1, G2, G3 y G4 era de $2,0 \pm 2,5$ (G1), $3,4 \pm 3,6$ (G2), $1,0 \pm 2,5$ (G3) y $10,9 \pm 11,2$ (G4). Todas las vacunas redujeron los signos clínicos.

D. *Diseminación de H9N2*

[00240] El D29 (7 días de posvacunación), se realizó un hisopado orofaríngeo en todos los pollos de engorde por grupo. Los hisopados fueron enviados a un laboratorio para la detección de la excreción orofaríngea de H9N2 mediante qRT-PCR.

[00241] (Diseminación orofaríngea promedio evaluada mediante QRT-PCR): porcentaje de positivos considerando el límite de cuantificación (LOQ) de la PCR a $2,94 \log_{10}$. Los resultados de G1 (vHVT513), G2 (vHVT514), G3 (vacuna inactivada G208) y G4 (control) se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Resultados de la diseminación de H2N9 a los 7 días de posdesafío (% de positivos (>2,94.LOD) qPCR:

Grupos	Diseminación de H9N2
G1 (vHVT513)	50%
G2 (vHVT514)	30%
G3 (H9 inact.)	88%
G4 (control)	90%

[00242] Los niveles de diseminación y el porcentaje de positivos se había reducido significativamente en los grupos vacunados en comparación con el grupo control no vacunado así como con el grupo vacunado con la vacuna H9 inactivado convencional.

E. *Conclusión*

[00243] Las vacunas con el HVT recombinante indujeron títulos de anticuerpos anti-H9N2, redujeron los signos clínicos y disminuyeron la diseminación después del desafío el D21 en pollos de engorde con H9N2, NDV y IBDV MDAs.

EJEMPLO 5: Efectos protectores del vHVT513 contra un desafío con IBD

A. Objetivos, diseño del estudio, vacunas y vacunación

[00244] El objetivo del estudio fue evaluar la protección contra IBD inducida por vHVT513 en pollitos SPF. El diseño del experimento se muestra en la Tabla 12.

[00245] En el estudio se usaron pollos Leghorn de un día de vida SPF blancos (12/grupo excepto por 11 en el grupo 4). Los pollos fueron vacunados el D0 por la ruta SC con una diana de 2500 PFU/ave de vHVT513 o se dejaron sin tratar.

Tabla 12: Diseño del estudio y resultados de la protección.

Grupo	Vacuna	Dosis	Fecha del desafío	Protección
1	vHVT513	2500 PFU	D21	100%
2	-	-	D21	8,3%
3	vHVT513	2500 PFU	D28	100%
4	-	-	D28	0%

B. Desafío con IBD y protección contra la misma

[00246] Todos los pollitos fueron sometidos a un desafío con la cepa STC IBDV (dosis de 2,0 log₁₀ EID₅₀/0,03 ml) por medio de gotas oftalmológicas el D21 (grupos 1 y 2) o el D28 (grupos 3 y 4). Las aves fueron observadas por signos clínicos durante 4 días de posdesafío. El D25 (grupos 1 y 2) o el D32 (grupos 3 y 4), fueron sacrificados y se examinaron las bursas por

la presencia de lesiones graves debido al clásico STC IBDV. A los efectos de esta prueba, las lesiones graves incluyeron edema peribursal y/o edema y/o hemorragia macroscópica en el tejido bursal, de acuerdo con 9 CFR 113,331(c)(3). Cualquier ave que presentara estas lesiones indicadas fue registrada como positiva. Los resultados de la protección se muestran en la Tabla 12. Todas las aves vacunadas estaban protegidos en ambas fechas en tanto la mayoría de las aves control no estaban protegidas.

C. *Conclusión*

[00247] En conclusión, vHVT513 indujo una protección completa contra IBDV a las 3 y 4 semanas de posvacunación.

EJEMPLO 6: Efectos protectores de vHVT514 contra el desafío con ND

A. *Objetivos, diseño del estudio, vacunas y vacunación*

[00248] El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia del virus recombinante vHVT514 en pollos SPF de un día de vida después de una administración subcutánea contra el desafío de la enfermedad de Newcastle velogénica. El objetivo secundario de este estudio fue evaluar la respuesta serológica inducida por la vacuna candidata.

[00249] El diseño del estudio se muestra en la Tabla 13. Se dividieron pollos SPF de 33 días de vida en dos grupos: 11 aves en G1 (controles) y 22 aves en G2 (aves vacunadas). Las aves de G2 fueron vacunadas con 3,4 log₁₀ PFU del vHVT514.

Tabla 13: Diseño del estudio y resultados de serología (título promedio expresado como log 10 ± desviación estándar (número de positivos/totales) y protección contra ND.

Grupo	Vacuna	NDV HI	Protección
-------	--------	--------	------------

G1	-	0,6 ± 0,0 (0/10)	0%
G2	vHVT514	1,08 ± 0,26 (20/20)	100%

B. *Serología*

[00250] Se tomó una muestra de sangre el D21 antes del desafío. Los títulos anti-NDV fueron evaluados mediante la prueba HI usando el antígeno La Sota. Los resultados se resumen en la Tabla 13. Los valores negativos se definieron en un valor umbral de 0,6 log₁₀ para NDV HI a fin de calcular la media y la desviación estándar. Todas las aves vacunadas tenían anticuerpos contra NDV HI.

C. *Desafío con ND y protección contra la misma*

[00251] El D21, 10 pollos control (G1) y 20 pollos vacunados (G2) fueron sometidos a un desafío con una cepa de Malasia (MAL04-01) con el genotipo VII_d (o VII.1.1) por vía intramuscular con 0,2 ml que contienen 5,0 log₁₀ EID₅₀. La protección se evaluó mediante observación de los signos clínicos durante 2 semanas de posdesafío.

[00252] Todos los pollos del grupo control G1 murieron dentro de los 3 días después del desafío. Ninguno de los pollos vacunados mostró signos clínicos ni murieron después del desafío.

D. *Conclusión*

[00253] En conclusión, la vacunación subcutánea de pollitos SPF de un día de vida con una dosis de 3,4 log₁₀ PFU/pollito de vHVT514 indujo un 100% de protección contra un desafío con ND usando la cepa MALAYSIAN MAL04-01 que se condujo 21 días después de la vacunación.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID N°: 1 (Secuencia de aminoácidos de la H9 Arabia Saudita de codones optimizados) (para vHVT513 y vHVT514)

MEPISLMIILLLVTTSNADKICIGHQSTNSTETVDTLTETNVPVTHAKELLHTEHN
GMLCATNLGHPLILNTCTIEGLIYGNPSCDLLLGGREWSYIVERPSAVNGTCYP
GNVENLEELRTLFSSSSSYQRIQIFPDTIWNVTYTGTSKSCSDSFYRNMRWLT
QKNGLYPVQDAQFTNNRGKDILFVWGIHHPPTDTAQTNLYTRDTTTSVTTEN
LDRTFKPLIGRPLVNGLIGRINYYSVLKPGQTLRVRSNGNLIAPWFGHVLSG
ESHGRILKTDLNSGNCVVQCQTEKGGLNSTLPFHNISKYAFGTCPKYIGVKSL
KLAIGLRNVPARSSRGLFGAAGFIEGGWPGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAA
DRDSTQKAVDKITSKVNNIVDKMNKQYEIIDHEFSEVETRLNMINNKIDDQIQDV
WAYNAELLVLENQKTLDEHDANVNNLYNKVKRALGSNAMEDGKGCFELYHK
CDDQCMETIRNGTYNRGKYKEESRLERQKIEGVKLESEGTYKILTIYSTVASSL
VLAMGLAAFLFWAMSNNGSCRCNICI

SEQ ID N°: 2. (Secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside estructural VP2 sintética del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa) (para vHVT513)

MTNLQDQTQQIVPFIRSLLMPTTGPASIPDDTLEKHTLRSETSTYNLTVGDTGS
GLIVFFPGFPGSIVGAHYTLQSNGNYKFDQMLLTAQNLPASYNYCRLVSRSLT
VRSSTLPGGVYALNGTINAVTFQGSLSELTDVSYNGLMSATANINDKIGNVLVG
EGVTVLSLPTSVDLGYVRLGDPIPAIGLDPKMOVATCDSSDRPRVYTITAADDYQ
FSSQYQPGGVTTITLFSANIDAITSLSIGGELVFQTSVQGLVLGATIYLIIGFDGTAV
ITRAVAADNGLTAGTDNLMPFNLVIPTNEITQPITSIKLEIVTSKSGGQAGDQMS
WSASGSLAVTIHGGNYPGALRPVTLVAYERVATGSVTVAGVSNFELIPNPEL
AKNLVTEYGRFDPGAMNYTKLILSERDRLGIKTVWPTREYTDFFREYFMEVADL

NSPLKIAGAFGFKDIIRAIRR

SEQ ID N°: 3. (secuencia de nucleótidos del plásmido

pSaH9optIRESVP2) (para vHVT513)

gacgaaagggcctcgtgatacgccatattttatagggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggc
acttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagac
aataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttatt
ccctttttgcggcattttgccttcctgttttgctcaccagaaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcag
ttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaaga
acgtttccaatgatgagcacttttaagtctgtatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagag
caactcggctcgccgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttac
ggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataacatgagtataactgacgacgccaacttactt
ctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttg
atcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatg
gcaacaacgttgcgcaaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggat
ggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcgcccttccggctggctggtttattgctgataaatctgg
agccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagtta
tctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactg
attaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcattttaattaaaag
gatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcag
accccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaa
accaccgctaccagcgggtggtttgttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcag
cagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcac
cgctacatacctcgctctgctaactctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttg
gactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggtcgtgcacacagccca
gcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttccc

gaagggagaaaaggcggacaggtatccggttaagcggcaggggtcggaacaggagagcgcacgagggag
ctccaggggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgat
gctcgtcaggggggaggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgctgg
ccttttgctacatgttcttctcgttatccccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagttagctgatacc
gctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagttagcgaggaagcggaagagcgcccaatac
gcaaaccgcctctccccgcgcgttgccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagc
gggcagttagcgcaacgcaattaatgtgagtttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgcttcc
ggctcgtatgttggtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccg
cggccgctctagaactcgtcgatcgcagcgatgacaaacctgcaagatcaaaccacagattgttccgttca
tacggagccttctgatgccaacaaccggaccggcgtccattccggacgacaccctggagaagcacactctc
aggtcagagacctcgacctacaatttgactgtgggggacacagggtcagggctaattgtcttttccctggattcc
ctgggtcaattgtgggtgctcactacacactgcagagcaatgggaactacaagttcgatcagatgctcctgact
gcccagaacctaccggccagctacaactactgcagactagttagtcggagttcacagttaggtcaagcac
actccctggtggcgtttatgcactaaacggcaccataaacgccgtgacctccaaggaagcctgagtgaactg
acagatgttagctacaatgggttgatgtctgcaacagccaacatcaacgacaaaattgggaatgtcctggtag
gggaaggggtcactgtcctcagcctaccacatcatatgatcttgggtatgtgaggcttggtgacccattcccg
ctatagggttgacccaaaaatggtagctacatgcgacagcagtgacaggcccagagtctacaccataactg
cagccgatgattaccaattctcatcacagtaccaaccagggtggggaacaatcacactgttctcagccaacatt
gatgctatcacaagcctcagcattgggggagagctcgtgttcaaacaagcgtccaaggcctgtactgggcg
ccaccatctaccttataggcttgatgggactgcggtaatcaccagagctgtagccgcagataatgggctgacg
gccggcaccgacaatcttatgccattcaatctgtcattccaaccaatgagataaccagccaatcacatccat
caaactggagatagtgacctccaaaagtgggtggcaggcaggggatcagatgtcatggtcggcaagtggga
gcctagcagtgacgatccatggtggcaactatccaggggccctccgtcccgtcacactagtagcctacgaaa
gagtggcaacaggatccgtcggttacggtcgctggggtagtaacttcgagctgattccaaatcctgaactagc
aaagaacctggttacagaatacggccgatttgaccaggagccatgaactacacaaaattgatactgagtga

gagggaccgtcttggcatcaagaccgtctggccaacaagggagtacactgattttcgtgagtacttcatggag
gtggccgacctcaactctccccgaagattgcaggagcatttggcttcaaagacataatccgggctataagga
ggtaacccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttattt
ccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttctgacgagcattcctaggg
gtctttccccctctcgccaaaggaatgcaaggctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctg
aagacaaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcggaacccccacctggcgacaggtgcctctgcg
gcaaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttggata
gttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtaccc
cattgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggc
ccccgaaccacggggacgtgggtttcctttgaaaaacacgatgataataccatggaaccaattagcctgatg
attatcctgctgctgggtaccacctctaacgtgacaaaaatctgcatcggtcaccagtctaccaactctaccgaa
accgttgacaccctgaccgaaaccaacgttccgggtaccacgctaaagaactgctgcacaccgaacacaa
cggtatgctgtgcgtaccaacctgggtcaccgctgatcctgaacacctgcactattgaaggctctgatctacgg
taaccgctcttgcgacctgctgctgggtggctgtaatggtcttacatcggtgaacgtccgtctgctgttaacggta
cctgctacccgggtaacgttgaaaacctggaagaactgcgtaccctgttcttcttcttcttcttaccagcgatcc
agatcttcccggacaccatctggaacgttacctacaccgggtacctctaaatcttgcctgactcttctaccgtaac
atgcgttggctgaccagaaaaacggctctgtaaccgggtcaggacgctcagttcaccaacaacgtggtaaa
gacatcctgttcgtttgggtatccaccacccgccgaccgacaccgctcagaccaacctgtacaccggtaccg
acaccaccacctctgttaccaccgaaaacctggaccgtaccttcaaaccgctgatcgggtccgctccgctgggt
aacggctctgatcggctgatcaactactactggtctgttctgaaaccgggtcagacctgcgtgttcgttctaacg
gtaacctgatcgctccgtgggtcgggtcacgttctgtctgggtgaatctcacggctgatcctgaaaaccgatctgaa
ctctggtaactgcgttggtcagtgccagaccgaaaaagggtggtctgaactctacctgccgttcacaacatctct
aaatacgctttcgggtacttggcgaaatacatcgggtgttaaactctctgaaactggctatcggctctcgtaacgttcc
ggctaggtcttccggtggtctgttcgggtgctatcgctgggttcacgaagggtgggtggccgggtctgggtgctgggtg
gtacgggttccagcactctaacgaccaggggtgttggtatggctgctgaccgtgattctaccagaaagctgttga

caaaatcacctctaaagttaacaacatcggtgacaaaatgaacaaacagtacgaaatcatcgaccacgaatt
ctctgaagttgaaacccgctctgaacatgatcaacaacaaaatcgacgaccagatccaggacggttgggcttac
aacgctgaactgctgggtctgctggaaaaccagaaaaccctggacgaacacgacgctaacgttaacaacct
gtacaacaaagttaaacgtgctctgggttctaacgctatggaagacggtaaagggtgcttcgaactgtaccaca
aatgcgacgaccagtgcatggaaacctccgtaacggtacctacaaccgtgggaaatacaaagaagaatc
tcgtctggaacgtcagaaaatcgaagggtgtaaactggaatctgaaggctacctacaaaatcctgaccatctact
ctaccgttgcttctctggttctggctatgggtctggctgcttctctggttctgggctatgtctaacggttctgccgttg
caacatctgcatctaatacgccggtggtccagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaaccacaa
ctagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctatgctttatttgaaccattataagctgcaat
aaacaagttacaacaacaattgcattcatttatgtttcagggtcagggggagggtggtgggagggtttttcggatcc
tctagacctgcagggctgacaattattttatataacatatagcccaaagacctctatgaacatttagttcccggt
atactcaacggcgctgtacacacgcatctcttgcatacgcatgaagttgttcggcagcagaaaaatgcagat
atccaacaatctggagaaaacttatcatcacagtggtcagtggaacataccccctctataattcatggtataatta
tcgtctacagcgtccaggatagtggtgagaaaatggagatctgcagccctccttccatggcatgccgcttta
ttgttcattaaacgcacaatgggtctcaacgccagatatgggcatagattctgaagaaccggtgacaatccgaa
gaagaaggcgtgcagggtcttgaagactcgacggttggtcttataatgtatgatcgagatgtcacctaatagcc
acatggtacaggcttatcgcggtcatggcgatcggacttgtaatttgaacgatgggcaaaggatcgacgaca
tgccaaacattctgaaccgtagagatgttaacgatgacgaggatgaatatcccatgctcgctgccatagtatc
aagtacaccgcaataaggacggtccaacatcgttatatgcacacaatgggctacacgtgactaacacccc
ccgaatattagtcatatgtgagtttcagctctgggtcccatatagcctgtagactatttgggttaagtgtaacgag
gcgctgtgaacgagactcgggcccgttgtaagaacaagcaagaattcactggccgtcggtttacaacgctgtg
actgggaaaaccctggcggttaccacacttaatcgcttgcagcacatcccccttcgccagctggcgtaatagc
gaagaggcccgacccgatcgccctcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgctgatgcggtat
tttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatgggtgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagt
taagccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggctgtctgctcccgcatccgctt

acagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcga

SEQ ID N°: 4. (vHVT513 secuencia de nucleótidos) (vHVT513)

accgccagatatccaaagtacagcacgatgttgacggacgactttgcagtcaccagccttcctttccaccccc
ccaccaacaaaatgtttatcgtaggacccatatccgtaataaggatgggtctggcagcaaccccataggcgc
ctcggcggtgtagttctcgaggatacatccaaagagggtgagtattctctctacacttctgttaaattggaaagtgc
atttgcttgttcttacaatcggtcccgagctcgttcacagcgccctggtcacacttaaacacaaaatagtctacagg
ctatatgggagccagactgaaactcacatatgactaatattcgggggtgttagtcacgtgtagcccattgtgtgc
atataacgatgttggacgcgtccttattcgcggtgtacttgatactatggcagcgagcatgggatattcatcctcgt
catcgtaaacatctctacgggttcagaatgtttggcatgtcgtcgatcctttgcccatcgttgcaaattacaagtccg
atcgccatgaccgcgataagcctgtaccatgtggcattagggtgacatctcgatcatacattataagaccaacg
tgcgagtcttccaaagacctgcacgccttcttctcggaattgtcaacgggttcttcagaatctatgcccatatctggc
gttgagaccattgtgcgtttaatgaacaataaagcggcatgcatggaaaggagggtgcagatctccattttct
cacgccactatcctggacgctgtagacgataattataccatgaatatagagggggtatgtttccactgccactgt
gatgataagttttctccagattgttgatactgtcattttctgtcgcgaacaaactcatcgctatgcaaagagatg
cgtgtgtacacgcgccgttgagtatacgggaaactaaatgttcataagaggcttttgggctatatgttattaaataa
aataattgtcgaccctgcaggcttagaggatccgaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacata
aatgaatgcaattgttgttgaactgtttattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaattt
cacaataaagcattttttcactgcattctagtgtgtgttgcctaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatccc
cgcggtcattagatgcagatgttgcaacggcaagaaccgttagacatagcccagaacaggaaagcagcca
gacctatagccagaaccagagaagaagcaacggtagagtagatggtcaggattttgtaggtaccttcagatt
ccagtttaacaccttcgattttctgacgttcagacgagattcttcttgtatttcccacgggtgtaggtaccgttacgg
atggtttccatgcactggctcgtcgatttgggtacagttcgaagcaacctttaccgtcttccatagcgttagaacc
cagagcacgtttaacttgtgtacaggtgttaacgtagcgtcgtgtccagggttttctggtttccagcaga
accagcagttcagcgttgaagcccaaacgtcctggatctggtcgtcgattttgtgtgatcatgttcagacgggt
ttcaacttcagagaattcgtggctgatgatttcgtactgtttgtcattttgtcaacgatgttgtaacttttagagggtgatt

ttgtcaacagctttctgggtagaatcacggtcagcagccataccaacaccctggctgtagagtgtggaacc
gtaccaaccagcaaccagacccggccaaccaccttcgatgaaaccagcgatagcaccgaacagaccac
gggaagacctagccggaacgttacgcagaccgatagccagtttcagagatttaacaccgatgtatttcgggc
aagtaccgaaagcgatatttagagatgttgtggaacggcagggtagagttcagaccaccttttcgggtctggcact
gaacaacgcagttaccagagttcagatcggttttcaggatacgaccgtgagattcaccagacagaacgtgac
cgaaccacggagcgatcaggttaccgttagaacgaacacgcaggggtctgacccggtttcagaacagacca
gtagtagttgatacgaccgatcagaccgttaaccagcggacgcggaccgatcagcgggttgaaaggtacggtc
caggttttcgggtgtaacagaggtgggtgtcgggtacgggtgtacaggttggtctgagcgggtgtcggtcggcg
gggtgggtgataccccaacgaacaggatgtctttaccacgggtgttggtgaactgagcgtcctgaaccgggta
cagaccgtttttctgggtcagccaacgcatgttacggtagaaagagtcagagcaagatttagaggtaccgggtg
aggtaacgttccagatgggtgtcgggaagatctggatacgctggtaagaagaagaagaagagaacagggt
acgcagttcttcagggtttcaacgttaccgggttagcaggtaccgttaacagcagacggacgttcaacgatgt
aagaccattcacgaccaccagcagcaggtcgcaagacgggttaccgttagatcagaccttcaatagtgcag
gtgttcaggatcagcgggtgacccagggtggtagcgcacagcataccgttggttcgggtgtcagcagttcttta
gcgtagggtaaccggaacgttgggttcgggtcaggggtgtcaacgggttcggtagagttggtagactggtgaccgat
gcagatttgtcagcgttagaggtggttaaccagcagcaggataatcatcaggctaattggttccatggtattatca
tcgtgttttcaaaggaaaaccacgtccccgtgggtcggggggcctagacgtttttaacctcgactaaacacatg
taaagcatgtgcaccgaggccccagatcagatcccatacaatggggtaccttctgggcaccttcagccccttg
ttgaatacgttgaggagagccatttgactctttccacaactatccaactcacaacgtggcactgggggtgtgcc
gcctttgcagggtgtatcttatacacgtggcttttgccgcagaggcacctgtcgcaggtgggggggttcgctgc
ctgcaaaggggtcgctacagacgttgtttgtcttcaagaagcttcagaggaactgcttccttcacgacattcaac
agaccttgcatctcttggcgagaggggaaagaccctaggaatgctcgtcaagaagacagggccagggttc
cggggccctcacattgccaaaagacggcaatatggtggaaaataacatatagacaaacgcacaccggccctta
ttccaagcggcttcggccagtaacgttaggggggggggttacctccttatagcccggttatgtctttgaagcca
aatgctcctgcaatcttcaggggagagttgaggtcggccacctccatgaagtactcacgaaaatcagtgactc

ccttggtggccagacgggtcttgatgccaaagacgggtccctctcactcagtatcaatcttgtagttcatggctcctgg
gtcaaatacgccgtattctgtaaccagggtcttctgtagttcaggatttggaatcagctcgaagtactcaccacag
cgaccgtaacgacggatcctggtgccactcttctgtaggctactagtgtaggggacggagggccctggata
ggtgccacatggatcgctactgctaggctcccacttgccgacatgacatctgatccctgcctgaccaccact
ttggaggctactatctccagtttgatggatgtgattggctgggtatctcattggttggaatgacaagattgaatgg
cataagattgtcggtgccggccgtcagcccattatctgcccgtacagctctgggtgattaccgcagtcccatcaaa
gcctataaggtagatggtggcgcccagtcacaaggccttgacgcttgttgaaacacgagctctccccaatg
ctgaggcttgtagatagcatcaatgttggtgagaacagtgtagttgtaacccacctgggttgtagtgatgaga
attggaatcatcggtgcagttatggtgtagactctgggcctgtcactgctgtcgcatgtagctaccattttgggt
caagccctatagcgggaatgggtcaccaagcctcacatacccaagatcatatgatgtgggtaggctgagg
acagtgacccctccctaccaggacattcccaatcttgctggtgatgttggtggtgcagacatcaaccattgta
gctaacatctgtcagttcactcaggcttccttggaaggacggcggttatggtgccgtttagtgcataaacgcca
ccaggagtggtgacctaactgtgagactccgactcactagctgtcagtagttgtagctggccggtaggttct
gggcagtcaggagcatctgatcgaacttgtagttccattgctctgcagtgtagtgagcaccacaaattgagc
cagggaaatccagggaagaaagacaattagccctgaccctgtgtcccccacagtcaaattgtaggtcgaggtct
ctgacctgagagtggtctctccagggtgtcgtccggaatggacgccggtccggtgttggtcagaaaggctc
cgtatgaacggaacaatctgttggttgatctgcagggttgatcgtcgtcgatcgacgagttctagagcggcc
gcctgcagcgaggagctctgcgttctacgggtggtcagaccgaagactgcgacggtaccgacgctggtcgcg
cctcttatacccacgtagaacgcagctcagccaatagaatgcgtgccaatatggaattccaggggaaaacc
ggggcggtgttacgttttggtgccccttcacttccattgacgtgtattggctcgagaacggtacttccattaatc
agctatgggaaagtaccgtttaagggtcacgttgcattagttcaatagcccattgacgtcaatggtgggaaagt
acatggcggtttaattaaattggtggaaaaacccaatgactcaccctattgacctatgtacgtgccaataatg
ggaaaaacccattgactcaccctattgacctttgtactgggcaaaaacccaatggaaagtcctattgactc
agtgtagttggtccaatgggacttctgtgattcaccctattgacctatgtactgggcaaaaacccattggaa
agtcctaatactgactcagtatcgtgccagtaatgggaaaaacccattggcttacctccattgacctatgtactg

ggcaaaacccattggaaagtcctattgactcaatgtacttggctccaatgggactttcctgttgactcaccctt
attgaccttatgtactgggcaaaacccaatggaaagtcctattgagtcagtgacttggctccaatgggttttcc
cattgactcatcccctattgaccttatgtactgggcaaaacccaatggaaagtcctattgacgcagtgacttgg
ctccaatgggactttcctgttgattcacccttattgaccttatgtactgggcagaatacaatggaaagtcctatt
gactcaccacattgaccttatagttgccaacaatggaaaaacccattggaaagtcctattgagtcagtgta
cttggcagcaatgggttttccattggctcacctcccattgaccaatgtacttgggcaaaacccagtggaaag
tcccatttgactcagtgcttggcagtaatgggaaaaacccattggcttacctcccattgaccaatgtacttgg
gtaaaggccattgagtcaccacccctatgtctgggaaatgggtgaacgccccctatgtggaaagtcctatgggc
cgccattagagtgcagaccgtgctgattcatatgccatagagtgattagggggctttccgcttgggaaattgg
gtaaaaagtccttactcacatagggggcgtttggcttgc aaattaggggattcagtgcaattggcattaa
aaactattggttctagtcataaaacgggcggttgggggatccactagtgaattcgtttaattgttagtttattcaat
gcattggttgc aaatattcattacttccaatcccagggtcattctttagcgagatgatgttatgacattgctgtgaaa
attactacaggatataattttaagatgcaggagtaacaatgtgcatagtaggcgtagttatcgacagcgtgcaac
gcttcgcaattgagttaccgaagtgcccaacagtgctgcggttatggtttatgcgacagaatccatgcatgtcct
aattgaacctccgatttttctttaatcgcgatcggttgggcaactgcgttatttcagatctaaaaaatttaccctt
tatgaccatcacatctctctggctcataccccgcttggataagatatcatgtagattccgcccctaagaaatgcaa
actaacattattgtcggttccatatacacttccatcttgccttcgaaaataacaaactcgcgcaatagaccgtcc
gtacatgcatggccgatgtgtgtcaacatcattggctgctagatcccgatgggacgaatcgtagcgtcgct
ccagcattggcaaaaatcccagataccctccatgcggcaaatctaaattgcgaccccgaagagactgcac
caaagtcttatcgacgcacgctgatttttgaacagcgggagcccattatcttcagtggagcgttagacgggcg
aggctaattatgtgacatagcaacactgcatgtatgttttataaatcaataagagtacataatttattacgtatcatt
tccgtttgaatatactgtatacatcatccacactattagtcagcactagcgcggggcgcacgttacaatagca
gcgtgcccgttatctatattgtccgatatttacacataacatttcacgacatgattaaatacctaagtactgcacac
agatgtttaatgtatatcgcatataaattatatcgctaggacagacccaaacgacctttatcccaaacagtcag
atcctcttcaagtgtcgatttctgttatggaatatgcataccctggcccagaaattgcacgcacgagcgtagtgtg

aatgcgctattgggttttacatttaaaggctaaatgcacaaattctttagacgacagcacatcgtaaatagcacatc
tagcgttcttatgaatgctaagcattggagtcctcctggtcggccacaataacagctgagtatcataccctgagct
ccgggggtgtcgcacatagcggattcgtataaacataggattttccgcgaatccatcagttgcaaaaatctgtta
ggctccatcaacaacgctggatttacttcagatccacgcgtaaagtaatggtgctcgaataccgtttttagagttg
tcggcatttcaaggaacaaaga

SEQ ID N°: 5. (Secuencia de aminoácidos de NDV Vlld wt (de tipo salvaje)) (para vHVT514)

MGSKPSTRIPAPLMLITRIMLILGCIRPTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNVYTS
SQTGSIIVKLLPNMPRDKEACAKAPLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQGSVSTSG
GGKQGRLIGAVIGSVALGVATAAQITAAAALIQANQNAANILRLKESIAATNEAV
HEVTDGLSQLSVAVGKMQQFVNDQFNNTARELDCIKITQQVGVELNLYLTELT
TVFGPQITSPALTQLTIQALYNLAGGNMDYLLTKLGIGNNQLSSLIGSGLITGYPI
LYDSQTQLLGIQVNLPSVGNLNNMRATYLETSLVSTTKGYASALVPKVVTQVG
SVIEELDTSYCIESDLDYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTP
YMALKGSVIANCKITTCRCTDPPGIISQNYGEAVSLIDRHSCNVLSLDGITLRLS
GEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDRLAESNSKLEKVN
VRLTSTSALIDADIVLTVISLVFGALSLVLACYLMYKQKAQQKTLLWLGNNTLDQ
MRATTRA

SEQ ID N°: 6. (secuencia de nucleótidos del plásmido pFwtIRESSaH9op) (vHVT514)

ctaaattgtaagcgtaatatatttgttaaaattcgcgttaaattttgttaaatacagctcatttttaaccaataggccga
aatcggcaaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtgtgtccagtttggaacaag
agtccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggccact
acgtgaaccatcacccctaatcaagtttttggggtcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaaggg
agcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaaggaaggaagaaagcgaa

aggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcgggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgcccgcgtt
aatgcgcccgtacagggcgctcccattcgccattcagggtgcgcaactgttgggaagggcgatcgggtcgg
gcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagtgggtaacgccagggt
ttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgagcgcgtaatacgactcactatagggcgaattgga
gctcagggtatgatactcagctgttattgtggccgaccaggaggactccaatgcttagcattcataagaacgct
agagatgctatttaacgatgtgctgtcgtctaaagaatttgtgcatttagcctttaaagttaaaccaatgacgcat
tcactacgctcgtgctgcaatttctgggccagggtatgcataattccataacagaaatcgacacttgagaagag
gatctgactgttgggataaaggctgttgggtctgtcctagcgatataatttatgacgatatacattaaacatct
gtgtgcagtacttaggtatttaacatgtcgtatgaaatgttatgtgtaaatacggacaatatagataacgggcac
gctgctattgtaacgtgcgcccgcgctagtgtgactaatagtgtggatgatgtatacagtatattacaaacg
gaaatgatacgtaataaattatgtactcttattgattataaaaaacatacatgcagtggtgctatgtcacataattag
cctcgcccgctacgctccactgaagataatgggctcccgtgttcaaaaaaatcagcgtgctcgataagact
ttggtgcagtctcttcggggtcgcaatttagatttgccgcatggagggtatctggggattttgccaatgctggagc
gacgactgtacgattcgtcccatcgggatctagcagaccaatgatgttgacacacatcggccatgcatgtacg
gacggtctattgcgcgagtttgtattttcgaaggacaagatggaagtgtatatggaaccgacaataatgttagttt
gcatttcttagggcggaatctacatgatatacttatccaagcggggatagagccagagagatgtgatggtcataa
agggtaaatttttagatctgaaataacgcagttgcccacaacgatcgcgattaaaagaaaaatcggatgg
ttcaattaggacatgcatggattctgtgcgcataaaccataaccgcagcactgttgggcacttcggttaactcaaa
tgcaagcggtgcacgtctgcgataactacgcctactatgcacattgttactcctgcatcttaaaaatatactctgt
agtaattttcacagcaatgcataacatcatctcgctaaagaatgacctgggattggagaagtaatgaatatttg
caaccaatgcattgaataaactaacattaaacgaattcactagtggatccccaactccgcccgttttatgacta
gaaccaatagttttaatgccaaatgcactgaaatcccctaatttgcaaagccaaacgcccctatgtgagtaat
acggggactttttacccaatttccaagcggaaagccccctaatacactcatatggcatatgaatcagcacggt
catgcactctaattggcggcccatagggactttccacatagggggcggtcaccatttcccagcataggggtggtg
actcaatggcctttacccaagtacattgggtcaatgggaggtgaagccaatgggttttccattactggcaagca

cactgagtcaaattgggactttccactgggttttggccaagtacattgggtcaatgggaggtgagccaatgggaa
aaacccattgctgccaagtacactgactcaatagggactttccaatgggttttccattgttggaagcatataag
gtcaatgtgggtgagtcaatagggactttccattgtattctgccagtacataaggtcaataggggtgaatcaa
caggaaagtcccatggagccaagtacactgctgcaatagggactttccattgggttttggccagtacataagg
tcaataggggatgagtcaatgggaaaaacccattggagccaagtacactgactcaatagggactttccattgg
gttttggccagtacataaggtcaataggggtgagtcaacaggaaagtcccatggagccaagtacattgagt
caatagggactttccaatgggttttggccagtacataaggtcaatgggaggttaagccaatgggttttccattac
tggcacgtatactgagtcattagggactttccaatgggttttggccagtacataaggtcaataggggtgaatcaa
caggaaagtcccatggagccaagtacactgagtcaatagggactttccattgggttttggccagtacaaaag
gtcaataggggtgagtcaatgggttttccattattggcacgtacataaggtcaataggggtgagtcattgggt
tttccagccaatttaattaaaacgcatgtactttccaccattgacgtcaatgggtctattgaaactaatgcaacg
tgaccttaaacggtactttccatagctgattaatgggaaagtaccgttctcgagccaatacacgtcaatggga
agtgaaggggcagccaaaacgtaacaccgccccgggttttcccctggaaattccatattggcacgcattctattg
gctgagctgcttctacgtgggtataagaggcgcgaccagcgctcggtaccgtcgagcttctgggtctgaccac
cgtagaacgcagagctcctcgctgcaggcgccgcatgggtccaaaccttctaccaggatcccagcacctc
tgatgctgatccccggattatgctgatattgggtgtatccgtccgacaagctctcttgacggcaggcctcttgc
agctgcaggaattgtagtaacaggagataaggcagtcattgtatacacttcgtctcagacagggtcaatcata
gtcaagttgctcccgaatatgccagggataaggaggcgtgtgcaaaagccccattagaggcatataacag
aacactgactactttgctcactcctcttggcgactccatccgcaagatccaagggtctgtgtccacatctggagg
aggcaagcaaggccgctgataggtgctgttattggcagtgtagctcttggggttgcaacagcggcacagata
acagcagctgcggccctaatacaagccaaccagaatgccgccaacatcctccggcttaaggagagcattgc
tgcaaccaatgaagctgtgcatgaagtcaccgacggattatcacaactatcagtggcagttgggaagatgca
gcagttgtcaatgaccagtttaataatacggcgcgagaattggactgtataaaaaatcacacaacagggttggtg
tagaactcaacctatacctaactgaattgactacagtatctgggccacagatcacctcccctgcattaactcagc
tgaccatccaggcactttataatttagctgggtggcaatatggattacttattaactaagttaggtatagggacaat

caactcagctcgtaattggtagcggcctgatcactgggtaccctatactgtatgactcacagactcaactcttgg
gcatacaagtgaaattaccctcagtcgggaacttaaataatagcgtgccacctatttgagaccttatctgtaag
tacaaccaaaggatatgcctcagcactgtcccgaaagtagtgacacaagtcgggtccgtgatagaagagctt
gacacctatactgtatagagtccgatctggatttatattgtactagaatagtgacattccccatgtccccagggtatt
tattcctgtttgagcggcaacacatcagcttgcattgtattcaaagactgaaggcgcactcactacgccgtatatg
gcccttaaaggctcagttattgccaattgtaaaataacaacatgtagatgtacagacctcctgggtatcatatcgc
aaaattatggagaagctgtatccctgatagatagacattcgtgcaatgtcttatcattagacgggataactctaa
ggctcagtggggaatttgatgcaacttatcaaaagaacatctcaatactagattctcaagtcacgtgacaggc
aatcttgatatacaactgaacttggaacgtcaacaattcaatcagcaatgccttggataggttggcagaaaag
caacagcaagctagaaaaagtcattgtcagactaaccagcacatctgctctcattacctatattgttctaactgt
catttctctagtttcggtgcacttagtctgggttagcgtgttacctgatgtacaaacagaaggcacaacaaaag
acctgctatggcttgggaataataacctcgatcagatgagagccactacaagagcatgagcggccgcccc
cccccccctaacgttactggccgaagccgcttgggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccat
attgccgtcttttgcaatgtgagggcccggaacacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttccc
ctctcgccaaaggaatgcaaggctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaa
acaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcgggaacccccacctggcgacagggtgcctctgcggccaaaa
gccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtgga
aagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtat
gggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgtttagtcgagggtaaaaaacgtctaggccccccg
aaccacggggacgtggttttcccttgaaaaacacgatgataataccatggaaccaattagcctgatgattacct
gctgctggttaccaccttaacgctgacaaaatctgcatcggtcaccagtctaccaactctaccgaaaccgttg
acacctgaccgaaaccaacgttccggttaccacgctaaagaactgctgcacaccgaacacaacgggtatg
ctgtgcgtaccaacctgggtcaccgctgatcctgaacacctgcactattgaaggctgatctacggtaaccc
gtcttgcgacctgctgctgggtggctgtaatggcttacctggtgaacgtccgtctgctgttaacgggtacctgcta
cccgggtaacgttgaaaacctggaagaactgcgtacctgttcttcttcttcttcttaccagcgtatccagatctt

cccggacaccatctggaacgttacctacaccggtacctctaaatcttgctctgactctttctaccgtaacatgcgtt
ggctgaccagaaaaacggctctgtacccggtcaggacgctcagttcaccaacaaccgtggttaaagacatc
ctgttcgtttggggatatccaccacccgccgaccgacaccgctcagaccaacctgtacacccgtaccgacacc
accacctctgttaccaccgaaaacctggaccgtacctcaaaccgctgatcggctccgctccgctgggtaacg
gtctgatcggctgtatcaactactactggctctgttctgaaaccgggtcagaccctgcgtgttcgttctaaccgtaac
ctgatcgtccgtgggtcgggtcacgttctgtctgggtaatctcacggctgtatcctgaaaaccgatctgaactctgg
taactgcgtgttcagtgccagaccgaaaaagggtgtctgaactctaccctgccgttcacaacatctctaaata
cgcttcgggtacttgccgaaatacatcgggtgttaaactctctgaaactggctatcggctctgcgtaacgttccggcta
ggctctcccggtggctgttcgggtgctatcgtctgggttcacgaagggtgggtggccgggtctgggtgctgggtggtacg
gtttccagcactctaacgaccaggggtgttggtatggctgctgaccgtgattctaccagaaagctgttgacaaaa
tcacctctaaagttaacaacatcgttgacaaaaatgaacaaacagtacgaaatcatcgaccacgaattctctga
agttgaaaccgctctgaacatgatcaacaacaaaatcgacgaccagatccaggacgtttgggcttacaacgc
tgaactgctgggtctgtctggaaaaccagaaaaccctggacgaacacgacgctaacgttaacaacctgtacaa
caaagttaaacgtgctctgggttctaacgctatggaagacggttaaagggtgcttcgaactgtaccacaaatgcg
acgaccagtgcattggaaccatccgtaacggtacctacaaccgtgggaaatacaaagaagaatctcgtctg
gaacgtcagaaaatcgaagggtttaaactggaatctgaaggctacctacaaaatcctgaccatctactctaccg
ttgcttctctctgggtctgggtatgggtctgggtgcttctctgttctgggctatgtctaaccggttctgccgttgcaacat
ctgcatctaatagaccgcggggatccagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaaccacaactagaat
gcagtgaaaaaaatgctttattgtgaaattgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaaca
gttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggagggtgtgggagggttttcggatcctctagag
tcgacaattattttatataacatatagcccaaagacctctatgaacatttagtttccgtatactcaacggcgcg
tgtacacacgcattctttgcatagcgatgaagttgttcggcagcagaaaaatgcagatatccaacaatctgga
gaaaacttatcatcacagtggcagtggaacataccccctctatattcatggtataattatcgtctacagcgcca
ggatagtggtgagaaaaatggagatctgcagccctccttccatggcatgccgctttattgttcattaaacgcac
aatggtctcaacgccagatatgggcatagattctgaagaaccggtgacaatccgaagaagaaggcggtgca

ggctcttgaagactcgacggttggtcttataatgtatgatcgagatgtcacctaatgccacatggtacaggctt
atcgcggtcatggcgatcggacttgtaatttgcaacgatgggcaaaggatcgacgacatgccaaacattctga
acccgtagagatgttaacgatgacgaggatgaatatcccatgctcgctgccatagtatcaagtacaccgcgaa
taaggacgctccaacatcggtatatgcacacaatgggctacacgtgactaacacccccgaatattagtcatat
gtgagtttcagctcggtcccatatagcctgtagactatgtgtggttaagtgtgaacgaggcgctgtgaacgaga
ctcgggcccgaattgaagaacaagcaaatgcactttccatttaacaagaagtgtagagagaataactcaaccttt
tggtatgatcctcgagggggggcccggtacccagctttgttcccttagtgagggtaattgcgcgcttgccgta
atcatggtcatagctgttccgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaagcata
aagtgtaaagcctgggggtgcctaatagtgtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagt
cgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaaacgcgcggggagaggcggttgcgtattgggc
gctcttccgcttctcgctcactgactcgctgcgctcggtcggtcggtgcggcgagcggtatcagctcactcaaa
ggcggtataacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagca
aaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatca
caaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggttccccctg
gaagctccctcgtgcgctctcgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaag
cgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcggtcgtccaagctgggctgtgtgc
acgaacccccgttcagccgaccgctgcgccttatccggtactatcgcttgagtccaacccggtgaagaca
cgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggatgtaggcggtgctacag
agttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatgttggtatctgcgctctgctgaagccag
ttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaccaccgctggtagcggtgggtttttgtttgc
aagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggctgacgctc
agtggaaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatcctttta
attaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaactgggtctgacagttaccaatgcttaatcagt
gaggcacctatctcagcgatctgtctatcttcgttcacatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgat
acgggaggggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccgggtccagattt

atcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggctctgcaactttatccgcctccatcc
agtcctattaattgttgccggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttggtgccattgcta
caggcatcggtgtcacgctcgctgttggatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttac
atgatcccccattgtgtgcaaaaaagcggtagctccttcggtcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgc
agtggttatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactg
gtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcgccgaccgagttgctcttgcggcggtcaatacgg
gataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttctcggggcgaaaactctc
aaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatctttacttt
caccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacac
ggaaatgttgaatactcactcttcttttcaatattattgaagcatttatcaggggtattgtctcatgagcggatac
atatgtgaatgtatttagaaaaataaacaatatgggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgccac

SEQ ID N°: 7. (secuencia de nucleótidos de vHVT514) (vHVT514)

accgccagatatccaaagtacagcacgatgttgacggacgactttgcagtcaccagccttctttccaccccc
ccaccaacaaaatgtttatcgtaggacccatatccgtaataaggatgggtctggcagcaaccccataggcgc
ctcggcggtgtagttctcgaggatacatccaaagagggtgagtattctctctacacttctgttaaatggaaagtgc
atttgctgttcttacaatcggtcccgagctcgttcacagcgctcgttcacacttaaacacaaaatagtctacagg
ctatatgggagccagactgaaactcacatatgactaatattcgggggtgttagtcacgtgtagcccattgtgtgc
atataacgatgttggacgcgtccttattcgcggtgtacttgatactatggcagcgagcatgggatattcatcctcgt
catcgttaacatctctacgggttcagaatgtttggcatgtcgtcgatcctttgcccatcgttgcaaattacaagtccg
atcgccatgaccgcgataagcctgtaccatgtggcattagggtgacatctcgatcatacattataagaccaacg
tgcgagtcttccaaagacctgcacgccttcttctcggtgtcaacgggttcttcagaatctatgcccatatctggc
gttgagaccattgtgcgtttaatgaacaataaagcggcatgcatggaaaggagggtgcagatctccattttct
cacgccactatcctggacgctgtagacgataattataccatgaatatagagggggtatgtttccactgccactgt
gatgataagttttctccagattgttgatatctgcattttctgtgccgaacaaactcatcgctatgcaaagagatg
cgtgtgtacacgcgccgttgagtatacgggaaactaaatgttcataagaggtctttgggctatatgttattaaataa

aataattgtcgactctagaggatccgaaaaaacctccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaat
gcaattgttgtttaactgtttattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaat
aaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatccccgcggtc
attagatgcagatgttgcaacggcaagaaccgtagacatagcccagaacaggaaagcagccagacccat
agccagaaccagagaagaagcaacggtagagtagatggtcaggattttgtaggtaccttcagattccagttta
acaccttcgattttctgacgttccagacgagattcttctttgtatttccacggtgttaggtaccgttacggatggtttc
catgcactggtcgtcgcatttgtggtacagttcgaagcaacctttaccgtcttccatagcgttagaaccagagc
acgtttaactttgtgtacaggtgttaacgttagcgtcggttcgtccagggttttctggtttccagcagaaccagc
agttcagcgttgtaagcccaaacgtcctggatctggtcgtcgattttgtgttgatcatgttcagacgggtttcaactt
cagagaattcgtggtcgatgatttcgtactgtttgttcattttgtcaacgatgttgtaacttttagaggtgattttgtcaa
cagctttctgggtagaatcacggtcagcagccataccaacacctggtcgttagagtgttgaaaccgtacca
accagcaaccagacccggccaaccaccttcgatgaaaccagcgatagcaccgaacagaccacgggaag
acctagccggaacgttacgcagaccgatagccagtttcagagatttaacaccgatgtatttcgggcaagtacc
gaaagcgtatttagagatgttgtgaacggcagggtagagttcagaccaccttttcgggtctggcactgaacaa
cgcagttaccagagttcagatcggttttcaggatacgaccgtgagattcaccagacagaacgtgaccgaacc
acggagcgatcaggttaccgttagaacgaacacgcaggggtctgacctggtttcagaacagaccagtagtag
ttgatacgaccgatcagaccgttaaccagcggacgcggaccgatcagcggttgaaggtaggttccaggtttt
cgggtggaacagaggtgggtggtgtcggtacgggtgtacaggttggtctgagcgggtgtcggtcggcgggtggtg
gataccccaaacgaacaggatgtctttaccacggttgttggtgaactgagcgtcctgaaccgggttacagaccg
ttttctgggtcagccaacgcatgttacggtagaaagagtcagagcaagatttagaggtaccggtgtaggtaac
gttccagatgggtgtccgggaagatctggatacgttgtaagaagaagaagaagagaacaggggtacgcagtt
cttccaggttttaacgttacctgggttagcaggtaccgttaacagcagacggacgttcaacgatgtaagacat
tcacgaccaccagcagcaggtcgcaagacgggttaccgttagatcagaccttaatagtcaggtgttcagg
atcagcgggtgacctcaggttggttagcgcacagcataccgttgttccggtgtgcagcagttcttagcgtgggtg
accggaacgttggttcgggtcaggggtgtcaacggttcggtagagttggttagactgggtgaccgatgcagattttgt

cagcgttagagggtgtaaccagcagcaggataatcatcaggctaattggttccatgggtattatcatcgtgttttca
aaggaaaaccacgtccccgtggttcggggggcctagacgtttttaacctcgactaaacacatgtaaagcatgt
gcaccgaggccccagatcagatcccatacaatggggtaccttctgggcatccttcagccccttggtgaatacgc
ttgaggagagccattgactctttccacaactatccaactcacaacgtggcactgggggttgccgccttgag
gtgtatcttatacacgtggcttttgccgcagaggcacctgtcgccagggtggggggtccgctgcctgcaaagg
gtcgctacagacgttggttcttcaagaagcttcagaggaactgtctccttcacgacattcaacagaccttgca
ttcctttggcgagaggggaaagacccttaggaatgctcgtcaagaagacagggccagggttccggggccctca
cattgccaaaagacggcaatatggtggaaaataacatatagacaaaacgcacaccggccttattccaagcgg
cttcggccagtaacgttagggggggggggggcgccgctcatgctctgtagtggctctcatctgatcaggggt
attattccaagccatagcaaggcttttgtgtgccttctgtttgtacatcaggtaacacgctaacaccagactaa
gtgcaccgaaaactagagaaatgacagttagaacaatataggaatgagagcagatgtgctgggttagtctga
cattgacttttctagcttctgttgccttctgccaacctatccaaggcattgctgattgaattgtgacgtttccaagttc
agttgatatatcaagattgcctgtcacgatgacttgagaatctagtattgagatgttctttgataagttgcatcaaat
tccccactgagccttagagttatcccgctaatgataagacattgcacgaatgtctatctatcagggatacagctt
ctccataatttgcgatatgataccaggaggggtctgtacatctacatggtgttattttacaattggcaataactgagc
ctttaagggccatatacggcgtagtgagtgcgccctcagctcttgaatacatgcaagctgatgtgtgcccgtcaa
acaggaataaataacctggggacatggggaatgtcactattctagtacaataataaatccagatcggactctatac
agtatgagggtgtcaagctcttctatcacggaaccgacttgtgtcactactttcgggacaagtgctgaggcatatcc
tttggtgtacttacagataaggtctccaaatagggtggcacgcataattatttaagttcccgactgagggtaaattca
ctgtatgccaagagttgagctgtgagtcatacagtatagggtaccagtgatcaggccgctaccaattaac
gagctgagttgattgttccctatacctaacttagttaataagtaatccatattgccaccagctaaattataaagtgc
ctggatggtcagctgagttaatgcaggggaggtgatctgtggccgaatactgtagtcaattcagttaggtatag
gttgagttctacaccaacctgtgtgtgattttatacagttcaattctcgcgccgtattattaaactgggtcattgaca
aactgtctgcattctccaactgccactgatagttgtgataatccgtcgggtgacttcatgcacagcttcattggtgc
agcaatgctctccttaagccggaggatgttggcggcattctggttggcttgattagggccgcagctgctgttatct

gtgccgctgttgcaacccaagagctacactgccaataacagcacctatcaggcgcccttgctgcctcctcca
gatgtggacacagacccttggatcttgcggatggagtcgccaagaggagtgagcaaagtagtcagtgttctgtt
atatgcctctaataggggctttgacacgcctccttatccctgggcatattcgggagcaactgactatgattgacc
ctgtctgagacgaagtgtatacattgactgccttatctcctgttactacaattcctgcagctgcaagaggcctgcc
gtcaagagagcttgtcggacggatacagcccaatatcagcataatccgggtgatcagcatcagaggtgctgg
gatcctggtagaaggtttgagcccatgcggccgcctgcagcgaggagctctgcgttctacggtggtcagacc
gaagactgcgacggtaccgacgctggtcgcgcctcttatacccacgtagaacgcagctcagccaatagaat
gcgtgccaatatggaatttcaggggaaaaccggggcggtgttacgttttggtgccctttcacttcccattgacg
tgtattggctcgagaacggtactttccattaatcagctatgggaaagtaccgtttaagggtcacgttgacattagttt
caatagcccattgacgtcaatggtgggaaagtacatggcgtttaattaaattggctggaaaaacccaatgact
caccctattgacctatgtacgtgccaataatgggaaaaaccattgactcaccctattgacctttgtactgg
gcaaaaacccaatggaaagtcctattgactcagtgacttggctccaatgggactttcctgttgattcaccctatt
gaccttatgtactgggcaaaaaccattggaaagtcctaatgactcagtatactgccagtaatgggaaaaac
ccattggcttacctcccattgacctatgtactgggcaaaaaccattggaaagtcctattgactcaatgtacttg
ctccaatgggactttcctgttgactcaccctattgacctatgtactgggcaaaaacccaatggaaagtcctatt
gagtcagtgacttggctccaatgggttttcccattgactcatccctattgacctatgtactgggcaaaaacca
atggaaagtcctattgacgcagtgacttggctccaatgggactttcctgttgattcaccctattgacctatgt
actgggcagaatacaatggaaagtcctattgactcaccacattgacctatgtcttgccaacaatggaaaa
accattggaaagtcctattgagtcagtgacttggcagcaatgggttttcccattggctcacctcccattgacc
caatgtacttgggcaaaaaccagtggaagtcctattgactcagtgcttgccagtaatgggaaaaaccca
ttggcttacctcccattgaccaatgtacttgggtaaaggccattgagtcaccaccctatgctgggaaatggtg
aacgccccctatgtgaaagtcctatgggcccattagagtgcacgctgctgattcatatgccatatga
gtgtattagggggctttccgcttgggaaattgggtaaaaagtccccgtattactcacatagggggcgtttgctttg
caaattaggggatttcagtcatttggcattaaaaactattggttctagtcataaaacgggagggtgggggat
ccactagtgaattcgtttaattgttagtttattcaatgcattggttgcaaatattcattacttctccaatcccagggtcattc

tttagcgagatgatgttatgacattgctgtgaaaattactacaggatatatTTTTAagatgcaggagtaacaatgtg
 catagtaggcgtagttatcgagacgtgcaacgcttcgcatttgagttaccgaagtgcccaacagtgtgcgggt
 atggtttatgcgcacagaatccatgcatgtcctaattgaaccatccgattttctTTAaatcgcgatcgttggtgggc
 aactgcgttatttcagatctaaaaaattaccctttatgaccatcacatctctctggctcataccccgcttgataag
 atatcatgtagattccgcccataagaaatgcaaactaacattattgtcgggtccatatacacttccatctgtccttcg
 aaaatacaaaactcgcgcaatagaccgtccgtacatgcatggccgatgtgtgtcaacatcattggctcgtaga
 tcccgatgggacgaatcgtacagtcgtcgtccagcattggcaaaaatcccagataccctccatgcggcaa
 atctaaattgcgaccccggaagagactgcaccaaagtcttatcgacgcacgctgattttttgaacagcgggagc
 ccattatcttcagtgaggcgttagacgggagaggctaattatgtgacatagcaacactgcatgtatgttttataaat
 caataagagtacataatttattacgtatcatttccgtttgtaatatctgtatacatcatccacactattagtcagcac
 tagcgcgcgggacgttacaatagcagcgtgcccgttatctatattgtccgatatttacacataacatttcac
 gacatgattaaatacctaagtactgcacacagatgtttaatgtatatcgtcatataaattatatcgctaggacaga
 cccaaacgacctttatcccaaacagtcagatcctcttctcaagtgtcgatttctgttatggaatatgcataccctgg
 ccagaaaattgcacgcacgagcgtagtgaatgcgtcattgggtttacatttaaaggctaaatgcacaaattcttta
 gacgacagcacatcgttaaatagcatctctagcgttcttgaatgctaagcattggagtcctcctggtcggcca
 caataacagctgagtatcataccctgagctccgggggtgtcgcacatagcggattcgtataaacataggatttcc
 cggaatccatcagttgcaaaaatctgttaggctccatcaacaacgctggatttacttcagatccacgcgtaaa
 gtaatggtgctcgaataaccgttttttagagttgtcggcatttcaaggaacaaaga

SEQ ID N°: 8. (secuencia de nucleótidos del promotor de mCMV IE)

aactccgcccgttttatgactagaaccaatagtttttaatgccaaatgcactgaaatcccctaatttgcaaagcca
 aacgccccctatgtgagtaatacggggactttttacccaatttccaagcggaaagccccctaatacactcatat
 ggcatatgaatcagcacggtcatgcactctaattggcgggcccatagggactttccacatagggggcggtcacca
 tttccagcataggggtggtgactcaatggcctttacccaagtacattgggtcaatgggaggttaagccaatggg
 ttttccattactggcaagcacactgagtcaaatgggactttccactgggttttgccaagtacattgggtcaatg
 ggaggtgagccaatgggaaaaaccattgctgccaagtacactgactcaatagggactttccaatgggttttc

cattgttggaagcatataaggtcaatgtgggtgagtcfaatagggactttccattgtattctgccagtacataag
gtcaataggggggtgaatcaacaggaaagtcccattggagccaagtacactgcgtcaatagggactttccattg
ggttttgccagtacataaggtcaataggggatgagtcfaatgggaaaaaccattggagccaagtacactga
ctcaatagggactttccattgggtttgccagtacataaggtcaataggggtgagtcacaggaaagtccca
ttggagccaagtacattgagtcfaatagggactttccaatgggtttgccagtacataaggtcaatgggaggta
agccaatgggtttttccattactggcacgtatactgagtcattagggactttccaatgggtttgccagtacata
aggtcfaataggggtgaatcaacaggaaagtcccattggagccaagtacactgagtcfaatagggactttccatt
gggtttgccagtacaaaaggtcfaataggggtgagtcfaatgggtttttccattattggcacgtacataaggtc
aataggggtgagtcattgggtttttccagccaatttaattaaaacgccatgtactttccaccattgacgtcaatgg
gctattgaaactaatgcaacgtgaccttaaacgggtactttccatagctgattaatgggaaagtaccgttctcga
gccaatacacgtcaatgggaagtgaaggggcagccaaaacgtaacaccgccccgggtttcccctggaaatt
ccatattggcacgcattctattggctgagctgcgttctacgtgggtataagaggcgcgaccagcgctcggtaccgt
cgcgacttctcggtctgaccaccgtagaacgcagagctcctcgctgcag

SEQ ID N°: 9. (secuencia de nucleótidos de AIV H9-HA de codones optimizados)

atggaaccaattagcctgatgattatcctgctgctggtaccacctctaacgctgacaaaaatctgcatcggtcac
cagcttaccaactctaccgaaaccgttgacacctgaccgaaaccaacgttccggttaccacgctaaagaa
ctgctgcacaccgaacacaacggtatgctgtgcgtaccaacctgggtcaccgctgatcctgaacacctgc
actattgaaggctctgatctacggtaacccgtcttgcgacctgctgctgggtggctgtaatggctttacatcggtga
acgtccgtctgctgttaacggtacctgctacccgggtaacgttgaaaacctggaagaactgcgtaccctgttctc
ttcttcttcttaccagcgatccagatcttcccgacaccatctggaacgttacctacaccggtacctctaaatc
ttgctctgactcttctaccgtaacatgcgttggctgaccagaaaaacggtctgtacccggttcaggacgctca
gttcaccaacaaccgtggtaaagacatcctgttcgtttgggtatccaccaccgccgaccgacaccgctcag
accaacctgtacaccgctaccgacaccaccacctctgttaccaccgaaaacctggaccgtaccttcaaaccg
ctgatcggtccgctccgctgggttaacggtctgatcggtcgatcaactactactggtctgttctgaaaccgggtc

agaccctgctgttcttaacggtaacctgatcgctccgtgggtcaggtctgtctggtgaatctcacggt
cgtatcctgaaaaccgatctgaactctggttaactgctgttctcagtgccagaccgaaaaagggtggtctgaactct
accctgccgttccacaacatctctaaatacgctttcgggtacttggccgaaatacatcggtgttaaatctctgaaact
ggctatcggctctgctgaacgttccggctagggtcttcccggtggtctgttcgggtgctatcgctggttcatcgaagggtg
ttggccgggtctggttctggttggtacggtttccagcactctaacgaccagggtgttggtatggctgctgaccgt
gattctaccagaaagctgttgacaaaatcacctctaaagttaacaacatcggttgacaaaatgaacaaacagt
acgaaatcatcgaccacgaattctctgaagttgaaacccgtctgaacatgatcaacaacaaaatcgacgacc
agatccaggacgtttgggttacaacgctgaactgctggttctgctggaaaaccagaaaaccctggacgaac
acgacgctaacgttaacaacctgtacaacaaagttaaacgtgctctgggttctaacgctatggaagacggtaa
agggtgcttgaactgtaccacaaatgcgacgaccagtgcatggaaaccatccgtaacgggtacctacaaccg
tggaatacaagaagaatctcgtctggaacgtcagaaaatcgaagggtgttaactggaatctgaagggtac
ctacaaaatcctgaccatctactctaccgttgccttctctggttctgggtatgggtctgggtgcttctctgttctgggc
tatgtctaacggttcttgcggttgcaacatctgcatctaataga

SEQ ID N°: 10. (secuencia de nucleótidos de IBDV VP2)

atgacaaacctgcaagatcaaaccacagattgttccgttcatacggagccttctgatgccaacaaccgga
ccggcgtccattccggacgacacctggagaagcacactctcaggtcagagacctcgacctacaatttgact
gtggggggacacaggggtcagggctaattgtcttttccctggattccctgggtcaattgtgggtgctcactacacact
gcagagcaatgggaactacaagttcgatcagatgctcctgactgccagaacctaccggccagctacaact
actgcagactagttagtcggagtctcacagttaggtcaagcacactccctgggtggcgtttatgcactaaacgg
caccataaacgccgtgacctccaaggaagcctgagtgaactgacagatgtagctacaatgggttgatgtct
gcaacagccaacatcaacgacaaaattgggaatgtcctggtaggggaaggggtcactgtcctcagcctacc
cacatcatatgatcttgggtatgtgaggcttggtagcccatcccgctatagggttgacccaaaaatggtagct
acatgcgacagcagtgacaggcccagagtctacaccataactgcagccgatgattaccaattctcatcacag
taccaaccagggtggggtacaacatcacactgttctcagccaacattgatgctatcacaagcctcagcattgggg
gagagctcgtgttcaacaagcgtccaaggccttgactgggcgccaccatctaccttataggctttagtggga

ctgCGGtaatcaccagagctgtagccgcagataatgggctgacggccggcaccgacaatcttatgccattca
atcttgTcattccaaccaatgagataaaccagccaatcacatccatcaaactggagatagtgacctccaaaag
tggTggtcaggcaggggatcagatgtcatggTcggaagtgggagcctagcagtgacgatccatggTggcaa
ctatccagggggccctccgtcccgtcacactagtagcctacgaaagagtggcaacaggatccgtcgTtacggTc
gctggggTgagtaacttcgagctgattccaaatcctgaactagcaaagaacctggTtacagaatacggccgat
ttgacccaggagccatgaactacacaaaattgatactgagtgagagggaccgtcttgGcatcaagaccgtct
ggccaacaagggagTactgattttcgTgagtacttcatggaggTggccgacctcaactctcccTgaagatt
gcaggagcatttgGcttcaaagacataatccgggctataaggaggtaa

SEQ ID N°: 11. (secuencia de nucleótidos de NDV F)

atgggctccaaaccttctaccaggatcccagcacctctgatgctgatcaccggattatgctgatattgggctgt
atccgtccgacaagctctcttgacggcaggcctcttgagctgcaggaattgtagtaacaggagataaggcag
tcaatgtatacacttcgtctcagacagggTcaatcatagTcaagTgctcccgaatatgccagggataaggag
gcgtgtgcaaaagccccattagaggcatataacagaacactgactactttgctcactcctcttgGcgactccatc
cgcaagatccaagggtctgtgtccacatctggaggaggcaagcaaggccgctgataggTgctgttattggc
agtgtagctcttggggTgcaacagcggcacagataacagcagctgcggccctaatacaagccaaccagaa
tgccgccaacatcctccggcttaaggagagcattgctgcaaccaatgaagctgtgcatgaagTaccgacgg
attatcacaactatcagTggcagTtggaagatgcagcagTttgtcaatgaccagTttaataatacggcgcgag
aattggactgtataaaaatcacacaacaggTtggtgtagaactcaacctatacctaactgaattgactacagtat
tcggggccacagatcacctcccctgcattaactcagctgaccatccaggcactttataatttagctggTggcaatat
ggattacttattaactaagTtaggtatagggaacaatcaactcagctcgTtaattggtagcggcctgatcactggTt
acctatactgtatgactcacagactcaactcttgggcatacaagtgaatttacctcagTcgggaaacttaata
atatgcgtgccacctatttgagaccttatctgtaagtacaaccaaaggatatgcctcagcactgtcccgaaag
tagtgacacaagTcggtccgtgatagaagagcttgacacctcatactgtatagagTccgatctggatttatattgt
actagaatagTgacattccccatgtccccaggTatttattcctgtttgagcggcaacacatcagcttgcatgtattc
aaagactgaaggcgcactcactacgccgtatatggcccttaaaggctcagTtattgccaattgtaaaataaca

acatgtagatgtacagaccctcctggatcatatcgcaaaattatggagaagctgtatccctgatagatagacat
tcgtgcaatgtcttatcattagacgggataactctaaggctcagtggggaatttgatgcaacttatcaaaagaac
atctcaatactagattctcaagtcacgtgacaggcaatcttgatatcaactgaacttgaaacgtcaacaatt
caatcagcaatgccttgataggtggcagaaagcaacagcaagctagaaaaagtcaatgtcagactaacc
agcacatctgctctattacctatatgttctaactgtcatttcttagtttcggtgcacttagctgggttagcgtgtta
cctgatgtacaaacagaaggcacaacaaaagacctgctatggcttggaataataccctcgatcagatgag
agccactacaagagcatg

SEQ ID N°: 12. (secuencia de nucleótidos de IRES)

ccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttattttccacc
atatggcgtcttttggaatgtgagggcccgaaacctggccctgtctcttgacgagcattcctaggggtctttc
ccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagac
aaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcggaacccccacctggcgacaggtgcctctcgggccaa
aagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacccagtgccacgttgtagttggatagttgtg
gaaagagtcaaatggctctctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgt
atgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttttagtcgaggttaaaaaacgtctagggcccccc
gaaccacggggacgtgggttttccttgaaaaacacgatgataat

SEQ ID N°: 13. (secuencia de nucleótidos de poliA de SV40)

ggggatccagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatg
ctttatttgtaaatttgtagtctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaatt
gcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggttttt

SEQ ID N°: 14. (P2A de pFP2AVP2)

ggctccggcgccaccaacttctccctgctcaagcaggccggcgacgtggaggagaaccctggacct

SEQ ID N°: 15. (cebador MB080)

CGAACAAACTTCATCGCTATG C

SEQ ID N°: 16. (cebador MB081)

TAACTCAAATGCGAAGCGTTGC

SEQ ID N°: 17. (cebador SAH9F.3)

CTCTGAAGTTGAAACCCGTC

SEQ ID N°: 18. (cebador VP2.F)

AGA TTG CAG GAG CAT TTG GCT

SEQ ID N°: 19. (cebador SV40poliA.R1)

ATGCAATTGTTGTAACT

SEQ ID N°: 20. (cebador mCMVF)

AACTCCGCCCGTTTTATG

SEQ ID N°: 21. (cebador 110P.1)

TCT TTG TTC CTT GAA ATG CCG ACA

SEQ ID N°: 22. (cebador 110P1)

TCA TGT CGA TGA AAT GTT ATG

SEQ ID N°: 23. (cebador 110P2)

TGC GTC GAT AAG ACT TTG GT

SEQ ID N°: 24. (cebador 119P1)

TTA GTT TGC ATT TCT TAG GG

SEQ ID N°: 25. (cebador 119P2)

TGA ATA TTT GCA ACC AAT GC

SEQ ID N°: 26. (cebador mCMVP1)

TCA GCA CGG TCA TGC ACT CT

SEQ ID N°: 27. (cebador 309P1)

ATG TAC TTT CCC ACC ATT GAC G

SEQ ID N°: 28. (cebador 309P2)

AGG CGG CCG CTC TAG AAC G

SEQ ID N°: 29. (cebador 309P3)

ACC GGC CAG CTA CAA CTA

SEQ ID N°: 30. (cebador 309P4)

ATG CGA CAG CAG TGA CAG

SEQ ID N°: 31. (cebador 309P5)

AGA TAA CCC AGC CAA TCA

SEQ ID N°: 32. (cebador 309P6)

ACT GAG TGA GAG GGA CCG TC

SEQ ID N°: 33. (cebador SAH9R)

ATC AGG CTA ATT GGT TCC AT

SEQ ID N°: 34. (cebador SAH9F)

ATG GAA CCA ATT AGC CTG AT

SEQ ID N°: 35. (cebador SAH9F.1)

ATG GAA CCA ATT AGC CTG AT

SEQ ID N°: 36. (cebador SAH9F.2)

ACG TTC TGT CTG GTG AAT CT

SEQ ID N°: 37. (cebador 309P15R)

ACA CGC GCC GTT GAG TAT

SEQ ID N°: 38. (cebador 309P15)

ATA CTC AAC GGC GCG TGT

SEQ ID N°: 39. (cebador 309P16)

ATC CGA AGA AGA AGG CGT

SEQ ID N°: 40. (cebador 309P18)

ACC GCC AGA TAT CCA AAG TA

SEQ ID N°: 41. (cebador 312P6)

CGT CAA CAA TTC AAT CAG CA

SEQ ID N°: 42. (cebador 312P2)

TAT GCC CAG GGA TAA GGA GG

SEQ ID N°: 43. (cebador 312P3R)

ACT TCA TGC ACA GCT TCA

SEQ ID N°: 44. (cebador 312P4)

CTG GTG GCA ATA TGG ATT

SEQ ID N°: 45. (cebador 312P5R)

ATG TGT TGC CGC TCA AAC AG