

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 789**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/145** (2006.01)

**C07K 14/11** (2006.01)

**C12N 15/861** (2006.01)

**A61P 31/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2006 PCT/US2006/031778**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.02.2007 WO07022151**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2006 E 06813446 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 1924282**

54 Título: **Inmunización de aves por administración de vacunas con vectores no replicantes**

30 Prioridad:

**15.08.2005 US 708524 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.06.2017**

73 Titular/es:

**ALTIMMUNE INC. (50.0%)  
2800 MILAN COURT, SUITE 231  
BIRMINGHAM, AL 35211, US y  
AUBURN UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TANG, DE-CHU, C.;  
VAN KAMPEN, KENT, R. y  
TORO, HAROLD**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 620 789 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Inmunización de aves por administración de vacunas con vectores no replicantes

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere en general a los campos de la inmunología y la tecnología de vacunas. Más específicamente, la invención se refiere a un vector de expresión de adenovirus humano recombinante para su uso en la vacunación profiláctica en un embrión de ave como se reivindica en la reivindicación 1. La invención también proporciona una composición inmunogénica para su uso en la vacunación profiláctica de un sujeto aviar como se reivindica en la reivindicación 7 y un adenovirus humano recombinante para su uso en la vacunación profiláctica de un sujeto aviar como se reivindica en la reivindicación 12.

**10 Antecedentes de la invención**

15 La influenza aviar (IA) es un patógeno grave que infecta aves, otros animales, y seres humanos. Desde 1997, ha habido varios casos de transmisión del virus de la IA en seres humanos (Subbarao et al., 1998; Ungchusak et al., 2005). La evidencia también muestra que la recombinación genética entre los virus de la influenza aviar y humana ha ocurrido en múltiples ocasiones en la historia médica (Kawaoka et al., 1989). Puesto que aves y seres humanos están en contacto cercano, se cree que la generación de nuevas cepas de virus de la IA que puedan cruzar la barrera de la especie a la población humana seguirá siendo un problema de salud pública.

20 La vacunación masiva de aves parece ser el enfoque más prometedor para prevenir la diseminación del virus de la IA y para reducir el riesgo de pandemias humanas. La vacunación de aves con vacunas de virus completos inactivados se ha llevado a cabo en algunos países en los últimos años. Estas vacunas de la IA se preparan a partir de fluido amnio-alantoideo cosechado de huevos infectados, y, posteriormente, son inactivadas con formalina o  $\beta$ -propiolactona (Tollis y Di Trani, 2002). Sin embargo, la aparición impredecible de nuevas cepas de virus de IA, la evolución de los virus de IA a una forma altamente letal para embriones de pollo (Wood et al., 2002), y la posible diseminación de cepas de IA letales por bioterroristas hacen que el rápido desarrollo y el suministro oportuno de vacunas seguras y eficaces para la IA sea una tarea fundamental, aunque muy difícil. Además, no es posible discriminar los pollos infectados en el campo de los previamente vacunados con virus de IA inactivados de las mismas cepas (Normile, 2004).

25 Un virus de la viruela aviar recombinante experimental que codifica la hemaglutinina (HA) de un virus de la IA ha protegido pollos contra una exposición al virus de la IA H5N2 después de la punción en la membrana del ala, aunque la respuesta serológica a la inhibición de la hemaglutinación (IH) fue insignificante (Beard et al., 1992). Los pollos a los que se inoculó a través de la membrana del ala un virus vaccinia recombinante vivo que expresaba HA también desarrollaron inmunidad protectora frente a una exposición letal al virus IA con bajos niveles detectados de anticuerpo IH en suero (Chambers et al., 1988). Aunque los productos aislados de IA de aves acuáticas que tienen un tropismo por el tracto digestivo se han inoculado en pollos como una vacuna oral para la IA (Crawford et al., 1998), no se espera que esos productos aislados vayan a ser ampliamente eficaces contra nuevas cepas de virus de IA, debido a la evolución inherentemente dinámica de este tipo de virus.

30 Las aves también han sido inmunizadas por medio de inyección subcutánea de las proteínas HA expresadas a partir de vectores de baculovirus (Crawford et al., 1999), y la inoculación de un plásmido de expresión que codifica HA en la piel utilizando una pistola de genes (Fynan et al., 1993). Estas vacunas de IA son capaces de proteger a las aves de la exhibición de los signos clínicos y de muerte, y de reducir la replicación intestinal y respiratoria de un virus de exposición que contiene HA homólogos. También hay pruebas de que puede ser eficaz una vacuna para IA en aerosol de bajo coste que expresa HA a partir de un vector de virus de la enfermedad de Newcastle (Swayne, 2003) o un virus de la influenza recombinante que contiene una cadena principal de virus de la influenza no patógeno (Lee et al., 2004; Webby et al., 2004).

35 La mayoría de las vacunas contra IA anteriores se basan en una administración parenteral laboriosa. Las vacunas contra IA orales y en aerosol adolecen de incongruencias en el suministro de dosis uniformes a las aves individuales durante la inoculación en masa. Los vectores de replicación utilizados en algunas vacunas también plantean un riesgo biológico al introducir formas microbianas no naturales en el entorno. La vacuna contra el virus de la influenza recombinado podría incluso generar redistribuciones nocivas mediante recombinación entre un virus de la influenza redistribuido y un virus de IA salvaje que circula al mismo tiempo en el entorno (Hilleman, 2002).

40 Existen varias razones notables para la utilización de vectores de adenovirus recombinante ("Ad") como vacuna anteriormente. Los vectores Ad son capaces de transducir células tanto mitóticas como postmitóticas in situ. Además, la preparación de soluciones de partida de Ad que contienen títulos elevados de virus (es decir, más de  $10^{12}$  ufp [unidades formadoras de placas] por ml) son fáciles de generar, lo que hace posible transducir células in situ a una elevada multiplicidad de infección (MOI). Los vectores de Ad también tienen un registro de seguridad comprobado, en función de su uso a largo plazo como vacuna. Adicionalmente, el virus Ad es capaz de inducir altos niveles de expresión de genes (al menos como una ráfaga inicial), y los vectores de Ad de replicación defectuosa pueden ser fácilmente biomodificados genéticamente, fabricados y almacenados utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica.

Las vacunas basadas en Ad son más potentes que las vacunas de ADN debido a la alta afinidad de los vectores de Ad por receptores específicos y a su capacidad para escapar de la vía endosomal (Curiel, 1994). Los vectores de Ad pueden transducir parte de un embrión de pollo a través de la unión de su fibra al receptor de coxsackie y adenovirus (CAR) encontrado en la superficie de las células de pollo (Tan et al., 2001). Además, al menos uno de los componentes de Ad, la hexona, es altamente inmunogénico y puede conferir actividad coadyuvante a los antígenos exógenos (Molinier-Frenkel et al., 2002).

Las vacunas basadas en Ad imitan los efectos de las infecciones naturales en su capacidad para inducir respuestas de las células T restringidas a la clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), sin embargo, eliminan la posibilidad de reversión a la virulencia de nuevo porque sólo un subfragmento del genoma del patógeno se expresa a partir del vector. Esta "expresión selectiva" puede resolver el problema de diferenciación de los animales vacunados pero no infectados de sus contrapartes infectadas, ya que los marcadores específicos del patógeno no codificado por el vector se pueden utilizar para discriminar los dos eventos. En particular, no se requiere la propagación del patógeno para la generación de vacunas vectorizadas porque los genes de los antígenos relevantes pueden ser amplificados y clonados directamente a partir de muestras de campo (Rajakumar et al., 1990). Esto es particularmente importante para la producción de cepas de IA altamente virulentas, tales como H5N1, ya que esta cepa es demasiado peligrosa y difícil de propagar (Wood et al., 2002). Además de los criterios anteriores, las consideraciones comerciales tienen un gran peso en la industria avícola. La vacuna de IA actual cuesta por sí sola alrededor de 7 centavos de dólar por ave, sin contar la mano de obra de la inyección en las aves corredoras (Normile, 2004).

Los vectores derivados del serotipo 5 de Ad humano (Ad5) defectuosos para E1/E3 de replicación incompetente han sido ampliamente estudiados en los mamíferos (Graham y Prevec, 1995). A pesar de que los pollos hayan sido inmunizados mediante inyección subcutánea o intradérmica de un vector viral huérfano letal de embrión de pollo Ad aviar (CELO) que codifica un antígeno (Francois et al., 2004), el vector CELO tiene una baja tasa de cumplimiento y podría ser potencialmente dañino debido a su capacidad para replicar en células de pollo. Puesto que CELO no posee regiones E1, E3, y E4 identificables (Chiocca et al., 1996), no se encuentra disponible un vector CELO de replicación incompetente como portador para la inmunización en este momento. La presente invención aborda esta necesidad al proporcionar medios seguros y eficaces como se reivindica en la presente memoria para el suministro de genes para proteger a las aves en una amplia variedad de entornos de enfermedad, y por lo tanto prevenir la transmisión de patógenos aviares a seres humanos.

El documento WO 03/070920 describe métodos para incluir una respuesta inmunitaria sistémica para proporcionar una inmunización genética no invasiva o una respuesta terapéutica en un animal, proporcionando un polinucleótido que codifica una proteína de interés.

El documento AU 2005201381, describe un método de inmunización genética no invasivo en un animal y/o métodos de inducción de una respuesta inmunitaria sistémica o terapéutica en un animal, los productos de los mismos y los usos de los métodos y los productos de los mismos. Los métodos pueden incluir el contacto de la piel del animal con un vector en una cantidad eficaz para inducir la respuesta del sistema inmunitario o terapéutica en animales.

La presentación por Gao et al. de Molecular Therapy, Academic Press, San Diego, Vol. 11, 2005, página 27 describe una vacuna protectora para una rápida respuesta a la pandemia de la influenza aviar.

### **Compendio de la invención**

Ahora se ha mostrado sorprendentemente que el su ministro intramuscular y *in ovo* de vacunas vectorizadas de adenovirus humanos puede inmunizar rápidamente, de forma segura, y efectiva aves. La inmunización masiva de aves contra varios patógenos aviares es crucial para evitar enormes pérdidas económicas, y para impedir la transmisión de patógenos aviares, tales como el virus de la influenza aviar, a la población humana. El suministro de vacunas o composiciones inmunogénicas *in ovo* con un inyector mecanizado es un método no laborioso para la inmunización en masa de aves de una manera oportuna. A diferencia de otras vacunas aviares *in ovo*, la producción de vacunas vectorizadas de humanos o composiciones inmunogénicas no requiere la propagación de agentes patógenos letales y no implica la transmisión de antígenos o inmunógenos por un vector que sea capaz de replicar en aves. Además, la inmunización por este tipo de vacuna o composición inmunogénica permite la diferenciación entre animales vacunados y animales infectados naturalmente.

En un aspecto, la invención proporciona un vector de expresión de adenovirus humano recombinante que comprende y expresa una secuencia de ADN adenoviral, y una secuencia promotora conectada operablemente a una secuencia foránea que codifica uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés, para su uso en la vacunación profiláctica de un embrión aviar mediante la introducción y expresión de uno o más antígenos o inmunógenos de la influenza aviar en un embrión aviar.

Preferiblemente, la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés deriva de uno o más virus aviares.

Más preferiblemente, la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés deriva del virus de la influenza aviar.

Más preferiblemente, la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés se selecciona del grupo que consiste en hemaglutinina, nucleoproteína, matriz o neuraminidasa.

Más preferiblemente, la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés se selecciona del grupo que consiste en el subtipo de hemaglutinina 3, 5, 7, ó 9.

5 La introducción en un embrión aviar se puede producir preferiblemente por medio de suministro *in ovo*.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un vector de expresión de adenovirus humano recombinante que comprende y expresa una secuencia de ADN adenoviral, y una secuencia promotora unida operablemente a una secuencia foránea que codifica uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés, para su uso en la vacunación profiláctica de un sujeto aviar provocando una  
 10 respuesta inmunogénica en un sujeto aviar, en donde el sujeto aviar está infectado *in ovo* con una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunogénica que comprende un vector de expresión de adenovirus humano recombinante que comprende y expresa una secuencia de ADN adenoviral, y una secuencia promotora conectada operablemente a una secuencia foránea que codifica uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés, en donde los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés se expresan a un nivel suficiente para  
 15 provocar una respuesta inmunogénica a los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés en el sujeto aviar.

Preferiblemente, los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés derivan de virus de la influenza aviar, virus de la enfermedad infecciosa de la bursa, virus de la enfermedad de Marek, herpesvirus aviar, virus de la laringotraqueitis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa aviar, reovirus aviar, avipox, viruela aviar, viruela del canario, viruela del pichón, viruela de la perdiz, y viruela de la paloma, poliomasvirus aviar, virus de la enfermedad de Newcastle, pneumovirus aviar, virus de la rinotraqueitis aviar, virus de la reticuloendoteliosis aviar, retrovirus aviares, virus endógeno aviar, virus de la eritroblastosis aviar, virus de la hepatitis aviar, virus de la anemia aviar, virus de la enteritis aviar, virus de la enfermedad de Pacheco, virus de la leucemia aviar, parvovirus aviar, rotavirus aviar, virus de la leucosis aviar, virus del fibrosarcoma musculoponeurótico aviar, virus de la mieloblastosis aviar, virus asociado a la mielocitomatosis aviar, virus de la mielocitomatosis aviar, virus del sarcoma aviar, o virus de la necrosis del bazo aviar.  
 20  
 25

Más preferiblemente, la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés deriva de virus de la influenza aviar.

Más preferiblemente, la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés se selecciona del grupo que consiste en hemaglutinina, nucleoproteína, matriz o neuraminidasa.  
 30

Más preferiblemente, la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés se selecciona del grupo que consiste el subtipo de hemaglutinina 3, 5, 7, ó 9.

El aspecto puede comprender adicionalmente la administración de una vacuna adicional.

En este aspecto, la infección se produce por medio de suministro *in ovo*.

Otro aspecto de la invención proporciona un adenovirus recombinante humano que contiene y expresa una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de un patógeno del sujeto aviar para su uso en la vacunación profiláctica de un sujeto aviar mediante la inoculación en un sujeto aviar, que comprende la administración *in ovo* de un adenovirus recombinante humano que contiene y expresa una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de un patógeno del sujeto aviar.  
 35

40 Preferiblemente, el adenovirus humano comprende secuencias derivadas de serotipo 5 de adenovirus.

Preferiblemente, el adenovirus humano comprende secuencias derivadas de adenovirus de replicación defectuosa, adenovirus no replicantes, adenovirus de replicación competente, o adenovirus de tipo salvaje.

Preferiblemente, el antígeno de un patógeno del ave deriva de virus de la influenza aviar, virus de la enfermedad infecciosa de la bursa, virus de la enfermedad de Marek, herpesvirus aviar, virus de la laringotraqueitis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa aviar, reovirus aviar, avipox, viruela aviar, viruela del canario, viruela del pichón, viruela de la codorniz y viruela de la paloma, poliomasvirus aviar, virus de la enfermedad de Newcastle, pneumovirus aviar, virus de la rinotraqueitis aviar, virus de la reticuloendoteliosis aviar, retrovirus aviares, virus endógeno aviar, virus de la eritroblastosis aviar, virus de la hepatitis aviar, virus de la anemia aviar, virus de la enteritis aviar, virus de la enfermedad de Pacheco, virus de la leucemia aviar, parvovirus aviar, rotavirus aviar, virus de la leucosis aviar, virus del fibrosarcoma musculoponeurótico aviar, virus de la mieloblastosis aviar, virus asociado a la mieloblastosis aviar, virus de la mielocitomatosis aviar, virus del sarcoma aviar, o virus de la necrosis del bazo aviar.  
 45  
 50

Más preferiblemente, el antígeno de un patógeno del ave deriva de virus de la influenza aviar.

Más preferiblemente, los antígenos o inmunógenos de la influenza aviar se seleccionan del grupo que consiste en hemaglutinina, nucleoproteína, matriz o neuraminidasa. Más preferiblemente, los antígenos o inmunógenos de la

influenza aviar se seleccionan del grupo que consiste en los subtipos de hemaglutinina 3, 5, 7, ó 9.

El aspecto puede comprender adicionalmente la administración de una vacuna adicional.

### Breve descripción de los dibujos

5 La siguiente Descripción Detallada, proporcionada a modo de ejemplo, pero sin pretender que limite la invención a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse junto con las Figuras adjuntas, en las que:

10 La Figura 1 es un gráfico que representa la inmunización de pollos por medio de inyección intramuscular e *in ovo* del vector de adenovirus recombinante que expresa HA de influenza aviar. El Grupo 1 representa huevos embrionados de pollo de 9 días de edad y el Grupo 2 representa huevos de pollo embrionados de 18 días de edad, respectivamente, en un volumen de 200  $\mu$ l a una dosis de  $5 \times 10^{10}$  ufp por huevo. En el Grupo 3, el vector de adenovirus recombinante que expresa la HA de influenza aviar se inyectó por vía intramuscular a tres pollos de 4  
15 semanas de edad, en un volumen de 100  $\mu$ l a una dosis de  $2,5 \times 10^{10}$  ufp por animal.

La Figura 2 es un gráfico que representa los títulos de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (puntos) detectados en pollos SPF de 28 días de edad vacunados con AdTW68.H5 *in ovo* solamente los días 10 o 18 de incubación, y pollos que fueron vacunados *in ovo* los días 10 o 18 de la incubación y recibieron un refuerzo por vía nasal el día 15 después de la eclosión. Barra, media geométrica del  $\log_2$  [título de IH]. No se detectaron títulos de IH en los pollos de control no sometidos a tratamiento previamente (datos no mostrados).  
20

La Figura 3 es un gráfico que representa los anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación en pollos SPF los días 23 y 29 después de la eclosión, ya sea vacunados *in ovo* solamente (7 pollos) el día 18 de embrionación ya sea vacunados *in ovo* y con un refuerzo por vía intranasal el día 15 después de la eclosión (12 pollos) con AdTW68.H5. D23 y D29, títulos de IH los días 23 y 29 después de la eclosión, respectivamente; puntos,  $\log_2$  [título de IH] en aves individuales; barra, media geométrica del  $\log_2$  [título de IH]. No se detectaron títulos de IH en 11 pollos de control no sometidos a tratamiento previo los días 23 y 29 después de la eclosión (datos no mostrados).  
25

La Figura 4 es un gráfico que representa la vacunación *in ovo* de embriones de pollo Leghorn blancos de 18 días. La vacunación *in ovo* se realizó utilizando  $10^8$  pv de AdTW68.H5 (*in ovo*). En un grupo separado, las aves vacunadas *in ovo* recibieron un refuerzo el día 15 después de la eclosión por instilación intranasal de AdTW68.H5 con la misma dosis (*in ovo* + refuerzo nasal). Los embriones que no habían sido sometidos a tratamiento previo, sin vacunación sirvieron como controles negativos (Control). A los 34 días de edad los pollos fueron sensibilizados por vía intranasal a través de la hendidura de la coana con una dosis letal de la cepa del virus de la IA A/Ck/Queretaro/14588-19/95 altamente patógena (H5N2). Los cambios estadísticamente significativos en la supervivencia se determinaron durante todo el estudio mediante el ensayo Logrank (Prism 4.03, GraphPad Software). La vacunación *in ovo* con AdTW68.H5 con o sin aplicaciones nasales de refuerzo protegieron de manera significativa a los pollos (100%) frente a una sensibilización letal con virus IA, en comparación con los controles no vacunados ( $P < 0,001$ ).  
30

La Figura 5 es un gráfico que representa ARN viral A/Ck/Queretaro/14588-19/95 cuantificado mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (16) en muestras de orofaringe de los pollos vacunados y de control después de la sensibilización intranasal con este virus IA altamente patógeno. Los pollos fueron vacunados como se describe en la descripción de la Fig. 3. Las muestras se recogieron a los 2, 4, y 7 días de la infección. El día 7 se alcanzó una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) en la carga viral entre los controles vacunados y no vacunados.  
35

La Figura 6 es un gráfico que representa la vacunación *in ovo* el día 18 realizada por inoculación del vector AdTW68.H5 a una dosis de  $3 \times 10^8$  ifu. El vector de Ad5 se purificó por medio de membrana Sartobind Q5 (Sartorius North America, Inc., Edgewood, NY) y se resuspendió en tampón A195 (Evans, 2004). Se analizaron los anticuerpos IH en suero antes de la sensibilización el D25. El signo menos (-) indica aves que sucumbieron a la sensibilización; el signo más (+) indica aves que sobrevivieron a la sensibilización. Los supervivientes tenían una actividad IH significativamente elevada en suero antes de la sensibilización ( $P < 0,001$ ) en comparación con aquellos que murieron (prueba de la t no pareada; Prism 4.03). Las aves de control no sometidas a tratamiento previo AU y las aves inmunizadas por el vector de control AdCMV-tetC no produjeron títulos de anticuerpos IH medibles.  
40

La Figura 7 es un gráfico que representa la vacunación *in ovo* el día 18 realizada por inoculación del vector AdTW68.H5 a una dosis de  $3 \times 10^8$  ifu. El vector Ad5 se purificó por medio de membrana Sartobind Q5 (Sartorius North America, Inc., Edgewood, NY) y se resuspendió en tampón A1 95 (Evans, 2004). Las aves de control e inmunizadas fueron sensibilizadas por medio de administración intranasal de  $10^5$  DIE<sub>50</sub> del virus IA H5N1 A/Swan/Mongolia/244L/2005 el D31.  
45

### Descripción detallada de la invención

55 En esta descripción, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de Patentes de los Estados Unidos y pueden significar "incluye", "que incluye", y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente en" asimismo tienen el significado atribuido en la ley de Patentes de los Estados Unidos y el término es abierto, permitiendo la presencia de más de lo

que se cita siempre que las características básicas o novedosas de lo que se cita no cambien por la presencia de más de lo que se cita, pero excluye realizaciones de la técnica anterior. El término "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a un oligonucleótido desoxirribonucleico o ribonucleico en forma de hebra sencilla o doble.

5 El término abarca ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. El término también abarca estructuras de tipo ácido nucleico con cadenas principales sintéticas, véase, p. ej., Eckstein, 1991; Baserga et al., 1992; Milligan, 1993; documentos WO 97/03211; WO 96/39154; Mata, 1997; Strauss-Soukup, 1997; y Samstag, 1996.

10 Según se utiliza en la presente memoria, "recombinante" se refiere a un polinucleótido sintetizado o manipulado de otro modo *in vitro* (p. ej., "polinucleótido recombinante"), a métodos de utilización de polinucleótidos recombinantes para producir productos génicos en células u otros sistemas biológicos, o a un polipéptido ("proteína recombinante") codificado por un polinucleótido recombinante. Los "medios recombinantes" también abarcan la ligación de ácidos nucleicos que tienen diversas regiones codificantes o dominios o secuencias promotoras de diferentes fuentes en un casete de expresión o vector para la expresión, p. ej., la expresión inducible o constitutiva de secuencias codificantes de polipéptidos en los vectores para su utilización en la invención.

15 El término "heterólogo" cuando se utiliza con referencia a un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico está en una célula o un virus en el que no se encuentra normalmente en la naturaleza; o, comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí que se encuentran normalmente en la naturaleza, o está modificado recombinantemente de manera que su nivel de expresión, o relación física con otros ácidos nucleicos u otras moléculas en una célula, o estructura, no se encuentra normalmente en la naturaleza. Un término similar  
20 utilizado en este contexto es "exógeno". Por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo es producido típicamente de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestas de una manera que no se encuentra en la naturaleza; p. ej., un gen humano conectado operablemente a una secuencia promotora insertada en un vector basado en adenovirus para su uso en la invención. Como ejemplo, un ácido nucleico heterólogo de interés puede codificar un producto génico inmunogénico, en donde el adenovirus se administra terapéuticamente o  
25 profilácticamente como una vacuna o una composición de vacuna. Las secuencias heterólogas pueden comprender varias combinaciones de promotores y secuencias, cuyos ejemplos se describen en detalle en la presente memoria.

Un "antígeno" es una sustancia que es reconocida por el sistema inmunitario e induce una respuesta inmunitaria. Un término similar utilizado en este contexto es "inmunógeno". Un "sujeto aviar" en el contexto de la presente invención se refiere a todos y cada uno de los miembros domésticos y salvajes de la clase Aves, que incluyen, pero no se limitan a, Neognathae y Palaeognathae. El orden Neognathae incluye, entre otros, Anseriformes, Apodiformes, Buceriformes, Caprimulgiformes, Charadriiformes, Ciconiiformes, Coliiformes, Columbiformes, Coraciiformes, Cuculiformes, Falconiformes, Galbuliformes, Galliformes, Gaviiformes, Gruiformes, Musofagiformes, Opisthocomiformes, Passeriformes, Pelecaniformes, Phoenicopteriformes, Piciformes, Podicipediformes, Procellariiformes, Psittaciformes, Sphenisciformes, Strigiformes, Trochiliformes, Trogoniformes, Turniciformes, y  
35 Upupiformes. El orden Palaeognathae incluye, entre otros, Apterygiformes, Casuariiformes, Dinornithiformes, Rheiformes, Struthioniformes, y Tiniamiformes. Los sujetos aviares pueden comprender aves adultas, pollos de aves, y embriones/huevos de aves.

"Expresión" de un ácido nucleico o gen abarca no sólo la expresión del gen celular, sino también la transcripción y la traducción del ácido nucleico o los ácidos nucleicos en los sistemas de clonación y en cualquier otro contexto.

40 Según se utiliza en la presente memoria, un "vector" es una herramienta que permite o facilita la transferencia de una entidad de un entorno a otro. A modo de ejemplo, algunos vectores utilizados en técnicas de ADN recombinante permiten que entidades, tales como un segmento de ADN (tal como un segmento de ADN heterólogo, tal como un segmento de ADNc heterólogo), sean transferidas a una célula diana. La presente invención comprende vectores recombinantes que pueden incluir vectores virales, vectores bacterianos, vectores de protozoos, vectores de ADN, o  
45 recombinantes de los mismos.

Con respecto al ADN exógeno para la expresión en un vector (p. ej., que codifica un epítipo y/o un antígeno y/o un agente terapéutico de interés) y los documentos que proporcionan semejante ADN exógeno, así como con respecto a la expresión de los factores de transcripción y/o traducción para potenciar la expresión de moléculas de ácido nucleico, y en cuanto a términos tales como "epítipo de interés", "agente terapéutico", "respuesta inmunitaria",  
50 "respuesta inmunológica", "respuesta inmunitaria protectora", "composición inmunológica", "composición inmunogénica", y "composición de vacuna", entre otros, se hace referencia a la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.990.091 presentada el 23 de noviembre, de 1999 y los documentos WO 98/00166 y WO 99/60164, y los documentos citados en ellos y los documentos de registro en el enjuiciamiento de esa patente y esas solicitudes PCT. Así, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.990.091 y los documentos WO 98/00166 y WO 99/60164 y los  
55 documentos citados en ellos y los documentos de registro en el enjuiciamiento de esa patente y esas solicitudes PCT y otros documentos citados en ellos, pueden consultarse en la práctica de esta invención; y, todas las moléculas de ácido nucleico exógeno, promotores, y vectores citados en los mismos se pueden utilizar en la práctica de esta invención. A este respecto, también se hace mención a las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.706.693; 6.716.823; 6.348.450; las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos con los Núms. de Serie  
60 10/424,409; 10/052,323; 10/116,963; 10/346,021; y el documento WO 99/08713, publicado el 25 de Febrero, de

1999, de PCT/US98/16739.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "composición inmunogénica" y "composición inmunológica" y "composición inmunogénica o inmunológica" abarcan cualquier composición que provoca una respuesta inmunitaria contra el antígeno o inmunógeno de interés expresado a partir de vectores adenovirales y virus para su uso en la invención; por ejemplo, después de la administración a un sujeto, provoca una respuesta inmunitaria contra el inmunógeno o antígeno elegido como diana de interés. Los términos "composición vacunal" y "vacuna" y "composición de vacuna" abarcan cualquier composición que induce una respuesta inmunitaria protectora contra el antígeno o los antígenos de interés, o que protege eficazmente contra el antígeno; por ejemplo, después de la administración o inyección al sujeto, provoca una respuesta inmunitaria protectora contra el antígeno o inmunógeno elegido como diana o proporciona una protección eficaz contra el antígeno o inmunógeno expresados a partir de los vectores de adenovirus de la invención para su uso en la invención. El término "composición veterinaria" significa cualquier composición que comprende un vector para uso veterinario que expresa una proteína terapéutica como, por ejemplo, la eritropoyetina (EPO) o una proteína inmunomoduladora, tal como, por ejemplo, el interferón (IFN). Del mismo modo, el término "composición farmacéutica" significa cualquier composición que comprende un vector para expresar una proteína terapéutica.

Una "cantidad inmunológicamente eficaz" es una cantidad o concentración del vector recombinante que codifica el gen de interés, que, cuando se administra a un sujeto, produce una respuesta inmunitaria al producto génico de interés.

Una "forma recombinante circulante" se refiere a virus recombinantes que se han sometido a una redistribución genética entre dos o más subtipos o cepas. Otros términos utilizados en el contexto de la presente invención son "forma híbrida", "forma recombinada", y "forma de genoma redistribuido".

"Productos aislados clínicos" se refiere, por ejemplo, a las cepas de virus de laboratorio utilizadas con frecuencia que se aíslan de los sujetos infectados y se restablecen en células de laboratorio o sujetos con cepas maestras de virus donantes de alto crecimiento adaptadas al laboratorio.

"Productos aislados de campo" se refiere a los virus que se aíslan de los sujetos infectados o del medio ambiente.

Los aspectos anteriores de la invención se aplican apropiadamente para prevenir enfermedades como vacunación profiláctica.

Los vectores recombinantes para su uso en la presente invención se pueden administrar a un sujeto ya sea solos o como parte de una composición inmunológica o inmunogénica. Los vectores recombinantes de la descripción también se pueden utilizar para suministrar o administrar una o más proteínas a un sujeto de interés por medio de la expresión *in vivo* de una o varias proteínas.

Se observa que los productos inmunológicos y/o anticuerpos y/o productos expresados obtenidos de acuerdo con esta descripción pueden ser expresados *in vitro* y utilizados de una manera en la que tales productos inmunológicos y/o productos expresados y/o anticuerpos se utilizan típicamente, y que las células que expresan tales productos inmunológicos y/o productos expresados y/o anticuerpos se pueden emplear en aplicaciones *in vitro* y/o *ex vivo*, p. ej., tales usos y aplicaciones pueden incluir diagnósticos, análisis, terapia *ex vivo* (p. ej., en donde las células que expresan el producto génico y/o la respuesta inmunológica se expanden *in vitro* y se reintroducen en el anfitrión o animal), etc., véanse la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.990.091, los documentos WO 99/60164 y WO 98/00166 y los documentos citados en los mismos. Adicionalmente, los anticuerpos o productos génicos expresados que se aíslan a partir de los métodos de la presente memoria, o que se aíslan de células expandidas *in vitro* siguiendo los métodos de administración de la presente memoria, se pueden administrar en composiciones, de un modo similar a la administración de epítomos de subunidades o antígenos o productos terapéuticos o anticuerpos para inducir la inmunidad, estimular una respuesta terapéutica y/o estimular la inmunidad pasiva.

Se pretende que el término "adenovirus humano" según se utiliza en la presente memoria abarque todos los adenovirus humanos de la familia Adenoviridae, que incluyen miembros de los géneros Mastadenovirus. Hasta la fecha, se han identificado más de cincuenta y un serotipos humanos de adenovirus (véase, p. ej., Fields et al., Virology 2, Cap. 67 (3d ed., Lippincott-Raven Publishers)). El adenovirus puede ser del serogrupo A, B, C, D, E o F. El adenovirus humano puede ser de serotipo 1 (Ad1), serotipo 2 (Ad2), serotipo 3 (Ad3), serotipo 4 (Ad4), serotipo 6 (Ad6), serotipo 7 (Ad7), serotipo 8 (Ad8), serotipo 9 (Ad9), serotipo 10 (Ad10), serotipo 11 (Ad11), serotipo 12 (Ad12), serotipo 13 (Ad13), serotipo 14 (Ad14), serotipo 15 (Ad15), serotipo 16 (Ad16), serotipo 17 (Ad17), serotipo 18 (Ad18), serotipo 19 (Ad19), serotipo 19a (Ad19a), serotipo 19p (Ad19p), serotipo 20 (Ad20), serotipo 21 (Ad21), serotipo 22 (Ad22), serotipo 23 (Ad23), serotipo 24 (Ad24), serotipo 25 (Ad25), serotipo 26 (Ad26), serotipo 27 (Ad27), serotipo 28 (Ad28), serotipo 29 (Ad29), serotipo 30 (Ad30), serotipo 31 (Ad31), serotipo 32 (Ad32), serotipo 33 (Ad33), serotipo 34 (Ad34), serotipo 35 (Ad35), serotipo 36 (Ad36), serotipo 37 (Ad37), serotipo 38 (Ad38), serotipo 39 (Ad39), serotipo 40 (Ad40), serotipo 41 (Ad41), serotipo 42 (Ad42), serotipo 43 (Ad43), serotipo 44 (Ad44), serotipo 45 (Ad45), serotipo 46 (Ad46), serotipo 47 (Ad47), serotipo 48 (Ad48), serotipo 49 (Ad49), serotipo 50 (Ad50), serotipo 51 (Ad51), o preferiblemente, serotipo 5 (Ad5), pero no se limitan a estos ejemplos.

También se contemplan en la presente invención los vectores recombinantes, composiciones inmunogénicas, y los

adenovirus recombinantes para el uso reivindicado que pueden comprender partículas subvirales de más de un serotipo de adenovirus. Por ejemplo, se sabe que los vectores de adenovirus pueden mostrar un tropismo alterado para tejidos o tipos de células específicos (Havenga, M.J. E. et al., 2002), y por lo tanto, la mezcla y combinación de diferentes cápsides adenovirales, es decir, proteínas de la fibra, o pentónicas de diferentes serotipos adenovirales pueden resultar ventajosas. La modificación de las cápsides adenovirales, incluyendo la fibra y la pentona puede dar como resultado un vector adenoviral con un tropismo que es diferente del de adenovirus sin modificar. Los vectores de adenovirus que son modificados y optimizados en su capacidad para infectar células diana pueden permitir una reducción significativa de la dosis terapéutica o profiláctica, dando como resultado la reducción de la toxicidad local y diseminada.

El adenovirus es un ADN virus sin envoltura. Los vectores derivados de adenovirus tienen una serie de características que los hacen particularmente útiles para la transferencia génica. Según se utiliza en la presente memoria, un "vector de adenovirus recombinante" es un vector de adenovirus que lleva una o más secuencias de nucleótidos heterólogas (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco o más secuencias de nucleótidos heterólogas). Por ejemplo, la biología de los adenovirus está caracterizada en detalle, el adenovirus no está asociado con ninguna patología humana grave, el virus es extremadamente eficiente en la introducción de su ADN en la célula anfitriona, el virus puede infectar una amplia variedad de células y tiene una amplia gama de anfitriones, el virus puede ser producido en grandes cantidades con relativa facilidad, y el virus se puede volver de replicación deficiente y/o no replicante por medio de deleciones en la región temprana 1 ("E1") del genoma viral.

El genoma de adenovirus es una molécula de ADN de doble hebra lineal de aproximadamente 36.000 pares de bases ("pb") con una proteína terminal de 55 kDa unida covalentemente al extremo 5' de cada hebra. El ADN de Ad contiene Repeticiones Terminales Invertidas ("ITR") idénticas de aproximadamente 100 pb, dependiendo la longitud exacta del serotipo. Los orígenes de replicación virales están localizados dentro de las ITR exactamente en los extremos del genoma. La síntesis de ADN se produce en dos etapas. En primer lugar, la replicación procede por desplazamiento de la hebra, generando una molécula dúplex hija y una hebra parental desplazada. La hebra desplazada es de hebra sencilla y puede formar una "franja" intermedia, que permite el inicio de la replicación y la generación de una molécula dúplex hija. Alternativamente, la replicación puede proceder de ambos extremos del genoma simultáneamente, obviando el requerimiento de formar la estructura de la franja.

Durante el ciclo de infección productiva, los genes virales se expresan en dos fases: la fase temprana, que es el período hasta la replicación del ADN viral, y la fase tardía, que coincide con el inicio de la replicación del ADN viral. Durante la fase temprana, sólo se expresan los productos génicos tempranos, codificados por las regiones E1, E2, E3 y E4, que llevan a cabo una serie de funciones que preparan la célula para la síntesis de proteínas estructurales virales (Berk, A.J., 1986). Durante la fase tardía, se expresan los productos génicos virales tardíos además de los productos de genes tempranos y la síntesis de ADN y proteínas de la célula anfitriona se desactiva. En consecuencia, la célula se dedica a la producción de ADN viral y de proteínas estructurales virales (Tooze, J., 1981).

La región E1 del adenovirus es la primera región del adenovirus expresada después de la infección de la célula diana. Esta región consiste en dos unidades transcripcionales, los genes de E1A y E1B, ambos los cuales son necesarios para la transformación oncogénica de cultivos primarios (embrionarios) de roedor. Las principales funciones de los productos génicos de E1A son la inducción de las células quiescentes para que entren en el ciclo celular y reanuden la síntesis de ADN celular, y la activación transcripcional del gen de E1B y las otras regiones tempranas (E2, E3 y E4) del genoma viral. La transfección de las células primarias con el gen de E1A solo puede inducir la proliferación ilimitada (inmortalización), pero no da lugar a la transformación completa. Sin embargo, la expresión de E1A, en la mayoría de los casos, da como resultado la inducción de la muerte celular programada (apoptosis), y sólo ocasionalmente se obtiene la inmortalización (Jochemsen et al., 1987). La co-expresión del gen de E1B es necesaria para evitar la inducción de la apoptosis y para que se produzca la transformación morfológica completa. En líneas celulares inmortales establecidas, la expresión de alto nivel de E1A puede causar la transformación completa en ausencia de E1B (Roberts, B. E. et al., 1985).

Las proteínas codificadas E1B ayudan a E1A en la reorientación de las funciones celulares para permitir la replicación viral. Las proteínas E1B de 55 kD y E4 de 33 kD, que forman un complejo que se localiza esencialmente en el núcleo, funcionan en la inhibición de la síntesis de proteínas del anfitrión y facilitan la expresión de los genes virales. Su influencia principal es establecer un transporte selectivo de los ARNm virales desde el núcleo hasta el citoplasma, de forma concomitante con el inicio de la fase tardía de la infección. La proteína E1B de 21 kD es importante para el control temporal correcto del ciclo de infección productivo, evitando de ese modo la muerte prematura de la célula anfitriona antes de que el ciclo de vida del virus se haya completado. Los virus mutantes incapaces de expresar el producto génico de E1B de 21 kD presentan un ciclo de infección acortado que está acompañado de una degradación excesiva del ADN cromosómico de la célula anfitriona (fenotipo deg) y un efecto citopático intensificado (fenotipo cyt; Telling et al., 1994). Los fenotipos deg y cyt son suprimidos cuando además se muta el gen de E1A, indicando que estos fenotipos son una función de E1A (White, E. et al., 1988). Además, la proteína E1B de 21 kDa disminuye la velocidad mediante la cual E1A pone en marcha los otros genes virales. Todavía no se conoce por medio de qué mecanismos la E1B de 21 kD inactiva estas funciones dependientes de E1A.

En contraste, por ejemplo, con los retrovirus, los adenovirus no se integran en el genoma de la célula anfitriona, son

capaces de infectar células que no están en división, y son capaces de transferir eficazmente genes recombinantes in vivo (Brody et al., 1994). Estas características hacen de los adenovirus atractivos candidatos para la transferencia génica in vivo, por ejemplo, de un antígeno o inmunógeno de interés a células, tejidos o sujetos que lo necesiten.

5 Se prefieren los vectores de adenovirus que contienen delecciones múltiples tanto para aumentar la capacidad de carga del vector como para reducir la probabilidad de recombinación para generar adenovirus de replicación competente (RCA). Cuando el adenovirus contiene múltiples delecciones, no es necesario que cada una de las delecciones, si está presente sola, de lugar a un adenovirus de replicación defectuosa y/o no replicante. Siempre que una de las delecciones convierta el adenovirus en uno de replicación defectuosa o no replicante, se pueden incluir delecciones adicionales para otros fines, p. ej., para aumentar la capacidad de carga del genoma del adenovirus para  
10 secuencias de nucleótidos heterólogas. Preferiblemente, más de una de las delecciones evita la expresión de una proteína funcional y convierte el adenovirus en un adenovirus de replicación defectuosa y/o no replicante y/o atenuado. Más preferiblemente, todas las delecciones son delecciones que convertirían el adenovirus en un adenovirus de replicación defectuosa y/o no replicante y/o atenuado. Sin embargo, la invención también abarca adenovirus y vectores de adenovirus para su uso que son adenovirus de replicación competente y/o de tipo salvaje, es decir, comprende todos los genes adenovirales necesarios para la infección y replicación en un sujeto.

Las realizaciones de la invención que emplean adenovirus recombinantes pueden incluir vectores de adenovirus con E1 defectuosa o suprimida, E3 defectuosa o suprimida, o E4 defectuosa o suprimida o vectores de adenovirus que comprenden delecciones de E1 y E3, o E1 y E4, o E3 y E4, o E1, E3, y E4, o el vector de adenovirus "vaciado" ("gutless") en el que se han eliminado todos los genes virales. Los vectores de adenovirus pueden comprender mutaciones en los genes de E1, E3, E4, o delecciones en estos o todos los genes adenovirales. La mutación en E1  
20 aumenta el margen de seguridad del vector porque se dice que los adenovirus con E1 defectuosa mutantes son de replicación defectuosa y/o no replicante en células no permisivas, y están, por lo menos, muy atenuados. La mutación en E3 mejora la inmunogenicidad del antígeno al alterar el mecanismo por el cual el adenovirus regula a la baja moléculas de clase I del MHC. La mutación en E4 reduce la inmunogenicidad del vector de adenovirus mediante la supresión de la expresión génica tardía, por lo que puede permitir una revacunación repetida utilizando el mismo vector. La presente invención comprende vectores de adenovirus de cualquier serotipo o serogrupo que tienen delecciones o mutaciones de E1, o E3, E4 o, o E1 y E3, o E1 y E4. La delección o mutación de estos genes adenovirales da como resultado el deterioro o la pérdida sustancialmente completa de la actividad de estas proteínas.

30 El vector de adenovirus "vaciado" es otro tipo de vector en la familia de vectores de adenovirus. Su replicación requiere un virus auxiliar y una línea celular 293 humana especial que expresa tanto E1A como Cre, una condición que no existe en el ambiente natural; el vector es privado de todos los genes virales, por lo tanto el vector como portador de vacuna es no inmunogénico y puede ser inoculado varias veces para la re-vacunación. El vector de adenovirus "vaciado" también contiene espacio de 36 kb para el alojamiento de uno o varios antígenos o  
35 inmunógenos de interés, permitiendo así la co-administración de un gran número de antígenos o inmunógenos a las células.

Otros sistemas de vectores de adenovirus conocidos en la técnica incluyen el sistema AdEasy (He et al., 1998) y el sistema AdEasier posteriormente modificado (Zeng et al., 2001), que fueron desarrollados para generar vectores de Ad recombinantes en células 293 rápidamente permitiendo que se produjera la recombinación homóloga entre los  
40 vectores donadores y los vectores auxiliares de Ad en células de Escherichia coli, tales como células BJ5183, durante la noche. pAdEasy comprende secuencias estructurales de adenovirus que, cuando se suministran en trans con un vector donador tal como pShuttle-CMV que expresa un antígeno o un inmunógeno de interés, da como resultado el empaquetamiento del antígeno o inmunógeno (p. ej., inmunógenos y/o antígenos) en una cápside adenoviral. La secuencia de pAdEasy es bien conocida en la técnica y está públicamente y comercialmente disponible a través de Stratagene.

La presente invención se puede generar utilizando el sistema de AdHigh (Solicitud de Patente de los Estados Unidos Provisional Núm. de Serie 60/683,638). AdHigh es un método seguro, rápido y eficaz de generación de altos títulos de adenovirus recombinante sin el riesgo de la generación de RCA, que puede ser perjudicial o fatal para los sujetos  
50 aviares. Además, los RCA pueden ser patógenos para los seres humanos y no es deseable que estén presentes en la cadena alimentaria. El sistema AdHigh utiliza plásmidos lanzadera modificados, tales como pAdHigh, para promover la producción de adenovirus libres de RCA en las células permisivas, tales como células PER.C6 después de generar recombinantes con un plásmido de cadena principal de adenovirus en células de E. coli. Estos plásmidos lanzadera contienen policonectores o sitios de clonación múltiple para la inserción fácil de inmunógenos o antígenos aviares tales como, por ejemplo, inmunógenos o antígenos de la influenza aviar. La recombinación de los plásmidos lanzadera adenovirales junto con un plásmido auxiliar adenoviral como pAdEasy en células bacterianas (es decir, BJ5183) se puede implementar fácilmente para producir los adenovirus humanos recombinantes que expresan antígenos o inmunógenos aviares para el uso de la invención. Los métodos de producción de vectores recombinantes mediante la clonación y el análisis de restricción son bien conocidos para los expertos en la técnica.

Se pueden insertar motivos de secuencia específica tales como el motivo RGD en el bucle de H-I de un vector de adenovirus para aumentar su infectividad. Se ha demostrado que esta secuencia es esencial para la interacción de  
60 ciertas proteínas de la matriz extracelular y de adherencia con una superfamilia de receptores de la superficie celular

denominadas integrinas. La inserción del motivo RGD puede ser ventajosamente útil en sujetos inmunocomprometidos. Se construye un recombinante de adenovirus por clonación de un antígeno o inmunógeno específico o fragmentos de los mismos en cualquiera de los vectores de adenovirus, tales como los descritos anteriormente. El adenovirus recombinante se utiliza para transducir células de un vertebrado utilizado como agente de inmunización. (Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. de Serie 10/424.409).

Los vectores de adenovirus para su uso en la presente invención son útiles para el suministro de ácidos nucleicos que expresan antígenos o inmunógenos a células *in vivo*. En particular, los vectores de la invención se pueden emplear ventajosamente para suministrar o transferir ácidos nucleicos a embriones aviares o a sujetos aviares por medio de la administración *in ovo*. Los ácidos nucleicos de interés incluyen ácidos nucleicos que codifican los péptidos o proteínas inmunogénicos (para vacunas).

Preferiblemente, los codones que codifican el antígeno o inmunógeno de interés son codones "optimizados", es decir, los codones son aquellos que aparecen con frecuencia, es decir, son genes aviares altamente expresados, en lugar de los codones que se utilizan con frecuencia, por ejemplo, influenza. Semejante uso de codones proporciona la expresión eficaz del antígeno o inmunógeno en células humanas o de aves. En otras realizaciones, por ejemplo, cuando el antígeno o inmunógeno de interés se expresa en bacterias, levaduras u otro sistema de expresión, el patrón de uso de codones se altera para representar el sesgo de codones para genes altamente expresados en el organismo en el que está siendo expresado el antígeno o inmunógeno. Los patrones de uso de codones se conocen en la bibliografía para genes altamente expresados de muchas especies (p. ej., Nakamura et al., 1996; Wang et al., 1998; McEwan et al., 1998).

En general, los vectores de adenovirus se pueden utilizar para infectar una célula en cultivo para expresar un producto génico deseado, p. ej., para producir una proteína o péptido de interés. Preferiblemente, la proteína o péptido se secreta al medio y se puede purificar a partir del mismo utilizando mecanismos rutinarios conocidos en la técnica, así como los proporcionados en la presente memoria. Las secuencias de péptido señal que dirigen la secreción extracelular de proteínas son conocidas en la técnica y las secuencias de nucleótidos que codifican las mismas pueden ser conectadas operablemente a la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido o proteína de interés por medio de mecanismos rutinarios conocidos en la técnica. Alternativamente, las células pueden ser lisadas y la proteína recombinante expresada puede ser purificada a partir del producto lisado celular. Preferiblemente, la célula es una célula animal, más preferiblemente una célula aviar o de mamífero. También se prefieren las células que son competentes para la transducción por adenovirus.

Tales células incluyen células PER.C6, células 911, y células HEK293. La descripción también comprende el uso de células de ave, tales como, pero no limitadas a, fibroblastos de embriones aviares, tales como células DF-1, células madre de ave, tales como las descritas en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.872.561; 6.642.042; 6.280.970; y 6.255.108, linfoblastos de ave, células epiteliales de ave, entre otras, tales como la cepa celular derivada de embrión de pollo CHCC-OU2 (Ogura, H. et al., 1987; Publicación de Patente Japonesa Núm. 9-173059), la cepa de células derivadas de codorniz QT-35 (Publicación de Patente Japonesa Núm. 9-98778). Cualquier célula de ave que sea competente para la infección, transfección, o cualquier tipo de transferencia de genes puede ser utilizada en la práctica de la descripción.

Un medio de cultivo para el cultivo de células anfitrionas incluye un medio comúnmente utilizado para el cultivo de tejidos, tal como base de Earle M199, MEM de Eagle (E-MEM), MEM de Dulbecco (DMEM), SC-UCM1 02, UP-SFM (GIBCO BRL), EX-CELL302 (Nichirei), EX-CELL293-S (Nichirei), TFBM-01 (Nichirei), ASF 104, entre otros. Los medios de cultivo adecuados para tipos de células específicos se pueden encontrar en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) o en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC). Los medios de cultivo se pueden complementar con aminoácidos tales como L-glutamina, sales, agentes anti-fúngicos o antibacterianos tales como Fungizone®, penicilina-estreptomocina, suero animal, y similares. El medio de cultivo celular puede estar opcionalmente libre de suero.

La presente invención también proporciona vectores para su uso como vacunas como se reivindica en las reivindicaciones independientes 1 y 7. El inmunógeno o antígeno se pueden presentar en la cápside del adenovirus, de forma alternativa, el antígeno se puede expresar a partir de un antígeno o inmunógeno introducidos en un genoma de adenovirus recombinante y portado por los adenovirus de la invención. El vector de adenovirus puede proporcionar cualquier antígeno o inmunógeno de interés. Los ejemplos de inmunógenos se detallan en la presente memoria.

Los antígenos o inmunógenos están preferiblemente asociados operablemente con las secuencias de control de la expresión apropiadas. Los vectores de expresión incluyen secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación (que puede tener origen bacteriano, p. ej., derivados de vectores bacterianos tales como pBR322, u origen eucariótico, p. ej., secuencias de replicación autónoma (ARS)), un promotor, un potenciador, y sitios de procesamiento de información necesarios, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, señales de empaquetamiento, y secuencias terminadoras de la transcripción.

Por ejemplo, los vectores de adenovirus recombinantes para su uso en la invención pueden contener señales de control de la transcripción/traducción y señales de poliadenilación (p. ej., señales de poliadenilación derivadas de la

hormona de crecimiento bovina, señal de poliadenilación de SV40) apropiadas, asociadas operablemente con la secuencia o las secuencias de antígenos o inmunógenos que se deben suministrar a la célula diana. Se puede utilizar una variedad de elementos promotores/potenciadores dependiendo del nivel y de la expresión específica del tejido deseado. El promotor puede ser constitutivo o inducible (p. ej., el promotor de la metalotioneína), dependiendo del patrón de expresión deseado. El promotor puede ser nativo o foráneo y puede ser una secuencia natural o sintética. Por foráneo, se quiere significar que la región de inicio de la transcripción no se encuentra en el anfitrión de tipo salvaje en el que se introduce la región de inicio de la transcripción. El promotor se elige de modo que funcione en la célula o las células o el tejido o los tejidos diana de interés. En la presente invención se contemplan promotores específicos del cerebro, específicos del hígado, y específicos del músculo (incluyendo específicos de la musculatura esquelética, del corazón, de la musculatura lisa y/o del diafragma). También se prefieren los promotores de mamíferos y aves.

El promotor puede ser ventajosamente un promotor "temprano". Los promotores "tempranos" son conocidos en la técnica y se definen como promotores que dirigen la expresión de un gen que se expresa rápida y transitoriamente en ausencia de la síntesis de proteínas de novo. El promotor también puede ser un promotor "fuerte" o "débil". Los términos "promotor fuerte" y "promotor débil" se conocen en la técnica y pueden ser definidos por la frecuencia relativa de inicio de la transcripción (veces por minuto) en el promotor. Un promotor "fuerte" o "débil" también puede ser definido por su afinidad por la ARN polimerasa.

Más preferiblemente, los antígenos o inmunógenos están asociados operablemente, por ejemplo, con un promotor inmediato temprano principal de citomegalovirus humano (CMV), un promotor del virus de simios 40 (SV40), un promotor de  $\beta$ -actina, un promotor de albúmina, un promotor del Factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ), un promotor de PyK, un promotor de MFG, o un promotor del virus del sarcoma de Rous. Otras secuencias de control de la expresión incluyen promotores derivados de genes de inmunoglobulina, adenovirus, virus del papiloma bovino, virus del herpes, etcétera. También se puede utilizar cualquier promotor viral de mamífero en la práctica de la invención, además de cualquier promotor viral aviar. Entre los promotores de aves de origen viral, se pueden utilizar los promotores de genes tempranos inmediatos (es decir, ICP4, ICP27) del virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV), tempranos (es decir, timidina quinasa, ADN helicasa, ribonucleótido reductasa) o tardíos (es decir, gB, gD, gC, gK) del virus de la enfermedad de Marek, (es decir, gB, gC, pp38, pp14, ICP4, Meq) o del virus del herpes de los pavos (p. ej., gB, gC, ICP4) en los vectores para el uso en la presente invención. Además, está dentro de la competencia del experto en la técnica seleccionar un promotor adecuado que exprese el antígeno o inmunógeno de interés a niveles suficientemente altos con el fin de inducir o provocar una respuesta inmunogénica al antígeno o inmunógeno, sin experimentación indebida.

Se ha especulado que la conducción de la transcripción de nucleótidos heterólogos con el promotor de CMV puede dar lugar a regulación a la baja de la expresión en animales inmunocompetentes (véase, p. ej., Guo et al., 1996). En consecuencia, también se prefiere asociar operablemente las secuencias de antígeno o inmunógeno, por ejemplo, con un promotor de CMV modificado que no dé como resultado esta regulación a la baja de la expresión del antígeno o inmunógeno.

Los vectores para su uso en la invención también pueden comprender un policonector o un sitio de clonación múltiple ("MCS"), que ventajosamente pueden estar situado aguas abajo de un promotor. El policonector proporciona un sitio para la inserción de las moléculas de antígeno o inmunógeno que están "en marco" con la secuencia promotora, dando como resultado la "conexión operativa" de la secuencia del promotor al antígeno o inmunógeno de interés. Los sitios de clonación múltiple y los policonectores son bien conocidos para los expertos en la técnica. Según se utiliza en la presente memoria, el término "conectado operablemente" significa que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida.

Dependiendo del vector, pueden estar presentes marcadores seleccionables que codifican resistencia a los antibióticos cuando se utilizan para la amplificación in vitro y la purificación del vector recombinante, y, en el contexto de los sistemas adenovirales AdEasy, AdEasier, y AdHigh disponibles en el mercado, para controlar la recombinación homóloga entre un vector donador y un vector auxiliar adenoviral. Los sistemas AdEasy, AdEasier, y AdHigh facilitan la recombinación homóloga entre un vector donador y un vector auxiliar adenoviral en las secuencias ITR. Cada vector comprende un gen de resistencia a antibiótico diferente, y por selección dual, se pueden seleccionar los recombinantes que expresan el vector recombinado. Los ejemplos de tales genes de resistencia a antibióticos que se pueden incorporar a los vectores para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, ampicilina, tetraciclina, neomicina, zeocina, kanamicina, bleomicina, higromicina, cloranfenicol, entre otros.

En realizaciones en las que hay más de un antígeno o inmunógeno, las secuencias de antígeno o inmunógeno pueden estar asociadas operativamente con un único promotor aguas arriba y una o más secuencias del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) (p. ej., la secuencia IRES de EMC de picornavirus).

En realizaciones de la invención en la que se transcribirán la secuencia o las secuencias del antígeno o inmunógeno y a continuación se traducirán en las células diana, se requieren generalmente señales de inicio específicas para una traducción eficaz de las secuencias de codificación de proteínas insertadas. Estas secuencias de control de la traducción exógenas, que pueden incluir el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes, pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos.

Se puede utilizar cualquier antígeno o inmunógeno aviar derivado de un patógeno aviar en los vectores recombinantes para su uso en la invención. Los antígenos o inmunógenos preferidos incluyen, pero no se limitan a, antígenos o inmunógenos derivados del virus de la influenza aviar, tales como antígenos o inmunógenos de hemaglutinina, neuraminidasa, matriz, y nucleoproteína, antígenos del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa tales como VP1, VP1s1, VP1s2, VP2 (Heine, HG et al., 1991; Dormitorio, T. V. et al., 1997; y Cao, Y.C. et al., 1998), VP2S, VP3, VP4, VP4S y VP5, antígenos del virus de la enfermedad de Marek como la timidina quinasa, gA, gB, gC, gD, gE, gH, gI, y gL (Coussens et al., 1988); Ross et al. 1989); Ross et al., 1991); Publicación Internacional Núm. WO 90/02803 (1990); Brunovskis y Velicer, 1995); y Yoshida et al., 1994), Herpesvirus tales como antígenos del virus de la laringotraqueitis infecciosa incluyendo gA, gB, gD, gE, gI, y gG (Veits, J. et al., 2003), antígenos del virus de la bronquitis infecciosa aviar, tales como la glicoproteína de la espícula, proteína M integrante de membrana, proteína E pequeña de la membrana, y poliproteína (Casais, R. et al., 2003), antígenos de reovirus aviar tales como las proteínas de la cápside, sigma NS, sigma A, sigma B, y sigma C (Spandidos, D. A. et al., 1976), poxvirus incluyendo antígenos de avipox, virus de la viruela aviar, de la viruela del canario, de viruela del pichón, de la viruela de la codorniz, y de la viruela de la paloma tales como la timidina quinasa, antígenos de poliomavirus aviar tales como VP1, VP2, VP3, y VP4 (Rott, O. et al., 1988), antígenos del virus de la enfermedad de Newcastle, tales como las proteínas HN, P, NP, M, F y L (revisado en Alexander, DJ., 1990), antígenos de pneumovirus aviar SH, F, G y N (Seal, B. S., 2000), antígenos del virus de la rinotraqueitis aviar tales como la glicoproteína, matriz, fusión y nucleocápside (Cook, J.K., 1990), antígenos de virus de la reticuloendoteliosis aviar tales como p29, envoltura, gag, proteasa y polimerasa (Dornburg, R. 1995), retrovirus aviares incluyendo los antígenos del virus del carcinoma aviar gag, pol y env, gag, pol, env, cápside, y proteasa de virus endógeno aviar (Rovigatti, U.G. et al., 1983), gag, erbA, erbB del virus de la eritroblastosis aviar (Graf, T. et al., 1983), proteína del núcleo, pol, y proteína de la superficie del virus de la hepatitis aviar (Cova, L. et al., 1993), VP1, VP2, VP3 del virus de la anemia aviar (Rosenberger, J.K. et al., 1998), antígenos de la polimerasa, proteína 52K, pentona, Iliá, y proteínas del núcleo del virus de la enteritis aviar (Pitcovski, J. et al., 1988), proteína IE, glicoproteína K, helicasa, glicoproteína N, VP11-12, glicoproteína H, timidina quinasa, glicoproteína B, y fosfoproteína nuclear del virus de la enfermedad de Pacheco (Kaleta E.F., 1990), antígenos de la envoltura, gag, y polimerasa del virus de la leucemia aviar (Graf, T. et al., 1978), antígenos de parvovirus aviar, rotavirus aviar como NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, y VP7 (Mori, Y. et al., 2003; Borgan, M. A. et al., 2003), antígenos del virus de la leucosis aviar tales como la envoltura, gag, y la polimerasa (Bieth, E. et al., 1992); virus del fibrosarcoma musculoponeurótico aviar (Kawai, S. et al., 1992), antígenos pi 5, p27, envoltura, gag, y polimerasa, nucleocápside, y gs-b del virus de la mieloblastosis aviar (Joliot, V. et al., 1993), virus asociado a la mieloblastosis aviar (Perbal, B., 1995), virus de la mielocitomatosis aviar (Petropoulos, C.J., 1997), antígenos del virus de sarcoma aviar tales como pi 9 y envoltura (Neckameyer, W.S. et al., 1985), y gag, envoltura, y polimerasa del virus de la necrosis del bazo aviar (Purchase, H.G. et al., 1975).

Otros inmunógenos/antígenos que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención incluyen antígenos bacterianos aviares de cepas de *Pasteurella multocida*, tales como la proteína capsular de 39 kDa (Ali, H.A. et al., 2004; Rimler, R.B. 2001), proteína de la membrana externa de 16 kDa (Kasten, R.W., et al., 1995), lipopolisacárido (Baert, K. et al., 2005), *Escherichia coli*, tales como fimbrias tipo 1, fimbrias P, y rizadas (Roland, K. et al., 2004); adhesina de pilus FI, adhesina de pilus P, proteína receptora de aerobactina, y lipopolisacárido (Kariyawasam, S. et al., 2002), *Mycoplasma gallisepticum*, tal como el antígeno de la membrana principal pMGA (también conocido como P67, Jan, G. et al., 2001; Noormohammadi, A.H. et al., 2002a), TM-I (Saito, S. et al., 1993), adhesina (Barbour, E.K. et al., 1989), P52 (Jan, G. et al., 2001) antígeno de aglutinación en placas con suero (SPA) (Ahmad, I. et al., 1988), *Mycoplasma gallinearum*, *Mycoplasma gallinarum*, *Mycoplasma gallopavonis*, *Mycoplasma synoviae*, incluyendo antígenos tales como antígeno de membrana principal MSPB (Noormohammadi, A. H. et al., 2002b) y proteína de 165 kDa (Ben Abdelmoumen, B. et al., 1999), *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma iowae*, *Mycoplasma pullorum*, *Mycoplasma imitatus*, *Salmonella enteritidis* tal como flagelina, porinas, OmpA, y fimbrias SEF21 y SEF14 (Ochoa-Reparaz, J. et al., 2004), serovariedades de *Salmonella enterica* tales como *Gallinarum* y *Typhimurium* que expresan, por ejemplo, SEF 14 y SEF21 (Li, W. et al., 2004), *Campylobacter jejuni*, tal como flagelina, antígeno de 67 kDa, proteínas Cj aA, Cj aC, y Cj aD (Widders, P. R. et al., 1998; Wyszynska, A. et al., 2004), *Haemophilus paragallinarum* tales como los antígenos de tipo hemaglutinina de los serogrupos A, B, y C (Yamaguchi, T. et al., 1988), *Riemerella anatipestifer*, tales como antígenos de bacterina (Higgins, D. A. et al., 2000), cepas de *Chlamydia psittaci* tales como las serovariedades A y 6B y que expresan, por ejemplo, la proteína de la membrana externa principal (MOMP) (Vanrompay, D. et al., 1999), *Erysipelothrix rhusiopathiae* incluyendo el antígeno de la proteína de 66-64 kDa (Timoney, J. F. et al., 1993), *Erysipelothrix iusidiosa* tal como bacterina (Bigland, C.H. y Matsumoto, J.J., 1975), *Brucella abortus*, tales como los antígenos P39 y bacterioferrina (Al-Mariri, A. et al., 2001), *Borrelia anserina* tal como la proteína de la superficie externa principal de 22 kilodalton (Sambri, V. et al., 1999), proteína de membrana externa P66 (Bunikis, J. et al., 1998), y OspC (Marconi, T. R. et al., 1993), *Alcaligenes faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, entre muchos otros.

La invención también comprende el uso de inmunógenos/antígenos derivados de antígenos de protozoos aviares, tales como, pero no limitados a *Eimeria acervulina* tal como antígeno 3-IE (Lillehoj, H.S. et al., 2005; Ding, X. et al., 2004), antígenos de complejo apical (Constantinoini, C.C. et al., 2004), y lactato deshidrogenasa (Schaap, D. et al., 2004), *Eimeria maxima* tales como las proteínas antigénicas gam56 y gam82 (Belli, S. I. et al., 2004) de 56 y 82 kDa (Belli, S. I. et al., 2002), y EmTFP250 (Witcombe, D. M. et al., 2004), *Eimeria necatrix* tal como la proteína de 35 kD (Tajima, O. et al., 2003), *Eimeria tenella* tales como los productos génicos de TA4 y SO7 (Wu, S.Q. et al., 2004; Pogonka, T. et al., 2003) y proteína de la pared de ooquistes de 12 kDa (Karim, M.J. et al., 1996), *Eimeria*

*vermiformis*, *Eimeria adenoeides*, *Leucocytozoon caulleryi* tales como el antígeno de la membrana externa R7 (Ito, A., et al., 2005), *Plasmodium relictum*, *Plasmodium gallinaceum* tal como la proteína CSP (Grim, K.C. et al., 2004) y los antígenos proteicos de 17 y 32 kDa (Langer, R. C. et al., 2002), y *Plasmodium elongatum*, entre otros.

Una realización preferida de la invención utiliza antígenos o inmunógenos virales de la influenza aviar. La invención también proporciona un vector recombinante para su uso como se ha reivindicado que expresa varios antígenos o inmunógenos aviares, tales como, por ejemplo, una vacuna multivalente o composición inmunogénica que puede proteger las aves contra múltiples enfermedades de las aves con una sola inyección. El virus de la influenza aviar se han transmitido a los seres humanos, cerdos, caballos, e incluso mamíferos marinos, y han sido los principales contribuyentes a la aparición de pandemias de influenza en seres humanos. Los virus de la influenza, que pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, se clasifican como A, B, y C basándose en las diferencias antigénicas en su nucleoproteína (NP) y proteína de la matriz (M1). Los virus de la influenza aviar AU se clasifican como de tipo A. La subtipificación adicional se basa en la antigenicidad de dos glicoproteínas de la superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Actualmente, se han identificado 15 subtipos de HA y 9 subtipos de NA entre los virus de influenza A (Murphy, B. R. et al., 1996; Rohm, C. et al., 1996b). Las secuencias de aminoácidos de la región HA1, que es responsable de la antigenicidad de la HA, difieren de subtipo a subtipo en 30% o más (Rohm, C. et al., 1996b). Aunque se encuentran virus con todos los subtipos de HA y NA en las especies de aves, los subtipos virales de virus de la influenza de mamíferos son limitados.

Los virus de la influenza aviar A se definen por su virulencia; tipos altamente virulentos que pueden causar plagas en la volatería, y tipos no virulentos que por lo general causan únicamente una enfermedad leve o una infección asintomática. En casos raros, sin embargo, los virus con baja patogenicidad en el laboratorio ocasionan brotes de enfermedades graves en el campo. No obstante, la morbilidad y la mortalidad asociadas con estos virus tienden a ser mucho más bajas que las causadas por los virus letales.

Los virus de la influenza aviar altamente virulentos han causado brotes en la volatería en Australia (1976 [H7] (Bashiruddin, J.B. et al., 1992); 1985 [H7] (Cross, G.M., 1987; Nestorowicz, A. et al., 1987), 1992 [H7] (Perdue, MX et al., 1997), 1995 [H7], y 1997 [H7]), Inglaterra (1979 [H7] (Wood, G. W., et al., 1993) y 1991 [H5] (Alexander, DJ et al., 1993), Estados Unidos (1983 a 1984 [H5] (Eckroade, R.J. et al., 1987), Irlanda (1983 a 1984 [H5]) (Kawaoka, Y. et al., 1987), Alemania (1979 [H7] (Rohm, C. et al., 1996a), México (1994 a 1995 [H5] (García, M. et al., 1996; Horimoto, T. et al., 1995), Pakistán (1995 [H7] (Perdue, MX. et al., 1997), Italia (1997 [H5]), y Hong Kong (1997 [H5] (Claas, E.J. et al., 1988). Sin desear estar limitado por ninguna teoría, se cree que todos los virus de la influenza aviar A patógena son de subtipo H5 o H7, aunque la razón de esta especificidad de subtipo sigue siendo desconocida. No parece haber ninguna asociación de los subtipos de NA con los virus virulentos. Dos subtipos adicionales, H4 [A/Chicken/Alabama/7395/75 (H4N8)] (Johnson, D.C. et al., 1976) y H10 [A/Chicken/Germany/N/49 (H10N7)], han sido aislados de pollos durante graves brotes de tipo plaga en la volatería.

Las estructuras de los virus de la influenza A son bastante similares (Lamb, R. A. et al., 1996). Por medio de microscopía electrónica, los virus son pleomórficos, incluyendo viriones que son más o menos esféricos (aproximadamente 120 nm de diámetro) y filamentosos. Dos tipos distintos de espículas (de aproximadamente 16 nm de longitud), que corresponden a las moléculas de HA y NA, residen en la superficie de los viriones. Estas dos glicoproteínas se anclan a la envoltura lipídica derivada de la membrana plasmática de las células anfitrionas mediante secuencias cortas de aminoácidos hidrófobos (región transmembrana). La HA es una glicoproteína de tipo I, que contiene un ectodominio N-terminal y un ancla C-terminal, mientras que NA es una glicoproteína de tipo II, que contiene un ancla N-proximal y un ectodominio C-terminal. La HA permite que el virión se ancle a los sialiloligosacáridos de la superficie celular (Paulson, J.C., 1985) y es responsable de su actividad hemaglutinante (Hirst, G.K., 1941). La HA da lugar a anticuerpos neutralizantes del virus que son importantes en la protección contra la infección. La NA es una sialidasa (Gottschalk, A., 1957) que impide la agregación del virión mediante la eliminación de ácido siálico de la superficie celular y del virión (el radical principal en los sialiloligosacáridos reconocidos por HA) (Paulson, J. C., 1985). Los anticuerpos para NA también son importantes en la protección de los anfitriones (Webster, R. G., et al., 1988).

Además de la HA y la NA, se encuentra integrado en los viriones un número limitado de proteínas M1 (Zebedee, S. L. et al., 1988). Éstas forman tetrámeros, tienen actividad de canal iónico H1, y, cuando son activadas por el pH bajo en los endosomas, acidulan el interior del virión, lo que facilita su descapsidación (Pinto, L.H. et al., 1992). Se piensa que la proteína M1 que se encuentra dentro de la envoltura funciona en el montaje y la gemación. Ocho segmentos de moléculas de ARN de hebra sencilla (efectora negativa, o complementaria al ARNm) están contenidos dentro de la envoltura viral, en asociación con NP y tres subunidades de la polimerasa viral (PB1, PB2, y PA), que en conjunto forman un complejo de ribonucleoproteína (RNP) que participa en la replicación y la transcripción del ARN. Se piensa que la proteína NS2, que ahora se sabe que existe en viriones (Richardson, J.C. et al., 1991; Yasuda, J. et al., 1993), desempeña un papel en la exportación de la RNP desde el núcleo (O'Neill, R.E. et al., 1998) a través de la interacción con la proteína M1 (Ward, A.C. et al., 1995). La proteína NS1, la única proteína no estructural del virus de la influenza A, tiene múltiples funciones, incluyendo la regulación del corte y empalme y la exportación nuclear de los ARNm celulares, así como la estimulación de la traducción (Lamb, R. A. et al., 1996). Se cree que su función principal es contrarrestar la actividad del interferón del anfitrión, ya que un virus con NS1 inactivada era viable a pesar de que crecía con menos eficacia que el virus parental en las células no carentes de interferón (García-Sastre, A. et al., 1988).

Los inmunógenos o antígenos de la influenza aviar útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, HA, NA, así como M1, NS2, y NS1. Los inmunógenos o antígenos de la influenza aviar particularmente preferidos son HA y NA. Los inmunógenos o antígenos de la influenza aviar pueden derivar de cualquier cepa conocida de IA, incluyendo todas las cepas aviarias de la influenza A, productos aislados clínicos, productos aislados de campo, y recombinaciones de los mismos. Los ejemplos de tales cepas y subtipos incluyen, pero no se limitan a, H10N4, H10N5, H10N7, H10N8, H10N9, H11N1, H11N13, H11N2, H11N4, H11N6, H11N8, H11N9, H12N1, H12N4, H12N5, H12N8, H13N2, H13N3, H13N6, H13N7, H14N5, H14N6, H15N8, H15N9, H16N3, H1N1, H1N2, H1N3, H1N6, H2N1, H2N2, H2N3, H2N5, H2N7, H2N8, H2N9, H3N1, H3N2, H3N3, H3N4, H3N5, H3N6, H3N8, H4N1, H4N2, H4N3, H4N4, H4N5, H4N6, H4N8, H4N9, H5N1, H5N2, H5N3, H5N7, H5N8, H5N9, H6N1, H6N2, H6N4, H6N5, H6N6, H6N7, H6N8, H6N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N5, H7N7, H7N8, H8N4, H8N5, H9N1, H9N2, H9N3, H9N5, H9N6, H9N7, H9N8, y H9N9. La invención también se refiere al uso de inmunógenos o antígenos de la influenza aviar mutados o alterados de otro modo que reflejan, entre otras cosas, la deriva antigénica y el cambio antigénico.

La antigenicidad de los virus de la influenza cambia gradualmente por medio de mutaciones puntuales (deriva antigénica) o drásticamente por medio de recombinación genética (cambio antigénico) (Murphy, B. R. et al., 1996). Se piensa que la presión inmunológica en HA y NA dirige la deriva antigénica. El cambio antigénico puede estar causado por una transmisión directa de virus de la influenza no humanos a los seres humanos o de la redistribución de los genes a partir de dos virus de influenza diferentes que han infectado una sola célula (Webster, R.G. et al., 1982). Teóricamente, se pueden producir 256 combinaciones diferentes de ARN a partir del barajado de los ocho segmentos genómicos diferentes del virus. La redistribución genética está bien documentada tanto in vitro como in vivo en condiciones de laboratorio (Webster, R. G. et al., 1975). Más importante aún, las infecciones mixtas se producen con relativa frecuencia en la naturaleza y pueden conducir a una redistribución genética, dando como resultado nuevos productos aislados de campo, formas híbridas, o formas redistribuidas (Bean, W.J. et al., 1980; Hinshaw, V.S. et al., 1980; Young, J.F., et al., 1979). La re-emergencia de un virus previamente circulante es otro mecanismo por el cual se puede producir el cambio antigénico.

Por lo tanto, la invención también se refiere al uso de inmunógenos o antígenos de la influenza aviar que han sido sometidos a deriva antigénica o cambio antigénico, incluyendo productos aislados clínicos de la influenza aviar, productos aislados de campo o del medio ambiente de la influenza aviar, formas híbridas, y formas redistribuidas de la influenza aviar. Además, la invención comprende el uso de más de un inmunógeno o de antígeno de la influenza aviar en los vectores y métodos descritos en la presente memoria, suministrados ya sea en vectores recombinantes separados, ya sea juntos en un vector recombinante con el fin de proporcionar una vacuna de la influenza aviar multivalente o una composición inmunogénica que estimula o modula la respuesta inmunogénica a una o más cepas y/o híbridos de la influenza aviar.

Muchas especies de aves domésticas y salvajes están infectadas con el virus de la influenza. Estas incluyen pollos, pavos, patos, gallinas de guinea, gansos domésticos, codornices, faisanes, perdices, pájaros myna, paseriformes, psitácidos, periquitos, gaviotas, aves costeras, aves marinas y emú (Easterday, B.C. et al., 1997; Webster, R.G. et al., 1988). Algunas aves infectadas muestran síntomas de influenza, mientras que otras no lo hacen. Entre las especies de aves domésticas, los pavos son los más frecuentemente implicados en brotes de influenza; los pollos también han estado implicados pero con menos frecuencia. Los virus de la influenza A aviar producen una gran variedad de síndromes en las aves, que van desde infecciones respiratorias de las vías altas de asintomáticas a leves o desde la pérdida de la producción de huevos a enfermedad sistémica rápidamente fatal (Eckroade, R.J. et al., 1987). La gravedad de la enfermedad depende de múltiples factores, incluyendo la virulencia del virus, el estado inmunitario y la dieta del anfitrión, las infecciones bacterianas concomitantes, y las tensiones impuestas en el anfitrión. Dependiendo de su patogenicidad en pollos y pavos, los virus de la influenza A aviar se clasifican como virulentos (capaces de causar una plaga en la volatería) o avirulentos (que causa una enfermedad leve o asintomática). Incluso cuando resultan altamente patógenos para una especie aviar, los virus de la influenza A pueden no ser patógenos para otra especie aviar (Alexander, DJ. et al., 1986). Por ejemplo, los patos son típicamente resistentes a los virus que son letales en los pollos. Como otro ejemplo, A/Turkey/Ireland/1378/85 (H5N8), que mata fácilmente pollos y pavos, no causa síntomas de enfermedad en patos, a pesar de que puede ser detectada en una variedad de órganos internos y en la sangre de aves infectadas (Kawaoka, Y. et al., 1987).

Los virus de la influenza son secretados desde el tracto intestinal en las heces de las aves infectadas (Kida, H., et al., 1980; Webster, R. G. et al., 1978). Los modos de transmisión pueden ser directos o indirectos; incluyendo el contacto con aerosoles y otros materiales contaminados por el virus. Dado que las aves infectadas excretan grandes cantidades de virus en sus heces, muchos elementos diferentes pueden ser contaminados (p. ej., alimento, agua, equipo y jaulas) y contribuir a la difusión del virus. La transmisión por el agua puede proporcionar un mecanismo para la perpetuación año a año de los virus de la influenza aviar en los hábitats naturales de las aves acuáticas. Los signos y síntomas típicos manifestados por las aves comerciales, tales como la volatería infectada con virus de la influenza aviar altamente patógenos incluyen la disminución de la producción de huevos, signos respiratorios, estertores, lagrimeo excesivo, sinusitis, cianosis en la piel sin plumas (especialmente las crestas y barbillas), edema de la cabeza y cara, plumas erizadas, diarrea y trastornos del sistema nervioso.

El número de características que presentan depende de la especie y la edad del ave, de la cepa del virus y de las infecciones bacterianas concomitantes (Easterday, B.C. et al., 1997; Webster, R. G. et al., 1988). De vez en cuando, un ave morirá sin mostrar ningún signo de enfermedad (Alexander, DJ. et al., 1993; Wood, G. W., et al., 1994). Las

lesiones macroscópicas e histológicas en los pollos inoculados con virus altamente patógenos son bastante similares, pero muestran cierta variación con la cepa (Alexander, DJ. et al., 1986; Mo, LP. et al., 1997; Swayne, D. E. et al., 1997). Algunas de las diferencias entre los casos referidos pueden reflejar diferencias en las condiciones experimentales, incluyendo la vía de inoculación, la raza y edad de los pollos, y la dosis de virus. La inflamación del endotelio microvascular, la congestión sistémica, las hemorragias multifocales, la infiltración de células mononucleares perivasculares, y la trombosis se observan comúnmente en pollos infectados con virus altamente virulentos. Tales virus replican de manera eficaz en el endotelio vascular y las células parenquimatosas perivasculares, una propiedad que puede ser importante para la difusión viral y la infección sistémica (Kobayashi, Y. et al., 1996; Suarez, D. L. et al., 1998). Los antígenos virales también se pueden encontrar en los miocitos cardíacos necróticos además de las células de otros órganos con cambios necróticos e inflamatorios (Kobayashi, Y. et al., 1996).

La presente descripción también se refiere a métodos de expresión de uno o más antígenos o inmunógenos en una célula. Como etapa preliminar en el laboratorio, el antígeno o inmunógeno pueden ser reemplazados en cambio por una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica proteínas y péptidos que incluyen aquellas proteínas indicadoras codificantes (p. ej., una enzima). Las proteínas indicadoras son conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los genes de la Proteína Verde Fluorescente, la  $\beta$ -galactosidasa, la  $\beta$ -glucuronidasa, la luciferasa, la fosfatasa alcalina, y la cloranfenicol acetiltransferasa. Muchas de estas proteínas indicadoras y los métodos para su detección se incluyen como una parte de muchos kits de diagnóstico disponibles comercialmente. El antígeno o inmunógeno de interés pueden codificar un ácido nucleico antisentido, ARN de interferencia pequeños (ARNip), una ribozima, u otros ARN no traducidos, tales como ARN "guía" (Gorman et al., 1998), y similares.

Los vectores recombinantes para su uso en la invención también comprenden el uso de proteínas terapéuticas o moléculas coadyuvantes que pueden modular la respuesta inmunitaria tras el suministro de vectores recombinantes o composiciones inmunogénicas. Tales proteínas terapéuticas o moléculas coadyuvantes pueden incluir, pero no se limitan a, moléculas inmunomoduladoras tales como interleuquinas, interferón, y moléculas co-estimuladoras. Las citoquinas aviares que son conocidas en la técnica por modular respuestas inmunitarias en un sujeto aviar son interferón- $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) de pollo (Karaca, K. et al., 1998; Schijns, V.E. et al., 2000), interferón- $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) de pollo, interleuquina-1 $\beta$  (ChIL-1 $\beta$ ) de pollo (Karaca, K. et al., 1998), interleuquina-2 (ChIL-2) de pollo (Hilton, L.S. et al., 2002), y factor de crecimiento mielomonocítico (cMGF1) de pollo (York, JJ. et al., 1996; Djeraba, A. et al., 2002). Las moléculas inmunomoduladoras pueden ser co-administradas con las composiciones inmunogénicas de la invención, o alternativamente, el ácido nucleico de la molécula o las moléculas inmunomoduladoras puede ser co-expresado junto con los inmunógenos o antígenos aviares en los vectores recombinantes para su uso en la invención.

La expresión en el sujeto de la secuencia heteróloga, es decir, los inmunógenos de la influenza aviar, puede dar como resultado una respuesta inmunitaria en el sujeto a los productos de expresión del antígeno o inmunógeno. Por lo tanto, los vectores recombinantes de la presente descripción se pueden utilizar en una composición inmunológica o vacuna para proporcionar un medio para inducir una respuesta inmunitaria, que puede, pero no necesita ser, protectora. Las técnicas de biología molecular utilizadas en el contexto de la invención son descritas por Sambrook et al. (2001).

Incuso más alternativamente o adicionalmente, en las composiciones inmunogénicas o inmunológicas para el uso incluido en la presente invención, la secuencia de nucleótidos que codifica los antígenos o inmunógenos puede tener una delección de la porción que codifica un dominio transmembrana. Incluso más alternativamente o adicionalmente, la composición de vector o inmunogénica puede contener y expresar además en una célula anfitriona, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal tPA heteróloga tal como tPA humana o aviar y/o un intrón estabilizador, tal como el intrón II del gen de la  $\beta$ -globina de conejo.

La presente descripción también proporciona un método de suministro y/o administración de una secuencia de nucleótidos heteróloga a una célula *in vitro* o *in vivo*. De acuerdo con este método, una célula se infecta con un vector de adenovirus humano recombinante para su uso de acuerdo con la presente invención (como se describe en detalle en la presente memoria). La célula puede ser infectada con el vector de adenovirus por el proceso natural de la transducción viral. Alternativamente, el vector puede ser introducido en la célula por cualquier otro método conocido en la técnica. Por ejemplo, la célula puede ponerse en contacto con un vector de adenovirus elegido como diana (como se describe a continuación) y absorberse por un mecanismo alternativo, p. ej., mediante endocitosis mediada por receptor. Como otro ejemplo, el vector puede ser dirigido a una proteína de la superficie celular internalizante utilizando un anticuerpo u otra proteína de unión.

Se puede administrar un vector a un sujeto aviar en una cantidad para lograr las cantidades indicadas para las composiciones de producto génico (p. ej., epítipo, antígeno, agente terapéutico, y/o anticuerpo). Por supuesto, la invención prevé dosis por debajo y por encima de las ilustradas en la presente memoria, y para cualquier composición que se vaya a administrar a un sujeto aviar, incluyendo los componentes de la misma, y para cualquier método particular de administración, se prefiere determinar: la toxicidad, por ejemplo mediante la determinación de la dosis letal (DL) y la DL<sub>50</sub> en un modelo aviar adecuado; y, la dosificación de la composición o las composiciones, la concentración de los componentes en la misma y el momento de administración de la composición o las composiciones, que provocan una respuesta adecuada, por ejemplo titulaciones de los sueros y análisis de los mismos, p. ej., mediante ELISA y/o análisis de seroneutralización. Tales determinaciones no requieren

experimentación excesiva desde el conocimiento del experto en la técnica, de esta descripción y de los documentos citados en la presente memoria.

Los ejemplos de composiciones de la descripción incluyen preparaciones líquidas para la administración en orificios, o en la mucosa, p. ej., oral, nasal, anal, vaginal, peroral, intragástrica, etc., tales como suspensiones, soluciones, pulverizaciones, jarabes o elixires; y, preparaciones para la administración parenteral, epicutánea, subcutánea (es decir, a través del cuello inferior), intradérmica, intraperitoneal, intramuscular (es decir, a través de punción en la membrana del ala, la punta del ala, la musculatura pectoral y del muslo), intranasal, o intravenosa (p. ej., administración inyectable) tales como suspensiones o emulsiones estériles. Se hace referencia a la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.716.823 presentada el 6 de abril de 2004; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.706.693 presentada el 16 de marzo de 2004; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.348.450 presentada el 19 de febrero de 2002; Solicitudes de los Estados Unidos Núms. de Serie 10/052.323 y 10.116.963; y 10/346.021, que describen la inmunización y el suministro de composiciones inmunogénicas o de vacuna a través de un modo no invasivo de suministro, es decir, administración epicutánea e intranasal. Otros métodos de administración y suministro a aves incluyen la administración de los vectores recombinantes o composiciones inmunogénicas en el agua potable o el alimento, en donde la dosis de la vacuna se puede seleccionar entre  $10^1$  y  $10^4$  por animal.

Para las inyecciones intramusculares, la administración se puede producir a través del pecho (pectorales), la pata (muslo superior/musculatura del flanco lateral), membrana del ala (patagio), bajo las alas (axila), y la punta del ala. La longitud y el diámetro (calibre) de la aguja utilizada debe ser tal que permita el suministro de la vacuna al centro del músculo elegido.

Un método de administración particularmente preferido es el suministro *in ovo* (Gildersleeve, R.P., 1993a; Gildersleeve, R.P. et al., 1993b; Sharma, J.M., 1985; Sharma, J.M. et al., 1984). El suministro *in ovo* está emergiendo como un método prometedor para la inmunización en masa de aves ya que la administración de una dosis uniforme de vacunas por medio de un inyector robótico ahorra tanto mano de obra como tiempo (Johnston et al., 1997; Oshop et al., 2002). Hasta la fecha, más de 80% de los pollos de engorde comerciales de los Estados Unidos son tratados *in ovo* con un inyector mecanizado contra la enfermedad de Marek (Wakenell et al., 2002). Este método también se utiliza cada vez más para administrar las vacunas contra la bursitis infecciosa aviar (IBD) y la enfermedad de Newcastle (ND). Las respuestas inmunitarias también se han originado en los pollos por medio de suministro *in ovo* de vacunas de ADN (Kapczynski et al., 2003; Oshop et al., 2003) y una vacuna vectorizada de alfavirus replicante (Schultz-Cherry et al., 2000). En comparación con sus contrapartes de replicación, el ADN, y los vectores virales, las vacunas y las composiciones inmunogénicas *in ovo* son menos propensas a matar o dañar el embrión y los vectores de Ad, en particular, tienen una tasa de cumplimiento más alta debido a su incompetencia para replicar *in ovo*.

Los sistemas, aparatos y dispositivos mecanizados, tales como los disponibles comercialmente como INOVOJECT®, inyectan cuidadosamente compuestos, vacunas y composiciones inmunogénicas en volúmenes calibrados con precisión, sin causar un trauma en el embrión en desarrollo, lo que reduce la manipulación del polluelo, mejorando de la manejabilidad de la incubación a través de la automatización, y reduciendo los costes de producción en vivo. INOVOJECT® y otros sistemas, dispositivos o aparatos mecanizados, funcionan haciendo bajar suavemente un cabezal de inyección sobre la parte superior del huevo y perforando con un punzón hueco de pequeño diámetro una pequeña abertura en la cáscara. Una aguja desciende a través de un tubo a una profundidad controlada (por lo general 2,54 cm), se suministra un pequeño volumen, pre-determinado de la vacuna, composición inmunogénica, o compuesto al embrión, y luego se retira la aguja y se limpia con un lavado de esterilización. Los métodos de la vacuna *in ovo* y de la administración de genes se pueden encontrar en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.458.630; RE 35973; 6.668.753; 6.601.534; 6.506.385; 6.395.961; 6.286.455; 6.244.214; 6.240.877; 6.032.612; 5.784.992; 5.699.751; 5.438.954; 5.339.766; 5.176.101; 5.136.979; 5.056.464; 4.903.635; 4.681.063; Solicitudes de los Estados Unidos con los Núm. de Serie 10/686.762, presentada el 16 de octubre de 2003; 10/216.427, presentada el 9 agosto de 2002; 10/074/714, presentada el 13 de febrero de 2002; y 10/043,025, presentada el 9 de enero de 2002. En consecuencia, la descripción contempla un dispositivo o aparato para el suministro o la administración *in ovo* de vectores recombinantes, vacunas o composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria. El dispositivo o aparato pueden comprender opcionalmente los vectores de adenovirus humanos recombinantes o composiciones inmunogénicas para su uso en la presente invención, es decir, pueden ser pre-cargados con los vectores o las composiciones inmunogénicas para la administración *in ovo* en un ave.

La invención también comprende la administración secuencial de composiciones de la invención o la realización secuencial de los métodos de la presente memoria, p. ej., la administración periódica de composiciones de la invención, tal como en el curso de la terapia o tratamiento para una afección y/o administración de refuerzo de composiciones inmunológicas y/o en regímenes de cebado-refuerzo; y, el tiempo y forma para las administraciones secuenciales se pueden determinar sin experimentación indebida. Adicionalmente, la descripción comprende composiciones y métodos para elaborar y utilizar vectores, incluidos los métodos para la producción de productos génicos y/o productos inmunológicos y/o anticuerpos *in vivo* y/o *in vitro* y/o *ex vivo* (p. ej., siendo los dos últimos, por ejemplo, después del aislamiento del mismo a partir de las células de un anfitrión al que se ha realizado una administración de acuerdo con la invención, p. ej., después de la expansión opcional de tales células), y los usos de tales genes y/o productos inmunológicos y/o anticuerpos, incluyendo diagnósticos, análisis, terapias, tratamientos, y similares.

Las composiciones de vectores se formulan mezclando el vector con un portador o diluyente adecuados; y, el producto génico y/o el producto inmunológico y/o las composiciones de anticuerpos se formulan igualmente mezclando el gen y/o el productos inmunológico y/o el anticuerpo con un portador o diluyente adecuados; véanse, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.990.091, los documentos WO 99/60164, WO 98/00166, documentos citados en los mismos, y otros documentos citados en la presente memoria, y otras enseñanzas de la presente memoria (por ejemplo, con respecto a los portadores, diluyentes y similares).

En tales composiciones, los vectores recombinantes pueden estar mezclados con un portador, diluyente, o excipiente aceptables adecuados desde el punto de vista veterinario o farmacéutico tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similares. Las composiciones también se pueden liofilizar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, coadyuvantes, gelificantes o aditivos aumentadores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseada.

Se ha sabido que el DMSO aumenta la potencia de las composiciones de vacuna e inmunogénicas, en particular en lo que respecta al suministro *in ovo* de vectores o composiciones inmunogénicas que comprenden vectores. Se cree que el DMSO aumenta la potencia de las vacunas mediante el aumento de la permeabilidad de las membranas celulares (Oshop et al., 2003). Se pueden utilizar en la formulación de vacunas o composiciones inmunogénicas otros agentes o aditivos que son capaces de permeabilizar las células, reducir la viscosidad del líquido amniótico, y presentar una tasa de cumplimiento superior en comparación con el DMSO, especialmente cuando se administran mediante suministro *in ovo*. Se ha demostrado que la absorción de una variedad de proteínas, tales como la insulina, la leptina, y la somatotropina, es mejorada por tensioactivos tales como tetradecil-maltósido (TDM) sin efectos secundarios apreciables, después de la administración intranasal (Arnold, et al., 2004). Por consiguiente, la presente invención comprende el uso de TDM en las composiciones para el uso descrito en la presente memoria.

Las formulaciones que contienen TDM al 0,125% pueden causar alteraciones moderadas en la morfología celular, mientras que las concentraciones más altas de TDM (es decir, 0,5%) pueden inducir transitoriamente cambios morfológicos más extensos. Se cree que el TDM mejora el suministro del vector en un entorno *in ovo* debido al moco nasal viscoso en los mamíferos y al líquido amniótico de los huevos embrionados de aves. El perfil de seguridad del TDM como describen Arnold, et al., (2004) también es particularmente ventajoso para promover la salud de aves inmunizadas y el cumplimiento para la introducción en la cadena alimentaria.

La cantidad de vector que se va a administrar variará para el sujeto y la afección que se vaya a tratar y variará de uno o unos pocos a unos pocos cientos o miles de microgramos de peso corporal por día y preferiblemente la dosis de vacuna o composición inmunogénica elegida estará preferiblemente entre  $10^1$  -  $10^6$  unidades formadoras de placas (UFP), preferiblemente de  $10^2$ - $10^5$  UFP por ave. Para la inyección, las vacunas que contienen el título anterior deben ser diluidas con un líquido farmacéuticamente o veterinariamente aceptable tal como solución salina fisiológica hasta un volumen final de aproximadamente 0,1 ml o 0,01 ml en el caso de administración a la membrana del ala. Los vectores y métodos de la presente descripción permiten la vacunación *in ovo* y la vacunación de polluelos de 1 día, así como la vacunación de polluelos de mayor edad y adultos.

Un vector puede ser administrado de manera no invasiva a un sujeto aviar en una cantidad para lograr las cantidades indicadas para las composiciones de producto génico (p. ej., epítipo, antígeno, agente terapéutico, y/o anticuerpo). Por supuesto, la invención prevé dosis por debajo y por encima de las ilustradas en la presente memoria, y para cualquier composición que se vaya a administrar a un sujeto aviar, incluyendo los componentes de la misma, y para cualquier método particular de administración, se prefiere determinar: la toxicidad, por ejemplo mediante la determinación de la dosis letal (DL) y  $DL_{50}$  en un modelo aviar adecuado; y, la dosificación de la composición o las composiciones, la concentración de los componentes en la misma y el momento de administración de la composición o las composiciones, que provocan una respuesta adecuada, por ejemplo mediante titulaciones de los sueros y análisis de los mismos, p. ej., mediante ELISA y/o análisis de seroneutralización. Tales determinaciones no requieren experimentación excesiva a partir del conocimiento del experto en la técnica, de esta descripción y de los documentos citados en la presente memoria.

Los vectores recombinantes se pueden administrar en una cantidad adecuada para obtener la expresión *in vivo* correspondiente a las dosis descritas en la presente memoria y/o en los documentos citados en la presente memoria. Por ejemplo, los intervalos adecuados para las suspensiones virales se pueden determinar empíricamente. Si se expresa más de un producto génico en más de un recombinante, cada recombinante puede ser administrado en estas cantidades; o, cada recombinante puede ser administrado de tal manera que haya, en la combinación, una suma de recombinantes que comprenden estas cantidades.

En las composiciones de vectores o plásmidos para su uso y empleo en la invención, las dosis pueden ser como se describe en los documentos citados en la presente memoria o como se describe en la presente memoria o como en los documentos referidos o citados en los documentos citados en la presente memoria. Ventajosamente, la dosis debe ser una cantidad suficiente de plásmido para provocar una respuesta análoga a composiciones en donde el antígeno o los antígenos están presentes directamente; o para tener una expresión análoga a las dosis en dichas composiciones; o para tener una expresión análoga a la expresión obtenida *in vivo* por las composiciones recombinantes.

Sin embargo, la dosificación de la composición o las composiciones, la concentración de los componentes de la misma y el momento de administración de la composición o las composiciones, que provocan una respuesta inmunológica adecuada, se pueden determinar por métodos tales como mediante titulaciones de anticuerpos en sueros, p. ej., mediante ELISA y/o análisis de ensayo de seroneutralización. Tales determinaciones no requieren experimentación excesiva desde el conocimiento del experto en la técnica, de esta descripción y de los documentos citados en la presente memoria. Y, el tiempo para las administraciones secuenciales se puede determinar igualmente con métodos verificables a partir de esta descripción, y del conocimiento en la técnica, sin experimentación excesiva.

Las composiciones inmunogénicas o inmunológicas para su uso contemplado por la invención también pueden contener un coadyuvante. Los coadyuvantes adecuados incluyen fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina; Patente de los Estados Unidos Núm. 6.017.537) y/o polímero de ácido acrílico o ácido metacrílico y/o un copolímero de anhídrido maleico y de un derivado de alqueno. Los polímeros de ácido acrílico o ácido metacrílico pueden ser entrecruzados, p. ej., con poli(alqueniéteres) de azúcares o de polialcoholes. Estos compuestos son conocidos bajo el término "carbómero" (Pharmeuropa, vol. 8, No. 2, Junio de 1996). Un experto en la técnica también puede ser remitido a la Patente de los Estados Unidos Núm. 2.909.462, que comenta tales polímeros acrílicos entrecruzados con un compuesto polihidroxilado que contiene al menos 3 grupos hidroxilo: en una realización, un compuesto polihidroxilado contiene no más de 8 grupos hidroxilo; en otra realización, los átomos de hidrógeno de al menos 3 hidroxilos se reemplazan por radicales alifáticos insaturados que contienen al menos 2 átomos de carbono; en otras realizaciones, los radicales contienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono, p. ej., vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener a su vez otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos comercializados bajo el nombre Carbopol® (Noveon Inc., Ohio, USA) son particularmente adecuados para su uso como coadyuvantes. Están entrecruzados con una alilsacarosa o con alilpentaeritritol, con respecto a ello, se hace mención de los productos Carbopol® 974P, 934P, y 971P.

En cuanto a los copolímeros de anhídrido maleico y de derivado de alqueno, se hace mención de los productos EMA® (Monsanto), que son copolímeros de anhídrido maleico y de etileno, que pueden ser lineales o entrecruzados, por ejemplo entrecruzados con diviniléter. También, se puede hacer referencia a la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.713.068 and Regelson, W. et al., 1960).

Los lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.713.068 también se pueden utilizar en las composiciones para el uso en la presente invención. Entre estos lípidos catiónicos, se da preferencia a DMRIE (N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propano-amonio; documento WO96/34109), ventajosamente asociado con un lípido neutro, ventajosamente DOPE (dioleoil-fosfatidil-etanolamina; Behr J. P., 1994), para formar DMRIE-DOPE.

Una vacuna recombinante o composición inmunogénica o inmunológica también se pueden formular en forma de una emulsión de aceite-en-agua. La emulsión de aceite-en-agua puede basarse, por ejemplo, en aceite de parafina líquida ligera (tipo Farmacopea Europea); aceite de isoprenoides tales como escualeno, escualeno, EICOSANE™ o tetratetracontano; aceite resultante de la oligomerización de uno o varios alquenos, p. ej., isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, tales como aceites vegetales, oleato de etilo, propilenglicol (dicaprilato/caprato), tri(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos o alcoholes ramificados, p. ej., ésteres de ácido isoesteárico. El aceite ventajosamente se usa combinado con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como ésteres de sorbitán, manidas (p. ej., oleato de manitol anhidro), glicerol, poliglicerol, propilenglicol, y ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico, o hidroxisteárico, que están opcionalmente etoxilados, y copolímero de bloques de polioxipropileno-polioxietileno, tales como los productos Pluronic®, p. ej., L121. El coadyuvante puede ser una mezcla de uno o varios emulsionantes, agente formador de micelas, y aceite tal como el que está disponible bajo el nombre Provac® (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA).

El adenovirus recombinante, o el vector adenoviral recombinante que expresa uno o más antígenos o inmunógenos de interés, p. ej., el vector de acuerdo con esta descripción, se pueden preservar y/o conservar y almacenar ya sea en forma líquida, a aproximadamente 5°C, ya sea en forma liofilizada o secada por congelación, en presencia de un estabilizador. El secado por congelación puede ser de acuerdo con procedimientos de secado por congelación convencionales bien conocidos. Los estabilizadores farmacéuticamente aceptables pueden ser SPGA (sacarosa fosfato glutamato albúmina. Bovarnick, et al., 1950), carbohidratos (p. ej., sorbitol, manitol, lactosa, sacarosa, glucosa, dextrano, trehalosa), glutamato de sodio (Tsvetkov, T. et al., 1983; Israeli, E. et al., 1993), proteínas tales como peptona, albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas tales como leche desnatada (Mills, CK. et al., 1988; Wolff, E. et al., 1990), y tampones (p. ej., tampón fosfato, tampón fosfato de metal alcalino). Se pueden utilizar un coadyuvante y/o un vehículo o excipiente para hacer solubles las preparaciones secadas por congelación.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de un vector de Ad que codifica la HA de A/Panama/2007/99

La cepa de virus de la influenza A/Panama/2007/99 (H3N2) (SEQ ID NO: 1, 2), seleccionada para la producción de vacunas en 2003-2004, fue proporcionada por los Centros para el Control de Enfermedades (CDC). El gen de la

hemaglutinina (HA) se clonó mediante transcripción inversa del ARN de influenza, seguido de la amplificación del gen de HA con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores de la Tabla 1.

Tabla 1: Cebadores utilizados en la construcción de vectores de Ad

Cebador	Secuencia
5' HA	5'-CACACAGGTACCGCCATGAAGACTATCATTGCTTTGAGC-3' (SEQ ID NO: 9)
3' HA	5'-CACACAGGTACCTCAAATGCAAATGTTGCACC-3' (SEQ ID NO: 10)

5 Estos cebadores contienen secuencias que se reasocian con los extremos 5' y 3' del gen de la HA de A/Panama/2007/99, así como las secuencias correspondientes a un sitio de unión al ribosoma de eucariotas (Kozak, 1986) inmediatamente aguas arriba del codón ATG de inicio de HA y sitios KpnI para la clonación subsiguiente. Se insertó el fragmento KpnI que contenía el gen de la HA completo en el sitio KpnI de pShuttle-CMV (He et al., 1998) (proporcionado por T. He) en la orientación correcta bajo el control transcripcional del promotor temprano de citomegalovirus humano (CMV). Se generó un vector Ad5 defectuoso para E1/E3 que codificaba la HA de A/Panama/2007/99 (AdPNM2007/99.H3) en células 293 humanas utilizando un sistema de recombinación simplificado como se ha descrito (Zeng et al., 2001).

15 El vector AdPNM2007/99.H3 se validó mediante la secuenciación de ambas uniones 5' y 3' entre el inserto de HA y el vector. Se obtuvieron anticuerpos IH contra A/Panama/2007/99 en ratones después de la administración intranasal de AdPNM2007/99.H3.

Ejemplo 2. Inmunización de pollos por medio de inyección *in ovo* e intramuscular de un vector de Ad recombinante.

20 No se ha informado hasta ahora sobre la inmunización de pollos mediante la inoculación de una vacuna vectorizada de Ad humano. Puesto que Ad5 no se encuentra naturalmente en las aves, se creyó que este vector era incapaz de infectar y/o replicar en células de pollo de manera eficaz. Sorprendentemente, se consiguieron títulos de IH en suero de 512 en los 3 pollos dos semanas después de la inyección intramuscular de AdPNM2007/99.H3 (Figura 1).

25 Cuando se inyectaron vectores AdPNM2007/99.H3 en huevos de gallina embrionados de 9 días de edad y 18 días de edad, se lograron títulos de IH en suero de 8 y 16 en la primera, y se lograron títulos de IH de <4, 4, y 8 en las dos últimas semanas después de la eclosión. Los resultados sugieren que el vector de Ad5 humano defectuoso para E1/E3 se puede utilizar como un portador de vacuna en las aves debido a su competencia para transducir y su incapacidad para replicar en células de aves. Los títulos de IH relativamente bajos inducidos por la vacunación *in ovo* pueden ser atribuidos, entre otras cosas, a la dosis y la edad de los embriones. El vector de Ad5 puede haber transducido parte del embrión de pollo a través de la unión de su fibra al receptor de coxsackievirus y adenovirus (CAR) encontrado sobre la superficie de las células de pollo (Tan et al., 2001). Se puede provocar una respuesta inmunitaria en pollos después de la transducción de sólo un pequeño número de células, porque Ad es un vector potente capaz de proteger el ADN del vector alterando los endosomas después de la internalización (Curiel, 1994). Además, al menos uno de los componentes del Ad, la hexona, es altamente inmunogénico y confiere actividad coadyuvante a los antígenos exógenos (Molinier-Frenkel et al., 2002).

35 El vector AdPNM2007/99.H3 se inyectó en el amnios de huevos de pollo embrionados de 9 días de edad (Grupo 1) y 18 días de edad (Grupo 2), respectivamente, en un volumen de 200 µl a una dosis de  $5 \times 10^{10}$  ufp por huevo. Hubo 6 huevos por grupo; sin embargo, sólo 2 aves eclosionaron en el Grupo 1 y 3 aves en el Grupo 2. Los títulos de IH en suero se determinaron como se ha descrito (Van Kampen et al., 2005) 2 semanas después de la eclosión. En el Grupo 3, el vector AdPNM2007/99.H3 se inyectó por vía intramuscular en tres pollos de 4 semanas de edad, en un volumen de 100 µl a una dosis de  $2,5 \times 10^{10}$  ufp por animal. Los títulos de IH se determinaron dos semanas después de la inmunización.

40 En el Grupo 1 (inmunización *in ovo* de embriones de 9 días de edad), se lograron títulos de IH de 8 y 16; en el Grupo 2 (inmunización *in ovo* de los embriones de 18 días de edad), se lograron títulos de IH de <4 (asignados arbitrariamente a un título de 2), 4, y 8; y en el Grupo 3 (inmunización intramuscular de pollos de 4 semanas de edad) se alcanzaron títulos de IH de 512 en las tres aves. La Figura 1 muestra los títulos de IH en la escala  $\log_2$ . Los cuadrados corresponden a los títulos de IH en aves individuales en el Grupo 1; mientras que los triángulos corresponden a los títulos de IH en aves individuales en el Grupo 2. Los círculos corresponden a los títulos de IH en aves individuales en el Grupo 3.

Ejemplo 3. Construcción de un vector de Ad que codifica el gen de H de A/Turkey/Wisconsin/68 TAdTW68.H5)

El molde de ADN de H de A/Turkey/WI/68 (SEQ ID NO: 3, 4) que codifica la H de la cepa del virus de la IA, fue

proporcionado por el USDA Southeast Poultry Research Laboratory, Athens GA, y se amplificó por PCR utilizando los cebadores mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2: Cebadores utilizados en la construcción de vectores de Ad

Cebador	Secuencia
5' HA	5'CACACAAAGCTTGCCGCCATGGAAAGAATAGTGATTGC3' (SEQ ID NO: 10)
3' HA	5'CACACAGGATCCATCTGAACTACAATCCTAGATGC3' (SEQ ID NO: 11)

5 Estos cebadores contienen secuencias que se reasocian con los extremos 5' y 3' del gen H de A/Turkey/Wisconsin/68, un sitio de unión al ribosoma de eucariotas (Kozak, 1986) inmediatamente aguas arriba del codón ATG de inicio de H, y los sitios de restricción únicos para la clonación subsiguiente. El fragmento que contenía el gen H completo se insertó en el sitio HindIII-BamHI del plásmido lanzadera p Ad Apt (proporcionado por Crucell, Leiden, Países Bajos) en la orientación correcta bajo el control transcripcional del promotor temprano de citomegalovirus humano (CMV). A continuación se generó un vector de Ad defectuoso para E1/E3 libre de RCA que codificaba el gen de H de A/Turkey/Wisconsin/68 (AdTW68.H5) en células PER.C6 humanas (proporcionadas por Crucell) por medio de co-transfección de pAdApt-TW68.H5 con el plásmido de cadena principal de Ad5 pAdEasy1 (He et al., 1998) como se ha descrito (Shi et al., 2001). El vector AdTW68.H5 fue validado por la secuenciación de las uniones tanto 5' como 3' entre el inserto de H y la cadena principal del vector.

15 Se pueden producir vacunas de IA *in ovo* vectorizadas de Ad rápidamente y administrar en masa a poblaciones de pollos en el contexto de un perfil de seguridad excelente en respuesta a una pandemia de IA emergente. La producción a gran escala de vectores de Ad5 libres de RCA en la línea celular PER.C6 bien caracterizada en biorreactores de suspensión libre de suero (Lewis, 2006), junto con la purificación mediada por cromatografía (Konz, 2005) y tampones que no requieren congeladores para el almacenamiento a largo plazo (Evans, 2004) debe reducir en gran medida los costes de producción de vectores de Ad5. El uso de células cultivadas en lugar de huevos embrionados como un sustrato para la producción de vacunas contra la IA es importante, sobre todo durante un brote de IA cuando los huevos fértiles pueden ser escasos. Esta vacuna contra la IA vectorizada de Ad5 está en consonancia con una estrategia DIVA porque el vector solamente codifica la HA del virus. Por lo tanto, el análisis de anticuerpos para IH en suero junto con la medición de la nucleoproteína anti-IA por medio de análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas permitiría la rápida determinación de la exposición a la vacuna contra IA o virus.

Aunque se puede desarrollar una vacuna contra IA en aerosol mediante la expresión de la HA a partir de un vector de virus de la enfermedad de Newcastle (Swayne, 2003) o un virus de influenza redistribuido que contiene una cadena principal de virus de influenza no patogénica (Lee, 2004), la vacuna contra IA *in ovo* vectorizada con Ad5 libre de RCA proporciona una plataforma única capaz de detener las infecciones por virus HPAI en aves inmunizadas a través del suministro automático de una dosis uniforme de la vacuna contra IA no replicante que sea compatible con una estrategia DIVA. A diferencia de vectores recombinantes replicantes que están asociados con el riesgo de generar reversiones y permiten la propagación de organismos modificados genéticamente en especies tanto diana como no diana en el medio ambiente, los vectores de Ad5 libres de RCA no se propagarán en el campo. En contraste con la vacuna de virus de IA redistribuidos que pueden generar más redistribuciones no deseadas con un virus de influenza salvaje circulante al mismo tiempo (Hilleman, 2002), no es posible que el genoma de ADN de Ad5 experimente una redistribución con el genoma de ARN segmentado de un virus de influenza.

#### Ejemplo 4. Inoculación *in ovo* de AdTW68.H5

Se llevó a cabo la inoculación *in ovo* como se ha descrito (Senne, 1998; Sharma et al., 1982). Antes de la inoculación todos los embriones se observaron al trasluz para determinar la viabilidad, y el sitio de inoculación se marcó y se desinfectó con una solución de alcohol etílico del 70% que contenía yodo al 3,5%. Se hizo un agujero en la cáscara con un taladro rotatorio equipado con una punta afilada. La inoculación se realizó por la vía amnios-alantoidea mediante el uso de jeringas de 1 ml. Después de la inoculación, el agujero fue sellado con parafina derretida.

#### Ejemplo 5. Serología después de la inoculación de AdTW68.H5

45 La cepa A/Turkey/WI/68 de IA se pasó a huevos de pollo embrionados SPF para lograr un título de 10 dosis infecciosas de 50%/ml para embriones. Los fluidos amnios-alantoicos se analizaron para determinar la actividad de hemaglutinación. Se determinaron los títulos de anticuerpos en muestras de suero individuales por inhibición de la hemaglutinación utilizando 4 unidades de hemaglutinación del virus de IA como se ha descrito (Swayne et al., 1998, Thayer et al., 1998).

## Ejemplo 6. Muestreo y cuantificación de los genomas de IA

Se suspendieron muestras orofaríngeas de aves individuales en 1,0 ml de medio de infusión de cerebro corazón (Difco, Detroit, Mich.) y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El ARN se extrajo utilizando el kit RNeasy mini (Qiagen). La RT-PCR cuantitativa en tiempo real se realizó con cebadores específicos para el ARN de la matriz del virus de influenza de tipo A, como se ha descrito previamente (Spackman, 2002). El ARN viral se interpoló a partir de los umbrales de ciclo mediante el uso de las curvas convencionales generadas a partir de cantidades conocidas de ARN de A/Ck/Queretaro/14588-19/95 de control ( $10^{10}$  a  $10^{60}$   $\text{DIE}_{50}/\text{mL}$ ).

Ejemplo 7. Inmunización de pollos por inoculación *in ovo* de AdTW68.H5 seguido de refuerzo después de la eclosión

La inmunización de pollos por inoculación se completó mediante la administración de 300  $\mu\text{l}$  de AdTW68.H5 que contenía  $10^{11}$  partículas virales/ml (pv/ml) en huevos embrionados SPF los días 10 o 18 de embrionación. Los polluelos eclosionados de cada grupo fueron divididos equitativamente en dos grupos: la mitad de los pollos fueron revacunados a través de la vía nasal con la misma dosis de AdTW68.H5 el día 15 después de la eclosión, y los pollos restantes no recibieron una aplicación de refuerzo después de la eclosión.

Los títulos de anticuerpos de IH detectados en sueros obtenidos el día 28 después de la eclosión de estos grupos de aves se muestran en la Fig. 2. Los polluelos vacunados *in ovo* el día 10 de embrionación mostraron títulos de IH que variaban entre 2 y 7  $\log_2$  (media de 4,2); los pollos vacunados el día 10 de embrionación con la aplicación de refuerzo después de la eclosión mostraron títulos de IH que variaban entre 2 y 9  $\log_2$  (media de 5,5); los polluelos vacunados al día 18 de embrionación mostraron títulos que variaban entre 2 y 9  $\log_2$  (media de 5,5); y los pollos vacunados el día 18 de embrionación y reforzados a los 15 días de la eclosión mostraron valores de IH entre 2 y 8  $\log_2$  (media de 5,7). En general, la administración *in ovo* de esta vacuna de IA vectorizada de Ad humano indujo una fuerte respuesta inmunitaria contra la IA en pollos, mientras que la instilación intranasal de esta vacuna vectorizada a pollos, como ha demostrado recientemente (Gao, 2006), es ineficaz.

Ejemplo 8. La inoculación *in ovo* de AdTW68.H5 protege contra la sensibilización letal con la cepa de influenza aviar altamente patogénica HPAI A/Ck/Queretaro/19/95 (H5N2<sup>\*</sup>)

Se inmunizaron 19 embriones de pollo SPF por vía *in ovo* el día 18 de la incubación con la misma dosis de AdTW68.H5 que se describe en el Ejemplo 7. Los pollos eclosionados fueron identificados individualmente por una banda en el ala. Un grupo de 12 pollos se reforzó por vía nasal el día 15 después de la eclosión y los 7 pollos restantes no fueron reforzados. Se obtuvieron muestras de sangre de cada ave con banda en el ala a los 23 y 29 días de edad y se sometieron a ensayo mediante IH para anticuerpos contra la cepa de la influenza aviar A/Turkey/Wisconsin/68. En general, los títulos de anticuerpos IH detectados en estas aves (Fig. 3) fueron similares a los valores obtenidos en la prueba anterior (Fig. 2). La mayoría de las aves alcanzó títulos  $> 5 \log_2$ . Los polluelos inoculados solamente *in ovo* alcanzaron títulos entre 5 y 9  $\log_2$  el día 23 después de la eclosión (Figura 3). Esos pollos mantuvieron o aumentaron sus títulos de anticuerpos alrededor del día 29 después de la eclosión. La vacunación *in ovo* combinada con el refuerzo intranasal mostró títulos de anticuerpos que variaban entre 3 y 9  $\log_2$  alrededor del día 23 después de la eclosión (Figura 3). Del mismo modo que en el grupo anterior, la mayoría de los polluelos había aumentado sus títulos en escalones de 1 o 2  $\log_2$  alrededor del día 29 después de la eclosión.

La sensibilización se realizó en las instalaciones de bioseguridad de nivel 3+ por medio de inoculación orofaríngea con  $10^5$  dosis infectivas de embrión ( $\text{DIE}_{50}$ ) de HPAI A/Ck/Queretaro/19/95 (H5N2) (Horimoto, 1995, García, 1998). El gen de H de esta cepa de sensibilización tiene una identidad de nucleótidos de 90,1% y una similitud de aminoácidos deducida de 94,4% con la H de la cepa de IA A/Tk/WI/68 utilizada en la vacuna vectorizada de Ad (Accesos GenBank U79448 y U79456) (SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8).

Un total de 30 pollos, incluyendo 7 polluelos vacunados *in ovo* y 12 polluelos vacunados *in ovo* y, posteriormente, reforzados por vía intranasal el día 15 después de la eclosión, así como 11 controles no vacunados, fueron sensibilizados el día 34 después de la eclosión.

Las aves sensibilizadas se observaron diariamente para determinar la morbilidad y mortalidad durante todo el período experimental de 14 días. Los signos clínicos de IA, incluyendo hinchazón de las crestas y las barbillas, conjuntivitis, anorexia e hipotermia, se observaron dos días después de la sensibilización en 10 de 11 aves de control. Dos días más tarde, la mayoría de los supervivientes en el grupo de control mostró necrosis de la cresta, hinchazón de la barbilla, diarrea, deshidratación, letargo y hemorragias subcutáneas de la caña de la pata. No se desarrollaron signos de la enfermedad en ninguna de las aves vacunadas. Todas las aves vacunadas con AdTW68.H5 (19/19) (*in ovo* solamente e *in ovo* + refuerzo nasal) sobrevivieron a la sensibilización (Fig. 4).

Los genomas virales de A/Chicken/Querétaro/19/95 en aves sensibilizadas fueron determinados cuantitativamente mediante reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR) en hisopos orofaríngeos recopilados los días 2, 4, y 7 después de la sensibilización. Hubo una diferencia significativa (PO.05) en la concentración de genomas virales de IA entre los pollos vacunados y no vacunados 7 días después de la sensibilización (Fig. 5). La ausencia de ARN viral detectable en las aves inmunizadas proporciona evidencia de que la vacunación *in ovo* logró una respuesta inmunitaria capaz de controlar la propagación del virus de la IA en el plazo de una semana.

Estos resultados muestran en conjunto que los pollos inmunizados *in ovo* con vectores de Ad humanos libres de RCA que codifican genes de H de diferentes virus de la influenza (origen humano y aviar) desarrollaban títulos de anticuerpos de IH contra el virus de IA homólogo, y eran protegidos frente a la sensibilización letal con una cepa de virus de IA altamente patogénica del mismo tipo de H.

- 5 Ejemplo 9. La inoculación *in ovo* de AdTW68.H5 protege contra la sensibilización letal con la cepa de la influenza aviar altamente patogénica A/Swan/Mongolia/244L/2005 (H5N1)

10 Para determinar si la vacuna de IA vectorizada con AdTW68.H5 puede conferir protección contra una cepa del virus HPAI H5N1 IAAP reciente, se vacunaron 31 pollos *in ovo* con el vector AdTW68.H5 a una dosis de  $2 \times 10^8$  ifu. Los grupos de control incluyeron 10 pollos vacunados con un vector de Ad5 (AdCMV-tetC) que codificaba un antígeno irrelevante (fragmento C de la toxina del tétanos) (Shi et al., 2001) y 10 pollos que no fueron expuestos a vectores de Ad5.

15 El D31, los pollos de control e inmunizados fueron sensibilizados con el virus de la IA H5N1 aviar A/Swan/Mongolia/244L/2005 (la HA de esta cepa de sensibilización tiene una similitud de la secuencia de aminoácidos de HA deducida de 89% con la HA de la cepa A/Turkey/Wisconsin/68). Como se muestra en la Fig. 6, la inmunización *in ovo* indujo anticuerpos dentro de un intervalo de 1 y 6  $\log_2$  el D25. Ninguna de las aves no vacunadas (10/10) e inmunizadas con AdCMV-tetC (10/10) produjo anticuerpos IH medibles y todas murieron a causa de la IA en el plazo de 9 días después de la sensibilización, mientras que 68% (21/31) de las aves vacunadas con AdTW68.H5 sobrevivieron sin signos clínicos 10 días después de la sensibilización (Fig. 7). Notablemente, 7

20 Es probable que la tasa de supervivencia contra este virus de IA H5N1 se pueda mejorar mediante vacunación *in ovo* con un vector de Ad5 que codifique una HA con una antigenicidad más próxima.

25 Estos resultados demuestran que los pollos inmunizados *in ovo* con un vector de Ad5 humano libre de RCA que codifica HA H5 aviar podría provocar inmunidad protectora contra los virus HPAI. Habiendo descrito de este modo en detalle las realizaciones preferidas de la presente invención, se debe entender que la invención definida por las reivindicaciones adjuntas no debe ser limitada por los detalles particulares expuestos en la descripción anterior ya que son posibles muchas variaciones evidentes de la misma sin apartarse del espíritu o alcance de la misma.

REFERENCIAS

1. Ahmad, L., Kleven, S.H., Avakian, A.P., y Glisson, J.R. (1988) Sensitivity and specificity of *Mycoplasma gallisepticum* agglutination antigens prepared from medium with artificial liposomes substituting for serum. *Avian Dis.* 32, 519-26.
- 5 2. Al-Mariri, A., Tibor, A., Mertens, P., De Bolle, X., Michel, P., Godefroid, J., Walravens, K., y Letesson, J.J. (2001) Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun.* 69, 4816-22.
3. Alexander, D.J., Lister, S.A., Johnson, M.J., Randall, C.J., y Thomas, P.J. (1993). An outbreak of highly pathogenic avian influenza in turkeys in Great Britain in 1991. *Vet. Rec.* 132, 535-536.
- 10 4. Alexander DJ. (1990) Avian Paramyxoviridae-recent developments. *Vet Microbiol.* 23, 103-14.
5. Alexander, DJ., Parsons, G., y Manvell, R.J. (1986) Experimental assessment of the pathogenicity of eight avian influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quail. *Avian Pathol.* 15, 647-662.
6. Ali, H.A., Sawada, T., y Noda K. (2004) Protectivity of an immunoaffinity-purified 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* in mice *J. Vet. Med. Sci.* 66, 1603-4.
- 15 7. Arnold, JJ., Ahsan, F., Meezan, E., y Pillion, DJ. (2004) Correlation of tetradecylmaltoside induced increases in nasal peptide drug delivery with morphological changes in nasal epithelial cells. *J. Pharm. Sci.* 93, 2205-13.
8. Baert, K., Duchateau, L., De Boever, S., Cherlet, M., y De Backer, P. (2005) Antipyretic effect of oral sodium salicylate after an intravenous *E. coli* LPS injection in broiler chickens. *Br Poult Sci.* 46, 137-43.
- 20 9. Barbour, E.K., Newman, J.A., Sasipreeyajan, J., Caputa, A.C., y Muneer, M.A. (1989) Identification of the antigenic components of the virulent *Mycoplasma gallisepticum* (R) in chickens: their role in differentiation from the vaccine strain (F). *Vet Immunol Immunopathol.* 21, 197-206.
10. Baserga, R., y Denhardt, D.T. (eds.)(1992), *Antisense Strategies*, Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 600, New York Academy of Sciences, New York, NY.
- 25 11. Bashiruddin, J.B., Gould, A.R., y Westbury, H. A. (1992) Molecular pathotyping of two avian influenza viruses isolated during the Victoria 1976 outbreak. *Aust. Vet. J.* 69, 140-142.
12. Bean, W.J., Cox, N.J., y Kendal, A.P. (1980) Recombination of human influenza A viruses in nature. *Nature* 284, 638-640.
13. Beard, C. W., Schnitzlein, W. M., y Tripathy, D. N. (1992). Effect of route of administration on the efficacy of a recombinant fowlpox virus against H5N2 avian influenza. *Avian Dis* 36, 1052-1055.
- 30 14. Behr, J.P. (1994) Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjug Chem.* 5, 382-9.
15. Belli, S.I., Lee, M., Thebo, P., Wallach, M.G., Schwartzburd, B., y Smith, N.C. (2002) Biochemical characterisation of the 56 and 82 kDa immunodominant gametocyte antigens from *Eimeria maxima*, *Int J Parasitol.* 32, 805-16.
- 35 16. Ben Abdelmoumen, B., Roy, R.S., y Brousseau, R. (1999) Cloning of *Mycoplasma synoviae* genes encoding specific antigens and their use as species-specific DNA probes. *J Vet Diagn Invest.* 11, 162-9.
17. Berk, A.J. (1986) Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Annu Rev Genet.* 20, 45-79.
18. Bieth, E., y Darlix, J. L. (1992) Complete nucleotide sequence of a highly infectious avian leukosis virus. *Nucleic Acids Res.* 20, 367.

19. Bigland, C.H., y Matsumoto, J.J. (1975) Nonspecific reactions to Mycoplasma antigens caused in turkeys sera by *Erysipelothrix insidiosus* bacterin. *Avian Dis.* 19, 617-21.
20. Borgan, M.A., Mori, Y., Ito, N., Sugiyama, M., y Minamoto, N. (2003) Antigenic analysis of nonstructural protein (NSP) 4 of group A avian rotavirus strain PO-13. *Microbiol Immunol.* 47, 661-8.
- 5 21. Bovarnick, M.R., Miller, J.C., y Snyder, J.C. (1950) The influence of certain salts, amino acids, sugars, and proteins on the stability of rickettsiae. *J Bacteriol.* 59, 509-22.
22. Brody, S.L., y Crystal, R.G. (1994) Adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Ann N Y Acad Sci.* 716, 90-101; discussion 101-3.
- 10 23. Bruno vskis, P., y Velicer, L.F. (1995) The Marek's disease virus (MDV) unique short region: alphaherpesvirus-homologous, fowlpox virus-homologous, and MDV- specific genes. *Virology* 206, 324-38.
24. Bunikis, J., Luke, C.J., Bunikiene, E., Bergstrom, S., y Barbour, A.G. (1998) A surface-exposed region of a novel outer membrane protein (P66) of *Borrelia* spp. is variable in size and sequence. *J Bacteriol.* 180, 1618-23.
25. Cao, Y.C., Yeung, W.S., Law, M., Bi, Y.Z., Leung, F.C., y Lim, B.L. (1998) Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. *Avian Dis.* 42, 340-51.
- 15 26. Casais, R., Dove, B., Cavanagh, D., y Britton, P. (2003) Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J Virol.* 77, 9084-9.
27. Chambers, T. M., Kawaoka, Y., y Webster, R. G. (1988). Protection of chickens from lethal influenza infection by vaccinia-expressed hemagglutinin. *Virology* 167, 414-421.
- 20 28. Chiocca, S., Kurzbauer, R., Schaffner, G., Baker, A., Mautner, V., y Gotten, M. (1996). The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO. *J Virol* 70, 2939-2949.
29. Claas, E.J., Osterhaus, A.E., Van Beek, R., De Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Senne, D. A., Krauss, S., Shortridge, K.F., y Webster, R. G. (1998) Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus *Lancet* 351, 412-411.
- 25 30. Constantinoiu, CC, Lillehoj, H.S., Matsubayashi, M., Tani, H., Matsuda, H., Sasai, K., Baba, E. (2004) Characterization of stage-specific and cross-reactive antigens from *Eimeria acervulina* by chicken monoclonal antibodies. *J Vet Med Sci.* 66, 403-8.
31. Cook, J.K. (2000) Avian rhinotracheitis. *Rev Sci Tech.* 19, 602-13.
32. Crawford, J., Wilkinson, B., Vosnesensky, A., Smith, G., Garcia, M., Stone, H., y Perdue, M. L. (1999) Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine* 17, 2265-2274.
- 30 33. Crawford, J. M., Garcia, M., Stone, H., Swayne, D., Slemmons, R., y Perdue, M. L. (1998). Molecular characterization of the hemagglutinin gene and oral immunization with a waterfowl-origin avian influenza virus. *Avian Dis* 42, 486-496.
34. Crook, S. y Lebleu, B. (eds.)(1993) *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- 35 35. Cross, G.M. (1987) The status of avian influenza in poultry in Australia, p. 96-103.. In *Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza*.
36. Coussens, P.M., y Velicer, L.F. (1988) Structure and complete nucleotide sequence of the Marek's disease herpesvirus gp57-65 gene. *J Virol.* 62, 2373-9.
- 40 37. Cova, L., Dufлот, A., Prave, M., y Trepo, C (1993) Duck hepatitis B virus infection, aflatoxin B1 and liver cancer in ducks. *Arch Virol Suppl.* 8, 81-7.

38. Curiel, D. T. (1994). High-efficiency gene transfer employing adenovirus-polylysine-DNA complexes. *Nat Immun* 13, 141-164.
39. Ding, X., Lillehoj, H.S., Quiroz, M.A., Bevenssee, E., y Lillehoj, E.P. (2004) Protective immunity against *Eimeria acervulina* following in ovo immunization with a recombinant subunit vaccine and cytokine genes. *Infect Immun*. 72, 6939-44.
40. Djeraba, A., Musset, E., Lowenthal, J.W., Boyle, D.B., Chausse, A.M., Peloille, M., y Quere, P. (2002) Protective effect of avian myelomonocytic growth factor in infection with Marek's disease virus. *J Virol*. 76, 1062-70.
41. Dormitorio, T. V., Giambone, J.J., y Duck, L. W. (1997) Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates. *Avian Dis*. 41, 36-44.
42. Dornburg, R. (1995) Reticuloendotheliosis viruses and derived vectors. *Gene Ther*. 2, 301-10.
43. Easterday, B.C., Hinshaw, V.S., y Halvorson, D. A. (1997) Influenza, p. 583-605. In B.W. Calnek, HJ. Barnes, CW. Beard, L.R. McDougald, y Y.M. Saif (eds), *Diseases of Poultry*. Iowa State University Press, Ames.
44. Eckroade, R.J. y Bachin, L.A.S. (1987) Avian influenza in Pennsylvania: the beginning, p. 22-32. In *Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza*.
45. Eckstein, F. (eds.) (1992) *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, NY.
46. Evans, R. K., Nawrocki, K.K., Isopi, L.A., Williams, D.M., Casimiro, D.R., Chin, S., Chen, M., Zhu, D.M., Shiver, J.W., Volkin, D.B. (2004) Development of stable liquid formulations for adenovirus-based vaccines. *J. Pharm. Sci*. 93, 2458-2475.
47. Fields, B.N., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E., y Knipe, D.M. (eds)(2001) *Fields - Virology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia, PA.
48. Francois, A., Chevalier, C, Delmas, B., Etteradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G., y Langlois, P. (2004). Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine* 22, 2351-2360.
49. Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C, y Robinson, H. L. (1993). DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11478-11482.
50. Gao, W., Soloff, A.C. y Lu, X. et al., (2006) Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. *J. Virol*. 80, 1959.
51. Garcia, M., Crawford, J.M., Latimer, J.W., Rivera-Cruz, E., y Perdue, M.L. (1996) Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J. Gen Virol*. 77, 1493-1504.
52. Garcia, A. Johnson, H., Srivastava, D.K., Jayawardene, D.A., Wehr, D.R., Webster, R.G., (1998) Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/Chicken/Queretaro/19/95 infection. *Avian Dis*. 42, 248.
53. Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D.E., Durbin, J.E., Palese, P., y Muster, T. (1998) Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252, 324-330.
54. Gildersleeve, R.P., (1993) In ovo technology update. *Zootec. Int*. 73-77.
55. Gildersleeve, R.P., Hoyle, C.M., Miles, A.M., Murray, D.L., Ricks, C.A., Secret, M.N., Williams, C.J., y Womack, C.L. (1993) Developmental performance of an egg injection machine for administration of Marek's disease vaccine. *J. Appl. Poult. Res*. 2, 337-346.

56. Gorman, L., Suter, D., Emerick, V., Schumperli, D., y Kole, R. (1998) Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 4929-34.
57. Gottschalk, A. (1957) The specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*. *Biochim. Biophys. Acta* 23, 645-646.
- 5 58. Graf, T., y Beug, H. (1978) Avian leukemia viruses: interaction with their target cells in vivo and in vitro. *Biochim Biophys Acta* 516, 269-99.
59. Graf, T., y Beug, H. (1983) Role of the v-erbA and v-erbB oncogenes of avian erythroblastosis virus in erythroid cell transformation. *Cell*. 34, 7-9.
60. Graham, F. L., y Prevec, L. (1995). Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol* 3, 207-220.
- 10 61. Grim, K.C., McCutchan, T., Li, J., Sullivan, M., Graczyk, T.K., McConkey, G., y Cranfield, M. (2004) Preliminary results of an anticircumsporozoite DNA vaccine trial for protection against avian malaria in captive African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *J Zoo Wildl Med*. 35, 154-61.
62. Guo, Z.S., Wang, L.H., Eisensmith, R.C., y Woo, S.L. (1996) Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression in vivo following adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther*. 3, 802-10.
- 15 63. Havenga, MJ., Lemckert, A.A., Grimbergen, J.M., Vogels, R., Huisman, L.G., Valerio, D., Bout, A., y Quax, P.H. (2001) Improved adenovirus vectors for infection of cardiovascular tissues. *J Virol*. 75, 3335-42.
64. Havenga, MJ., Lemckert, A.A., Ophorst, OJ., van Meijer, M., Germeraad, W.T., Grimbergen, J., van Den Doel, M.A., Vogels, R., van Deutekom, J., Janson, A.A., de Bruijn, J.D., Uytdehaag, F., Quax, P.H., Logtenberg, T., Mehtali, M., y Bout, A. (2002) Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol*. 76, 4612-20.
- 20 65. He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J, Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenovirus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 95, 2509 (1998).
66. He, T. C, Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., y Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2509-2514.
- 25 67. Heine, H.G., Haritou, M., Failla, P., Fahey, K., y Azad, A. (1991) Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. *J Gen Virol*. 72, 1835-43.
68. Higgins, D.A., Henry, R.R., y Kounev, Z. V. (2000) Duck immune responses to *Riemerella anatipestifer* vaccines. *Dev Comp Immunol*. 24, 153-67.
- 30 69. Hilleman, M. R. (2002). Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 20, 3068-3087.
70. Hinshaw, V.S., Bean, WJ., Webster, R.G., y Sriram, G. (1980) Genetic reassortment of influenza A viruses in the intestinal tract of ducks. *Virology* 102, 412-419.
71. Hilton, L.S., Bean, A.G., Kimpton, W.G., y Lowenthal, J.W. (2002) Interleukin-2 directly induces activation and proliferation of chicken T cells in vivo. *J Interferon Cytokine Res*. 22, 755-63.
- 35 72. Hirst, G.K. (1941) Agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science* 94, 22-23.
73. Horimoto, T., Rivera, E., Pearson, J., Senne, D., Krauss, S., Kawaoka, Y., y Webster, R. G. (1995) Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology* 213, 223-230.
- 40

74. Israeli, E., Shaffer, B.T., y Lighthart, B. (1993) Protection of freeze-dried *Escherichia coli* by trehalose upon exposure to environmental conditions. *Cryobiology* 30, 519-23.
75. Ito A. Gotanda, T., Kobayashi, S., Kume, K., Sugimoto, C, y Matsumura, T. (2005) Increase of antibody titer against *Leucocytozoon caulleryi* by oral administration of recombinant R7 antigen. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 211-3.
- 5 76. Jan, G., Le Henaff, M., Fontenelle, C, y Wroblewski, H. (2001) Biochemical and antigenic characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* membrane proteins P52 and P67 (pMGA). *Arch Microbiol.* 177, 81-90.
77. Jochemsen, A.G., Peltenburg, L.T., te Pas, M.F., de Wit, CM., Bos, J.L., y van der Eb, AJ. (1987) Activation of adenovirus 5 E1A transcription by region E1B in transformed primary rat cells. *EMBO J.* 6, 3399-405.
- 10 78. Johnson, D. C, Maxfield, B. G., y Moulthrop, J.I. (1976) Epidemiologic studies of the 1975 avian influenza outbreak in chickens in Alabama. *Avian Dis.* 21, 167-177.
79. Johnston, P. A., Liu, H., O'Connell, T., Phelps, P., Bland, M., Tyczkowski, J., Kemper, A., Harding, T., Avakian, A., Haddad, E., et al. (1997). Applications in in ovo technology. *Poult Sci* 76, 165-178.
- 15 80. Joliot, V., Boroughs, K., Lasserre, F., Crochet, J., Dambrine, G., Smith, R.E., y Perbal, B. (1993) Pathogenic potential of myeloblastosis-associated virus: implication of env proteins for osteopetrosis induction. *Virology* 195, 812-9.
81. Kaleta, E.F. (1990) Herpesviruses of birds- a review. *Avian Pathol.* 10, 193-211.
82. Kapczynski, D. R., Hilt, D. A., Shapiro, D., Sellers, H. S., y Jackwood, M. W. (2003). Protection of chickens from infectious bronchitis by in ovo and intramuscular vaccination with a DNA vaccine expressing the S1 glycoprotein. *Avian Dis* 47, 272- 285.
- 20 83. Karaca, K., Sharma, J.M., Winslow, BJ., Junker, D.E., Reddy, S., Cochran, M., y McMillen, J. (1998) Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following in ovo or post-hatch administration of recombinant viruses. *Vaccine.* 16, 1496-503.
- 25 84. Karim, M. J., Basak, S. C, y Trees, AJ. (1996) Characterization and immunoprotective properties of a monoclonal antibody against the major oocyst wall protein of *Eimeria tenella*. *Infect Immun.* 64, 1227-32.
85. Kariyawasam, S., Wilkie, B.N., Hunter, D.B., y Gyles, CL. (2002) Systemic and mucosal antibody responses to selected cell surface antigens of avian pathogenic *Escherichia coli* in experimentally infected chickens. *Avian Dis.* 46, 668-78.
- 30 86. Kasten, R.W., Hansen, L.M., Hinojoza, J., Bieber, D., Ruehl, W.W., y Hirsh, D.C. (1995) *Pasteurella multocida* produces a protein with homology to the P6 outer membrane protein of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.* 63, 989-93.
87. Kawai, S., Goto, N., Kataoka, K., Saegusa, T., Shinno-Kohno, H., y Nishizawa, M. (1992) Isolation of the avian transforming retrovirus, AS42, carrying the v-maf oncogene and initial characterization of its gene product. *Virology* 188, 778-84.
- 35 88. Kawaoka, Y., Nestorowicz, A., Alexander, DJ., y Webster, R.G. (1987) Molecular analyses of the hemagglutinin genes of H5 influenza viruses: origin of a virulent turkey strain. *Virology* 158, 218-227.
89. Kawaoka, Y., Krauss, S., y Webster, R. G. (1989). Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 63, 4603-4608.
- 40 90. Kida, H., Yanagawa, R., y Matsuoka, Y. (1980) Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infect. Immun.* 30, 547-553.
91. Kobayashi, Y., Horimoto, T., Kawaoka, Y., Alexander, D.J., y Itakura, C. (1996) Pathological studies of chickens experimentally infected with two highly pathogenic avian influenza strains. *Avian Pathol.* 25, 285-304.

92. Konz, J. O. et al. (2005) Serotype specificity of adenovirus purification using anion-exchange chromatography. *Hum. Gene Ther.* 16, 1346-1353.
93. Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-292.
- 5 94. Lamb, R.A. y Krug, R.M. (1996) Orthomyxoviruses: the viruses and their replication, p. 1353-1395. In B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3 ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
95. Langer, R.C., Li, F., y Vinetz, J.M. Identification of novel *Plasmodium gallinaceum* zygote- and ookinete-expressed proteins as targets for blocking malaria transmission. *Infect Immun.* 70, 102-6.
- 10 96. Lee, C. W., Senne, D. A., y Suarez, D. L. (2004). Generation of reassortant influenza vaccines by reverse genetics that allows utilization of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy for the control of avian influenza. *Vaccine* 22, 3175-3181.
97. Lewis, J. A., Brown, E. L. & Duncan, P. A. (2006) Approaches to the release of a master cell bank of PER.C6 cells; a novel cell substrate for the manufacture of human vaccines. *Dev. Biol. (Basel)* 123, 165-176.
- 15 98. Li, W., Watarai, S., Iwasaki, T., y Kodama, H. (2004) Suppression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis excretion by intraocular vaccination with fimbriae proteins incorporated in liposomes. *Dev Comp Immunol.* 28, 29-38.
99. Lillehoj, H.S., Ding, X., Quiroz, M.A., Bevensee, E., y Lillehoj, E.P. (2005) Resistance to intestinal coccidiosis following DNA immunization with the cloned 3- IE *Eimeria* gene plus IL-2, IL-15, and IFN-gamma. *Avian Dis.* 49, 112-7.
- 20 100. Marconi, R.T., Samuels, D.S., Schwan, T.G., y Garon, CF. (1993) Identification of a protein in several *Borrelia* species which is related to OspC of the Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol.* 31, 2577-83.
101. Mata, J.E., Joshi, S.S., Palen, B., Pirruccello, SJ., Jackson, J.D., Elias, N., Page, TJ. , Medlin, K.L., y Iversen, P. L. (1997) A hexameric phosphorothioate oligonucleotide telomerase inhibitor arrests growth of Burkitt's lymphoma cells in vitro and in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol.* 144, 189-97.
- 25 102. McEwan, N.R., y Gatherer, D. (1998) Adaptation of standard spreadsheet software for the analysis of DNA sequences. *Biotechniques* 24, 131-6, 138.
103. Milligan, J.F., Matteucci, M.D., y Martin, J.C. (1993) Current concepts in antisense drug design. *J Med Chem.* 36, 1923-37.
104. Mills, C.K., y Gherna, R.L. (1988) Cryopreservation studies of *Campylobacter*. *Cryobiology* 25, 148-52.
- 30 105. Mo, I.P., Brugh, M., Fletcher, OJ., Rowland, G.N., y Swayne, D.E. (1997) Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. *Avian Dis.* 41, 125-136.
106. Mori, Y., Borgan, M.A., Takayama, M., Ito, N., Sugiyama, M., y Minamoto, N. (2003) Roles of outer capsid proteins as determinants of pathogenicity and host range restriction of avian rotaviruses in a suckling mouse model. *Virology* 316, 126-34.
- 35 107. Molinier-Frenkel, V., Lengagne, R., Gaden, F., Hong, S. S., Choppin, J., Gahery-Segard, H., Boulanger, P., y Guillet, J. G. (2002). Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response. *J Virol* 76, 127-135.
108. Murphy, B.R. y Webster, R.G. (1996) Orthomyxoviruses, p. 1397-1445. In B.N. Fields, D. M. Knipe, y P.M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
- 40 109. Nakamura, Y., Wada, K., Wada, Y., Doi, H., Kanaya, S., Gojobori, T., y Ikemura, T. (1996) Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases. *Nucleic Acids Res.* 24, 214-5.

110. Neckameyer, W.S., y Wang, L.H. (1985) Nucleotide sequence of avian sarcoma virus UR2 and comparison of its transforming gene with other members of the tyrosine protein kinase oncogene family. *J Virol.* 53, 879-84.
- 5 111. Nestorowicz, A., Kawaoka, Y., Bean, W.J., y Webster, R.G., (1987) Molecular analysis of the hemagglutinin genes of Australian H7N7 influenza viruses: role of passerine birds in maintenance or transmission? *Virology* 160, 411-418.
112. Noormohammadi, A.H., Browning, G.F., Cowling, P.J., O'Rourke, D., Whithear, K.G., y Markham, P.F. (2002a) Detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* vaccine ts-11 by an autologous pMGA enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 46,405-11.
- 10 113. Noormohammadi, A.H., Browning, G.F., Jones, J., y Whithear, K.G. (2002b) Improved detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* vaccine MS-H using an autologous recombinant MSPB enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Pathol.* 31, 611-7.
114. Normile, D. (2004). Influenza: girding for disaster. Vaccinating birds may help to curtail virus's spread. *Science* 306, 398-399.
- 15 115. O'Neill, R.E., Talon, J., y Palese, P. (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* 17, 288- 296.
116. Ochoa-Reparaz, J., Sesma, B., Alvarez, M., Jesus Renedo, M., Irache, J.M., y Gamazo, C. (2004) Humoral immune response in hens naturally infected with *Salmonella* Enteritidis against outer membrane proteins and other surface structural antigens. *Vet Res.* 35, 291-8.
- 20 117. Oshop, G. L., Elankumaran, S., y Heckert, R. A. (2002). DNA vaccination in the avian. *Vet Immunol Immunopathol* 89, 1-12.
118. Oshop, G. L., Elankumaran, S., Valcharia, V. N., y Heckert, R. A. (2003). In ovo delivery of DNA to the avian embryo. *Vaccine* 21, 1275-1281.
119. Paulson, J.C. (1985) Interactions of animal viruses with cell surface receptors, p. 131-219. In M. Connor (ed.), *The receptors*. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.
- 25 120. Perbal, B. (1995) Pathogenic potential of myeloblastosis-associated viruses. *Infect Agents Dis.* 4, 212-27.
121. Perdue, M.L., Garcia, M., y Senne, D. (1997) Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res.* 49, 173-186.
122. Petropoulos, C.J., Appendix 2: Retroviral Taxonomy, protein structure, sequences, and genetic maps. In: Coffin, J.M. (Ed.); *RETROVIRUSES*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York USA (1997).
- 30 123. Pinto, L.H., Holsinger, L.J., y Lamb, R.A. (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69, 517-528.
124. Pitcovski, J., Mualem, M., Rei-Koren, Z., Krispel, S., Shmueli, E., Peretz, Y., Gutter, B., Gajili, G.E., Michael, A., y Goldberg, D. (1998) The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus. *Virology* 249, 307-15.
- 35 125. Pogonka, T., Klotz, C, Kovacs, F., y Lucius, R. (2003) A single dose of recombinant *Salmonella typhimurium* induces specific humoral immune responses against heterologous *Eimeria tenella* antigens in chicken. *Int J Parasitol.* 33, 81-8.
126. Purchase, H.G., y Witter, R.L. (1975) The reticuloendotheliosis viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 71, 103-24.
- 40 127. Rajakumar, A., Swierkosz, E. M., y Schulze, I. T. (1990). Sequence of an influenza virus hemagglutinin determined directly from a clinical sample. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4154-4158.

128. Regelson, W., Kuhar, S., Tunis, M., Fields, J., Johnson, J., Gluesenkamp, E. (1960) Synthetic polyelectrolytes as tumour inhibitors. *Nature*. 186, 778-80.
129. Richardson, J.C, y Akkina, R.K. (1991) NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch. Virol.* 116, 69-80.
- 5 130. Rimler, R.B. (2001) Purification of a cross-protective antigen from *Pasteurella multocida* grown in vitro and in vivo. *Avian Dis.* 45, 572-80.
131. Roberts, B.E., Miller, J.S., Kimelman, D., Cepko, C. L., Lemischka, I.R., y Mulligan, R.C. (1985) Individual adenovirus type 5 early region IA gene products elicit distinct alterations of cellular morphology and gene expression. *J Virol.* 56, 404- 13.
- 10 132. Rohm, C, Suss, J., Pohle, V., y Webster, R. G. (1996a) Different hemagglutinin cleavage site variants of H7N7 in an influenza outbreak in chickens in Leipzig, Germany. *Virology* 218, 253-257.
133. Rohm, C, Zhou, N.A., Suss, J., Mackenzie, J., y Webster, R.G. (1996b) Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H1 5: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 217, 508-516.
- 15 134. Roland, K., Karaca, K., y Sizemore, D. (2004) Expression of *Escherichia coli* antigens in *Salmonella typhimurium* as a vaccine to prevent airsacculitis in chickens. *Avian Dis.* 48, 595-605.
135. Rosenberger, J.K., y Cloud, S. S. (1998) Chicken anemia virus. *Poult Sci.* 77, 1190-2.
136. Ross, L.J., Sanderson, M., Scott, S.D., Binns, M.M., Doel, T., y Milne, B. (1989) Nucleotide sequence and characterization of the Marek's disease virus homologue of glycoprotein B of herpes simplex virus. *J Gen Virol.* 70, 1789-804.
- 20 137. Ross, L.J. , y Binns, M.M. (1991) Properties and evolutionary relationships of the Marek's disease virus homologues of protein kinase, glycoprotein D and glycoprotein I of herpes simplex virus. *J Gen Virol.* 72, 939-47.
138. Rott, O., Kroger, M., Muller, H., y Hobom, G. (1988) The genome of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus. *Virology* 165, 74-86.
139. Rovigatti, U.G., y Astrin, S.M. (1983) Avian endogenous viral genes. *Curr Top Microbiol Immunol.* 103, 1-21.
- 25 140. Saito, S., Fujisawa, A., Ohkawa, S., Nishimura, N., Abe, T., Kodama, K., Kamogawa, K., Aoyama, S., Iritani, Y., y Hayashi, Y. (1993) Cloning and DNA sequence of a 29 kilodalton polypeptide gene of *Mycoplasma gallisepticum* as a possible protective antigen. *Vaccine* 11, 1061-6.
141. Sambri, V., Marangoni, A., Olmo, A., Storni, E., Montagnani, M., Fabbi, M., y Cevenini, R. (1999) Specific antibodies reactive with the 22-kilodalton major outer surface protein of *Borrelia anserina* Ni-NL protect chicks from infection. *Infect Immun.* 67,2633-7.
- 30 142. Sambrook, J., Russell, D.W., y Sambrook, J. (2001) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
143. Samstag, W., Eisenhardt, S., Offensperger, W.B., y Engels, J.W. (1996) Synthesis and properties of new antisense oligodeoxynucleotides containing benzylphosphonate linkages. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6, 153-6.
- 35 144. Schaap, D., Arts, G., Kroeze, J., Niessen, R., Roosmalen-Vos, S. V., Spreeuwenberg, K., Kuiper, CM., Beek-Verhoeven, N.V., Kok, JJ., Knegtel, R.M., y Vermeulen, A.N. (2004) An *Eimeria* vaccine candidate appears to be lactate dehydrogenase; characterization and comparative analysis. *Parasitology.* 128, 603-16.
145. Schijns, V.E., Weining, K.C., Nuijten, P., Rijke, E.O., y Staeheli, P. (2000) Immunoadjuvant activities of *E. coli*- and plasmid-expressed recombinant chicken IFN- $\alpha$ 'eta, IFN- $\gamma$  and IL-1 $\beta$  in 1-day- and 3-week-old chickens. *Vaccine.* 18, 2147-54.
- 40

146. Schultz-Cherry, S., Dybing, J. K., Davis, N. L., Williamson, C., Suarez, D. L., Johnston, R., y Perdue, M. L. (2000). Influenza virus (A/HK/156/97) hemagglutinin expressed by an alphavirus replicon system protects chickens against lethal infection with Hong Kong-origin H5N1 viruses. *Virology* 278, 55-59.
- 5 147. Seal, B. S. (2000) Avian pneumoviruses and emergence of a new type in the United States of America. *Anim Health Res Rev.* 1, 67-72.
148. Senne, D.A., in *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens* Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E., Reed, W.M., Eds. (American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, 1998) pág. 235-240.
- 10 149. Sharma, J.M. (1985) Embryo vaccination with infectious bursal disease virus alone or in combination with Marek's disease vaccine. *Avian Dis.* 27, 134-139.
150. Sharma, J.M. y Burmester, B.R. (1982) Resistance of Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. *Avian Dis.* 26, 134-139.
151. Shi, Z., Zeng, M., Yang, G., Siegel, F., Cain, L. J., van Kampen, K., Elmets, C.A., y Tang, D. C. Protection against tetanus by needle- free inoculation of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous vaccines. *J. Virol.* 75, 11474 (2001).
- 15 152. Spackman, E., Senne, D. A., Myers, T. J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., Suarez, D. L. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3256 (2002).
153. Spandidos, D.A., y Graham, A.F. (1976) Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J Virol.* 19, 968-76.
- 20 154. Strauss-Soukup, JX, Vaghefi, M.M., Hogrefe, R.I., Maher, L.J., 3rd. (1997) Effects of neutralization pattern and stereochemistry on DNA bending by methylphosphonate substitutions. *Biochemistry.* 36, 8692-8.
155. Suarez D.L., Perdue, M.K., Cox, N., Rowe, T., Bender, C, Huang, J., y Swayne, D. E. (1998) Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J. Virol.* 72, 6678-6688.
- 25 156. Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C, Huang, J., et al. (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279, 393-396.
157. Swayne, D.E., Perdue, MX., Garcia, M., Rivera-Cruz, E., y Brugh, M. (1997) Pathogenicity and diagnosis of H5N2 Mexican avian influenza viruses in chickens. *Avian Dis.* 41, 335-346.
- 30 158. Swayne, D. E. (2003). Vaccines for List A poultry diseases: emphasis on avian influenza. *Dev Biol (Basel)* 114, 201-212.
159. Swayne, D.E., Senne, D. A. y Beard., C.W., in *A laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens* D. E. Swayne, J. R. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson, y W. M. Reed, Eds. (American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, 1998) pág. 150-155.
- 35 160. Tajima, O., Onaga, H., and Nakamura, T. (2003) An enzyme-linked immunosorbent assay with the recombinant merozoite protein as antigen for detection of antibodies to *Eimeria necatrix*. *Avian Dis.* 47, 309-18.
161. Tan, P. K., Michou, A. L, Bergelson, J. M., y Cotten, M. (2001). Defining CAR as a cellular receptor for the avian adenovirus CELO using a genetic analysis of the two viral fibre proteins. *J Gen Virol* 82, 1465-1472.
- 40 162. Telling, G.C., Perera, S., Szatkowski-Ozers, M., y Williams, J. (1994) Absence of an essential regulatory influence of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein on viral growth and early gene expression in human diploid WI38, HeLa, and A549 cells. *J Virol.* 68,541-7.

163. Thayer, S. G. y Beard, C.W., in A laboratory Manual for the Isolation and Identification of avian pathogens D. E. Swayne, J. R. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson, y W. M. Reed, Eds. (American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, 1998) pág. 255-266.
- 5 164. Timoney, J.F., y Groschup, M.M. (1993) Properties of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet Microbiol.* 37, 381-7.
165. Tollis, M., y Di Trani, L. (2002). Recent developments in avian influenza research: epidemiology and immunoprophylaxis. *Vet J* 164, 202-215.
166. Tooze, J. (1980) DNA Tumor Viruses (Part 2): Molecular Biology of Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 10 167. Tsvetkov, T., y Brankova, R. (1983) Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology* 20,318-23.
168. Ungchusak, K., Auewarakul, P., Dowell, S. F., Kitphati, R., Auwanit, W., Puthavathana, P., Uiprasertkul, M., Boonnak, K., Pittayawonganon, C, Cox, N. J., et al. (2005). Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med* 352, 333-340.
- 15 169. Van Kampen, K.R., Shi, Z., Gao, P., Zhang, J., Foster, K. W., Chen, D. T., Marks, D., Elmets, C. A., y Tang, D. C. (2005). Safety and immunogenicity of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous influenza vaccines in humans. *Vaccine* 23, 1029-1036.
170. Vanrompay, D., Cox, E., Volckaert, G., y Goddeeris, B. (1999) Turkeys are protected from infection with *Chlamydia psittaci* by plasmid DNA vaccination against the major outer membrane protein. *Clin Exp Immunol.* 118, 49-55.
- 20 171. Veits, J., Mettenleiter, T.C., y Fuchs, W. (2003) Five unique open reading frames of infectious laryngotracheitis virus are expressed during infection but are dispensable for virus replication in cell culture. *J Gen Virol.* 84, 1415-25.
172. Wakenell, P. S., Bryan, T., Schaeffer, J., Avakian, A., Williams, C, y Whitfill, C. (2002). Effect of in ovo vaccine delivery route on herpesvirus of turkeys/SB- 1 efficacy and viremia. *Avian Dis* 46, 274-280.
- 25 173. Wang, T.T., Cheng, W.C., y Lee, B.H. (1998) A simple program to calculate codon bias index. *Mol Biotechnol.* 10, 103-6.
174. Ward, A.C., Castelli, L.A., Lucantoni, A.C., White, J.F., Azad, A. A., y Macreadie, LG. (1995) Expression and analysis of the NS2 protein of influenza A virus. *Arch. Virol.* 140, 2067-2073.
- 30 175. Webby, R. J., Perez, D. R., Coleman, J. S., Guan, Y., Knight, J. H., Govorkova, E. A., McClain-Moss, L. R., Peiris, J. S., Rehg, J. E., Tuomanen, E. L, y Webster, R. G. (2004). Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet* 363, 1099-1103.
176. Webster, R.G., y Laver, W.G. (1975) Antigenic variation of influenza viruses, P. 270-314. In E.D. Kilbourne (ed.), *The influenza viruses and influenza*. Academic Press, Inc., New York, NY.
- 35 177. Webster, R.G., Yakhno, M.A., Hinshaw, V.S., Bean, WJ., y Murti, K.G. (1978) Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84, 268-278.
178. Webster, R.G., Laver, W.G., Air, G.M., y Schild, G.C. (1982) Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature* 296, 115-121.
179. Webster, R.G., y Kawaoka, Y. (1988) Avian influenza. *Crit. Rev. Poult. Biol.* 1, 211-246.
- 40 180. Webster, R.G., Reay, P. A., y Laver, W.G. (1998) Protection against lethal influenza with neuraminidase. *Virology* 164, 230-237.

181. White, E., Denton, A., y Stillman, B. (1988) Role of the adenovirus E1B 19,000-dalton tumor antigen in regulating early gene expression. *J Virol.* 62, 3445-54.
182. Widders, P.R., Thomas, L.M., Long, K. A., Tokhi, M. A., Panaccio, M., y Apos, E. (1998) The specificity of antibody in chickens immunised to reduce intestinal colonisation with *Campylobacter jejuni*. *Vet Microbiol.* 64, 39-50.
- 5 183. Wolff, E., Delisle, B., Corrieu, G., y Gibert, H. (1990) Freeze-drying of *Streptococcus thermophilus*: a comparison between the vacuum and the atmospheric method. *Cryobiology* 27, 569-75.
184. Wood, G.W., McCauley, J.W., Bashiruddin, J.B., y Alexander, DJ. (1993) Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch. Virol.* 130, 209-217.
- 10 185. Wood, G. W., Banks, J., McCauley, J.W., y Alexander, DJ. (1994) Deduced amino acid sequences of the haemagglutinin of H5N1 avian influenza vims isolates from an outbreak in turkeys in Norfolk, England. *Arch. Virol.* 134, 185-194.
186. Wood, J. M., Major, D., Newman, R. W., Dunleavy, U., Nicolson, C, Robertson, J. S., y Schild, G. C. (2002). Preparation of vaccines against H5N1 influenza. *Vaccine* 20, S84-587.
- 15 187. Wu, S.Q., Wang, M., Liu, Q., Zhu, Y.J., Suo, X., y Jiang, J.S. (2004) Construction of DNA vaccines and their induced protective immunity against experimental *Eimeria tenella* infection. *Parasitol Res.* 94, 332-6.
188. Wyszynska, A., Raczko, A., Lis, M., y Jagusztyn-Krynicka, E.K. (2004) Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 *cjaA* gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine* 22, 1379-89.
- 20 189. Yamaguchi, T., Iritani, Y., y Hayashi, Y. (1988) Serological response of chickens either vaccinated or artificially infected with *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 32, 308-12.
190. Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T., y Ishihama, A., (1993) Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* 196,249-255.
191. York, JJ., Strom, A.D., Connick, T.E., McWaters, P.G., Boyle, D.B., y Lowenthal, J. W. (1996) In vivo effects of chicken myelomonocytic growth factor: delivery via a viral vector. *J Immunol.* 156, 2991-7.
- 25 192. Yoshida, S., Lee, L.F., Yanagida, N., y Nazerian, K. (1994) Identification and characterization of a Marek's disease virus gene homologous to glycoprotein L of herpes simplex virus. *Virology* 204, 414-9.
193. Young, J.F., y Palese, P. (1979) Evolution of human influenza A viruses in nature. Recombination contributes to genetic variation of HLN1 strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6547-6551.
- 30 194. Zebedeem S.L., y Lamb, R. A. (1988) Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J. Virol.* 62,2762-2772.
195. Zeng, M., Smith, S. K., Siegel, F., Shi, Z., Van Kampen, K. R., Elmets, C. A., y Tang, D. C. (2001). AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination. *Biotechniques* 31, 260-262.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Vaxin, Inc.  
 <120> Inmunización de aves por administración de vacunas con vectores no replicantes  
 <130> 858610-2011.1WO

10 <140> Pendiente de asignar  
 <141> 2006-08-15  
 <150> 60/708,524  
 <151> 2005-08-15

15 <160> 10  
 <170> PatentIn versión 3.2

20 <210> 1  
 <211> 1701  
 <212> DNA  
 <213> Virus de la gripe A

25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1701)  
 <220>  
 <221> característica miscelánea

30 <222> (1). (1701)  
 <223> Virus de la gripe A/Panamá/2007/1999(H3N2) gen de la hemaglutinina (HA) Banco de genes DQ508865

<400> 1  
 48 atg aag act atc att gct ttg agc tac att tta tgt ctg gtt ttc gct  
 Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ala  
 1 5 10 15

96 caa aaa ctt ccc gga aat gac aac agc acg gca acg ctg tgc ctg ggg  
 Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly  
 20 25 30

144 cac cat gca gtg tca aac gga acg cta gtg aaa aca atc acg aat gac  
 His His Ala Val Ser Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp  
 35 40 45

192 caa att gaa gtg act aat gct act gag ctg gtt cag agt tcc tca aca  
 Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr  
 50 55 60

240 ggt aga ata tgc gac agt cct cac caa atc ctt gat gga gaa aac tgc  
 Gly Arg Ile Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly Glu Asn Cys  
 65 70 75 80

35





ES 2 620 789 T3

Glu Arg Thr Lys Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn  
 465 470 475 480

1488 ggt tgt ttc aaa ata tac cac aaa tgt gac aat gcc tgc ata ggg tca  
 Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser  
 485 490 495

1536 atc aga aat gga act tat gac cat gat gta tac aga gac gaa gca tta  
 Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu  
 500 505 510

1584 aac aac cgg ttc cag atc aaa ggt gtt gag ctg aag tca gga tac aaa  
 Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys  
 515 520 525

1632 gat tgg atc cta tgg att tcc ttt gcc ata tca tgc ttt ttg ctt tgt  
 Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys  
 530 535 540

1680 gtt gtt ttg ctg ggg ttc atc atg tgg gcc tgc caa aaa ggc aac att  
 Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile  
 545 550 555 560

1701 agg tgc aac att tgc att tga  
 Arg Cys Asn Ile Cys Ile  
 565

<210> 2  
 <211> 566  
 5 <212> PRT  
 <213> Virus de la gripe A

<400> 2  
 Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ala  
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly  
 20 25 30

His His Ala Val Ser Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp  
 35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr  
 50 55 60

Gly Arg Ile Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly Glu Asn Cys  
 65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Gly Phe Gln



ES 2 620 789 T3

Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala  
 340 345 350

Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly  
 355 360 365

Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys  
 370 375 380

Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asn Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Leu  
 385 390 395 400

Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser  
 405 410 415

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr  
 420 425 430

Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu  
 435 440 445

Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe  
 450 455 460

Glu Arg Thr Lys Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn  
 465 470 475 480

Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser  
 485 490 495

Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu  
 500 505 510

Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys  
 515 520 525

Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys  
 530 535 540

Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile  
 545 550 555 560

Arg Cys Asn Ile Cys Ile  
 565

<210> 3  
 <211> 1647  
 <212> DNA  
 <213> Virus de la gripe A

ES 2 620 789 T3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1647)

5

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1647)  
 <223> Secuencia de nucleótidos de HA del virus de la gripe A/pavo/Wisconsin/68 Banco de genes: U79456.1

10

<400> 3

gac caa atc tgc atc ggt tat cat gca aac aat tca aca aaa caa gtt

48

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val  
 1 5 10 15

gac aca atc atg gag aag aat gtg acg gtc aca cat gct caa gat ata

96

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
 20 25 30

ctg gaa aaa gag cac aac ggg aaa ctc tgc agt ctc aaa gga gtg agg

144

Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg  
 35 40 45

ccc ctc att ctg aag gat tgc agt gtg gct gga tgg ctt ctt ggg aac

192

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn  
 50 55 60

cca atg tgt gat gag ttc cta aat gta ccg gaa tgg tca tat att gta

240

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val  
 65 70 75 80

gag aag gac aat cca acc aat ggc tta tgt tat ccg gga gac ttc aat

288

Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn  
 85 90 95

gat tat gaa gaa ctg aag tat tta atg agc aac aca aac cat ttt gag

336

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His Phe Glu  
 100 105 110

aaa att caa ata atc cct agg aac tct tgg tcc aat cat gat gcc tca

384

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser  
 115 120 125

tca gga gtg agc tca gca tgc cca tac aat ggt agg tct tcc ttt ttc

432

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe  
 130 135 140

ES 2 620 789 T3

480   agg agt gtg gtg tgg ttg atc aag aag agt aat gta tac cca aca ata  
       Arg Ser Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Val Tyr Pro Thr Ile  
       145                   150                   155                   160

528   aag agg acc tac aat aac acc aat gta gag gac ctt ctg ata ttg tgg  
       Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp  
       165                   170                   175

576   gga atc cat cac cct aat gat gca gcg gaa caa acg gaa ctc tat cag  
       Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu Tyr Gln  
       180                   185                   190

624   aac tcg aac act tat gtg tct gta gga aca tca aca cta aat cag agg  
       Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg  
       195                   200                   205

672   tca att cca gaa ata gct acc agg ccc aaa gtg aat gga caa agt gga  
       Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
       210                   215                   220

720   aga ata gaa ttt ttc tgg aca ata cta agg ccg aac gat gca atc agc  
       Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser  
       225                   230                   235                   240

768   ttt gaa agt aat ggg aac ttt ata gct cct gaa tat gca tac aag ata  
       Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
       245                   250                   255

816   gtt aaa aag gga gat tca gca atc atg aga agc gaa ctg gag tat ggc  
       Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu Tyr Gly  
       260                   265                   270

864   aac tgt gat acc aaa tgt cag acc cca gtg ggt gct ata aat tcc agt  
       Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
       275                   280                   285

912   atg cct ttt cac aat gtt cat ccc ctt acc att gga gag tgt ccc aaa  
       Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
       290                   295                   300

960   tat gtc aaa tca gat aaa ctg gtc ctt gca aca gga ctg agg aac gtg  
       Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val  
       305                   310                   315                   320

1008  cct cag aga gaa aca aga ggt ctg ttt gga gca ata gca gga ttc ata  
       Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile  
       325                   330                   335

ES 2 620 789 T3

1056 gaa ggg ggg tgg caa gga atg gta gat gga tgg tat ggt tac cat cat  
 Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His  
 340 345 350

1104 agc aac gag cag gga agt gga tat gct gca gac aaa gag tcc act cag  
 Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln  
 355 360 365

1152 aaa gca atc gac ggg atc acc aat aaa gtc aac tca atc att gac aaa  
 Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys  
 370 375 380

1200 atg aac act caa ttc gaa gcc gtt ggg aaa gaa ttc aac aac tta gaa  
 Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu  
 385 390 395 400

1248 agg aga ata gaa aat ttg aat aag aaa atg gaa gat gga ttt cta gat  
 Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp  
 405 410 415

1296 gta tgg act tac aat gca gaa ctt ctg gtg ctc atg gaa aat gaa aga  
 Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg  
 420 425 430

1344 act ctg gat ttc cat gat tca tat gtc aag aac cta tac gat aag gtc  
 Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val  
 435 440 445

1392 cga ctc cag ctg aga gat aat gca aaa gaa ttg ggc aat ggg tgt ttg  
 Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Leu  
 450 455 460

1440 gag ttc tcc cac aaa tgt gac aat gaa tgc atg gaa agt gtg aga aac  
 Glu Phe Ser His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn  
 465 470 475 480

1488 gga acg tat gac tat cca caa tac tca gaa gaa tca agg ctg aac aga  
 Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg  
 485 490 495

1536 gag gaa ata gat gga gtc aaa ttg gag tca atg ggc acc tat cag ata  
 Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile  
 500 505 510

1584 cta tca att tac tca aca gtg gcg agt tcc cta gca ctg gca atc atg  
 Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met  
 515 520 525

1632 gta gct ggt ctg tct ttt tgg atg tgc tcc aat gga tca ttg caa tgc

ES 2 620 789 T3

Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys  
 530 535 540

aga att tgc atc tag

1647

Arg Ile Cys Ile  
 545

<210> 4

<211> 548

5

<212> PRT

<213> Virus de la grippe A

<400> 4

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val  
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
 20 25 30

Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg  
 35 40 45

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn  
 50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val  
 65 70 75 80

Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn  
 85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His Phe Glu  
 100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser  
 115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe  
 130 135 140

Arg Ser Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Val Tyr Pro Thr Ile  
 145 150 155 160

Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp  
 165 170 175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu Tyr Gln  
 180 185 190

10

ES 2 620 789 T3

Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg  
 195 200 205  
 Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
 210 215 220  
 Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser  
 225 230 235 240  
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
 245 250 255  
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu Tyr Gly  
 260 265 270  
 Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
 275 280 285  
 Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
 290 295 300  
 Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val  
 305 310 315 320  
 Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile  
 325 330 335  
 Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His  
 340 345 350  
 Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln  
 355 360 365  
 Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys  
 370 375 380  
 Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu  
 385 390 395 400  
 Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp  
 405 410 415  
 Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg  
 420 425 430

ES 2 620 789 T3

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val  
 435 440 445

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Leu  
 450 455 460

Glu Phe Ser His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn  
 465 470 475 480

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg  
 485 490 495

Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile  
 500 505 510

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met  
 515 520 525

Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys  
 530 535 540

Arg Ile Cys Ile  
 545

5 <210> 5  
 <211> 1659  
 <212> DNA  
 <213> Virus de la gripe A

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1659)

15 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1).. (1659)  
 <223> Virus de la gripe A (A/gallina/Querétaro/7653-20/95(H5N2)) nº de entrada en el banco de genes U79448

<400> 5  
 gac caa atc tgc att ggt tat cat gca aac aat tca aca aaa cag gtt  
 48  
 Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val  
 1 5 10 15  
 gac aca atc atg gag aag aat gtg acg gtc aca cat gct cag gac ata  
 96  
 Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
 20 25 30  
 ctg gaa aaa gaa cac aat gga aga ctc tgc agt ctt aaa gga gtg aag  
 144



ES 2 620 789 T3

768 ttt gag agt act ggg aac ttt ata gct cct gaa tat gca tac aag ctt  
Phe Glu Ser Thr Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Leu  
245 250 255

816 att aaa aaa gga gat tca gca atc atg aaa agt gaa ctg aat tat ggt  
Ile Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Asn Tyr Gly  
260 265 270

864 aac tgt gat acc aaa tgt cag acc cca gcg ggt gct ata aat tcc agg  
Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ala Gly Ala Ile Asn Ser Arg  
275 280 285

912 atg cct ttt cac aat gtc cat cct ttt act att ggg gag tgc ccc aag  
Met Pro Phe His Asn Val His Pro Phe Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
290 295 300

960 tat gtc aaa tcg aaa aaa cta gtt ctt gca aca ggg cta aga aac gta  
Tyr Val Lys Ser Lys Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val  
305 310 315 320

1008 ccc caa aga aaa aga aaa aga aaa aca aga ggc cta ttt gga gca ata  
Pro Gln Arg Lys Arg Lys Arg Lys Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile  
325 330 335

1056 gcc gga ttc ata gaa gga gga tgg caa gga atg gtg gat gga tgg tat  
Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr  
340 345 350

1104 gga tat cat cat agc aat gag cag gga agt gga tat ggt gaa gac aac  
Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Gly Glu Asp Asn  
355 360 365

1152 gaa tct aca cag aaa gca atc gat ggg atc act aat aaa gtc aac tca  
Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser  
370 375 380

1200 atc att gac aaa atg aac act caa ttc gaa gcc gtt ggg aaa gaa ttc  
Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe  
385 390 395 400

1248 aac aac cta gaa agg aga ata gaa aat ttg aat aag aaa atg gaa gat  
Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp  
405 410 415

1296 ggc ttt ata gat gta tgg act tac aat gcg gaa ctt cta gtg ctc atg  
Gly Phe Ile Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met  
420 425 430

ES 2 620 789 T3

1344 gaa aac gaa aga act ctg gat ctc cat gat tca aat gtc aag aaa tta  
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Leu His Asp Ser Asn Val Lys Lys Leu  
                   435                                  440                                  445

1392 tac gat agg gtc cga ctc cag ctg aga gac aat gcc aaa gaa tta ggc  
 Tyr Asp Arg Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly  
           450                                  455                                  460

1440 aat ggg tgc ttt gaa ttc tac cac aag tgt gac aat gaa tgc atg gaa  
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu  
           465                                  470                                  475                                  480

1488 agt gtg aga aat gga acg tat gac tat cca caa tac tca gaa gaa tca  
 Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser  
                   485                                  490                                  495

1536 aga ctg aac agg gag gaa ata gac gga gtc aaa tta gaa tca atg ggg  
 Arg Leu Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly  
                   500                                  505                                  510

1584 act tat cag ata ctt tca atc tat tca aca gta gcg agt tcc cta gca  
 Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala  
                   515                                  520                                  525

1632 ctg gca atc atg gta gct ggt cta tct ttt tgg atg tgt tcc aat gga  
 Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly  
           530                                  535                                  540

1659 tca tta cag tgc aga att tgc atc tag  
 Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile  
           545                                  550

<210> 6  
 <211> 552  
 5 <212> PRT  
 <213> Virus de la gripe A

<400> 6  
 Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val  
 1                  5                                  10                                  15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
           20                                  25                                  30

Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Arg Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Lys  
           35                                  40                                  45

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn  
           50                                  55                                  60

ES 2 620 789 T3

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val  
65 70 75 80

Glu Lys Asp Asn Pro Ala Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn  
85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Met Ser Ser Thr Asn His Phe Glu  
100 105 110

Lys Ile Gln Ile Phe Pro Arg Ser Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser  
115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe  
130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Val Tyr Arg Thr Ile  
145 150 155 160

Lys Arg Thr Tyr His Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp  
165 170 175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Ile Lys Leu Tyr Gln  
180 185 190

Asn Pro Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg  
195 200 205

Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
210 215 220

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ser Ile Asn  
225 230 235 240

Phe Glu Ser Thr Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Leu  
245 250 255

Ile Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Asn Tyr Gly  
260 265 270

Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ala Gly Ala Ile Asn Ser Arg  
275 280 285

Met Pro Phe His Asn Val His Pro Phe Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
290 295 300

ES 2 620 789 T3

Tyr Val Lys Ser Lys Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val  
305 310 315 320

Pro Gln Arg Lys Arg Lys Arg Lys Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile  
325 330 335

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr  
340 345 350

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Gly Glu Asp Asn  
355 360 365

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser  
370 375 380

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe  
385 390 395 400

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp  
405 410 415

Gly Phe Ile Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met  
420 425 430

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Leu His Asp Ser Asn Val Lys Lys Leu  
435 440 445

Tyr Asp Arg Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly  
450 455 460

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu  
465 470 475 480

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser  
485 490 495

Arg Leu Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly  
500 505 510

Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala  
515 520 525

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly  
530 535 540

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile  
545 550

<210> 7  
<211> 1647

ES 2 620 789 T3

<212> DNA  
 <213> Virus de la gripe A

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1647)

10 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1).. (1647)  
 <223> Virus de la gripe A (A/pavo/Wisconsin/68(H5N9)) nº de entrada en el banco de genes U79456

<400> 7

48 gac caa atc tgc atc ggt tat cat gca aac aat tca aca aaa caa gtt  
 Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val  
 1 5 10 15

96 gac aca atc atg gag aag aat gtg acg gtc aca cat gct caa gat ata  
 Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
 20 25 30

144 ctg gaa aaa gag cac aac ggg aaa ctc tgc agt ctc aaa gga gtg agg  
 Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg  
 35 40 45

192 ccc ctc att ctg aag gat tgc agt gtg gct gga tgg ctt ctt ggg aac  
 Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn  
 50 55 60

240 cca atg tgt gat gag ttc cta aat gta ccg gaa tgg tca tat att gta  
 Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val  
 65 70 75 80

288 gag aag gac aat cca acc aat ggc tta tgt tat ccg gga gac ttc aat  
 Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn  
 85 90 95

336 gat tat gaa gaa ctg aag tat tta atg agc aac aca aac cat ttt gag  
 Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His Phe Glu  
 100 105 110

384 aaa att caa ata atc cct agg aac tct tgg tcc aat cat gat gcc tca  
 Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser  
 115 120 125

432 tca gga gtg agc tca gca tgc cca tac aat ggt agg tct tcc ttt ttc

15

ES 2 620 789 T3

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe  
 130 135 140  
 480 agg agt gtg gtg tgg ttg atc aag aag agt aat gta tac cca aca ata  
 Arg Ser Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Val Tyr Pro Thr Ile  
 145 150 155 160  
 528 aag agg acc tac aat aac acc aat gta gag gac ctt ctg ata ttg tgg  
 Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp  
 165 170 175  
 576 gga atc cat cac cct aat gat gca gcg gaa caa acg gaa ctc tat cag  
 Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu Tyr Gln  
 180 185 190  
 624 aac tcg aac act tat gtg tct gta gga aca tca aca cta aat cag agg  
 Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg  
 195 200 205  
 672 tca att cca gaa ata gct acc agg ccc aaa gtg aat gga caa agt gga  
 Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
 210 215 220  
 720 aga ata gaa ttt ttc tgg aca ata cta agg ccg aac gat gca atc agc  
 Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser  
 225 230 235 240  
 768 ttt gaa agt aat ggg aac ttt ata gct cct gaa tat gca tac aag ata  
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
 245 250 255  
 816 gtt aaa aag gga gat tca gca atc atg aga agc gaa ctg gag tat ggc  
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu Tyr Gly  
 260 265 270  
 864 aac tgt gat acc aaa tgt cag acc cca gtg ggt gct ata aat tcc agt  
 Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
 275 280 285  
 912 atg cct ttt cac aat gtt cat ccc ctt acc att gga gag tgt ccc aaa  
 Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
 290 295 300  
 960 tat gtc aaa tca gat aaa ctg gtc ctt gca aca gga ctg agg aac gtg  
 Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val  
 305 310 315 320  
 1008 cct cag aga gaa aca aga ggt ctg ttt gga gca ata gca gga ttc ata  
 Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile  
 325 330 335

ES 2 620 789 T3

1056 gaa ggg ggg tgg caa gga atg gta gat gga tgg tat ggt tac cat cat  
 Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His  
 340 345 350

1104 agc aac gag cag gga agt gga tat gct gca gac aaa gag tcc act cag  
 Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln  
 355 360 365

1152 aaa gca atc gac ggg atc acc aat aaa gtc aac tca atc att gac aaa  
 Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys  
 370 375 380

1200 atg aac act caa ttc gaa gcc gtt ggg aaa gaa ttc aac aac tta gaa  
 Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu  
 385 390 395 400

1248 agg aga ata gaa aat ttg aat aag aaa atg gaa gat gga ttt cta gat  
 Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp  
 405 410 415

1296 gta tgg act tac aat gca gaa ctt ctg gtg ctc atg gaa aat gaa aga  
 Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg  
 420 425 430

1344 act ctg gat ttc cat gat tca tat gtc aag aac cta tac gat aag gtc  
 Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val  
 435 440 445

1392 cga ctc cag ctg aga gat aat gca aaa gaa ttg ggc aat ggg tgt ttg  
 Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Leu  
 450 455 460

1440 gag ttc tcc cac aaa tgt gac aat gaa tgc atg gaa agt gtg aga aac  
 Glu Phe Ser His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn  
 465 470 475 480

1488 gga acg tat gac tat cca caa tac tca gaa gaa tca agg ctg aac aga  
 Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg  
 485 490 495

1536 gag gaa ata gat gga gtc aaa ttg gag tca atg ggc acc tat cag ata  
 Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile  
 500 505 510

1584 cta tca att tac tca aca gtg gcg agt tcc cta gca ctg gca atc atg  
 Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met  
 515 520 525

ES 2 620 789 T3

gta gct ggt ctg tct ttt tgg atg tgc tcc aat gga tca ttg caa tgc  
 1632 Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys  
 530 535 540

aga att tgc atc tag  
 1647 Arg Ile Cys Ile  
 545

<210> 8  
 <211> 548  
 5 <212> PRT  
 <213> Virus de la gripe A

<400> 8  
 Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val  
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
 20 25 30

Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg  
 35 40 45

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn  
 50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val  
 65 70 75 80

Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn  
 85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His Phe Glu  
 100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser  
 115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe  
 130 135 140

Arg Ser Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Val Tyr Pro Thr Ile  
 145 150 155 160

Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp  
 165 170 175

10

ES 2 620 789 T3

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu Tyr Gln  
180 185 190

Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg  
195 200 205

Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
210 215 220

Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser  
225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu Tyr Gly  
260 265 270

Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
275 280 285

Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val  
305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile  
325 330 335

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His  
340 345 350

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln  
355 360 365

Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys  
370 375 380

Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu  
385 390 395 400

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp  
405 410 415

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg  
420 425 430

ES 2 620 789 T3

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Tyr Val Lys<sup>1</sup> Asn Leu Tyr Asp Lys Val  
 435 440 445

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Leu  
 450 455 460

Glu Phe Ser His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn  
 465 470 475 480

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg  
 485 490 495

Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile  
 500 505 510

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met  
 515 520 525

Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys  
 530 535 540

Arg Ile Cys Ile  
 545

<210> 9

<211> 39

5 <212> DNA

<213> Organismo Artificial

<220>

10 <223> Cebadores usados en la construcción de vectores Ad

<400> 9

cacacaggta ccgccatgaa gactatcatt gctttgagc 39

<210> 10

15 <211> 32

<212> DNA

<213> Organismo Artificial

<220>

20 <223> Cebadores usados en la construcción de vectores Ad

<400> 10

cacacaggta cctcaaatgc aatgttgca cc 32

25

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de expresión de adenovirus humano recombinante que comprende y expresa una secuencia de ADN adenoviral, y una secuencia promotora conectada operablemente a una secuencia foránea que codifica uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés, para su uso en la vacunación profiláctica de un embrión aviar mediante la introducción y la expresión de uno o más antígenos o inmunógenos de la influenza aviar en dicho embrión aviar.
2. El vector de expresión de adenovirus humano recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés deriva de uno o más virus aviares.
- 10 3. El vector de expresión de adenovirus humano recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés deriva del virus de la influenza aviar.
- 15 4. El vector de expresión de adenovirus humano recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés deriva del virus de la influenza aviar y se selecciona del grupo que consiste en hemaglutinina, nucleoproteína, matriz, y neuraminidasa.
5. El vector de expresión de adenovirus humano recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés deriva del virus de la influenza aviar y se selecciona del grupo que consiste en el subtipo 3, 5, 7, y 9 de hemaglutinina.
- 20 6. El vector de expresión de adenovirus humano recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha introducción en dicho embrión aviar se lleva a cabo por medio del suministro *in ovo*.
- 25 7. Una composición inmunogénica que comprende un vector de expresión de adenovirus humano recombinante que comprende y expresa una secuencia de ADN adenoviral, y una secuencia promotora conectada operablemente a una secuencia foránea que codifica uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés, para su uso en la vacunación profiláctica de un sujeto aviar mediante la obtención de una respuesta inmunogénica en dicho sujeto aviar, en donde el sujeto aviar está infectado *in ovo* con una cantidad inmunológicamente eficaz de dicha composición inmunogénica y en donde los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés se expresan a un nivel suficiente para provocar una respuesta inmunogénica a los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés en el sujeto aviar.
- 30 8. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés deriva del virus de la influenza aviar, virus de la enfermedad infecciosa de la bursa, virus de la enfermedad de Marek, herpesvirus aviar, virus de la laringotraqueitis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa aviar, reovirus aviar, avipox, viruela aviar, viruela del canario, viruela del pichón, viruela de la codorniz, y viruela de la paloma, poliomavirus aviar, virus de la enfermedad de Newcastle, pneumovirus aviar, virus de la rinotraqueitis aviar, virus de la reticuloendoteliosis aviar, retrovirus aviares, virus endógeno aviar, virus de la eritroblastosis aviar, virus de la hepatitis aviar, virus de la anemia aviar, virus de la enteritis aviar, virus de la enfermedad de Pacheco, virus de la leucemia aviar, parvovirus aviar, rotavirus aviar, virus de la leucosis aviar, virus de fibrosarcoma musculoponeurótico aviar, virus de la mieloblastosis aviar, virus asociado a la mieloblastosis aviar, virus de la mielocitomatosis aviar, virus del sarcoma aviar, o virus de la necrosis del bazo aviar.
- 35 9. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés deriva del virus de la influenza aviar.
- 40 10. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés deriva del virus de la influenza aviar y se selecciona del grupo que consiste en hemaglutinina, nucleoproteína, matriz y neuraminidasa.
- 45 11. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la secuencia foránea que codifica los uno o más antígenos o inmunógenos aviares de interés deriva del virus de la influenza aviar y se selecciona del grupo que consiste en el subtipo 3, 5, 7, y 9 de hemaglutinina.
- 50 12. Un adenovirus humano recombinante que contiene y expresa una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de un patógeno de un sujeto aviar para su uso en la vacunación profiláctica de un sujeto aviar mediante la inoculación a dicho sujeto aviar, en donde dicho adenovirus es administrado *in ovo*.
13. El adenovirus humano recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el adenovirus humano comprende secuencias derivadas del serotipo 5 de adenovirus.
14. El adenovirus humano recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el adenovirus

humano comprende secuencias derivadas de adenovirus de replicación defectuosa, adenovirus no replicantes, adenovirus de replicación competente, o adenovirus de tipo salvaje.

- 5 15. El adenovirus humano recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el antígeno de un patógeno de un sujeto aviar deriva de virus de la influenza aviar, virus de la enfermedad infecciosa de la bursa, virus de la enfermedad de Marek, herpesvirus aviar, virus de la laringotraqueitis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa aviar, reovirus aviar, avipox, viruela aviar, viruela del canario, viruela del pichón, viruela de la codorniz, y viruela de la paloma, poliomasvirus aviar, virus de la enfermedad de Newcastle, metapneumovirus aviar, virus de la rinitis aviar, virus de la reticuloendoteliosis aviar, retrovirus aviares, virus endógeno aviar, virus de la eritroblastosis aviar, virus de la hepatitis aviar, virus de la anemia aviar, virus de la enteritis aviar, virus de la enfermedad de Pacheco, virus de la leucemia aviar, parvovirus aviar, rotavirus aviar, virus de la leucosis aviar, virus del fibrosarcoma musculoponeurótico aviar, virus de la mieloblastosis aviar, virus asociado a la mieloblastosis aviar, virus de la mielocitomatosis aviar, virus del sarcoma aviar, o virus de la necrosis del bazo aviar.
- 10 16. El adenovirus humano recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el antígeno de un patógeno de un sujeto aviar deriva del virus de la influenza aviar.
- 15 17. El adenovirus humano recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el antígeno de un patógeno de un sujeto aviar deriva del virus de la influenza aviar y se selecciona del grupo que consiste en hemaglutinina, nucleoproteína, matriz y neuraminidasa.
- 20 18. El adenovirus humano recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el antígeno de un patógeno de un sujeto aviar deriva del virus de la influenza aviar y se selecciona del grupo que consiste en el subtipo 3, 5, 7, y 9 de hemaglutinina.

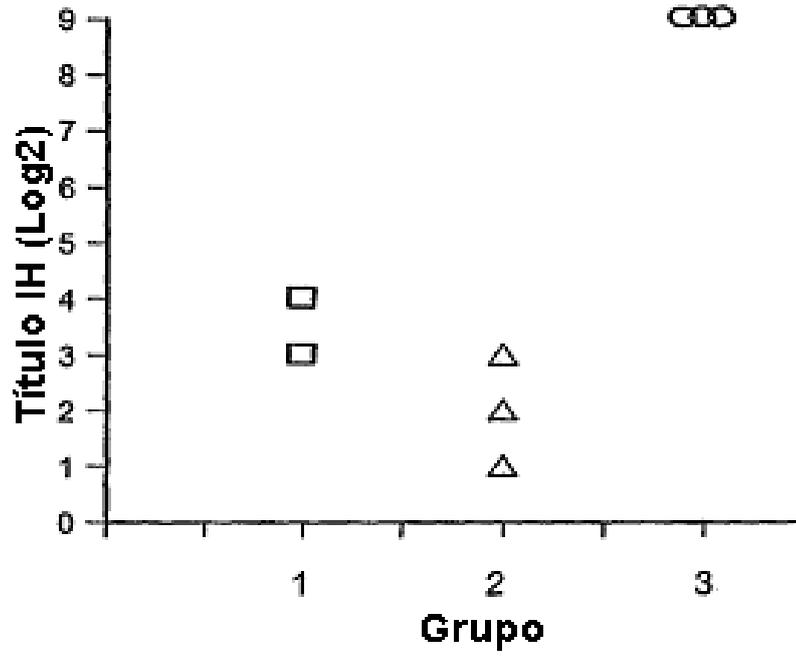


FIGURA 1



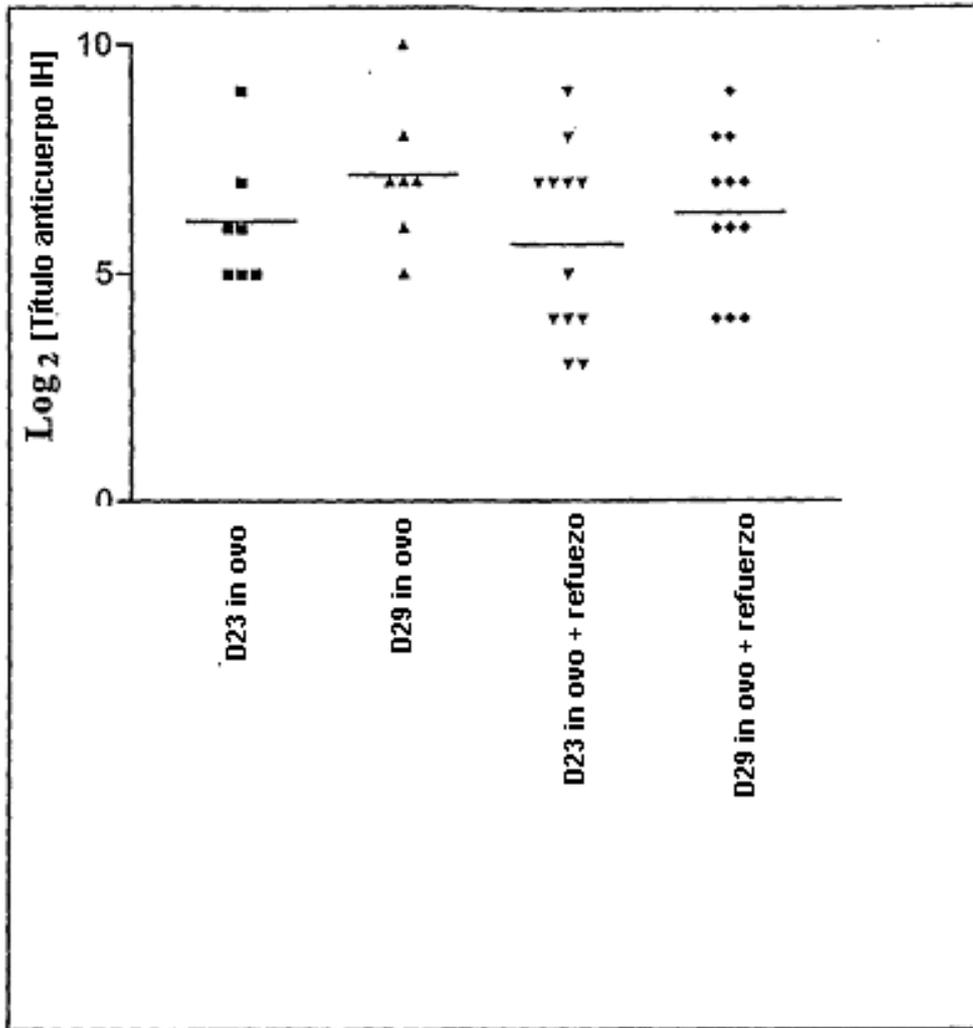


FIGURA 3

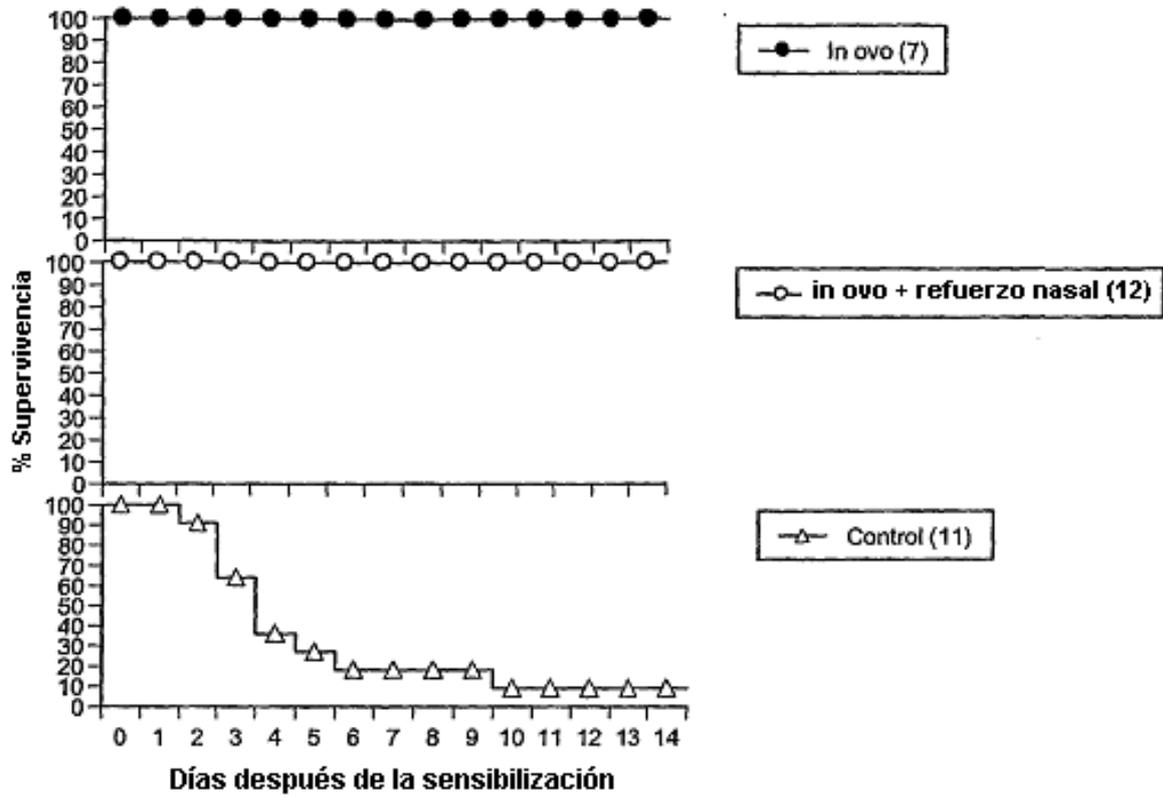
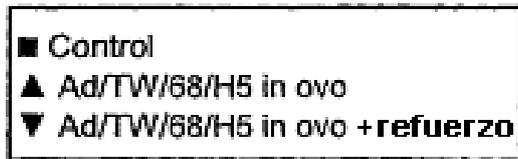
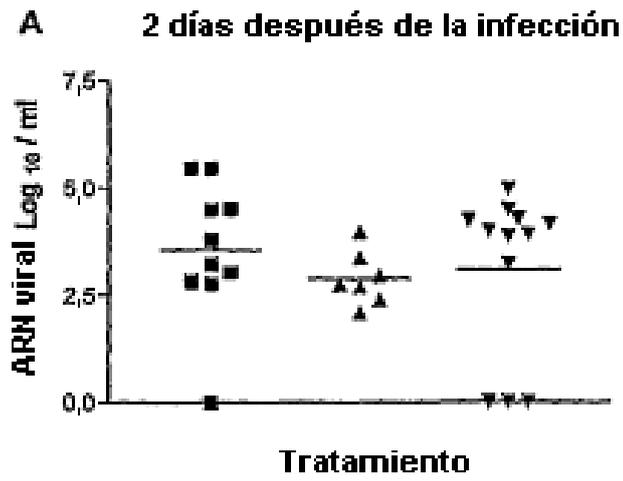
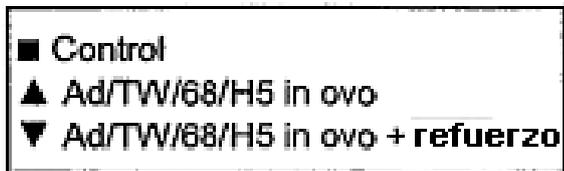
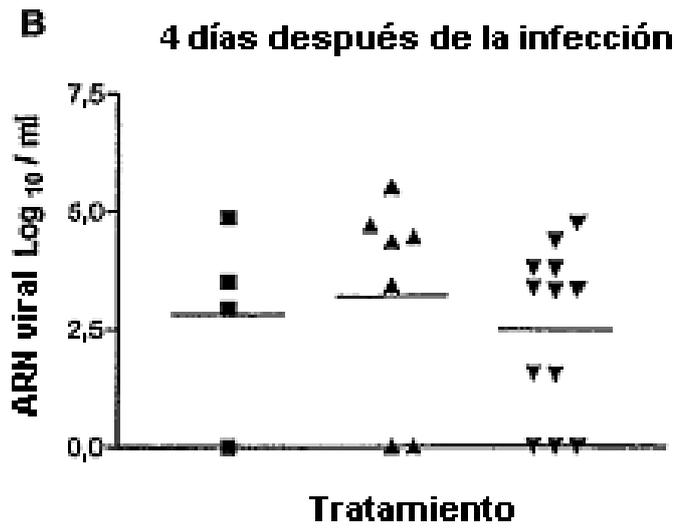


FIGURA 4



**FIGURA 5A**



**FIGURA 5B**



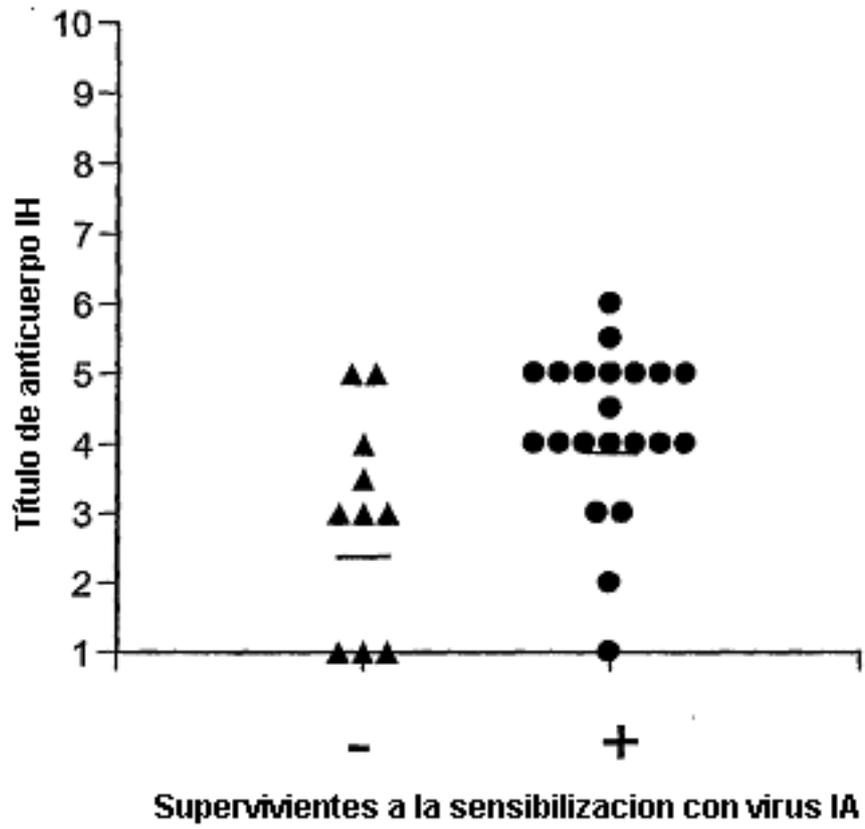


FIGURA 6

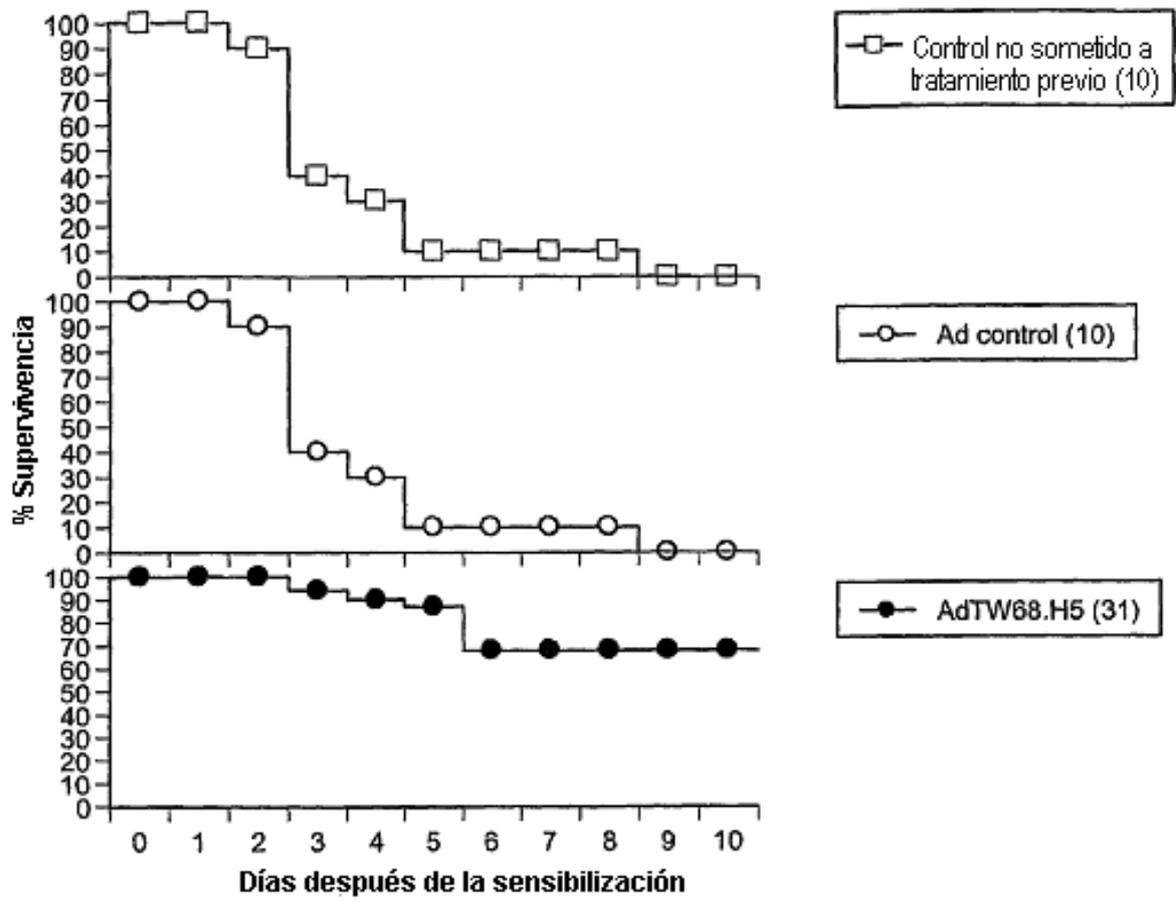


FIGURA 7