

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 464**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/869** (2006.01)

**A61K 39/17** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2013 PCT/EP2013/056839**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144355**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2013 E 13713195 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **06.11.2024 EP 2831246**

54 Título: **Herpesvirus aviares recombinantes multivalentes y vacunas para inmunizar especies aviares**

30 Prioridad:

**30.03.2012 EP 12305390**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:  
**03.04.2025**

73 Titular/es:

**CEVA SANTÉ ANIMALE (100.00%)  
10 Avenue de La Ballastière  
33500 Libourne Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**FUJISAWA, AYUMI;  
KUBOMURA, MAYUMI;  
SAEKI, SAKIKO y  
SAITO, SHUJI**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**DESCRIPCIÓN**

Herpesvirus aviares recombinantes multivalentes y vacunas para inmunizar especies aviares

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente al campo de las preparaciones de vacunas. La presente invención se refiere específicamente a herpesvirus recombinantes multivalentes en los que al menos se han insertado dos genes foráneos, y a sus usos para inducir simultáneamente una inmunidad protectora contra una pluralidad de enfermedades aviares.

**Antecedentes de la invención**

La carne y huevos de aves de corral son importantes fuentes de alimento, cuyo consumo aumenta continuamente debido al crecimiento de la población humana y a su gran relación calidad-precio. La reciente epidemia de gripe aviar centró la opinión pública en la salud de las aves de corral, así como en la inocuidad y seguridad alimentarias. La tecnología de vacunas para aves de corral se convirtió en una preocupación mundial.

Los vectores virales que expresan proteínas patógenas se usan comúnmente como vacunas para aves de corral contra patógenos diana. Las vacunas que incluyen dichos vectores virales inducen la expresión de proteínas patógenas foráneas dentro de las células infectadas y, de esta manera, inducen la correspondiente inmunidad de las células T.

Es bien conocido que todos los herpesvirus, incluidos el herpesvirus de pavo (HVT) y el virus de la enfermedad de Marek (MDV), pueden sobrevivir permanentemente en el cuerpo de un animal infectado en estado de infección latente o persistente. Por consiguiente, los herpesvirus recombinantes, en los que se ha integrado un gen foráneo derivado de un agente patógeno, se han desarrollado para usarse como vacunas de vectores virales que aumentan la duración de la inmunidad de un animal inmunizado.

La estructura genómica del HVT, su uso generalizado como vacuna contra el MDV y su capacidad de permanecer persistente en los pollos hacen de este virus un vector atractivo para producir vacunas recombinantes para aves de corral.

Se han desarrollado preparaciones de vacunas para lograr vacunaciones aviares eficaces, utilizando herpesvirus recombinantes que incorporan un gen que codifica un xenoantígeno. Dichas preparaciones de vacunas permiten vacunar tanto contra el MDV (el vector) como contra otra enfermedad aviar, a través de la secuencia de ADN foráneo insertada.

Aunque dichas preparaciones de vacunas proporcionan resultados eficaces para vacunar a las especies aviares contra muchas enfermedades mortales, se pueden producir competencia e inmunosupresión entre agentes patógenos cuando se inyectan a las aves dos o más herpesvirus recombinantes, cada uno de los cuales alberga un gen de xenoantígeno diferente.

Por lo tanto, se estudiarían particularmente herpesvirus recombinantes multivalentes (es decir, que albergan al menos dos genes de antígenos diferentes) para inmunizar simultáneamente contra diferentes enfermedades. Sin embargo, hasta ahora, los HVT recombinantes (rHVT) que expresan múltiples genes foráneos resultaron ser inestables, y todos o parte de los genes foráneos se eliminan durante la repetición de subcultivos en las células de cultivo. En consecuencia, dichos vectores virales multivalentes inestables no se pueden usar como vacunas eficaces.

En consecuencia, existe una necesidad de vectores virales recombinantes multivalentes estables, que permitan la coexpresión de los genes foráneos en las células infectadas.

**Resumen de la invención**

El trabajo realizado por el solicitante ha conducido al sorprendente descubrimiento de que se puede usar un conjunto de sitios de inserción particulares en el genoma del herpesvirus para insertar y expresar de manera estable dos o más genes de antígenos, proporcionando de esta manera vectores virales multivalentes eficaces para la vacunación aviar. Más particularmente, el solicitante ha descubierto que un número reducido de sitios de inserción se pueden usar simultáneamente para incorporar distintos genes de antígenos, proporcionando vectores virales recombinantes multivalentes estables.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un herpesvirus aviar recombinante, según la reivindicación 1.

Según la reivindicación 1, una secuencia de nucleótidos recombinante se inserta en la región ubicada entre UL45 y UL46, y una secuencia de nucleótidos recombinante se inserta en la región ubicada entre UL44 y UL45, entre US10 y SORF3, o entre SORF3 y US2. Como se ilustra en la solicitud, dichas construcciones de herpesvirus aviar

recombinante proporcionan una expresión particularmente estable y eficiente de los dos correspondientes péptidos antigénicos en las células aviares infectadas.

5 En particular, de forma ventajosa, las dos o más secuencias de nucleótidos recombinantes se coexpresan en células de fibroblastos de embriones de pollo (CEF), aun después de 10 o más subcultivos, y preferencialmente aun después de 15 subcultivos.

10 Según la invención, las secuencias de nucleótidos recombinantes están de forma ventajosa bajo el control de promotores particulares. Los promotores se eligen preferencialmente entre el promotor de la beta-actina (Bac) de pollo, el promotor Pec, el promotor inmediatamente temprano (ie)1 del citomegalovirus murino (Mcmv), el promotor del citomegalovirus humano (Hcmv), el promotor del virus símico (SV)40 y el promotor del virus del sarcoma de Rous (VRS) o cualquier fragmento de los mismos que retenga una actividad promotora. Preferencialmente, cada secuencia de nucleótidos recombinante está bajo el control de un promotor distinto.

15 Según la invención, los genes foráneos se eligen de forma ventajosa entre un péptido antigénico del paramixovirus aviar de tipo 1 y, preferencialmente, la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), un péptido antigénico del virus de la enfermedad de Gumboro, preferencialmente la proteína VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV), un péptido antigénico del virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILT), preferencialmente la proteína gB, un péptido antigénico de Mycoplasma galisepticum, preferencialmente la proteína 40K, y un péptido antigénico del virus de la gripe aviar, preferencialmente una proteína de superficie hemaglutinina (HA).

20 En una realización preferida, el herpesvirus aviar recombinante comprende una primera secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un primer péptido antigénico insertado en la región no codificante ubicada entre UL44 y UL45, y una segunda secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un segundo péptido antigénico insertado en la región no codificante ubicada entre UL45 y UL46.

25 En otra realización preferida, el herpesvirus aviar recombinante comprende una primera secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un primer péptido antigénico insertado en la región no codificante ubicada entre UL45 y UL46, y una segunda secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un segundo péptido antigénico insertado en la región no codificante ubicada entre US10 y SORF3, o entre SORF3 y US2.

30 Un objeto adicional de la invención se refiere a una vacuna multivalente para inmunizar especies aviares, tales como aves de corral, que comprende una cantidad inmunizante eficaz del herpesvirus aviar recombinante de la invención. Esta vacuna se puede usar para inmunizar especies aviares, tales como aves de corral. En la presente memoria, se expone además un antisuero dirigido contra el herpesvirus aviar obtenido inmunizando especies aviares con una cantidad eficaz de herpesvirus aviar recombinante de la invención y recuperando el antisuero después del sangrado del ave.

35 La invención se refiere además a un método de inmunización de un ave que comprende administrar a dicho ave una cantidad inmunizante eficaz de la vacuna según la invención. La invención proporciona además un kit de vacunación para inmunizar especies aviares que comprende una cantidad eficaz de la vacuna de la invención y un medio para administrar dichos componentes a dicha especie.

40 La invención se puede usar en cualquier ave, para la vacunación contra cualquier agente patógeno aviar.

45 **Breve descripción de los dibujos**

50 La Figura 1 ilustra el diagrama esquemático del genoma del HVT. La ubicación de la larga única (UL) 44, UL45 y UL46 y la ubicación de la corta única (US)10, SORF3 y US2 están marcadas. Las secuencias de nucleótidos recombinantes se pueden insertar en sitios Sfil generados por PCR entre UL44 y UL45, y/o entre UL45 y UL46, y/o entre US10 y SORF3, y/o entre SORF3 y US2.

55 Las Figuras 2A y 2B ilustran diagramas esquemáticos del genoma del HVT que integran diferentes agrupaciones de secuencias de nucleótidos y promotores.

60 La Figura 3 muestra la tinción por inmunofluorescencia de CEF infectados con HVT recombinantes dobles según las realizaciones de la invención (FW129 y FW141) que coexpresan NDV-F e IBDV-VP2 (células infectadas con rHVT/ND/IBD). La expresión de la proteína VP2 se detectó mediante el AcM anti-VP2 (R63) y Alexa Fluor 546. La expresión de la proteína F se detectó mediante el suero de conejo anti-F #35 y Alexa Fluor 488. Los resultados muestran que ambas células infectadas con FW129 o FW141 expresan tanto la proteína NDV-F insertada como la proteína IBDV-VP2 insertada.

65 Las Figuras 4A y 4B son análisis por inmunoelectrotransferencia que muestran la expresión de la proteína VP2 y/o la proteína F en células CEF infectadas con los rHVT de la invención. Según muestra la Figura 4A, se observó una banda proteica de 60 kilodaltons (kDa) solo en el carril con células infectadas por rHVT/ND/IBD, que era el tamaño esperado de la proteína F (■). No había ninguna banda en el carril de rHVT/44-45BacVP2 (FW123). Según muestra la Figura

4B, la proteína VP2 se observó a 38 kilodaltons (kDa) en los carriles de cada rHVT/ND/IBD (Fig. 4B). Por el contrario, no había ninguna banda en el carril de rHVT/45-46 PecF (FW029). La proteína VP2 madura es la de 38 kDa (A. A. Azad y col., 1987, *Virology* 161:145-152, K. J., Fahey y col., 1985 *J. Gen. Virol.* 66:1479-1488). Los rHVT dobles de la invención expresaron tanto NDV-F como IBDV-VP2.

Las Figuras 5A a 5D muestran los resultados de un análisis por transferencia de Southern para comprobar la estructura del genoma de FW129 purificada (rHVT/45-46 pecF/44-45 Rsv VP2), lo que indica que el HVT/ND/IBD recombinante doble de la invención tenía la estructura genómica esperada. Más justamente, los resultados de la transferencia de Southern mostraron que

– se hibridó un fragmento de 2077 pb con la sonda VP2 en el ADN de cada FW129 de HVT recombinante doble (columnas 1, 2 y 3, Figura 5A). Por el contrario, no se detectó ninguna banda en p45/46Pec F (Figura 5A).

– se hibridó un fragmento de 2744 pb con la sonda F en el ADN de cada FW129 de HVT recombinante doble (columnas 1, 2 y 3, Figura 5C). No se detectó ninguna banda en el p45/46 Sfil.

– los fragmentos de 2077 pb y 1228 pb se hibridaron con la sonda IS44/45 en el ADN de cada FW129 de HVT recombinante doble (columnas 1, 2 y 3, Figura 5B). No se detectó ninguna banda para el marcador molecular lambda digerido con HindIII (columna M, Figura 5B).

– los fragmentos de 2744 pb y 770 pb se hibridaron con la sonda IS45/46 en el ADN de cada FW129 de HVT recombinante doble (columnas 1, 2 y 3, Figura 5D).

Las Figuras 6A y 6B muestran los resultados de un análisis de inmunoelectrotransferencia para comprobar la estabilidad de FW129 de HVT recombinante en subcultivos sucesivos, lo que indica que después de 15 subcultivos, la proteína F y la proteína VP2 se expresaron de manera estable en el CEF infectado con el rHVT FW129 de la invención.

Las Figuras 7A a 7D muestran los resultados de un análisis por transferencia de Southern para comprobar la estabilidad de los HVT recombinantes después de 15 subcultivos. (Figura 7A) Los resultados de la transferencia de Southern muestran que un fragmento de 2077 pb se hibridó con la sonda VP2 en el ADN de FW129. El fragmento de 2334 pb se hibridó con la sonda VP2 en el ADN de FW130. Por el contrario, no se detectó ninguna banda en p45/46Pec F. (Figura 7C) Los resultados de la transferencia de Southern muestran que un fragmento de 2744 pb se hibridó con la sonda F en el ADN de cada FW129 y FW130 de HVT recombinante doble. No se detectó ninguna banda en el p45/46 Sfil. (Figura 7B) Los resultados de la transferencia de Southern muestran que los fragmentos de 2077 pb y 1228 pb se hibridaron con la sonda IS44/45 en el ADN de FW129, y que los fragmentos de 2334 pb y 1022 pb se hibridaron con la sonda IS44/45 en el ADN de FW130. Un fragmento de 1350 pb se hibridó con la sonda IS44/45 en p45/46 PecF, que no contenía ningún gen en el sitio IS44/45. (Figura 7D) Los resultados de la transferencia de Southern muestran que los fragmentos de 2744 pb y 770 pb se hibridaron con la sonda IS45/46 en el ADN de cada FW129 y FW130 de HVT recombinante doble. La transferencia de Southern con la sonda 44/45 y la sonda 45/46 mostró que el gen VP2 o el gen F se mantenían estables en el sitio de inserción 44/45 o 45/46, respectivamente, en FW129 y FW130. Estos resultados indican que, después de 15 subcultivos, la proteína F y la proteína VP2 se expresaron de manera estable en los CEF infectados con FW129 de rHVT de la invención.

Las Figuras 8A y 8B muestran los resultados comparativos de los títulos de anti-NDV (Figura 8A) y los títulos de anti-IBDV (Figura 8B) obtenidos de pollos a los que se les inoculó HVT recombinantes dobles (FW122, FW137, FW129, FW130, FW135), en comparación con los títulos obtenidos de pollos a los que se les inoculó HVT recombinantes individuales (FW029 y FW023, respectivamente).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención generalmente se refiere a los herpesvirus recombinantes multivalentes y a su uso para inmunizar especies aviares contra al menos dos enfermedades al mismo tiempo. Según se expone en la presente memoria, las secuencias de ADN foráneo se insertan en sitios de inserción particulares dentro del genoma del rHV, proporcionando construcciones estables y eficientes adecuadas para usar en composiciones o métodos de vacunas.

La presente exposición se entenderá mejor haciendo referencia a las siguientes definiciones:

#### Definiciones

En el contexto de la invención, el término “reconstruido” o “recombinante” en relación con una secuencia, denomina una secuencia, ácido nucleico o unidad que no existe de forma natural y/o que se ha genomodificado utilizando ingeniería genética (también denominada clonación génica o clonación molecular).

El término “recombinante” en relación con un herpesvirus se refiere a un herpesvirus cuyo genoma se ha modificado mediante la inserción de al menos un ácido nucleico heterólogo, es decir, un ácido nucleico (p. ej., ADN) que no se encuentra de forma natural en el genoma del herpesvirus, o que se encuentra de forma natural en dicho genoma pero en una forma diferente o en una posición diferente. Se entenderá que el herpesvirus recombinante se puede fabricar mediante una variedad de métodos y, una vez fabricado, se puede reproducir sin el uso de ingeniería genética adicional. Por lo tanto, la estructura del “herpesvirus recombinante” se describe en términos de inserción de ADN.

En la presente descripción, los términos “ácido nucleico”, “secuencia nucleica” y “secuencia de nucleótidos” se usan indistintamente y se refieren a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia determinada, que puede ser desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede prepararse primero, p. ej., mediante técnicas recombinantes, enzimáticas y/o químicas, y posteriormente replicarse en una célula huésped o en un sistema in vitro. Una secuencia de nucleótidos preferencialmente comprende un marco de lectura abierto que codifica un péptido. La secuencia de nucleótidos puede contener secuencias adicionales tales como un terminador de la transcripción, un péptido señal, un IRES, un intrón, etc. Preferiblemente, un marco de lectura abierto en un ácido nucleico recombinante no contiene un intrón.

El término “región no traducida” como se usa en la presente memoria se refiere a una región de nucleótidos que no tiene ORF y no define una secuencia de aminoácidos de la proteína que se va a expresar mediante traducción, o una región de nucleótidos en la que el ORF no participa en ninguna de las transcripciones, traducciones ni expresiones de proteínas.

El término “especie aviar” pretende abarcar todos los tipos de aves, tales como aves de la clase Aves, es decir, animales vertebrados con plumas, alas, bípedos, endotérmicos y que ponen huevos. En el contexto de la invención, las aves o especies aviares se refieren más particularmente a aves con interés económico y/o agronómico, tales como aves de corral (tales como pollos y pavos), aves acuáticas (tales como patos y gansos) y aves ornamentales (tales como cisnes y psittaciformes).

El término “vacuna” como se usa en la presente memoria denomina un agente que se puede usar para causar, estimular o amplificar una respuesta inmunitaria en un organismo.

Virus

Los virus para su uso en la presente invención son aquellos que pertenecen generalmente al género de los herpesvirus aviares.

Por ejemplo, los herpesvirus aviares para su uso en la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, un herpesvirus de pavo (HVT), un virus de la enfermedad de Marek del serotipo 2, preferiblemente la cepa SB1 del virus de la enfermedad de Marek del serotipo 2, o un virus de la enfermedad de Marek del serotipo 1, preferiblemente la cepa CVI988/Rispens del virus de la enfermedad de Marek del serotipo 1. Los herpesvirus preferidos de la invención se derivan de serotipos o cepas que no son patógenas para las especies aviares diana.

Herpesvirus aviares recombinantes multivalentes

Un objeto de la invención se refiere a los herpesvirus aviares recombinantes adecuados para inmunizar especies aviares contra al menos dos enfermedades, con una estabilidad mejorada a través de los subcultivos. Los inventores han identificado sitios de inserción particulares que, en combinaciones, proporcionan una estabilidad mejorada para los genes de xenoantígenos.

Un objeto de la invención por lo tanto se refiere a un herpesvirus aviar recombinante según la reivindicación 1.

La ubicación de las regiones no codificantes expresadas es conocida en la técnica y se puede encontrar, p. ej., en Kingham y col. (“The genome of herpesvirus of turkeys: comparative analysis with Marek's disease viruses” - Journal of General Virology (2001) 82, 1123-1135).

Por ejemplo, como referencia a un genoma completo de FC126 (GenBank: AF291866.1), la región ubicada entre UL44 y UL45 corresponde a los nucleótidos 94243-94683 del genoma del HVT, la región ubicada entre UL45 y UL46 corresponde a los nucleótidos 95323-95443 del genoma del HVT, la región ubicada entre US10 y SORF3 corresponde a los nucleótidos 138688-138825 del genoma del HVT, y la región ubicada entre SORF3 y US2 corresponde a los nucleótidos 139867-140064 del genoma del HVT.

El ácido nucleico de interés para la inserción en el genoma del herpesvirus puede ser homólogo o heterólogo con respecto al herpesvirus. El ácido nucleico típicamente codifica un antígeno de un agente patógeno y se puede derivar u obtener de cualquier organismo patógeno capaz de provocar una infección en especies aviares. Típicamente, los ácidos nucleicos clonados se derivan de agentes patógenos que causan enfermedades que tienen un impacto económico en la industria de aves de corral. Los ejemplos de agentes patógenos que causan infecciones en las aves incluyen virus, bacterias, hongos, protozoos, etc.

5 La secuencia de nucleótidos homóloga o heteróloga para la inserción en el genoma viral puede ser, por lo tanto, cualquier secuencia que codifique un péptido antigénico de un agente patógeno de aves. La secuencia de ácido nucleico según la presente invención se puede derivar de cualquier fuente, p. ej., viral, procariota, eucariota o sintética. Típicamente, las secuencias de nucleótidos codifican un péptido inmunogénico de un agente patógeno, y preferiblemente representan proteínas de superficie, proteínas secretadas o proteínas estructurales de dicho agente patógeno, o fragmentos de las mismas.

10 La secuencia de nucleótidos puede codificar, por ejemplo, un péptido antigénico derivado del virus de la gripe aviar, paramixovirus aviar de tipo 1, también denominado virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), metapneumovirus aviar, virus de la enfermedad de Marek, virus de la enfermedad de Gumboro, también denominado virus de la bursitis infecciosa (IBDV), virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILVT), virus de la bronquitis infecciosa (IBV), la Escherichia coli, especies de Salmonella, Pasteurella multocida, Riemerella anatipestifer, Ornithobacterium rhinotracheale, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, microorganismos micoplasmas infectando especies de aves o coccidios.

15 Preferencialmente, las secuencias de nucleótidos insertadas en el genoma viral se eligen entre la proteína F de NDV, la proteína VP2 de IBDV, la proteína gB de ILTV, la proteína 40K de Mycoplasma galisepticum y la proteína de superficie hemaglutinina (HA) del virus de la gripe aviar.

20 Diversas combinaciones de péptidos antigénicos pueden presentar un gran interés, dependiendo de varios factores, tales como la especie aviar, el país de cría, las condiciones de cría, etc.

25 Por ejemplo, en una realización, el herpesvirus aviar recombinante multivalente de la invención incorpora en su genoma la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína F de NDV y la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína VP2 de IBDV.

Según una realización particular, se pueden insertar tres o más secuencias de nucleótidos en el genoma viral.

30 El herpesvirus recombinante de la invención puede expresar dos o más antígenos de un mismo agente patógeno.

35 Las secuencias de nucleótidos homólogas o heterólogas que codifican los antígenos de interés se pueden unir operativamente a un promotor e insertarse además en el genoma viral. El promotor usado puede ser un promotor sintético o natural, endógeno o heterólogo.

El promotor no está limitado siempre que pueda funcionar eficazmente en células de aves infectadas con rHVT. Por lo tanto, la elección de un promotor se extiende a cualquier promotor eucariota, procariota o viral capaz de dirigir la transcripción génica en células aviares infectadas por el rHVT.

40 Preferencialmente, los promotores se eligen entre el promotor de la beta-actina (Bac) de pollo, el promotor Pec, el promotor ie1 del citomegalovirus murino (Mcmv), el promotor del citomegalovirus humano (Hcmv), el promotor del virus símico (SV)40 y el promotor del virus del sarcoma de Rous (VRS) o cualquier fragmento de los mismos que retenga una actividad promotora.

45 La secuencia de ácido nucleico de un promotor de Bac de pollo se muestra en la Id. de sec. n.º 1, la secuencia de un promotor Pec se muestra en la Id. de sec. n.º 2, la secuencia de un promotor ie1 de Mcmv se muestra en la Id. de sec. n.º 3, la secuencia de un promotor de Hcmv se muestra en la Id. de sec. n.º 4, la secuencia de un promotor de SV40 se muestra en la Id. de sec. n.º 5 y la secuencia de un promotor de VRS se muestra en la Id. de sec. n.º 6.

50 Cabe señalar que las variantes de dichas secuencias que codifican promotores funcionales son conocidas y/o se pueden diseñar o ensayar por un experto en la materia, para su uso en la presente invención.

55 En un herpesvirus recombinante preferido de la invención, al menos uno de los ácidos nucleicos comprende un promotor Pec o Bac para impulsar la expresión del péptido antigénico.

#### Construcción multivalente

60 La clonación génica y la construcción de plásmidos son bien conocidas por una persona con experiencia en la técnica y se pueden realizar esencialmente mediante técnicas de biología molecular estándar (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3.<sup>a</sup> edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, N.Y. 2001).

65 Para construir un herpesvirus recombinante multivalente de la presente invención, inicialmente, el herpesvirus se propaga en una célula huésped adecuada y después se obtiene el ADN genómico. El huésped y las condiciones para propagar el virus se seleccionan según corresponda. Como células huésped, se prefieren las células derivadas de pollo, y se pueden usar CEF (fibroblastos de embriones de pollo), células de riñón de pollo y similares. Se pueden

cultivar en un medio de cultivo tal como el medio de cultivo MEM de Eagle, L-15 de Leibovitz/5A de McCoy (mezcla 1:1) a aproximadamente 37 °C durante 3 a 4 días.

5 El ADN se extrae de las células infectadas por el virus cultivadas como se ha indicado anteriormente según un método convencional. Después de desnaturalizar la proteína en el tampón de lisis y eliminarla, el ADN se extrae con fenol y etanol.

10 Típicamente, los virus recombinantes se pueden preparar mediante recombinación homóloga entre el genoma viral y una construcción (p. ej., un plásmido) que comprende el ácido nucleico que se va a insertar, flanqueado por nucleótidos del sitio de inserción para permitir la recombinación.

Plásmido con secuencia de sitio de inserción

15 Una posibilidad de insertar un gen foráneo en una de las regiones no traducidas del genoma viral según la invención puede ser clonar primero una secuencia que contenga la región no traducida diana en un plásmido u otro vector adecuado. Como se describe en la presente memoria, dicha secuencia se elige entre la secuencia de la región ubicada entre UL44 y UL45, la secuencia de la región ubicada entre UL45 y UL46, la secuencia de la región ubicada entre US10 y SORF3, y la secuencia de la región ubicada entre SORF3 y US2. Los ejemplos de plásmidos comprenden pBR322, pBR325, pBR327, pBR328, pUC18, pUC19, pUC7, pUC8 y pUC9, los ejemplos de fagos comprenden el fago lambda y el fago M13, y el ejemplo de cósmidos comprende pHC79.

25 La secuencia de la región no traducida se integra en el plásmido según un método de clonación convencional. Las secuencias de la región de inserción son preferiblemente de suficiente longitud para que, tras la inserción del ácido nucleico, las secuencias que flanquean el ácido nucleico tengan una longitud adecuada para permitir la recombinación homóloga in vivo con el genoma viral. Preferiblemente, las secuencias flanqueantes deberán tener al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud.

30 Para insertar una o más secuencias foráneas en la región no traducida, la mutación puede llevarse a cabo en un sitio específico de la región no traducida para crear un nuevo sitio de escisión para las enzimas de restricción. Un método para llevar a cabo la mutación puede ser un método convencional, y se puede usar un método usado habitualmente por una persona experta en la técnica, tal como la mutagénesis in vitro y PCR. Por lo tanto, en el método de PCR, se lleva a cabo una mutación tal como la delección, el reemplazo o la adición de 1 a 2 nucleótidos en el cebador de PCR, y el cebador se usa después para crear una mutación.

35 Plásmido que contiene además una o varias secuencias de nucleótidos foráneas diana

Las secuencias de nucleótidos y promotores, para la inserción en el virus, se insertan además en la región de inserción del genoma viral en el plásmido.

40 Más justamente, las secuencias de nucleótidos y promotores se introducen en un fragmento de ADN genómico del herpesvirus que contiene secuencias de la región de inserción, subclonadas en el plásmido.

45 Si se desea, se puede preparar un plásmido que contenga dos o más secuencias de ácidos nucleicos foráneas, p. ej., derivadas del mismo o de diferentes agentes patógenos, estando dichas secuencias flanqueadas por secuencias de la región de inserción como se describe en la presente memoria.

Genoma viral que comprende una secuencia de nucleótidos foránea en un sitio de inserción

50 Los plásmidos en los que se ha insertado al menos una secuencia de nucleótidos en la región no traducida obtenida como se ha indicado anteriormente se pueden introducir en una célula infectada con HVT o en células transfectadas con genoma del HVT mediante electroporación, fosfato de calcio, un método basado en lipofectina o similares. Cuando la cantidad del plásmido que se va a introducir está en el intervalo de 0,1 a 1000 µg, la eficiencia de la generación de virus recombinantes mediante recombinación entre las regiones homólogas del ADN del HVT y el plásmido aumenta en las células.

55 Producción del herpesvirus recombinante multivalente

60 El multivalente de la invención se puede obtener cotransfectando en el mismo cultivo celular un plásmido que contiene, como se ha descrito anteriormente, una secuencia de sitio de inserción en la que está integrada una secuencia de nucleótidos foránea, y un herpesvirus recombinante que contiene, como se ha descrito anteriormente, el mismo sitio de inserción exento de secuencias de nucleótidos foráneas y un segundo sitio de inserción en el que se integra una secuencia de nucleótidos foránea distinta. Esta cotransfección resulta en la recombinación del ADN plasmídico en el genoma viral. De cualquier otra manera, el multivalente de la invención se puede obtener cotransfectando en el mismo cultivo celular dos plásmidos, conteniendo cada uno una secuencia de sitio de inserción distinta en la que está integrada una secuencia de nucleótidos foránea distinta, y un herpesvirus que contiene, como se ha descrito

anteriormente, los mismos sitios de inserción exentos de secuencia de nucleótidos foránea. La cotransfección resulta en la recombinación de ambos ADN plasmídicos en el genoma viral.

El virus recombinante multivalente resultante se puede seleccionar genotípicamente o fenotípicamente usando técnicas de selección conocidas, p. ej., mediante hibridación, detectando la actividad enzimática codificada por un gen cointegrado junto con las secuencias de ácido nucleico recombinantes o detectando el péptido antigénico expresado por el herpesvirus recombinante inmunológicamente. El herpesvirus recombinante seleccionado se puede cultivar a gran escala en cultivo celular, después de lo cual se pueden recolectar herpesvirus recombinantes que contienen péptidos.

Construcciones multivalentes preferidas

Un objeto de la invención es proponer herpesvirus recombinantes multivalentes que presenten al menos dos secuencias de nucleótidos foráneas, cada una de las cuales se inserta en un sitio de inserción particular, de manera adecuada para codificar y expresar los péptidos antigénicos correspondientes en células aviares.

Entre la pluralidad de posibles realizaciones basadas en las combinaciones de los sitios de inserción dirigida y las secuencias de nucleótidos recombinantes preferidas y, opcionalmente, los promotores preferidos, el solicitante ha descubierto sorprendentemente que combinaciones particulares presentan un alto nivel de estabilidad, lo que permite su uso para preparar vacunas multivalentes mejoradas.

Basándose en esta observación, un propósito de la invención es proponer herpesvirus aviares recombinantes multivalentes específicos con un alto nivel de estabilidad.

Los herpesvirus aviares recombinantes multivalentes de la invención comprenden dos secuencias de nucleótidos recombinantes, como se define en la reivindicación 1.

Los péptidos antigénicos preferidos de la invención se eligen entre la proteína F de NDV, la proteína VP2 de IBDV, la proteína gB de ILTV, la proteína 40K de Mycoplasma galisepticum y la proteína de superficie HA del virus de la gripe aviar.

De forma ventajosa, los promotores usados con secuencias de nucleótidos insertadas en el sitio de inserción entre UL44 y UL45 se eligen entre el promotor Pec, el promotor ie1 de Mcmv, el promotor de Hcmv, el promotor de SV40 y el promotor de VRS, o cualquier fragmento de los mismos que retenga una actividad promotora. De hecho, el solicitante ha descubierto sorprendentemente que el promotor de Bac insertado entre UL44 y UL45 no permite la expresión estable de un gen foráneo. Sin embargo, el promotor de Bac, insertado en la región entre UL45 y UL46, permite una expresión estable.

Según una primera realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende, insertada entre UL45 y UL46, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Pec, e insertada entre UL44 y UL45, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de SV40 (FW130).

Según una segunda realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Pec, y en el sitio de inserción entre UL44 y UL45 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de VRS (FW129).

Según una tercera realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Pec, y en el sitio de inserción entre UL44 y UL45 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW141).

Según una cuarta realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Pec, y en el sitio de inserción entre SORF3 y US2 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW144).

Según una quinta realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Pec, y en el sitio de inserción entre SORF3 y US2 una secuencia de

nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de Bac (FW146).

5 Según una sexta realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL44 y UL45 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Pec, y en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW143).

10 Según una séptima realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL44 y UL45 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv, y en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Bac (FW142).

15 Según una octava realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre SORF3 y US2 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Pec, y en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de Bac (FW147).

20 Según una novena realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de Bac, y en el sitio de inserción entre SORF3 y US2 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW145).

25 Según una décima realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de Bac, y en el sitio de inserción entre SORF3 y US2 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de SV40 (FW149).

30 Según una undécima realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de SV40, y en el sitio de inserción entre SORF3 y US2 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de Bac (FW148).

35 Según una duodécima realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Pec, y en el sitio de inserción entre US10 y SORF3 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW153).

40 Según una decimotercera realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Pec, y en el sitio de inserción entre US10 y SORF3 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de Bac (FW154).

45 Según una decimocuarta realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de Bac, y en el sitio de inserción entre US10 y SORF3 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW155).

50 Según una decimoquinta realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de Bac, y en el sitio de inserción entre US10 y SORF3 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Pec (FW156).

55 Según una realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv, y en el sitio de inserción entre US10 y SORF3 una

secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV o un fragmento de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Pec (FW161).

#### Cultivos celulares

5 Los virus recombinantes resultantes de la presente invención se pueden propagar en cultivos celulares en los que dicho virus recombinante se puede propagar y crecer. Después de alcanzar el crecimiento requerido de los virus, las células se pueden despegar de los pocillos utilizando un raspador o con tripsina, y las células infectadas se pueden separar del sobrenadante mediante centrifugación.

10 En las realizaciones preferidas de la invención, se pueden usar CEF, huevos embrionados, células de riñón de pollo y similares como células huésped para la propagación de herpesvirus recombinantes. Los virus recombinantes multivalentes de la presente invención se pueden cultivar en un medio de cultivo tal como el medio de cultivo MEM de Eagle, L-15 de Leibovitz/5A de McCoy (mezcla 1:1) a aproximadamente 37 °C durante 3 a 4 días. Por lo tanto, las células infectadas obtenidas se suspenden en un medio de cultivo que contiene sulfoxido de dimetilo (DMSO) al 10 % y se almacenan congeladas en nitrógeno líquido.

20 De forma ventajosa, los herpesvirus multivalentes recombinantes de la invención presentan un alto nivel de estabilidad a través de los subcultivos, lo que corresponde a una coexpresión de las secuencias de nucleótidos recombinantes en células de especies aviares aun después de 10 o más subcultivos. En el contexto de la invención, un “subcultivo” o “subcultivo celular” significa un cultivo de células en condiciones adecuadas para permitir su crecimiento y mantenerlas vivas hasta que tengan una confluencia del 90 % al 100 %. La etapa de subcultivo consiste en transferir un pequeño número de células del cultivo confluyente anterior a un nuevo medio de cultivo. Una alícuota del cultivo confluyente anterior, que contiene unas pocas células, se puede diluir en un gran volumen de medio nuevo. En el caso de cultivos adherentes, las células se pueden despegar primero, por ejemplo, usando una mezcla de tripsina y EDTA, o cualquier enzima adecuada, antes de usar un número reducido de células despegadas para sembrar un nuevo medio de cultivo.

30 Según las realizaciones preferidas de la invención, las células CEF transfectadas con herpesvirus aviares recombinantes de la invención aún coexpresan los péptidos antigénicos correspondientes después de al menos 10 subcultivos. En otras palabras, las células CEF resultantes de 10 o más subcultivos de células CEF transfectadas con herpesvirus aviares recombinantes de la invención y, más particularmente, resultantes de 15 subcultivos, aún contienen las secuencias de nucleótidos foráneas del herpesvirus aviar recombinante usado para la transfección celular inicial y expresan los al menos dos péptidos antigénicos correspondientes. En el contexto de la invención, se considera que las células de dicho subcultivo aún expresan los péptidos antigénicos si el nivel de producción es mayor del 80 % del nivel de producción del primer subcultivo, y preferencialmente mayor del 85 %.

#### Composiciones de vacunas multivalentes

40 La invención también se refiere a una vacuna multivalente para inmunizar especies aviares, tales como aves de corral, que comprende una cantidad inmunizante eficaz de un herpesvirus aviar recombinante multivalente de la invención.

45 Preferencialmente, las vacunas de la invención pueden causar, estimular o amplificar la inmunidad contra al menos dos agentes patógenos elegidos entre el paramixovirus aviar de tipo 1, el virus de la enfermedad de Gumboro, el virus de la laringotraqueítis infecciosa, *Mycoplasma galisepticum* y el virus de la gripe aviar.

Las vacunas de la invención comprenden una cantidad eficaz inmunológicamente de un herpesvirus recombinante multivalente de la invención, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 Un herpesvirus recombinante multivalente según la invención se puede usar preferiblemente como una vacuna con microbios vivos, aunque otras alternativas, como las vacunas inactivadas o las vacunas atenuadas, están dentro de las habilidades de una persona experta en la técnica.

55 La vacuna según la presente invención puede también comprender un disolvente adecuado, tal como, por ejemplo, un tampón acuoso o un tampón fosfato. Preferiblemente, la vacuna también comprende aditivos. Los aditivos de la presente invención se pueden obtener de cualquiera de un número de fuentes, que incluyen diversas proteínas y péptidos derivados de animales (p. ej., hormonas, citocinas, factores coestimuladores) y nuevos ácidos nucleicos derivados de virus y otras fuentes (p. ej., ARN bicatenario, CpG) y similares que se administran con la vacuna en una cantidad suficiente para mejorar la respuesta inmunitaria. Además, cualquier número de combinaciones de las sustancias mencionadas anteriormente puede proporcionar un efecto de inmunopotenciación y, por lo tanto, puede formar un inmunopotenciador de la presente invención.

65 Las vacunas de la presente invención se pueden formular además con uno o más aditivos adicionales para mantener la isotonicidad, el pH fisiológico y la estabilidad, por ejemplo, un tampón tal como solución salina fisiológica (0,85 %), solución salina tamponada con fosfato (PBS), tampones de citrato, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), solución salina tamponada con Tris y similares, o un antibiótico, por ejemplo, neomicina o estreptomina, etc.

5 La vía de administración puede ser cualquier vía, que incluye la administración oral, ocular (p. ej., mediante colirio),  
oculonasal con aerosol, intranasal o cloacal en el pienso, en el agua o mediante pulverización, en el huevo,  
tópicamente o mediante vacunación inyectable (p. ej., intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intraocular,  
intradérmica y/o intraperitoneal). La persona experta adaptará fácilmente la formulación de la composición de la  
vacuna para cada tipo de vía de administración.

10 Cada dosis de vacuna puede contener una dosis adecuada suficiente para inducir una respuesta inmunitaria protectora  
en las especies aviares. La optimización de dicha dosis es bien conocida en la técnica. La cantidad de antígeno por  
dosis se puede determinar mediante métodos conocidos usando reacciones antígeno-anticuerpo, por ejemplo,  
mediante el método ELISA.

15 Las vacunas de la invención se pueden administrar como dosis únicas o en dosis repetidas, dependiendo del protocolo  
de vacunación.

Las vacunas de la presente invención son además ventajosas porque confieren a las especies de aves hasta un 80 %  
de protección contra los agentes patógenos aviares diana después de 3 semanas de vacunación.

20 La presente invención además se refiere al uso de la vacuna como se ha descrito anteriormente para inmunizar  
especies aviares, tales como aves de corral, y al método para inmunizar especies aviares mediante la administración  
de una cantidad eficaz inmunológicamente de la vacuna según la invención. La vacuna se puede administrar de forma  
ventajosa por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, oral, en el huevo, mediante administración mucosa o  
mediante administración oculonasal.

25 La presente invención se refiere además a kits de vacunación para inmunizar especies aviares que comprenden una  
cantidad eficaz de la vacuna multivalente como se ha descrito anteriormente y un medio para administrar dichos  
componentes a dicha especie. Por ejemplo, dicho kit comprende un dispositivo de inyección relleno con la vacuna  
multivalente según la invención e instrucciones para la inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular o en el  
huevo. Alternativamente, el kit comprende un dispositivo de pulverización/aerosol o colirio relleno con la vacuna  
30 multivalente según la invención e instrucciones para la administración oculonasal, oral o mucosa.

La presente invención se explicará ahora en mayor detalle con referencia a los siguientes experimentos y ejemplos,  
pero no se debe considerar que la presente invención está limitada por estos experimentos y ejemplos.

### 35 Experimentos

En los experimentos, se han usado varios herpesvirus recombinantes (monovalentes o multivalentes según la  
invención), denominados de la siguiente manera (HVT/primer sitio de inserción-primer gen foráneo/segundo sitio de  
inserción-segundo gen foráneo):

40 FW122: HVT/45-46 Hcmv VP2 Bac F

FW123: HVT/44-45 Bac VP2,

45 FW125: HVT/45-46 Bac F/44-45 Hcmv VP2

FW129: HVT/45-46 PecF/44-45 Rsv VP2

50 FW130: HVT/45-46 PecF/44-45 SV40 VP2

FW135: HVT/45-46 sv40 F/44-45 Bac VP2

FW137: HVT/45-46 Pec F sv40 VP2

55 FW141: HVT/45-46 PecF/44-45 Mcmv ie1 VP2

FW142: HVT/45-46 Bac VP2/44-45 Mcmv ie1 F

60 FW144: HVT/45-46 Pec F/87-88 Mcmv ie1 VP2

FW145: HVT/45-46 Bac VP2/87-88 Mcmv ie1 F

FW023: HVT/45-46 Bac VP2

65 FW029: HVT/45-46 Pec F

## ES 2 636 464 T5

### Experimento 1: construcción de vectores de homología

La construcción de plásmidos se realizó esencialmente mediante las técnicas estándar de biología molecular (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3.<sup>a</sup> edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001).  
5 Los fragmentos de restricción de ADN se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se purificaron con el kit Plasmid plus Midi (QIAGEN, cat. # 12945)

#### Construcción de p44/45d46Sfi

10 Basado en la información del gen homólogo de gC (gCH) de MDV del serotipo 1 (Coussens y col., J. Virol. 62:2373-2379, 1988) y su fragmento BamHI-B adyacente (patente japonesa sin examinar con n.º de publicación H6-292583), un fragmento de ADN que tiene un sitio SfiI entre dos ORF, UL44 h y UL45h, se preparó mediante PCR y se clonó en pUC18. Primero, se preparó ADN de HVT a partir de células CEF infectadas con la cepa FC126 de HVT según el método de Lee y col. (J. Gen. Virol., 51: 245-253, 1980). Utilizando el ADN de HVT obtenido como plantilla, se realizó  
15 la PCR con dos pares de cebadores.

El primer par fue la sec. n.º 7 (5'-CCCCGAATTCATGGAAGAAATTTCC-3') y la sec. n.º 8 (5'-CGCGGGCCAATAAGGCCAACATCGGGACGTACATC-3').

20 El segundo par fue la sec. n.º 9 (5'-GCGCGGCCTTATTGGCCTTAAATACCGCGTTTGGAG-3') y la sec. n.º 10 (5'-CCCCAAGCTTCAAGTGATACTGCGTGA-3').

Usando la mezcla de los dos productos de PCR obtenidos como plantilla, se llevó a cabo otra PCR con la sec. n.º 7 y la sec. n.º 10 para generar un fragmento que tiene un sitio SfiI entre dos ORF, UL44 h y UL45h.

25 El fragmento resultante se digirió después con EcoRI y HindIII y se ligó a pUC18, que se había digerido con EcoRI y HindIII. El plásmido obtenido se denominó p44/45Sfi.

30 Para la construcción del HVT recombinante doble en el que se insertaron dos genes en UL44/45 y UL45/46 respectivamente, el gen UL46 se eliminó de p44/45Sfi. El p45/46Sfi (US 7569365) digerido con EcoRI y SfiI se ligó con el conector dSfiI-EcoRI, lo que resultó en el plásmido p44/45d46. El p44/45Sfi se escindió con SphI y PstI se ligó con p44/45d46 escindido con las mismas enzimas, lo que resultó en el plásmido p44/45d46Sfi.

#### Construcción de pHVT 87-88

35 Se preparó ADN de HVT a partir de células CEF infectadas con la cepa FC126 de HVT según el método de Lee y col. (J. Gen. Virol., 51: 245-253, 1980). Utilizando el ADN de HVT obtenido como plantilla, se realizó la PCR con dos pares de cebadores. Cada cebador se diseñó con la información de GenBank X68653.1. Un fragmento de ADN que tenía un sitio SfiI entre dos ORF, US2 (HVT088) y SORF3 (HVT087), se preparó mediante PCR y se clonó en pUC18.

40 El primer par fue la sec. n.º 11 (5'-GGGAATTCGAAGAGCCCCGCGGACGCATG-3') y la sec. n.º 12 (5'-CCGCTAGCGGCCGCAAGTTCCTTACCATGACCAG-3')

45 El segundo par fue la sec. n.º 13 (5'-GCGGCCGCTAGCGGCCTTATTGGCCGTAGCATAAAGACGCAGG-3') y la sec. n.º 14 (5'-CCAAGCTTCTAGTACATATATACATGAC-3')

El primer fragmento resultante se digirió con EcoRI y NheI. El segundo fragmento resultante se digirió con NheI y HindIII. Estos fragmentos escindidos se integraron en pUC18 escindido con EcoRI y HindIII, resultando en el plásmido pHVT 87-88.

50 Construcción de pHVT 86-87

Se preparó ADN de HVT a partir de células CEF infectadas con la cepa FC126 de HVT según el método de Lee y col. (J. Gen. Virol., 51: 245-253, 1980). Utilizando el ADN de HVT obtenido como plantilla, se realizó la PCR con dos pares  
55 de cebadores. Cada cebador se diseñó con la información de GenBank X68653.1. Un fragmento de ADN que tenía un sitio SfiI entre dos ORF, US 10 (HVT086) y SORF3 (HVT087), se preparó mediante PCR y se clonó en pUC18.

El primer par fue la sec. n.º 15 (5'-GGGGGAATTCATTATCCCATCTAACAGTTATATACG-3') y la sec. n.º 16 (5'-GCCGCTAGCGGCCGCTTTATTAACAACCTTAC-3')

60 El segundo par fue la sec. n.º 17 (5'-GCGGCCGCTAGCGGCCTTATTGGCC GTTTATTCTATGTAAGAC-3') y la sec. n.º 18 (5'-CCAAGCTTAAGTTCCTTACCATG-3')

65 El primer fragmento resultante se digirió con EcoRI y NheI. El segundo fragmento resultante se digirió con NheI y HindIII. Estos fragmentos escindidos se integraron en pUC18 escindido con EcoRI y HindIII, resultando en el plásmido pHVT 86-87.

Construcción del vector de homología

Promotor ie1 de Mcmv sintetizado químicamente

5 El promotor ie1 de Mcmv (sec. n.º 19) se sintetizó a partir de la información de 4191-4731 pb en la genoteca L06816.1 comunicada por Koszinowski, U. H. El promotor ie1 de Mcmv sintetizado se diseñó añadiendo sitios BglI-PstI delante de él y sitios XbaI-NotI al final.

10 SEC. N.º 19: GGCCAATAAG GCTGCAGTAC TGAGTCATTA GGGACTTTCC  
 AATGGGTTTT GCCCAGTACA TAAGGTCAAT AGGGGTGAAT CAACAGGAAA  
 15 GTCCCATTTG AGCCAAGTAC ACTGAGTCAA TAGGGACTTT CCATTGGGTT  
 TTGCCCAGTA CAAAAGGTCA ATAGGGGGTG AGTCAATGGG TTTTCCCAT  
 TATTGGCAGC TACATAAGGT CAATAGGGGT GAGTCATTGG GTTTTTCCAG  
 20 CCAATTTAAT TAAAACGCCA TGTACTTTCC CACCATTGAC GTCAATGGGC  
 TATTGAACT AATGCAACGT GACCTTTAAA CGGTACTTTC CCATAGCTGA  
 25 TTAATGGGAA AGTACCGTTC TCGAGCCAAT ACACGTCAAT GGGAAGTGAA  
 AGGGCAGCCA AAACGTAACA CCGCCCCGGT TTTCCCCTGG AAATTCCATA  
 TTGGCAGCA TTCTATTGGC TGAGCTGCGT TCTACGTGGG TATAAGAGGC  
 30 GCGACCAGCG TCGGTACCGT CGCAGTCTTC GGTCTGACCA CCGTAGAACG  
 CAGAGCTCCT CGCTGCAGGC GGCCGCTCTA GA

35 Construcción de p44/45 Mcmv ie1 VP2 SPA

El p44-45d46Sfi escindido por SfiI se desfosforiló usando fosfatasa alcalina Shewanella sp. S1B1 recombinante (PAP) (Funakoshi #DE110). El fragmento se ligó con p45/46BacVP2 escindido por BglI, resultando en el plásmido, p44/45d46 BacVP2. El promotor ie1 de Mcmv sintetizado (BglI/XbaI) se ligó con p44/45d46 BacVP2 escindido con EcoRV y XbaI, y p44/45d46 Bac VP2 escindido con EcoRV y BglI, resultando en p44/45d46 Mcmv ie1 VP2. La señal poliA corta sintetizada (SPA: sec. n.º 20: CTGCAGGCGGCCGCTCTAGAGTCGACAATAAAAGATCTTTATTTCATTAGATC (TGTGTGTTGTTTTTGTGTGGCCAATAAGGCC) se integró en p44/45d46 Mcmv ie1 VP2 escindido con Sall y SfiI, resultando en el plásmido de homología, p44/45d46 Mcmv ie1 VP2 SPA.

45 Experimento 2: purificación del HVT recombinante en CEF transfectados con cada vector de transferencia

El ADN viral de la cepa FC126 natural del HVT (wt-HVT) se preparó como se describe en Morgan y col. (Avian Diseases, 34:345-351, 1990). Los ADN virales de FW029 (rHVT/45-46PecF) y FW023 (rHVT/45-46BacVP2) se prepararon con un método similar. El primer patrón de rHVT doble fue que las células CEF se transfectaron con el ADN wt-HVT y p45/46sv40VP2 PecF preparados (p. ej., FW137). El segundo patrón fue que las células CEF se transfectaron con el ADN de FW029 y p44/45 Mcmv ie1 VP2 preparados (p. ej., FW141). El tercer patrón fue que las células CEF se transfectaron con el ADN de FW023 y p44/45 Mcmv ie1 F preparados (p. ej., FW142). El cuarto patrón fue que los CEF se transfectaron con el ADN de FW029 y pHVT87-88Bac VP preparados (p. ej., FW144). El quinto patrón fue que los CEF se transfectaron con el FW023 y pHVT87-88Bac F preparados (p. ej., FW145). Estos virus recombinantes resultantes se purificaron en placas mediante la tinción de placas con el anticuerpo anti-NDV-F y el anticuerpo anti-IBDV-VP2.

En resumen, se suspendieron 107 células CEF primarias en 100 µl de MEF-1 (Lonza LNJD-1004) y se cotransfectaron con 1 µg del vector de homología, por ejemplo, p44/45 Mcmv ie1 F y pHVT Bac VP2, y 2 µg de ADN del HVT, por ejemplo, FC126, FW029 and FW023 mediante electroporación. La electroporación se realizó en Nucleofector II. Las células transfectadas se diluyeron en 20 ml de L-15 de Leibovitz (GIBCO BRL, n.º cat. 41300-39), medio 5A de McCoy (GIBCO BRL, n.º cat. 21500-061) (1:1) y suero de ternera al 4 % (denominado solución de medio LM (+)), distribuidas en 100 µl por pocillo de una placa de 96 pocillos.

65 Se incubaron a 37 °C en CO2 al 5 % hasta que las placas se hicieron visibles, las células se despegaron de las placas mediante tripsinización, se diluyeron en células CEF secundarias recién preparadas, se transfirieron por igual a dos

placas de 96 pocillos y se incubaron durante 3 días para visualizar las placas. A continuación, una de las dos placas se tiñó con el anticuerpo monoclonal anti-VP2 R63 (ATCC #: HB-9490) como el anticuerpo primario. Después de detectar el pocillo que contenía las placas recombinantes teñidas, se recuperaron las células del pocillo correspondiente de la otra placa, se diluyeron en células CEF secundarias nuevas y se transfirieron por igual a dos placas de 96 pocillos para completar la primera ronda de purificación. El procedimiento de purificación se repitió hasta que cada placa obtenida se tiñó positivamente con el anticuerpo monoclonal R63. Después, el candidato rHVT doble se tiñó con el anticuerpo anti-NDV-F 3-1G/5 (Morrison, T. G., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 84: 1020-1024, 1987) o suero de conejo anti F. Finalmente, la expresión de las proteínas de todas las placas del rHVT candidato se confirmó mediante tinción con IFA dual. Los CEF infectados por cada rHVT se fijaron con acetona-metanol (2:1) frío, se lavaron con PBS y se hicieron reaccionar con una mezcla de anticuerpos (suero de conejo anti F #35 diluido a 1:1000 y AcM R63 murino anti-VP2) a 37 °C en 60 minutos. Después de lavarse 3 veces con PBS, se hizo reaccionar las células con una mezcla de anticuerpos fluorescentes (Alexa Fluor 488 anticonejo diluido a 1:1000 y Alexa Fluor 546 anti-ratón, proporcionados por Invitrogen) a 37 °C en 60 minutos. Después de lavar 3 veces con PBS, se observan con un microscopio de fluorescencia con un aumento de 400 veces. La expresión de la proteína VP2 se detectó mediante el AcM anti-VP2 (R63) y Alexa Fluor 546. La expresión de la proteína F se detectó mediante el suero de conejo anti-F #35 y Alexa Fluor 488. Cuando todas las placas se expresaron tanto en F como en VP2, concluimos que la purificación se había completado. La Figura 3 muestra algunos ejemplos de IFA dual. El HVT recombinante purificado se denominó rHVT/ND/IBD.

La Tabla 1 a continuación muestra la expresión de las proteínas VP2 y F obtenidas de los diferentes rHVT/ND/IBD. La cepa FW023 (HVT/45-46 Bac VP2) corresponde a un herpesvirus recombinante monovalente usado como control para la expresión de VP2, y FW029 (HVT/45-46 PecF) corresponde a un herpesvirus recombinante monovalente usado como control para la expresión de la proteína F.

Tabla 1. Expresión de los genes NDV-F e IBDV-VP2 insertados mediante rHVT/ND/IBD (detección de fluorescencia)

Virus	Anticuerpo primario		
	Antisuero anti-F	Anticuerpo monoclonal anti-VP2 (R63) de conejo	PBS
FW137	+d	+d	-
FW129	+	+	-
FW130	+	+	-
FW141	+	+	-
FW142	+	+	-
FW144	+	+	-
FW145	+	+	-
FW029	+	-	-
FW023	-	+	-
FC126	-	-	-
Ninguno	-	-	-

+: detectado, +d; detectado débilmente, -: no detectado

#### Experimento 3: coexpresión de dos proteínas en CEF infectadas con HVT recombinante doble

Se infectaron 2 ml que contenían  $2 \times 10^5$  células CEF con HVT recombinantes y se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 3 días.

A continuación, el cultivo se centrifugó a 300 g durante 3 minutos y las células precipitadas se resuspendieron en 100  $\mu$ l. Se añadió tampón Laemmli (100  $\mu$ l) a la suspensión celular. La mezcla resultante se hirvió después durante 5 minutos y 5  $\mu$ l de la misma se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS al 10 %. Las proteínas sometidas a electroforesis se transfirieron del SDS-GEL a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore), que se bloqueó en leche en polvo desnatada al 1 % p/v en PBS a temperatura ambiente durante una hora.

Para la detección de F (Figura 4A), la membrana tratada se hizo reaccionar después con el antisuero de conejo anti-F #35 en una dilución de 500 veces a temperatura ambiente durante una hora, se lavó tres veces con PBS y se incubó durante una hora con el antisuero de cabra anticonejo biotinilado.

Para la detección de VP2 (Figura 4B), la membrana tratada se hizo reaccionar después con el AcM R63 anti-VP2 en una dilución de 500 veces a temperatura ambiente durante una hora, se lavó tres veces con PBS y se incubó durante una hora con el antisuero de cabra anti-ratón biotinilado.

5 Después de lavar tres veces con PBS, la membrana se incubó durante una hora con un complejo de avidina-fosfatasa alcalina, se lavó tres veces con PBS y una vez con TBS (solución salina tamponada con Tris) y se hizo reaccionar con BCIP-NBT (un sustrato de fosfatasa alcalina). Según muestra la Figura 4A, se observó una banda proteica de 60 kilodaltons (kDa) solo en el carril con células infectadas por rHVT/ND/IBD, que era el tamaño esperado de la proteína F (■). No había ninguna banda en el carril de rHVT/44-45BacVP2 (FW123).

La Figura 3B mostró que la proteína VP2 se observó a 38 kilodaltons (kDa) en los carriles de cada rHVT/ND/IBD (⇒). Por el contrario, no había ninguna banda en el carril de rHVT/PecF (FW029) (Figura 1B). La proteína VP2 madura es la de 38 kDa (A. A. Azad y col., 1987, Virol. 161:145-152, K. J., Fahey y col., 1985 J. Gen. Virol. 66:1479-1488).

15 Los HVT recombinantes dobles según la invención expresaron tanto NDV-F como IBDV VP2.

Experimento 4: verificación de la estructura genómica

20 Análisis por transferencia de Southern

El rHVT/ND/IBD purificado se propagó en células CEF de un matraz de 25 cm<sup>2</sup> para obtener las placas confluentes. Las células se recuperaron de las placas raspándolas, se transfirieron a tubos Falcon y se sometieron a centrifugación a 300 xg durante 5 minutos. Las células recolectadas se lavaron con PBS, se resuspendieron en 0,6 ml de PBS y 0,4 ml de tampón de lisis (TritonX-100 al 1,25 %, 2-ME 250 mM y EDTA 50 mM en PBS) y se lisaron mediante agitación vorticial durante 3 minutos. A continuación, los productos de lisado se centrifugaron a 600 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente y los sobrenadantes se transfirieron a tubos Falcon de 15 ml. Los virus se recogieron por centrifugación a 20 400 xg durante 20 minutos. Los sedimentos resultantes se suspendieron después en 0,33 ml de una solución de nucleasa (Tris-Cl 12,5 mM (pH 7,5), desoxirribonucleasa I 1 µg/ml y ribonucleasa A 1 µg/ml), se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y se rompieron incubando a 55 °C durante 30 minutos con 83 µl de solución de SDS-proteasa (EDTA 50 mM, SDS al 5 %, proteasa K 0,5 mg/ml y 2-mercaptoetanol 28,5 mM). La mezcla obtenida se trató dos veces con fenol-cloroformo y se añadió NaCl a la fase acuosa hasta la concentración final de 0,2 M. El ADN viral se precipitó añadiendo 2,5 volúmenes de etanol helado, se lavó con etanol al 70 % y se sometió a centrifugación a 20 400 xg durante 20 minutos a 4 °C. Después del secado al aire, los sedimentos se disolvieron en tampón TE (Tris-Cl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM).

El ADN viral del tampón TE se digirió con XhoI, SphI y SmaI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. Los fragmentos de ADN sometidos a electroforesis en el gel único se transfirieron simultáneamente a dos membranas de nailon (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.<sup>a</sup> edición, 6.35, Sambrook, J., and Russell, D.W. Cold Spring Harbor Laboratory). Después de fijar el ADN mediante horneado, el ADN inmovilizado se hibridó con una sonda marcada con DIG, “sonda VP2” o “sonda IS44/45”, que se preparó con el kit de síntesis de sondas PCR DIG (ROCHE DIAGNOSTICS, n.º cat. 1636090). Además, el ADN viral del tampón TE se digirió con XhoI y SphI y se hibridó con la sonda marcada con DIG, “sonda F”, “sonda IS45/46” mediante el mismo procedimiento mencionado anteriormente. La sonda VP2 se preparó con VP2 STC-F (Id. de sec. n.º 21) y VP2 STC-R (Id. de sec. n.º 22) como cebadores y p45/46BacVP2-STC como plantilla. La sonda F se preparó con F-F (Id. de sec. n.º 23) y F-R (Id. de sec. n.º 24) como cebadores y p45/46PecF como plantilla. La sonda IS45/46 se preparó con 45/46-F (Id. de sec. n.º 25) y 45/46-R (Id. de sec. n.º 26) como cebadores y pNZ45/46Sfi como plantilla. La sonda IS44/45 se preparó con 44/45-F (Id. de sec. n.º 27) y 44/45-R (Id. de sec. n.º 28) como cebadores y pNZ44/45d46Sfi como plantilla.

50 VP2 STC-F (Id. de sec. n.º 21) 5'-CACCGTCCTCAGCTTACCCACATC-3'  
 VP2 STC-R (Id. de sec. n.º 22) 5'-ACGACGGATCCTGTTGCCACTCT-3'  
 NDV-F-F (Id. de sec. n.º 23) 5'-CTAGCAGTGGCAGTTGGGAAGAT-3'  
 NDV-F-R (Id. de sec. n.º 24) 5'-GTTAAGGCAGGGGAAGTGATTTGT-3'  
 55 45/46-F (Id. de sec. n.º 25) 5'-GGGGAAGTCTTCCGGTTAAGGGAC-3'  
 45/46-R (Id. de sec. n.º 26) 5'-GGTGCAATTCGTAAGACCGATGGG-3'  
 44/45-F (Id. de sec. n.º 27) 5'-GTACTATAGAATGTGTTCC-3'  
 60 44/45-R (Id. de sec. n.º 28) 5'-GTATCCAACGCCTCAAGATC-3'

Los resultados de la transferencia de Southern mostraron (Figuras 5A-5D) que un fragmento de 2077 pb se hibridó con la sonda VP2 en el ADN de FW129. Por el contrario, no se detectó ninguna banda en p45/46Pec F.

65 Además, el fragmento de 2744 pb se hibridó con la sonda F en el ADN de cada HVT recombinante doble. No se detectó ninguna banda en el p45/46 Sfil. Fragmentos de 2077 pb y 1228 pb con la sonda IS44/45 en el ADN de FW129.

## ES 2 636 464 T5

Fragmento de 1350 pb con la sonda IS44/45 en p45/46 PecF, no se insertó ningún gen en el sitio IS44/45. Fragmentos de 2744 pb y 770 pb de la sonda IS45/46 en el ADN de cada HVT recombinante doble. La Figura 5A-5D indicó que los HVT/ND/IBD recombinantes dobles obtenidos tienen la estructura genómica esperada.

### 5 Experimento 5: estabilidad de los HVT recombinantes en el subcultivo

Análisis por inmunoelectrotransferencia

10 Se subcultivaron en serie HVT recombinantes dobles (hasta 15 veces) en fibroblastos de embriones de pollo (CEF). Después, se aplicaron los lisados celulares al análisis por inmunoelectrotransferencia. En un primer panel (Figura 6A), se hizo reaccionar la transferencia con un suero de conejo anti-F (#35). En un segundo panel (Figura 6B), se hizo reaccionar la transferencia con un AcM anti-VP2 (R63). Simulacro: CEF M no infectado: Patrones Precision Plus Protein de Bio-Rad #161-0374

15 Después de 15 subcultivos, F y VP2 se expresaron de manera estable en CEF infectados con HVT recombinante doble. Sin embargo, FW137 no expresó ninguna señal de los antígenos F y VP2 después de 15 subcultivos, lo que indica que el HVT recombinante que tiene dos genes en el sitio único es inestable.

Análisis por transferencia de Southern

20

M: Marcador molecular lambda digerido con HindIII

TP-24: plásmido de transferencia p44-45d46SV40VP2

25 TP-25: plásmido de transferencia p44-45d46RsvVP2

30 Cada rHVT/ND/IBD se subcultivó quince veces en células CEF y se sometió a un análisis por transferencia de Southern como se describe en el Experimento 4. Los resultados fueron los mismos que los obtenidos en el Experimento 4, lo que indica que el virus recombinante era estable aun después de 15 subcultivos. Los resultados de la transferencia de Southern mostraron en la Figura 7A que un fragmento de 2077 pb se hibridó con la sonda VP2 en el ADN de FW129. El fragmento de 2334 pb se hibridó con la sonda VP2 en el ADN de FW130. Por el contrario, no se detectó ninguna banda en p45/46Pec F.

35 La Figura 7C muestra que un fragmento de 2744 pb se hibridó con la sonda F en el ADN de cada HVT recombinante doble. No se detectó ninguna banda en el p45/46 Sfil.

40 La Figura 7B muestra que los fragmentos de 2077 pb y 1228 pb se hibridaron con la sonda IS44/45 en el ADN de FW129, y los fragmentos de 2334 pb y 1022 pb se hibridaron con la sonda IS44/45 en el ADN de FW130. El fragmento de 1350 pb se hibridó con la sonda IS44/45 en p45/46 PecF, que no contenía ningún gen en el sitio IS44/45.

45 La Figura 7D muestra que los fragmentos de 2744 pb y 770 pb se hibridaron con la sonda IS45/46 en el ADN de cada HVT recombinante doble.

La transferencia de Southern con la sonda 44/45 y la sonda 45/46 mostró que el gen VP2 o el gen F se mantenían estables en el sitio de inserción 44/45 o 45/46, respectivamente, en FW129 y FW130.

Experimento 6: título de ELISA anti-NDV e IBDV en pollos inoculados con HVT recombinantes dobles

50 Se inocularon 3000 UFP/200 µL/ave de cada rHVT/ND/IBD por vía subcutánea en el lomo de diez pollos SPF de un día de edad (LineM, Japan Biological Laboratories) utilizando una jeringa de calibre 20. A partir de las tres semanas posteriores a la vacunación, se recogió el suero de las aves vacunadas. El título de anticuerpos anti-NDV se midió mediante un kit de ELISA comercial (IDEXX, kit de ELISA para diagnosticar la enfermedad de Newcastle). El anticuerpo anti-IBDV se valoró mediante un kit de ELISA comercial, kits de prueba de anticuerpos contra la bursitis infecciosa para comprobación de bandadas (IDEXX Laboratory, Inc.). A los pollos del grupo de control negativo (no inmunes) no se les administró ninguna vacuna.

55 La Figura 8A muestra el cambio del título de anti-NDV. La Figura 8B muestra el cambio del título de anti-IBDV. El HVT recombinante doble que usó dos sitios indujo de manera estable ambos títulos de anti-NDV y anti-IBDV.

### 60 Experimento 7: eficacia de rHVT/ND/IBD en pollos SPF contra NDV

La eficacia de rHVT/ND/IBD (FW130, FW135, FW137, FW129) como vacuna contra la ND se evaluó utilizando el ensayo de eficacia como vacuna contra la enfermedad de Newcastle.

65 Se inocularon 3.000 UFP/200 µL/ave de cada rHVT/ND por vía subcutánea en el lomo de diez pollos SPF de un día de edad (LineM, Japan Biological Laboratories) utilizando una jeringa de calibre 20. A partir de las tres semanas

posteriores a la vacunación, se recogió el suero de las aves vacunadas y se midió el título de anticuerpos anti-NDV mediante un kit de ELISA comercial (IDEXX, kit de ELISA para diagnosticar la enfermedad de Newcastle).

5 Los pollos del grupo de control positivo se vacunaron a los 14 días de edad con una vacuna con microbios vivos comercial contra el NDV según las recomendaciones del vendedor. A los pollos del grupo de control negativo no se les administró ninguna vacuna.

10 A los 43 días de edad (42 días después de la vacunación), los pollos de los siete grupos fueron expuestos a 103EID50 de NDV-TexasGB, la cepa de exposición estándar en los Estados Unidos, por vía intramuscular en la región femoral. Los pollos expuestos se observaron diariamente para comprobar la mortalidad y detectar cualquier síntoma de la enfermedad de Newcastle.

Tabla 2. Experimentos de exposición con pollos SPF vacunados con rHVT/ND/IBD con NDV virulento

Vacunación	Dosis (UFP/pollos)	N.º de pollos	N.º de síntomas/total (%)	Título HI (ELISA) en la eclosión	Título de ELISA en la prueba de exposición
FW130	3000	10	0/10 (0)	0	0,649
FW135	3600	10	2/10(20)		0,085
FW137	3600	10	3/10(30)		0,050
FW129	3000	10	0/10(0)		0,233
FW029	4000	10	0/10(0)		0,544
Vacuna con microbios vivos NDV comercial	En la etiqueta	10	0/10 (0)		1,089
Controles con exposición	N	10	11/12(92)		0,089
Controles sin exposición	N	10	0/5 (0)		N

35 Como se muestra en la Tabla 2, los pollos vacunados con rHVT/ND/IBD de la invención no mostraron ningún signo clínico y el título de ELISA el día de la prueba de exposición fue significativamente elevado. Como era de esperar, los dos pollos vacunados con FW137 (en donde se insertan dos secuencias de nucleótidos recombinantes en el mismo sitio de inserción) o FW135 (en donde el promotor de Bac se inserta entre UL44 y UL45) muestran signos clínicos y el título del ELISA fue débil.

Experimento 8: eficacia de rHVT/ND/IBD en pollos SPF contra IBDV

40 La eficacia de FW129 y FW141 (HVT/45-46 PecF/44-45 Mcmv ie1 VP2) como vacuna contra la IBD se evaluó exponiendo la STC de IBDV.

45 En primer lugar, se inocularon 2000 UFP de rHVT/ND/IBD en huevos de gallina embrionados SPF el día 18 o por vía subcutánea en el lomo de pollos SPF de un día de edad. A las tres semanas de edad, los pollos vacunados fueron expuestos por vía oral a 103.5EID50/ave de STC de IBDV. Una semana después, se pesaron todos los pollos y se les hizo una necropsia para recuperar la bolsa de Fabricio, que se observó para detectar cualquier lesión causada por la bursitis infecciosa.

50 La protección se evaluó mediante dos criterios que son los siguientes. (1) La relación de peso de la bolsa y el cuerpo (índice B/B) no fue estadísticamente diferente de la de los pollos no vacunados ni expuestos. (2) No se detectó ninguna malformación de la bolsa de Fabricio, tal como edematización, hemorragia, exudado amarillento, decoloración, atrofia o exudado gelatinoso. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Experimentos de exposición con pollos SPF vacunados con rHVT/ND/IBD con IBDV virulento

Vacunación		N.º protegidos/total (%)
Vacuna	Vía	(%)
FW129	SC	7/8 (88 %)
FW141	SC	8/8 (100 %)
FW023	SC	8/8 (100 %)
FW129	En el huevo	8/10 (80 %)
FW141	En el huevo	9/10 (90 %)

## ES 2 636 464 T5

FW023	En el huevo	9/10 (90 %)
Ninguna	N	0/4 (0 %)
Ninguna	N	5/5 (100 %)

Más del 80 % de todos los pollos vacunados estaban protegidos contra la exposición a la cepa STC de IBDV, lo que indica que rHVT/ND/IBD puede inducir una inmunidad protectora en los pollos contra el IBDV virulento.

Experimento 9: ensayo de exposición a IBDV a las 8 semanas en pollos con MDA+

Grupos:

G1: NVNE (no vacunado ni expuesto)

G2: ENV (expuesto no vacunado)

G3: FW141

G4: FW144

G5: FW023 (control positivo)

Pollos

Aves MDA+ (ponedoras), de 16 a 17 aves/grupo en cada grupo.

Se inocularon tres mil UFP de vacunas por vía subcutánea en el lomo de 16 a 17 pollos MDA+ de un día de edad. A las 8 semanas de edad, los pollos vacunados fueron expuestos por vía oral a 103 TCID50/ave de STC de IBDV. Una semana después, se pesaron todos los pollos y se les hizo una necropsia para recuperar la bolsa de Fabricio, que se observó para detectar cualquier lesión causada por la bursitis infecciosa.

La protección se evaluó mediante los dos criterios siguientes: (1) La relación de peso de la bolsa y el cuerpo (índice B/B); (2) No se detectó ninguna malformación de la bolsa de Fabricio, tal como edematización, hemorragia, exudado amarillento, decoloración, atrofia o exudado gelatinoso. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla.

	<b>N</b>	<b>Índice B/B</b>	<b>Muerte</b>	<b>Lesión</b>	<b>% de protección</b>
NVNE	16	1,00	0	0/16	-
ENV	16	0,44	1	16/16	0
FW141	16	0,94	0	2/16	88
FW144	16	0,93	1	5/16	69
FW023	17	0,98	0	3/17	82

Estos resultados muestran que la vacuna multivalente de la invención causa una protección eficaz in vivo contra el IBDV.

Experimento 10: ensayo de exposición a NDV a las 8 semanas en pollos con MDA+

Grupo

G1: control con exposición

G2: FW141

G3: FW144

G4: FW145

G5: FW029 (control positivo)

Pollos

Aves MDA+ (ponedoras), 17 aves/grupo en cada grupo.

## ES 2 636 464 T5

Se inocularon tres mil UFP de vacunas por vía subcutánea en el lomo de 17 pollos MDA+ de un día de edad. A las 8 semanas de edad, los pollos vacunados fueron expuestos a 103 EID50 de NDV-TexasGB, la cepa de exposición estándar en los Estados Unidos, por vía intramuscular en la región femoral. Los pollos expuestos se observaron diariamente para comprobar la mortalidad y detectar cualquier síntoma de la enfermedad de Newcastle. Los resultados se presentan a continuación.

% de protección contra el síntoma de muerte en aves expuestas e inmunizadas					
Control con exposición	17	13	13	0	0,0
FW141	17	15	1	0	93,3
FW144	17	15	3	1	73,3
FW145	17	13	0	0	100,0
FW029	17	16	3	0	81,3
* algunos síntomas del NDV sin muerte					

Estos resultados muestran que la vacuna multivalente de la invención causa una protección eficaz in vivo contra el NDV y IBDV. La protección es potente y estable.

# ES 2 636 464 T5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CEVA SANTE ANIMALE

<120> Herpesvirus aviaries recombinantes multivalentes y vacunas para inmunizar especies aviaries

<130> B1326PC00

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1506

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Promotor de Bac

<400> 1

```

tgcagctcag tgcattgcac ctcatctgcc atcctctacc ctgcctctcc tgctggcgcg      60
ccccgggagg tgacttcaag gggaccgcag gaccacctcg ggggtggggg gagggctgca      120
cacgcggacc ccgctcccc tccccaaaca agcactgtgg aatcaaaaag gggggagggg      180
ggatggaggg gcgcgtcaca cccccgcccc acaccctcac ctcgaggtga gccccacggt      240
ctgcttcact ctccccatct cccccccctc cccacccccca attttgtatt tatttatttt      300
ttaattattt tgtgcagcga tgggggcggg gggggggggg gcgcgcgcca ggcggggcgg      360
ggcggggcca ggggcggggg ggggcgaggg ggagaggtgc ggcggcagcc aatcagagcg      420
gcgcgctccg aaagtctcct tttatggcga ggcggcggcg ggcgggccc tataaaaagc      480
gaagcgcgcg gcgggcggga gtcgctgcgc gctgccttcg ccccgctccc cgtccgccc      540
ccgcctcgcg ccgcccgcgc cggctctgac tgaccgcggt actcccacag gtgagcgggc      600
gggacggccc ttctcctccg ggctgtaatt agcgtttggt ttaatgacgg ctcgtttcct      660
ttctgtggct gcgtgaaagc cttaaagggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc      720
ggctcggggg gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg ctccgcgctg      780
cccggcggct gtgagcgcgt cgggcgcggc gcggggcttt gtgcgctccg cagtgtgcgc      840
gaggggagcg cggccggggg cggctccccg cgtgcggggg ggggctgcga ggggaacaaa      900
ggctgcgtgc ggggtgtgtg cgtggggggg tgagcagggg gtgtgggccc ggcggtcggg      960
ctgtaacccc ccctgcacc cccctccccg aagtgtctga gcacggcccc gcttcgggtg      1020
cggggctccg tgcggggcgt ggcgcggggc tcgccgtgcc gggcgggggg tggcggcagg      1080
tgggggtgcc gggcggggcg gggccgcctc gggccgggga gggctcgggg gaggggcgcg      1140
gcggcccccg gagcgcggcg ggctgtcgag gcgcggcgag ccgcagccat tgccttttat      1200
ggtaatcgtg cgagagggcg cagggacttc ctttgtccca aatctgtgcg gagccgaaat      1260

```

ES 2 636 464 T5

ctgggaggcg ccgcgcacc ccctctagcg ggcgcggggc gaagcgggtgc ggcgccggca 1320  
 ggaaggaaat gggcggggag ggccttcgtg cgtcgcgcgc ccgcgcgtccc cttctccatc 1380  
 tccagcctcg gggctgtccg cagggggacg gctgccttcg ggggggacgg ggcagggcgg 1440  
 ggttcggctt ctggcgtgtg accggcgggg tttatatctt cccttctctg ttctccgca 1500  
 gcccc 1506

<210> 2

<211> 557

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Promotor Pec

<400> 2

tgcagagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagcca tatatggagy 60  
 tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgcgggctga ccgcccaacg acccccggcc 120  
 attgacgtca ataatgacgt atgytcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg 180  
 tcaatgggtg gagtayttac ggtaaactgc ccattggcag tacatcaagt gtatcatatg 240  
 ccaagtacgc ccctattga cgtcaatgac ggtaaatgga tgcagtattt tgtgcagcga 300  
 tgggggcggg gggggggggc gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg 360  
 ggcgagggcg agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt 420  
 tatggcgagg cggcggcggc ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc gggcgggagt 480  
 cgctgcgcgc tgccttcgcc ccgtgccccg ctccgcgcgc gcctcgcgcc gcccgccccg 540  
 gctctgactg accgcgt 557

<210> 3

<211> 541

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Promotor ie1 de Mcmv

<400> 3

ES 2 636 464 T5

tactgagtea ttagggactt tccaatgggt tttgccagc acataaggc aataggggtg 60  
aatcaacagg aaagtcccat tggagccaag taaactgagt caataggac tttccattgg 120  
gttttgccca gtacaaaagg tcaatagggg gtgagtcaat gggtttttcc cattattggc 180  
acgtacataa ggtcaatagg ggtgagtcac tgggtttttc cagccaattt aattaaaacg 240  
ccatgtactt tcccaccatt gacgtcaatg ggctattgaa actaatgcaa cgtgaccttt 300  
aaacggtact ttcccatagc tgattaatgg gaaagtaccg ttctcgagcc aatacacgtc 360  
aatgggaagt gaaagggcag ccaaaaacgta acaccgcccc ggttttcccc tggaaattcc 420  
atattggcac gcattctatt ggctgagctg cgttctacgt ggggtataaga ggcgcgacca 480  
gcgctcggtac cgtcgcagtc ttcggctctga ccaccgtaga acgcagagct cctcgtgca 540  
g 541

<210> 4

<211> 589

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Promotor de Hcmv

<400> 4

gagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60  
cgttacataa cttacggtaa atggcccggc ggctgaccgc ccaacgacct ccgccattg 120  
acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa 180  
tgggtggagt atttacggta aactgcccac tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa 240  
gtacgccccc tattgacgtc aatgacggta aatggcgcgc ctggcattat gcccagtaca 300  
tgaccttatg ggaacttctc acttggcagt acatctacgt attagtcate gctattacca 360  
tgggtgatgag gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat 420  
ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg 480  
actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac 540  
ggtgggaggt ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg tcagatcct 589

<210> 5

<211> 646

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Promotor de SV40

<400> 5

ES 2 636 464 T5

gcgcagcacc atggcctgaa ataacctctg aaagaggaac ttggttaggt accttctgag 60  
 gcggaagaa ccagctgtgg aatgtgtgtc agttaggggtg tggaaagtcc ccaggctccc 120  
 cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc agcaaccagg tgtggaagt 180  
 ccccaggctc ccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca 240  
 tagtcccgcc cetaactccg cccatcccgc ccetaactcc gccagttcc gccattctc 300  
 cgccccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagagggc cgaccgcctc ggctctgag 360  
 ctattccaga agtagtgagg aggccttttt ggaggcctag gcttttgcaa aaagcttgat 420  
 tcttctgaca caacagtctc gaacttaagc cgcagaagtt ggtcgtgagg cactgggcag 480  
 gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga 540  
 cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc 600  
 tttctctcca caggtgtcca ctccagttca attacagctc ttaagg 646

<210> 6

<211> 534

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> promotor de VRS

<400> 6

tgcattctgct cctgcttgt gtggtggagg tcgctgagta gtgcgcgagc aaaatttaag 60  
 ctacaacaag gcaaggcttg accgacaatt gcatgaagaa tctgcttagg gttaggcggt 120  
 ttgcgctgct tcgcgatgta cgggccagat atacgcgat ctgaggggac tagggtgtgt 180  
 ttaggcgaaa agcggggcctt cggttgtacg cggttaggag tcccctcagg atatagtagt 240  
 ttcgcttttg catagggagg gggaaatgta gtcttatgca atactcttgt agtcttgcaa 300  
 catggtaacg atgagttagc aacatgcctt acaaggagag aaaaagcacc gtgcatgccg 360  
 attggtggaa gtaaggtggt acgatcgtgc cttattagga aggcaacaga cgggtctgac 420  
 atggattgga cgaaccactg aataccgatc tcgagagata attgtattta agtgcctagc 480  
 tcgatacaat aaacgccatt tgaccattca ccacattggt gtgcacctgg ctag 534

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 7

## ES 2 636 464 T5

ccccgaattc atggaagaaa ttcc 25

<210> 8

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 8

cgcgggccaa taaggccaac atcgggacgt acatc 35

<210> 9

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 9

gcgcggcctt attggcctta aataccgctg tggag 36

<210> 10

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 10

ccccaagctt tcaagtgata ctgctgta 28

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 11

gggaattcga agagcccccg cggacgcatg 30

## ES 2 636 464 T5

<210> 12

<211> 35

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 12

ccgctagcgg ccgcaagtc ctcacatg accag 35

<210> 13

<211> 43

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 13

gcgcccgcta gcgccctat tggccgtagc ataaagacgc agg 43

<210> 14

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 14

ccaagcttct agtacatata tatacatgac 30

<210> 15

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 15

gggggaattc attatcccat ctaacagtta tatacg 36

<210> 16

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 16

gccgctagcg gccgccttta ttaacaacct tac 33

<210> 17

<211> 43

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 17

gcggccgcta gcggccttat tggccgttta ttctatgtaa gac 43

<210> 18

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 18

cccaagctta agttcctca ccatg 25

<210> 19

<211> 572

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Promotor ie1 de Mcmv

<400> 19

ES 2 636 464 T5

ggccaataag gctgcagtac tgagtcatta gggactttcc aatgggtttt gcccagtaca 60  
taaggtcaat aggggtgaat caacaggaaa gtccattgg agccaagtac actgagtcaa 120  
tagggacttt ccattgggtt ttgccagta caaaaggcca ataggggtg agtcaatggg 180  
ttttcccat tattggcagc tacataaggc caataggggt gagtcattgg gttttccag 240  
ccaatttaat taaaacgcca tgtactttcc caccattgac gtcaatgggc tattgaaact 300  
aatgcaacgt gacctttaa cggactttc ccatagctga ttaatgggaa agtaccgttc 360  
tcgagccaat acacgtcaat gggaagtga agggcagcca aaacgtaaca ccgcccggg 420  
tttccctgg aaattccata ttggcagca ttctattggc tgagctgct tctacgtggg 480  
tataagaggc ggcaccagcg tcggtagcgt cgcagtcttc ggtctgacca ccgtagaacg 540  
cagagctcct cgtgcaggc ggcgctcta ga 572

<210> 20

<211> 87

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> SPA

<400> 20

ctgcaggcgg ccgctctaga gtcgacaata aaagatcttt attttcatta gatctgtgtg 60  
ttggtttttt gtgtggccaa taaggcc 87

<210> 21

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> VP2 STC-F

<400> 21

caccgtcctc agcttaccca catc 24

<210> 22

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> VP2 STC-R

<400> 22

## ES 2 636 464 T5

acgacggatc ctgtgccac tct 23  
<210> 23  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> NDV-F-F  
<400> 23

ctagcagtgg cagtgggaa gat 23  
<210> 24  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> NDV-F-R  
<400> 24

gttaaggcag gggaagtgat ttgt 24  
<210> 25  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> 45/46-F  
<400> 25

ggggaagtct tccggtaag ggac 24  
<210> 26  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> 45/46-R  
<400> 26

ggtgcaattc gtaagaccga tggg 24

## ES 2 636 464 T5

<210> 27

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> 44/45-F

<400> 27

gtactataga atgtgtcc 19

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220><223> 44/45-R

<400> 28

gtatccaacg cctcaagatc 20

## REIVINDICACIONES

1. Un herpesvirus aviar recombinante, que comprende al menos dos secuencias de nucleótidos recombinantes, cada secuencia de nucleótidos recombinante codificando un péptido antigénico distinto de un agente patógeno aviar, en donde cada una de dichas al menos dos secuencias de nucleótidos recombinantes se inserta en una región no codificante distinta del genoma viral elegida entre la región ubicada entre UL44 y UL45, la región ubicada entre UL45 y UL46, la región ubicada entre US10 y SORF3, y la región ubicada entre SORF3 y USF3 2, en donde una primera secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un primer péptido antigénico se inserta en la región no codificante ubicada entre UL45 y UL46, y una segunda secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un segundo péptido antigénico se inserta en la región no codificante ubicada entre UL44 y UL45, o entre US10 y SORF3, o entre SORF3 y US2.
2. El herpesvirus aviar recombinante de la reivindicación 1, en donde los péptidos antigénicos de los agentes patógenos aviarios son proteínas de superficie, proteínas secretadas o proteínas estructurales de dichos agentes patógenos, o fragmentos antigénicos de los mismos.
3. El herpesvirus aviar recombinante de la reivindicación 1, en donde las secuencias de nucleótidos recombinantes codifican péptidos antigénicos elegidos entre un péptido antigénico del paramixovirus aviar de tipo 1, preferiblemente la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) o un fragmento antigénico de la misma, un péptido antigénico del virus de la enfermedad de Gumboro, preferiblemente la proteína VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV) o un fragmento antigénico de la misma, un péptido antigénico del virus de la laringotraqueítis infecciosa (LTV), preferiblemente la proteína gB o un fragmento antigénico de la misma, un péptido antigénico de *Mycoplasma galisepticum*, preferiblemente la proteína 40K o un fragmento antigénico de la misma, y un péptido antigénico del virus de la gripe aviar, preferencialmente una proteína de superficie hemaglutinina (HA) o un fragmento antigénico de la misma.
4. El herpesvirus aviar recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada secuencia de nucleótidos recombinante está bajo el control de un promotor distinto.
5. El herpesvirus aviar recombinante de la reivindicación 4, en donde los promotores que controlan las secuencias de nucleótidos recombinantes se eligen entre el promotor de la beta-actina (Bac) de pollo, el promotor Pec, el promotor inmediatamente temprano (ie)1 del citomegalovirus murino (Mcmv), el promotor del citomegalovirus humano (Hcmv), el promotor del virus simio (SV)40 y el promotor del virus del sarcoma de Rous (VRS), o cualquier fragmento de los mismos que retenga una actividad promotora.
6. El herpesvirus aviar recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende insertar entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un primer péptido antigénico bajo el control del promotor Pec, e insertar entre UL44 y UL45 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un segundo péptido antigénico, preferencialmente bajo el control del promotor de VRS o SV40 o ie1 de Mcmv.
7. El herpesvirus aviar recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende insertar entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un primer péptido antigénico e, insertada entre SORF3 y US2, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un segundo péptido antigénico.
8. El herpesvirus aviar recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende insertar entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o un fragmento antigénico de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de Bac, e insertar entre UL44 y UL45 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV o un fragmento antigénico de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv.
9. El herpesvirus aviar recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento antigénico de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de Bac y en el sitio de inserción entre SORF3 y US2 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento antigénico de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor Pec.
10. El herpesvirus aviar recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV o un fragmento antigénico de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor de Bac y en el sitio de inserción entre SORF3 y US2 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o un fragmento antigénico de la misma, preferencialmente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv.
11. El herpesvirus aviar recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un herpesvirus recombinante de pavo (rHVT)

12. Una vacuna multivalente que comprende una cantidad inmunizante eficaz del herpesvirus aviar recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 5 13. Un herpesvirus aviar recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso para inmunizar un ave, tal como aves de corral, contra un agente patógeno.
- 10 14. Una vacuna multivalente de la reivindicación 12 para su uso en un método para vacunar a un ave simultáneamente contra al menos dos agentes patógenos.
15. Un kit de vacunación para inmunizar especies aviares que comprende los siguientes componentes:
- a. una cantidad eficaz de la vacuna de la reivindicación 12, y
  - b. un medio para administrar dichos componentes a dicha especie.
- 15

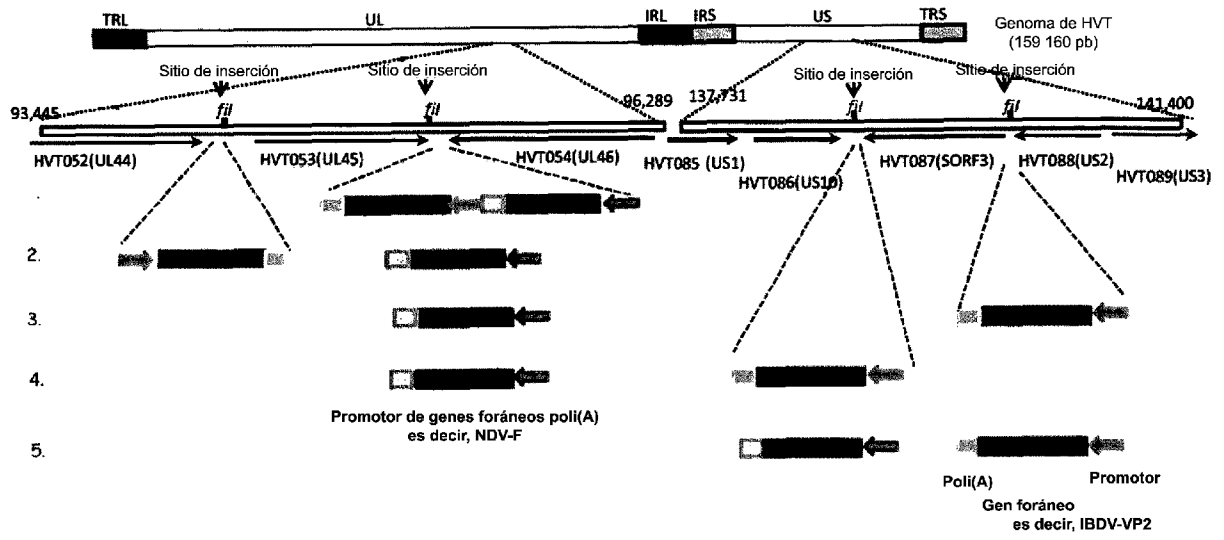


Figura 1

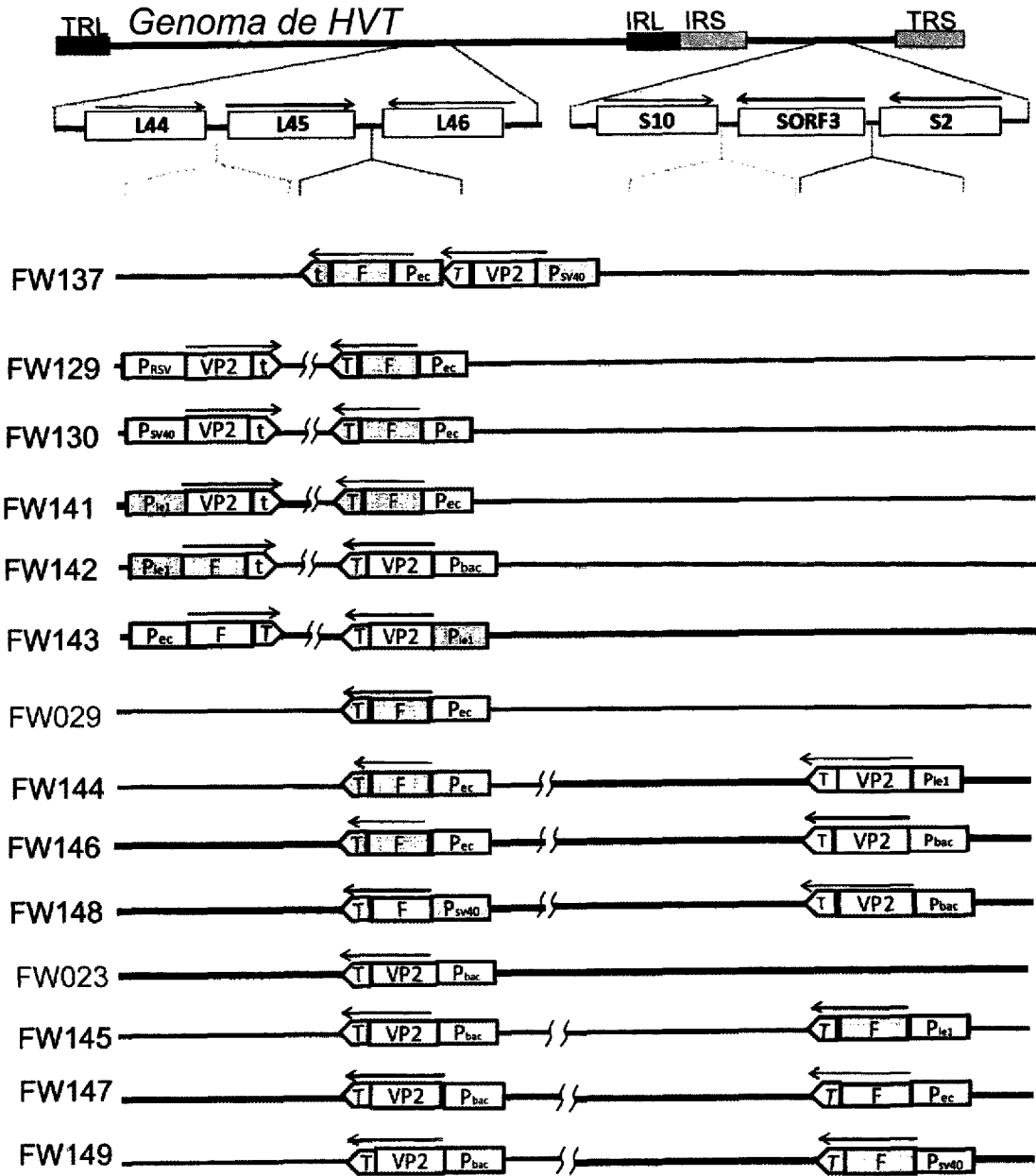


Figura 2A

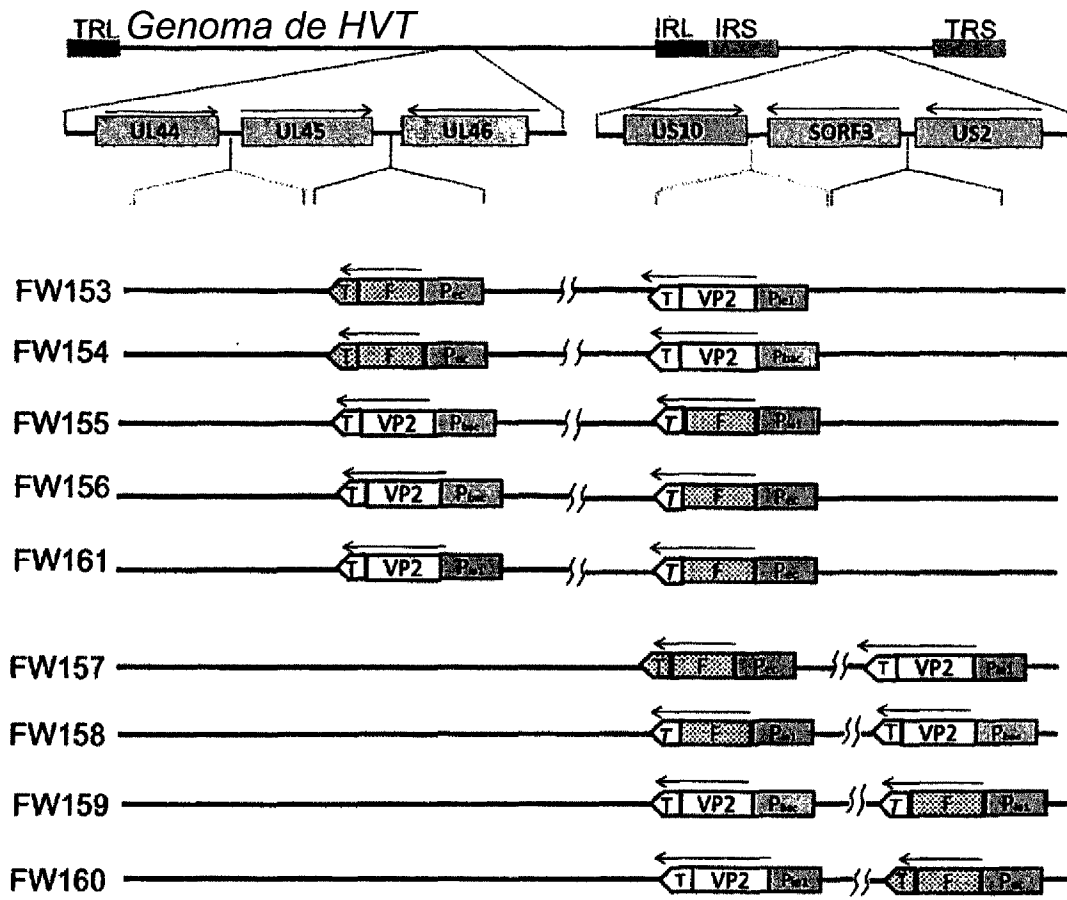


Figura 2B

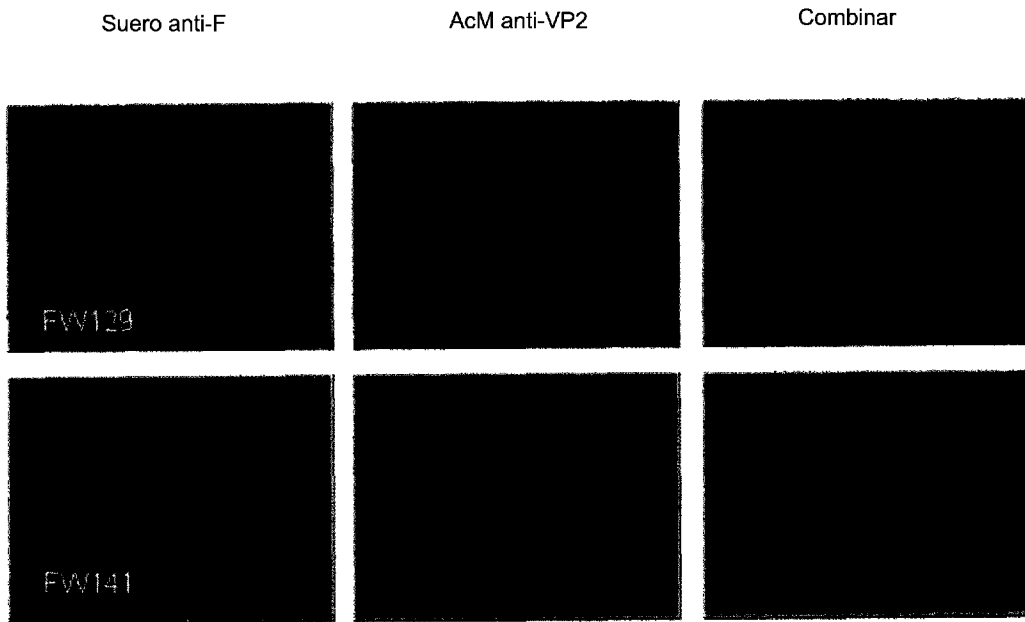


Figura 3

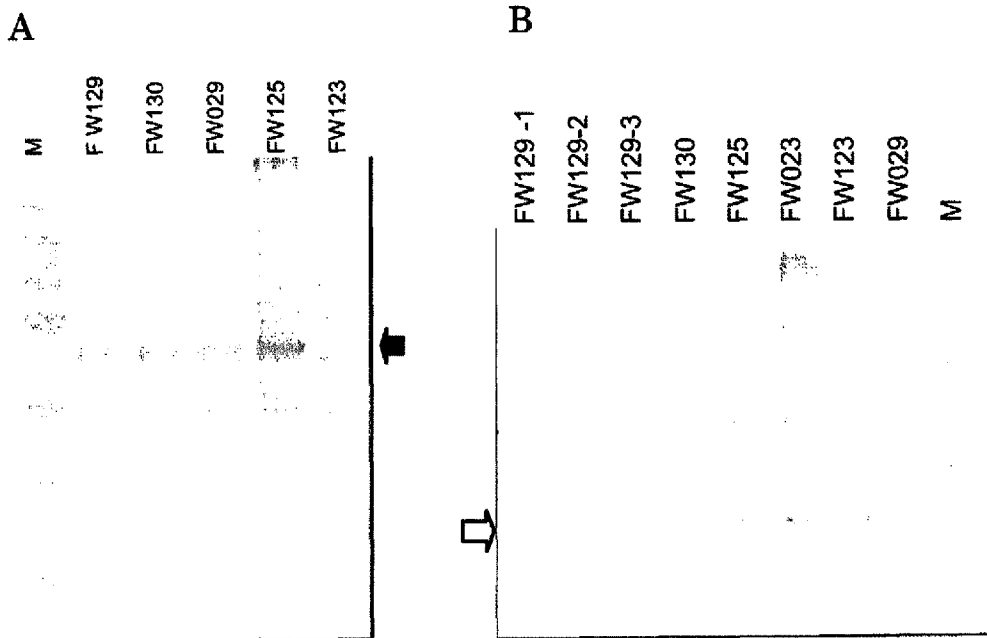


Figura 4

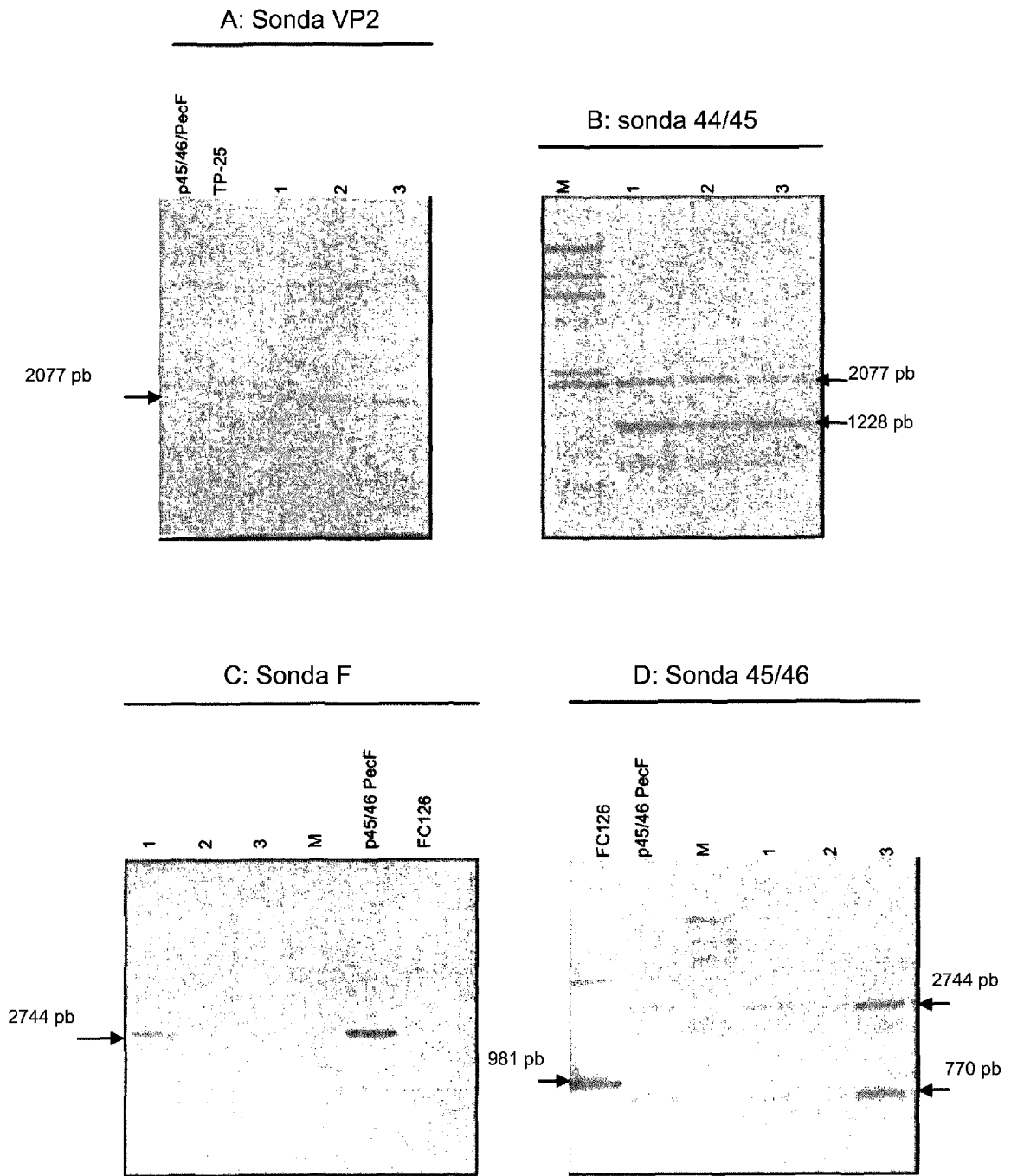


Figura 5

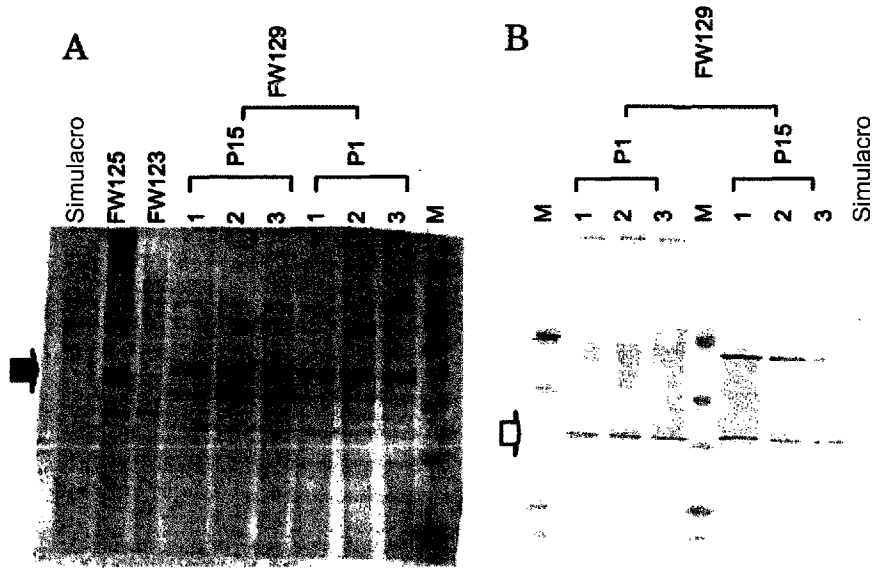


Figura 6

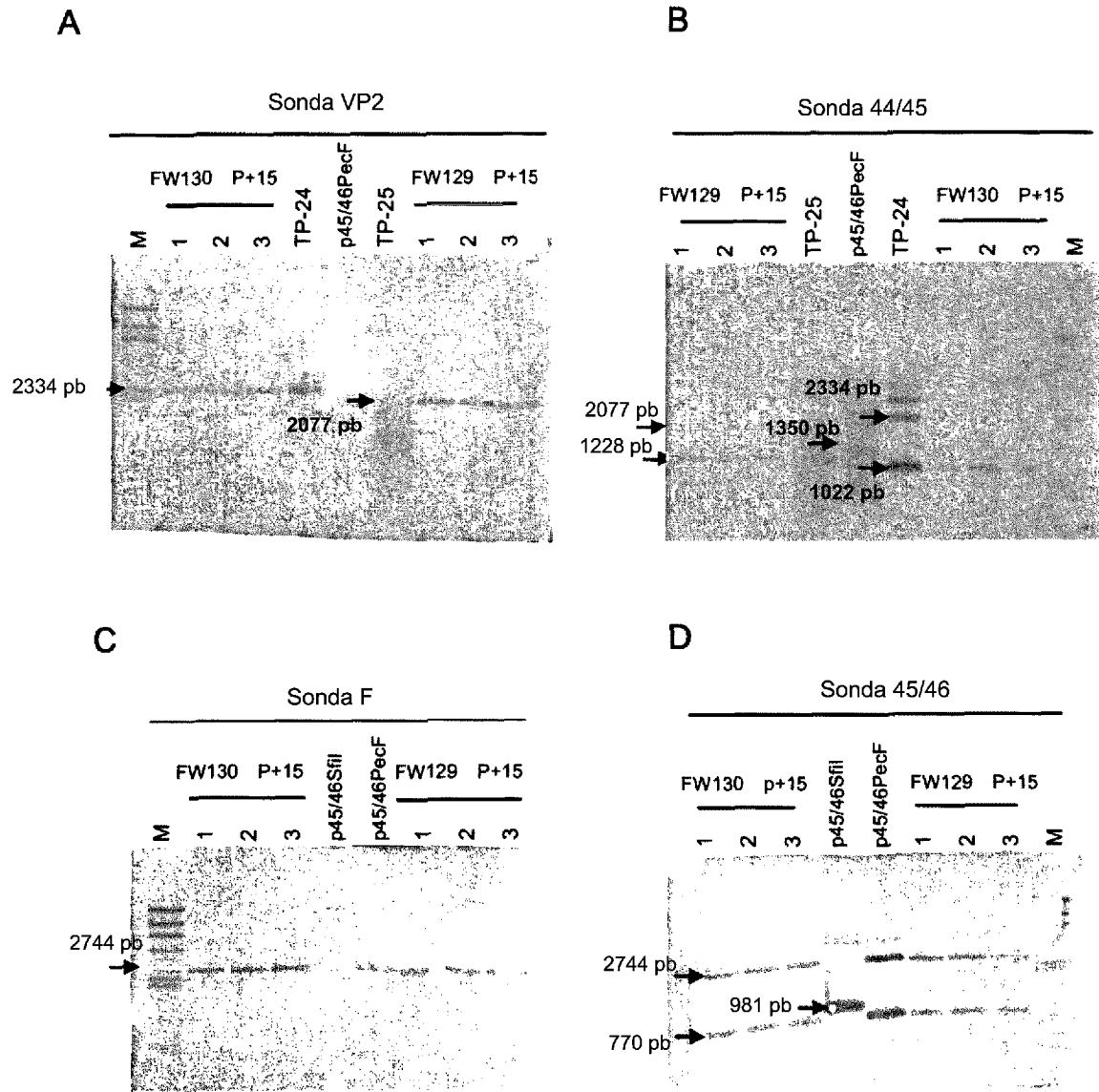


Figura 7

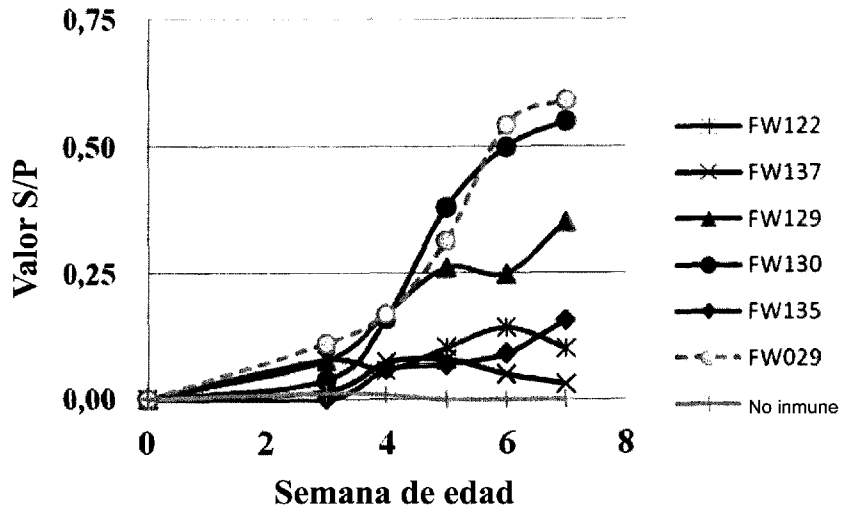


Figura 8A

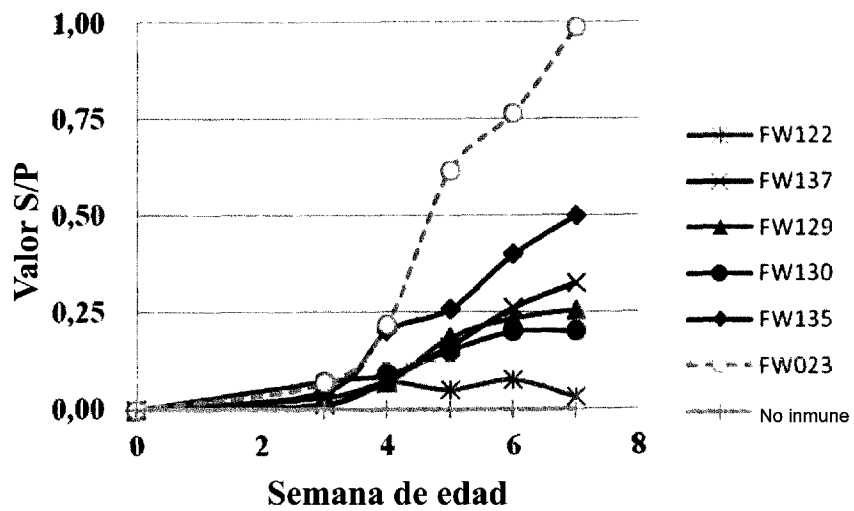


Figura 8B