(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 807 952**

(51) Int. CI.:

C12N 15/869 (2006.01)
A61K 39/17 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2013 E 17168632 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3219802**

(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:
24.02.2021

(73) Titular/es:

CEVA SANTÉ ANIMALE (100.0%)
10 Avenue de La Ballastière
33500 Libourne, FR

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

DESCRIPCIÓN

Herpesvirus aviares recombinantes multivalentes y vacunas para inmunizar especies aviares

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

La carne y los huevos de aves de corral son importantes fuentes de alimentos, cuyo consumo aumenta continuamente debido al crecimiento de la población humana y 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 de los alimentos. La tecnología de las 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 extrañas dentro de las células infectadas y por tanto inducen la inmunidad correspondiente por linfocitos T.

Es bien sabido que todos los herpesvirus, incluyendo el herpesvirus de pavo (HVT, por sus siglas en inglés) y el virus de la enfermedad de Marek (MDV, por sus siglas en inglés), pueden sobrevivir permanentemente en el cuerpo de un animal infectado en estado de infección latente o persistente. En consecuencia, se han desarrollado herpesvirus recombinantes, en los que se ha integrado un gen extraño procedente de un patógeno, para ser utilizados como vacunas vectorizadas virales, aumentando la duración de la inmunidad en un animal inmunizado.

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

Se han desarrollado preparaciones de vacunas para conseguir vacunaciones aviares eficaces, utilizando herpesvirus recombinantes que incorporan un gen que codifica un antígeno extraño. Dichas preparaciones de vacunas permiten la vacunación tanto contra el MDV (el vector) como otra enfermedad aviar, por medio de la secuencia de DNA extraña insertada.

Aunque dichas preparaciones de vacunas proporcionan resultados eficaces para la vacunación de especies aviares contra muchas enfermedades mortales, se puede producir competencia e inmunosupresión entre patógenos cuando las aves son inyectadas con dos o más herpesvirus recombinantes, albergando cada uno un gen de antígeno extraño diferente.

Por tanto, se estudiarán particularmente herpesvirus recombinantes multivalentes (es decir, que albergan al menos dos genes de antígenos diferentes) para inmunizar simultáneamente frente a diferentes enfermedades. Sin embargo, hasta ahora, los HVT recombinantes (rHVT) que expresan múltiples genes extraños resultaron ser inestables y todos o parte de los genes extraños se delecionan durante el pase repetido en células de cultivo. Por consiguiente, dichos vectores de virus multivalentes inestables no pueden utilizarse como vacunas eficaces.

En consecuencia, se necesitan vectores virales recombinantes multivalentes estables, que permitan la coexpresión de los genes extraños en células infectadas.

Sumario de la invención

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

Por tanto, la presente invención se refiere a un herpesvirus aviar recombinante, como se define en las reivindicaciones. Según la invención, se inserta una secuencia de nucleótidos recombinante en la región situada entre UL45 y UL46, y se inserta una secuencia de nucleótidos recombinante en la región situada 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 eficaz de los dos péptidos antigénicos correspondientes en células aviares infectadas.

En particular, ventajosamente, las dos o más secuencias de nucleótidos recombinantes se coexpresan en células de fibroblastos de embriones de pollo (CEF, por sus siglas en inglés), incluso después de 10 o más pases, y preferiblemente incluso después de 15 pases.

De acuerdo con la invención, las secuencias de nucleótidos recombinantes están ventajosamente bajo el control de promotores particulares. Los promotores se eligen preferiblemente entre promotor de beta-actina (Bac) de pollo, promotor Pec, promotor inmediato-temprano (ie)1 de citomegalovirus de múrido (Mcmv, por sus siglas en inglés), promotor de citomegalovirus humano (Hcmv, por sus siglas en inglés), promotor del virus de simio (SV)40 y promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés) o cualquiera de sus fragmentos que retenga una actividad promotora. Preferiblemente, cada secuencia de nucleótidos recombinante está bajo el control de un promotor distinto.

De acuerdo con la invención, los genes extraños se eligen ventajosamente entre un péptido antigénico de paramixovirus aviar tipo 1 y preferiblemente la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV, por sus siglas en inglés), un péptido antigénico del virus de la enfermedad de Gumboro, preferiblemente la proteína VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV, por sus siglas en inglés), un péptido antigénico del virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV, por sus siglas en inglés), preferiblemente la proteína gB, un péptido antigénico de *Mycoplasma gallisepticum*, preferiblemente la proteína 40K, y un péptido antigénico del virus de la gripe aviar, preferiblemente una proteína de superficie hemaglutinina (HA).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende una primera secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un primer péptido antigénico insertado en la región no codificadora situada entre UL44 y UL45 y una segunda secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un segundo péptido antigénico insertado en la región no codificadora situada entre UL45 y UL46, entre US10 y SORF3 o entre SORF3 y US2.

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

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende una primera secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un primer péptido antigénico insertado en la región no codificadora situada entre US10 y SORF3 y una segunda secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un segundo péptido antigénico insertado en la región no codificadora situada entre SORF3 y US2.

Un objeto más de la invención se refiere a una vacuna multivalente para inmunizar especies aviares, tales como aves de corral, que comprende una cantidad inmunizante eficaz de herpesvirus aviar recombinante de la invención. Esta vacuna se puede usar para inmunizar especies aviares, tales como aves de corral.

También se describe en la presente memoria un antisuero dirigido contra el herpesvirus aviar obtenido inmunizando especies aviares con una cantidad eficaz del herpesvirus aviar recombinante de la invención y recuperando el antisuero después de extraer sangre al ave.

También se describen en esta memoria métodos de inmunización de un ave que comprende administrar a dicha ave una cantidad inmunizante eficaz de la vacuna de acuerdo con 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.

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

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** ilustra el diagrama esquemático del genoma del HVT. Están marcadas las posiciones de los genes largos únicos (UL, por sus siglas en inglés) a saber UL44, UL45 y UL46 y las posiciones de los genes cortos únicos (US, por sus siglas en inglés), a saber US10, SORF3 y US2. Las secuencias de nucleótidos recombinantes pueden estar insertadas en sitios SfiI 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.

Las **Figuras 2A y 2B** ilustran diagramas esquemáticos del genoma del HVT que integran diferentes agrupamientos de secuencias de nucleótidos y promotores, de acuerdo con realizaciones particulares de la invención.

La **Figura 3** muestra la tinción por inmunofluorescencia de los CEF infectados con los HVT recombinantes dobles de acuerdo con 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 fue detectada por el Mab anti-VP2 (R63) y Alexa Flour 546. La expresión de la proteína F fue detectada por suero de conejo anti-F nº 35 y Alexa Flour 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.

Las **Figuras 4A y 4B** son análisis de transferencia de Western que muestran la expresión de la proteína VP2 y/o la proteína F en células de CEF infectadas con los rHVT de la invención. Como se muestra en la Figura 4A, se observó una banda de proteínas de 60 kilodaltones (kDa) solo en la pista con células infectadas con rHVT/ND/IBD, que era el tamaño esperado de la proteína F (➡).

No había banda en la pista de rHVT/44-45BacVP2 (FW123). Como se muestra en la Figura 4B, la proteína VP2 se observó a 38 kilodaltones (kDa) en las pistas de cada rHVT/ND/IBD (⇨).

Por el contrario, no había banda en la pista de rHVT/45-46 PecF (FW029). La proteína de 38 kDa es la VP2 madura (A. A. Azad et al., 1987, Virol. 161: 145-152, K. J., Fahey et al., 1985 J. Gen. Virol. 66: 1479-1488). Los rHVT dobles de la invención expresaban tanto NDV-F como IBDV-VP2.

Las **Figuras 5A a 5D** muestran los resultados de un análisis de transferencia de Southern para la verificación de la estructura genómica de FW129 purificado (rHVT/45-46 PecF/44-45 RSV VP2), indicando que HVT/ND/IBD recombinante doble de la invención tenía la estructura genómica esperada. Más precisamente, los resultados de la transferencia de Southern mostraron que:

- un fragmento de 2077 pb estaba hibridado con una sonda para VP2 en el DNA de cada HVT FW129 recombinante doble (columnas 1, 2 y 3, Figura 5A). En contraste, no se detectó ninguna banda en p45/46Pec F (Figura 5A).

- un fragmento de 2744 pb estaba hibridado con una sonda para F en el DNA de cada HVT FW129 recombinante doble (columnas 1, 2 y 3, Figura 5C). No se detectó ninguna banda en p45/46 SfiI.

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

- los fragmentos de 2744 pb y 770 pb estaban hibridados a la sonda para IS45/46 en el DNA de cada HVT FW129 recombinante doble (columnas 1, 2 y 3, Figura 5D).

Las **Figuras 6A y 6B** muestran los resultados de un análisis de transferencia de Western para verificar la estabilidad de HVT FW129 recombinante en pases sucesivos, lo que indica que después de 15 pases la proteína F y la proteína VP2 se expresaron establemente en CEF infectados con el rHVT FW129 de la invención.

Las **Figuras 7A a 7D** muestran los resultados de un análisis de transferencia de Southern para verificar la estabilidad de los HVT recombinantes después de 15 pases (Figura 7A). Los resultados de la transferencia de Southern muestran que un fragmento de 2077 pb estaba hibridado a una sonda para VP2 en el DNA de FW129. El fragmento de 2334 pb estaba hibridado a una sonda para VP2 en el DNA 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 estaba hibridado a la sonda para F en el DNA de cada HVT FW129 y FW130 recombinantes dobles. No se detectó ninguna banda en el p45/46 SfiI (Figura 7B). Los resultados de la transferencia de Southern muestran que fragmentos de 2077 pb y 1228 pb estaban hibridados a la sonda para IS44/45 en el DNA de FW129 y que fragmentos de 2334 pb y 1022 pb estaban hibridados a una sonda para IS44/45 en el DNA de FW130. Un fragmento de 1350 pb estaba hibridado a una sonda para 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 fragmentos de 2744 pb y 770 pb estaban hibridados a la sonda para IS45/46 en el DNA de cada HVT FW129 y FW130 recombinantes dobles. La transferencia de Southern con la sonda para 44/45 y la sonda para 45/46 mostró el gen VP2 o el gen F mantenidos establemente en el sitio de inserción 44/45 o 45/46 respectivamente en FW129 y FW130. Estos resultados indican que después de 15 pases la proteína F y la proteína VP2 se expresaban establemente en CEF infectados con el rHVT FW129 de la invención.

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

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere generalmente a herpesvirus recombinantes multivalentes y a su uso para inmunizar especies aviares contra al menos dos enfermedades al mismo tiempo. De acuerdo con la invención, se insertan secuencias de DNA extrañas en sitios de inserción particulares dentro del genoma de rHV, proporcionando construcciones estables y eficaces adecuadas para su uso en composiciones o métodos de vacunas.

La presente descripción se entenderá mejor con referencia a las siguientes definiciones:

Definiciones

En el contexto de la invención, el término "*reconstruido*" o "*recombinante*" con relación a una secuencia, designa una secuencia, un ácido nucleico o una unidad que no existe de forma natural y/o que ha sido modificado genéticamente usando tecnología de DNA recombinante (también denominada clonación génica o clonación molecular).

El término "*recombinante*" con relación a un herpesvirus se refiere a un herpesvirus cuyo genoma ha sido modificado por inserción de al menos un ácido nucleico heterólogo, es decir, un ácido nucleico (por ejemplo, DNA) 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 por una variedad de métodos, y una vez fabricado, se puede reproducir sin el uso de tecnología de DNA recombinante adicional. Por tanto, la estructura del "herpesvirus recombinante" se describe en términos de inserción de DNA.

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 de desoxirribonucleótidos y/o de ribonucleótidos. La secuencia de nucleótidos se puede preparar en primer lugar, por ejemplo, por técnicas recombinantes, enzimáticas y/o químicas, y posteriormente se replican en una célula hospedante o en un sistema *in vitro*. Una secuencia de nucleótidos comprende preferiblemente un marco de lectura abierto que codifica un péptido. La secuencia de nucleótidos puede contener otras secuencias tales como un terminador de la transcripción, un péptido de señal, un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés), un intrón, etc. Preferiblemente, un marco de lectura abierto (ORF) en un ácido nucleico recombinante no contiene un intrón.

El término "*región no traducida*" como se utiliza en la presente memoria se refiere a una región de nucleótidos que no tenga ORF y no defina una secuencia de aminoácidos de proteína que se exprese por traducción, o una región de nucleótidos en la que el ORF no está implicado en ninguna transcripción, traducción o expresión de proteínas.

El término "*especie aviar*" se pretende que abarque toda clase de aves, tales como pájaros de la clase de Aves, es decir, animales vertebrados que tienen plumas, alas, son bípedos, endotérmicos y ponen huevos. En el contexto de la invención, aviar o especies aviares se refieren más particularmente a aves con intereses económicos y/o agronómicos, tales como aves de corral (tales como pollos y pavos), aves acuáticas (tales como patos y gansos) y aves ornamentales (tales como cisnes y psitácidas).

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

Virus

Los virus para uso en la presente invención son los que pertenecen generalmente al género de herpesvirus aviares de pavos (HVT). Los herpesvirus preferidos de la invención proceden de serotipos o cepas que no son patógenos para las especies aviares diana.

Herpesvirus aviares recombinantes multivalentes

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

Por tanto, un objeto de la invención se refiere a un herpesvirus aviar recombinante, como se define en las reivindicaciones.

La posición de las regiones no codificadoras citadas es conocida en la técnica y se puede encontrar, por ejemplo, en Kingham et al. ("*The genoma of herpesvirus of turkeys: comparative analysis with Marek's disease viruses*" - Journal of General Virology (2001) 82, 1123-1135).

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

El ácido nucleico de interés para la inserción en el genoma del herpesvirus puede ser homólogo o heterólogo respecto al herpesvirus. El ácido nucleico codifica típicamente un antígeno de un patógeno y puede proceder u obtenerse de cualquier organismo patógeno capaz de causar una infección en especies aviares. Típicamente, los ácidos nucleicos clonados proceden de patógenos que causan enfermedades que tienen un impacto económico en la industria avícola. Ejemplos de patógenos que causan infección en las aves incluyen virus, bacterias, hongos, protozoos, etc.

La secuencia de nucleótidos homóloga o heteróloga para inserción en el genoma viral puede ser, por tanto, cualquier secuencia que codifique un péptido antigénico de un agente patógeno de aves. La secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención puede proceder de cualquier fuente, por ejemplo, viral, procariota, eucariota o sintética. Típicamente, las secuencias de nucleótidos codifican un péptido inmunógeno de un patógeno, y preferiblemente representan proteínas de superficie, proteínas secretadas o proteínas estructurales de dicho patógeno, o sus fragmentos.

La secuencia de nucleótidos puede codificar, por ejemplo, un péptido antigénico procedente del virus de la gripe aviar, paramixovirus aviar tipo 1, también denominado virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), metaneumovirus aviar, virus de la enfermedad de Marek, virus de la enfermedad de Gumboro, también denominado virus de la bursitis infecciosa (IBDV), virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILVT), virus de la bronquitis infecciosa (IBV),

microorganismos que infectan especies aviares tales como *Escherichia coli*, especies de *Salmonella*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Ornitobacterium rhinotracheale*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasmas* o coccidios.

Preferiblemente, 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 gallisepticum* y la proteína de superficie hemaglutinina (HA) del virus de la gripe aviar.

Varias combinaciones de péptidos antigénicos pueden presentar gran interés, dependiendo de varios factores, tales como las especies aviares, país de crianza, condiciones de crianza, etc. 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.

De acuerdo con una realización particular, se pueden insertar tres o más secuencias de nucleótidos en el genoma viral. El herpesvirus recombinante de la invención puede expresar dos o más antígenos de un mismo patógeno.

Las secuencias de nucleótidos homólogas o heterólogas que codifican los antígenos de interés pueden estar unidas operativamente a un promotor y además insertadas en el genoma viral. El promotor utilizado puede ser un promotor sintético o natural, endógeno o heterólogo.

El promotor no está limitado siempre que pueda actuar eficazmente en células de aves infectadas con rHVT. Por 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.

Preferiblemente, los promotores se eligen entre el promotor de beta-actina (Bac) de pollo, el promotor Pec, el promotor ie1 de citomegalovirus de múridos (Mcmv), el promotor de citomegalovirus humano (Hcmv), el promotor del virus de simio (SV)40 y el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), o cualquiera de sus fragmentos que retenga una actividad promotora.

La secuencia de ácidos nucleicos de un promotor de Bac de pollo se muestra en SEQ ID NO: 1, la secuencia de un promotor Pec se muestra en SEQ ID NO: 2, la secuencia de un promotor ie1 de Mcmv se muestra en SEQ ID NO: 3, la secuencia de un promotor de Hcmv se muestra en SEQ ID NO: 4, la secuencia de un promotor de SV40 se muestra en SEQ ID NO: 5 y la secuencia de un promotor de RSV se muestra en SEQ ID NO: 6.

Debe observarse que para su uso en la presente invención los expertos en la técnica conocen y/o pueden diseñar/analizar variantes de dichas secuencias que codifican promotores funcionales.

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

Construcción multivalente

La clonación de genes y la construcción de plásmidos son muy conocidas por una persona experta en la técnica y pueden ser realizadas esencialmente por técnicas estándar de biología molecular (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, N.Y. 2001).

Con el fin de construir un herpesvirus recombinante multivalente de la presente invención, inicialmente, se propaga el herpesvirus en una célula hospedante adecuada y a continuación se obtiene el DNA genómico. El hospedante y las condiciones para la propagación del virus se seleccionan según sea apropiado. Como células hospedantes, se prefieren las células procedentes de pollo y se pueden usar CEF (fibroblastos de embrión de pollo), células de riñón de pollo y similares. Se pueden cultivar en un medio de cultivo, tal como medio de cultivo MEM de Eagle, Leibowitz-L-15/McCoy 5A (mezcla 1:1) a aproximadamente 37ºC durante 3 a 4 días.

El DNA se extrae de las células infectadas con virus cultivadas como anteriormente de acuerdo con un método convencional. Después de que se desnaturaliza la proteína en el tampón de lisis y se elimina, el DNA se extrae con fenol y etanol.

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

Plásmido con secuencia de los sitios de inserción

Una posibilidad para insertar un gen extraño en una de las regiones no traducidas del genoma viral de acuerdo con la invención puede ser clonar en primer lugar una secuencia que contiene la región no traducida diana en un plásmido u otro vector adecuado. De acuerdo con la invención, dicha secuencia se selecciona entre la secuencia de la región situada entre UL44 y UL45, la secuencia de la región situada entre UL45 y UL46, la secuencia de la región situada entre US10 y SORF3 y la secuencia de la región situada entre SORF3 y US2.

Ejemplos de plásmidos comprenden pBR322, pBR325, pBR327, pBR328, pUC18, pUC19, pUC7, pUC8 y pUC9, ejemplos de fagos comprenden fago lambda y fago M13, y ejemplo de cósmidos comprende pHC79.

La secuencia de la región no traducida se integra en el plásmido de acuerdo con un método de clonación convencional. Las secuencias de la región de inserción tienen preferiblemente una longitud suficiente de modo que, por inserción del ácido nucleico, las secuencias que flanquean el ácido nucleico tienen una longitud apropiada de forma que permiten la recombinación homóloga *in vivo* con el genoma viral. Preferiblemente, las secuencias flanqueantes tendrán al menos aproximadamente una longitud de 50 nucleótidos.

Con el fin de insertar una o más secuencias extrañas en la región no traducida, la mutación se puede realizar en un sitio específico de la región no traducida para formar un nuevo sitio de escisión para las enzimas de restricción. Un método para realizar la mutación puede ser un método convencional, y se puede usar un método comúnmente utilizado por un experto en la técnica, tal como mutagénesis *in vitro* y PCR. Por tanto, en el método de PCR, se lleva a cabo una mutación tal como la deleción, sustitución o adición de 1 a 2 nucleótidos en el cebador de PCR, y el cebador se utiliza entonces para crear una mutación.

Plásmido que contiene además secuencia(s) de nucleótidos extraña(s) diana(s)

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

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

Si se desea, se puede preparar un plásmido, que contenga dos o más secuencias de ácidos nucleicos extrañas, por ejemplo procedentes del mismo o diferentes patógenos, estando flanqueadas dichas secuencias por secuencias de la regiones de inserción, tal como se describe en la presente memoria.

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

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

Producción del herpesvirus recombinante multivalente

El herpesvirus multivalente de la invención se puede obtener cotransfectando en el mismo cultivo celular un plásmido que contiene, como se ha descrito anteriormente, una secuencia del sitio de inserción en la que está integrada una secuencia de nucleótidos extraña y un herpesvirus recombinante que contiene, como se ha descrito anteriormente, el mismo sitio de inserción libre de secuencia de nucleótidos extraña y un segundo sitio de inserción en el que está integrada una secuencia de nucleótidos extraña distinta. Esta cotransfección da como resultado la recombinación del DNA plasmídico en el genoma viral.

De otro modo, el herpesvirus multivalente de la invención se puede obtener cotransfectando en el mismo cultivo celular dos plásmidos, conteniendo cada uno una secuencia del sitio de inserción distinta en la que está integrada una secuencia de nucleótidos extraña distinta y un herpesvirus que contiene, como se ha descrito anteriormente, los mismos sitios de inserción libres de la secuencia de nucleótidos extraña. La cotransfección da como resultado la recombinación de ambos DNA plasmídicos en el genoma viral.

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

Construcciones multivalentes preferidas

Un objeto de la invención es proponer herpesvirus recombinantes multivalentes que presentan al menos dos secuencias de nucleótidos extrañas, estando insertadas cada una en un sitio de inserción particular, de manera adecuada para codificar y expresar los péptidos antigénicos correspondientes en células aviares.

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

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

Los herpesvirus aviares recombinantes multivalentes preferidos de la invención son como se define en las reivindicaciones.

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 gallisepticum* y la proteína de superficie HA del virus de la gripe aviar.

Ventajosamente, los promotores usados con las 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 RSV, o cualquiera de sus fragmentos que retenga una actividad promotora. En realidad, el solicitante ha encontrado sorprendentemente que el promotor de Bac insertado entre UL44 y UL45 no permite la expresión estable de un gen extraño. Sin embargo, el promotor de Bac, insertado en la región entre UL45 y UL46 permite la expresión estable.

De acuerdo con una primera realización, el herpesvirus aviar recombinante comprende, insertado entre UL45 y UL46, una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o uno de sus fragmentos, 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor de SV40 (FW130).

De acuerdo con 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 uno de sus fragmentos, 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 uno de sus fragmentos, bajo el control del promotor de RSV (FW129).

De acuerdo con 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 uno de sus fragmentos, 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 uno de sus fragmentos, bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW141).

De acuerdo con 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 uno de sus fragmentos, 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW144).

De acuerdo con 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 uno de sus fragmentos, 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 uno de sus fragmentos, bajo el control del promotor de Bac (FW146).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre UL44 y UL45 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW143).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre UL44 y UL45 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor de Bac (FW142).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre SORF3 y US2 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor de Bac (FW147).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW145).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor de SV40 (FW149).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor de Bac (FW148).

De acuerdo con una realización adicional, 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 uno de sus fragmentos, 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW153).

De acuerdo con una realización adicional, 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 uno de sus fragmentos, 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 uno de sus fragmentos, bajo el control del promotor de Bac (FW154).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW155).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor Pec (FW156).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre US10 y SORF3 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW157).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre US10 y SORF3 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv, y en el sitio de inserción entre SORF3 y US2 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor de Bac (FW158).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre US10 y SORF3 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv (FW159).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre US10 y SORF3 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor ie1 de Mcmv, y en el sitio de inserción entre SORF3 y US2 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F de NDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor Pec (FW160).

También se describe en esta memoria un herpesvirus aviar recombinante que comprende en el sitio de inserción entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 de IBDV, o uno de sus fragmentos, preferiblemente 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 uno de sus fragmentos, preferiblemente bajo el control del promotor Pec (FW161).

Cultivos celulares

Los virus recombinantes resultantes de la presente invención pueden propagarse en cultivos celulares en los que puedan propagarse y crecer dichos virus recombinantes. Después de que se consigue el crecimiento requerido de los virus las células se pueden retirar de los pocillos usando un raspador o con tripsina y las células infectadas se pueden separar del líquido sobrenadante por centrifugación.

En realizaciones preferidas de la invención se pueden usar, como las células hospedantes para la propagación de herpesvirus recombinantes CEF, huevo embrionado, célula de riñón de pollo y similares. Los virus recombinantes multivalentes de la presente invención se pueden cultivar en un medio de cultivo, tal como medio de cultivo MEM de

Eagle, Leibowitz-L-15/McCoy 5A (mezcla 1:1) a aproximadamente 37ºC durante 3 a 4 días. Las células infectadas así obtenidas se ponen en suspensión en un medio de cultivo que contiene dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y se conservan congeladas bajo nitrógeno líquido.

Ventajosamente, los herpesvirus multivalentes recombinantes de la invención presentan un alto nivel de estabilidad por medio de pases, que corresponde a una coexpresión de las secuencias de nucleótidos recombinantes en células de especies aviares incluso después de 10 o más pases. En el contexto de la invención un "pase" o "pase de células" significa un cultivo de células en condiciones adecuadas para permitir su crecimiento y mantenerlas vivas hasta que son confluentes del 90% al 100%. La etapa de pase consiste en transferir un pequeño número de células del cultivo confluente previo a un nuevo medio de cultivo. Una parte alícuota del cultivo confluente previo, que contiene unas cuantas células, se puede diluir en un gran volumen de medio de nueva aportación. En el caso de cultivos adherentes, las células se pueden retirar primero, por ejemplo usando una mezcla de tripsina y EDTA, o cualquier enzima adecuada, antes de usar un número reducido de células retiradas para sembrar un nuevo medio de cultivo.

De acuerdo con realizaciones preferidas de la invención, las células CEF transfectadas con herpesvirus aviares recombinantes de la invención todavía coexpresan los péptidos antigénicos correspondientes después de al menos 10 pases. En otras palabras, las células CEF resultantes de 10 o más pases de células CEF transfectadas con herpesvirus aviares recombinantes de la invención, y más particularmente resultantes de 15 pasajes, contienen todavía las secuencias de nucleótidos extrañas del herpesvirus aviar recombinante usado para la transfección inicial de células y expresan los al menos dos péptidos antigénicos correspondientes. En el contexto de la invención, se considera que las células de dicho pase todavía expresan los péptidos antigénicos si el nivel de producción es superior al 80% del nivel de producción del primer pase, y preferiblemente superior al 85%.

Composiciones de vacunas multivalentes

La invención se refiere también 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.

Preferiblemente, las vacunas de la invención son capaces de causar o estimular o amplificar la inmunidad contra al menos dos patógenos elegidos entre paramixovirus aviar de tipo 1, virus de la enfermedad de Gumboro, virus de la laringotraqueitis infecciosa, *Mycoplasma gallisepticum* y virus de la gripe aviar. Las vacunas de la invención comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de un herpesvirus recombinante multivalente como se ha descrito anteriormente, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un herpesvirus recombinante multivalente de acuerdo con la invención se puede usar preferiblemente como una vacuna viva aunque otras alternativas como vacunas inactivadas o vacunas atenuadas están dentro de la capacidad de un experto en la técnica.

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

Las vacunas de la presente invención se pueden formular adicionalmente con uno o más aditivos 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 estreptomicina, etc.

La vía de administración puede ser cualquier vía que incluya administración oral, ocular (por ejemplo, por gotas para ojos), óculo-nasal usando vacunación por aerosol, intranasal, cloacal en alimentación, en agua, o por pulverización, *in ovo*, tópicamente o por inyección (por ejemplo, Intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intraocular, intradérmica y/o intraperitoneal). El experto adaptará fácilmente la formulación de la composición de vacuna para cada tipo de vía de administración.

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

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 patógenos aviares dianas después de 3 semanas de la vacunación.

La presente invención se refiere además 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 por administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna de acuerdo con la invención. La vacuna se puede administrar ventajosamente por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, oral, *in ovo, p*or administración mucosal o por administración óculo-nasal.

La presente invención se refiere además a kits de vacunación para inmunizar especies aviares que comprenden una cantidad eficaz de la vacuna multivalente que se ha descrito antes y un medio para administrar dichos componentes a dichas especies. Por ejemplo, dicho kit comprende un dispositivo de inyección lleno con la vacuna multivalente de acuerdo con la invención e instrucciones para inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular o *in ovo*. Alternativamente, el kit comprende un dispositivo de pulverización/aerosol o de gotas para los ojos lleno con la vacuna multivalente de acuerdo con la invención e instrucciones para la administración óculo-nasal, oral o mucosal.

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

Experimentos

En los experimentos se han usado varios herpesvirus recombinantes (monovalentes o multivalentes de acuerdo con la invención), designados como sigue (HVT/primer sitio de inserción-primer gen extraño/segundo sitio de inserción-segundo gen extraño):

FW122: HVT/45-46 Hcmv VP2 Bac F

FW123: HVT/44-45 Bac VP2,

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

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

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

FW141: HVT/45-46 PecF/44-45 Mcmv ie1VP2

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

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

FW029: HVT/45-46 Pec F

Experimento 1: Construcción de vectores de homología

La construcción del plásmido se realizó esencialmente por técnicas estándares de biología molecular (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001). Los fragmentos de restricción de DNA se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se purificaron con el kit *Plasmid plus Midi* (QIAGEN, nº de Catalogo 12945)

Construcción de p44/45d46Sfi

Basándose en la información del gen homólogo gC (gCh) de MDV serotipo 1 (Coussens et al., *J. Virol.* 62: 2373-2379, 1988) y su fragmento BamHI-B adyacente (publicación de patente japonesa no examinada nº H6-292583), se preparó por PCR un fragmento de DNA que tenía un sitio SfiI entre los dos ORF, UL44h y UL45h, y se clonó en pUC18. En primer lugar, se preparó DNA de HVT a partir de células CEF infectadas con la cepa HVT FC126 de acuerdo con el método de Lee et al., (*J. Gen. Virol.,* 51: 245-253, 1980). Utilizando el DNA del HVT obtenido como molde, la PCR se realizó con dos pares de cebadores.

El primer par era la SEQ ID NO: 7 (5'-CCCCGAATTCATGGAAGAAATTTCC-3') y SEQ ID NO: 8 (5'-CGCGGGCCAATAAGGCCAACATCGGGACGTACATC-3').

El segundo par era la SEQ ID NO: 9 (5'-GCGCGGCCTTATTGGCCTTAAATACCGCGTTTGGAG-3') y SEQ ID NO: 10 (5'-CCCCAAGCTTTCAAGTGATACTGCGTGA-3').

Usando como molde la mezcla de los dos productos de PCR obtenidos, se llevó a cabo otra PCR con las SEQ ID NO.7 y SEQ ID NO.10 para generar un fragmento que tenía un sitio SfiI entre los dos ORF, UL44h y UL45h.

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

Para la construcción del HVT recombinante doble en el que estaban insertados dos genes en UL44/45 y UL45/46, respectivamente, se delecionó el gen UL46 de p44/45Sfi. El p45/46Sfi (patente de EE.UU. 7.569.365) digerido con EcoRI y SfiI se ligó con el enlazador dSfiI-EcoRI, dando como resultado el plásmido p44/45d46. El plásmido p44/45Sfi escindido con SphI y PstI se ligó con p44/45d46 escindido con las mismas enzimas, dando como resultado el plásmido p44/45d46Sfi.

Construcción de pHVT 87-88

El DNA del HVT se preparó a partir de células CEF infectadas con la cepa HVT FC126 de acuerdo con el método de Lee et al., (*J. Gen. Virol.*, 51: 245-253, 1980). Utilizando como molde el DNA del HVT obtenido, la PCR se realizó con dos pares de cebadores. Cada cebador fue diseñado basándose en la información de GenBank X68653.1. Se preparó por PCR un fragmento de DNA que tenía un sitio SfiI entre dos ORF, US2 (HVT088) y SORF3 (HVT087) y se clonó en pUC18.

El primer par era la SEQ ID NO.11 (5'-GGGAATTCGAAGAGCCCCCGCGGACGCATG-3') y la SEQ ID NO. 12 5'(-CCGCTAGCGGCCGCAAGTTCCTTCACCATGACCAG-3').

El segundo par era la SEQ ID NO 13 (5'-GCGGCCGCTAGCGGCCTTATTGGCCGTAGCATAAAGACGCAGG-3') y la SEQ Nº 14 (5'-CCAAGCTTCTAGTACATATATATACATGAC-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, dando como resultando el plásmido pHVT 87-88.

Construcción de pHVT 86-87

El DNA del HVT se preparó a partir de células CEF infectadas con la cepa HVT FC126 de acuerdo con el método de Lee et al. (*J. Gen. Virol.*, 51: 245-253, 1980). Utilizando como molde el DNA del HVT obtenido, la PCR se realizó con dos pares de cebadores. Cada cebador fue diseñado basándose en la información de GenBank X68653.1. Se preparó por PCR un fragmento de DNA que tenía un sitio SfiI entre dos ORF, US10 (HVT086) y SORF3 (HVT087) y se clonó en pUC18.

El primer par era la SEQ ID NO. 15 (5'-GGGGGAATTCATTATCCCATCTAACAGTTATATACG-3') y la SEQ ID NO.16 (5'-GCCGCTAGCGGCCGCCTTTATTAACAACCTTAC-3').

El segundo par era la SEQ ID NO. 17 (5'-GCGGCCGCTAGCGGCCTTATTGGCCGTTTATTCTATGTAAGAC-3') y la SEQ ID NO 18 (5'-CCCAAGCTTAAGTTCCTTCACCATG-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, dando como resultado el plásmido pHVT 86-87.

Construcción del vector de homología

Promotor ie1 de Mcmv sintetizado químicamente

El promotor ie1 de Mcmv (SEQ ID NO. 19) se sintetizó basándose en la información de 4191-4731pb en GenBank L06816.1 descrito por Koszinowski, U. H. El promotor ie1 de Mcmv sintetizado se diseñó para que se añadieran sitios BglI-PstI delante de él y se añadieran sitios XbaI-NotI al final.

SEQ ID NO.19: GGCCAATAAG GCTGCAGTAC TGAGTCATTA GGGACTTTCC AATGGGTTTT GCCCAGTACA TAAGGTCAAT AGGGGTGAAT CAACAGGAAA GTCCCATTGG AGCCAAGTAC ACTGAGTCAA TAGGGACTTT CCATTGGGTT TTGCCCAGTA CAAAAGGTCA ATAGGGGGTG AGTCAATGGG TTTTTCCCAT TATTGGCACG TACATAAGGT CAATAGGGGT GAGTCATTGG GTTTTTCCAG CCAATTTAAT TAAAACGCCA TGTACTTTCC CACCATTGAC GTCAATGGGC TATTGAAACT AATGCAACGT GACCTTTAAA CGGTACTTTC CCATAGCTGA TTAATGGGAA AGTACCGTTC TCGAGCCAAT ACACGTCAAT GGGAAGTGAA AGGGCAGCCA AAACGTAACA CCGCCCCGGT TTTCCCCTGG AAATTCCATA TTGGCACGCA TTCTATTGGC TGAGCTGCGT TCTACGTGGG TATAAGAGGC GCGACCAGCG TCGGTACCGT CGCAGTCTTC GGTCTGACCA CCGTAGAACG CAGAGCTCCT CGCTGCAGGC GGCCGCTCTA GA

Construcción de p44/45 Mcmv ie1 VP2 SPA

El p44-45d46Sfi escindido con SfiI se desfosforiló usando fosfatasa alcalina Shewanella sp. S1B1 Recombinant (PAP) (Funakoshi Nº DE110). El fragmento se ligó con p45/46BacVP2 escindido con BglI, dando como resultado 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, dando como resultado p44/45d46 Mcmv ie1 VP2. Se integró la señal de poliA corta sintetizada (SPA: SEQ ID NO. 20 CTGCAGGCGGCCGCTCTAGAGTCGACA ATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGGCCAATAAGGCC) en p44/45d46 Mcmv ie1 VP2 escindida con SalI y SfiI, dando como resultado el plásmido de homología p44/45d46 Mcmv ie1 VP2 SPA.

Experimento 2: Purificación del HVT recombinante en CEF transfectado con cada vector de transferencia

]Se preparó el DNA viral de la cepa FC126 de HVT de tipo natural (wt-HVT), tal como ha sido descrito por Morgan et al., (*Avian Diseases*, 34: 345-351, 1990). Los DNA vírales de FW029 (rHVT/45-46PecF) y FW023 (rHVT/45-46BacVP2) se prepararon por el método similar. El primer patrón doble de rHVT fue que las células CEF fueron transfectadas con el DNA de wt-HVT preparado y p45/46SV40VP2 PecF (ex. FW137). El segundo patrón fue que las células CEF fueron transfectadas con el DNA de FW029 preparado y p44/45 Mcmv ie1 VP2 (ex. FW141). El tercer patrón fue que las células CEF fueron transfectadas con el DNA de FW023 preparado y p44/45 Mcmv ie1 F (ex. FW142). El cuarto patrón fue que las células CEF fueron transfectadas con el DNA de FW029 preparado y pHVT87-88Bac VP (ex. FW144). El quinto patrón fue que las células CEF fueron transfectadas con el DNA de FW023 preparado y pHVT87-88Pec F (ex. FW145). Estos virus recombinantes resultantes se purificaron en placas mediante placas de tinción con el anticuerpo anti-NDV-F y el anticuerpo anti-IBDV-VP2.

Brevemente, se pusieron en suspensión 10^7 células CEF primarias en 100 µL de MEF-1 (Lonza LNJVD-1004) y se co-transfectaron con 1 µg del vector de homología, por ejemplo, p44/45 Mcmv ie1 F y pHVT Bac VP2 y 2 µg de DNA del HVT, por ejemplo, FC126, FW029 y FW023 por electroporación. La electroporación se realizó en Nucleofector II. Las células transfectadas se diluyeron en 20 mL de L-15 de Leibovitz (GIBCO BRL, Nº de cat. 41300-39), medio 5A de McCoy (GIBCO BRL, nº de catálogo 21500-061) (1:1) y se extendió suero de ternera al 4% (solución denominada medio LM (+)),100 µL por pocillo de placa de 96 pocillos.

Incubando a 37ºC en CO_2 al 5% hasta que las placas se hicieron visibles, las células se retiraron de las placas por 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. Una de las dos placas fue teñida luego con el anticuerpo monoclonal anti-VP2 R63 (ATCC Nº: HB-9490) como anticuerpo primario. Después de detectar el pocillo que contenía las placas recombinantes teñidas, se recuperaron células del pocillo correspondiente de la otra placa, se diluyeron en células CEF secundarias recién preparadas y se transfirieron por igual a dos placas de 96 pocillos para completar la primera ronda de purificación. Se repitió el procedimiento de purificación hasta que cada placa obtenida estuviera teñida positivamente por el anticuerpo monoclonal R63. Posteriormente, el candidato de rHVT doble se tiñó por el anticuerpo anti-NDV-F 3-1G/5 (Morrison, T.G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 1020-1024,

1987) o suero de conejo anti-F. Finalmente, la expresión de proteínas de cada una de las placas del rHVT candidato se confirmó por tinción con IFA doble. Los CEF infectados por cada rHVT se fijaron con una mezcla fría de acetona-metanol (2:1), se lavaron con PBS, se hicieron reaccionar con una mezcla de anticuerpos (suero de conejo anti-F diluido 1:1000 Nº 35 y Mab R63 de ratón anti-VP2) a 37ºC en 60 minutos. Después de lavar 3 veces con PBS, las células reaccionaron con una mezcla de anticuerpos fluorescentes (anti-conejo Alexa Fluor488 diluido 1:1000 y anti-ratón Alexa Fluor546 proporcionados por Invitrogen) a 37ºC en 60 minutos. Después del lavar 3 veces con PBS, se observaron por microscopia de fluorescencia con 400 aumentos. La expresión de la proteína VP2 fue detectada por el MAb Mab (R63) anti-VP2 y Alexa Flour 546. La expresión de la proteína F se detectó por suero de conejo anti-F Nº 35 y Alexa Flour 488. Cuando en todas las placas se expresaron tanto F como VP2, los inventores llegaron a la conclusión que se había completado la purificación. La Figura 3 muestra algunos ejemplos de IFA dual.

El HVT recombinante purificado se denominó rHVT/ND/IBD.

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

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

Virus	Anticuerpo primario		
	Antisuero anti-F	Anticuerpo monoclonal anti-VP2 (R63) de conejo	PBS
FW137	+w	+w	-
FW129	+	+	-
FW130	+	+	-
FW141	+	+	-
FW142	+	+	-
FW144	+	+	-
FW145	+	+	-
FW029	+	-	-
FW023	-	+	-
FC126	-	-	-
Ninguno	-	-	-
+: Detectado, + w: Débilmente detectado, -: no detectado			

Experimento 3: Coexpresión de dos proteínas en CEF infectados con HVT recombinantes dobles

Se infectaron con HVT recombinantes 2 mL que contenían 2 x 10^5 células CEF, y se incubaron a 37ºC en CO_2 al 5%$_2$ durante 3 días.

A continuación, el cultivo se centrifugó a 300 g durante 3 minutos y las células precipitadas se volvieron a poner en suspensión en 100 µL. A la suspensión celular se añadió tampón Laemmli (100 µL). La mezcla resultante se hirvió a continuación durante 5 minutos y 5 µL de la misma se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10%. Las proteínas electroforetizadas se transfirieron desde el gel de SDS a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore), que se bloqueó en polvo de leche sin grasa 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 luego con el antisuero de conejo anti-F Nº 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 anti-conejo biotinilado.

Para la detección de VP2 (Figura 4B), la membrana tratada se hizo reaccionar luego con el Mab 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.

Después de lavar tres veces con PBS, se incubó la membrana 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). Como se muestra en la Figura 4A, se observó una banda de proteína de 60 kilodaltones (kDa) solamente en la pista con células infectadas con rHVT/ND/IBD, que era el tamaño esperado de la proteína F (➡). No había banda en la pista de rHVT/44-45Bac VP2 (FW123).

Se observó la proteína VP2 mostrada en la Figura 3B a 38 kilodaltones (kDa) en las pistas de cada rHVT/ND/IBD (⇨). Por el contrario, no había banda en la pista de rHVT/PecF (FW029) (Fig. 1 B). El peso molecular de 38 kDa es de la proteína VP2 madura (A. A. Azad et al., 1987, *Virol.* 161: 145-152, K. J., Fahey et al., 1985 *J. Gen. Virol.* 66: 1479-1488).

Los HVT recombinantes dobles de acuerdo con la invención expresaban tanto NDV-F como IBDV VP2.

Experimento 4: Verificación de la estructura genómica

Análisis de transferencia de Southern

El rHVT/ND/IBD purificado se propagó en células CEF de un matraz de 25 cm^2 para obtener las placas confluentes. Las células se recuperaron de las placas por raspado, se transfirieron a tubos Falcon y se sometieron a centrifugación a 300 x *g* durante 5 minutos. Las células recogidas se lavaron con PBS, se volvieron a poner en suspensión 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 por agitación con vórtice durante 3 minutos. Los lisados se centrifugaron luego a 600 x *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente y los líquidos sobrenadantes se transfirieron a tubos Falcon de 15 mL. Los virus se recogieron por centrifugación a 20.400 x *g* durante 20 minutos. Los sedimentos resultantes se pusieron luego en suspensión en 0,33 mL de una solución de nucleasa (Tris-Cl 12,5 mM (pH 7,5), 1 µg/mL de DNasa I y 1 µg/mL de RNasa A), se incubaron a 37ºC durante 30 minutos y se interrumpieron incubando a 55ºC durante 30 minutos con 83 µL de solución de SDS-proteasa (EDTA 50 mM, SDS al 5%, 0,5 mg/mL de proteasa K 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 DNA viral se precipitó añadiendo 2,5 volúmenes de etanol enfriado con hielo, se lavó con etanol al 70% y se sometió a centrifugación a 20.400 x *g* durante 20 minutos a 4ºC. Después del secado al aire, los sedimentos se disolvieron en tampón TE (Tris-Cl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM).

El DNA viral en tampón TE se digirió con XhoI, SphI y SmaI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Los fragmentos de DNA electroforetizados en el único gel se transfirieron simultáneamente a dos membranas de nilón (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, 6.35, Sambrook, J., and Russell, D.W. Cold Spring Harbor Laboratory). Después de fijar el DNA por cocción, el DNA inmovilizado se hibridó con una sonda marcada con DIG, "sonda para VP2" o "sonda para IS44/45" que se preparó con el kit de síntesis de sonda DIG para PCR (ROCHE DIAGNOSTICS, Nº catálogo 1636090). Además, el DNA viral en tampón TE se digirió con XhoI y SphI, y se hibridó con una sonda marcada con DIG, "sonda para F", "sonda para IS45/46" por el mismo procedimiento mencionado anteriormente. La sonda para VP2 se preparó con VP2 STC-F (SEQ ID NO: 21) y VP2 STC-R (SEQ ID NO: 22) como cebadores y p45/46BacVP2-STC como molde. La sonda para F se preparó con F-F (SEQ ID NO. 23) y F-R (SEQ ID Nº 24) como cebadores y p45/46PecF como molde. La sonda para IS45/46 se preparó con 45/46-F (SEQ ID NO. 25) y 45/46-R (SEQ ID NO. 26) como cebadores y pNZ45/46Sfi como molde. La sonda para IS44/45 se preparó con 44/45-F (SEQ ID NO: 27) y 44/45-R (SEQ ID NO: 28) como cebadores y pNZ44/45d46Sfi como molde.

VP2 STC-F	(SEQ ID NO: 21) 5'-CACCGTCCTCAGCTTACCCACATC-3'
VP2 STC-R	(SEQ ID NO: 22) 5'-ACGACGGATCCTGTTGCCACTCT-3'
NDV-F-F	(SEQ ID NO: 23) 5'-CTAGCAGTGGCAGTTGGGAAGAT-3'
NDV-F-R	(SEQ ID NO: 24) 5'-GTTAAGGCAGGGGAAGTGATTTGT-3'
45/46-F	(SEQ ID NO. 25) 5'-GGGGAAGTCTTCCGGTTAAGGGAC-3'
45/46-R	(SEQ ID NO: 26) 5'-GGTGCAATTCGTAAGACCGATGGG-3'
44/45-F	(SEQ ID NO: 27) 5'-GTACTATAGAATGTGTTCC-3'
44/45-R	(SEQ ID NO: 28) 5'-GTATCCAACGCCTCAAGATC-3'

Los resultados de la transferencia de Southern mostraron (Figuras 5A-5D) que un fragmento de 2077 pb estaba hibridado con la sonda para VP2 en el DNA de FW129. En contraste, no se detectó ninguna banda en p45/46Pec F.

Además, el fragmento de 2744 pb estaba hibridado con la sonda para F en el DNA de cada HVT recombinante doble. No se detectó ninguna banda en p45/46SfiI.

Los fragmentos de 2077 pb y de 1228 pb estaban hibridados con la sonda para IS44/45 en el DNA de FW129. El fragmento de 1350 pb estaba hibridado con la sonda IS44/45 en p45/46 PecF, y no estaba insertado ningún gen en el sitio IS44/45. Los fragmentos de 2744 pb y 770 pb estaban insertados con la sonda para IS45/46 en el DNA de cada HVT recombinante doble. La Figura 5A-5D indicó que los recombinantes dobles HVT/ND/IBD obtenidos tienen la estructura genómica esperada.

Experimento 5: Estabilidad de los HVT recombinantes en los pases

Análisis de transferencia de Western

Los HVT recombinantes dobles se sometieron a pases en serie (hasta 15 veces) en fibroblastos de embriones de pollo (CEF). A continuación, los lisados celulares se aplicaron a análisis de transferencia de Western. En un primer panel (Figura 6A), la mancha de transferencia se hizo reaccionar con un suero de conejo anti-F (Nº 35). En un segundo panel (Figura 6B) la mancha de transferencia se hizo reaccionar con un Mab (R63) anti-VP2. Sin tratamiento: CEF no infectado. M: Patrones de precisión más proteína Bio Rad Nº 161-0374

Después de 15 pases, F y VP2 se expresaron establemente en CEF infectados con HVT recombinante doble. Sin embargo, FW137 no expresó ninguna señal de los antígenos F y VP2 después de 15 pases indicando que es inestable el HVT recombinante que tiene dos genes en un solo sitio.

Análisis de transferencia de Southern

M: Marcador molecular lambda HindIII digerido

TP-24: plásmido de transferencia p44-45d46SV40VP2

TP-25: plásmido de transferencia p44-45d46RsvVP2

Cada rHVT/ND/IBD se sometió a pases quince veces en células CEF y se sometió a análisis de 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 incluso después de 15 pases.

Los resultados de la transferencia de Southern mostraron, Figura 7A, que un fragmento de 2077 pb estaba hibridado con la sonda para VP2 en el DNA de FW129. El fragmento de 2334 pb estaba hibridado con la sonda para VP2 en el DNA de FW130. En contraste, no se detectó ninguna banda en p45/46Pec F.

La Figura 7C muestra que un fragmento de 2744 pb estaba hibridado con la sonda para F en el DNA de cada HVT recombinante doble. No se detectó ninguna banda en el p45/46 SfiI.

La Figura 7B muestra que los fragmentos de 2077 pb y 1228 pb estaban hibridados con la sonda para IS44/45 en el DNA de FW129, y los fragmentos de 2334 pb y 1022 pb estaban hibridados con la sonda para IS44/45 en el DNA de FW130. Un fragmento de 1350 pb estaba hibridado con la sonda para IS44/45 en p45/46 PecF, que no contenía ningún gen en el sitio IS44/45.

La Figura 7D muestra que los fragmentos de 2744 pb y 770 pb estaban hibridados con la sonda para IS45/46 en el DNA 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 establemente en el sitio de inserción 44/45 o 45/46 respectivamente en FW129 y FW130.

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

Se inocularon subcutáneamente 3.000 UFP/200 µL/ave de cada rHVT/ND/IBD en la parte trasera de diez pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día (LineM, Japan Biological Laboratories) usando una jeringa de calibre 20. Tres semanas posteriores a la vacunación, se recogió suero de las aves vacunadas. El título de anticuerpos anti-NDV se midió por un kit ELISA comercial (IDEXX, kit ELISA para diagnosticar la enfermedad de Newcastle). El anticuerpo anti-IBDV se tituló por un kit ELISA comercial, *Flock Check Infectious Bursal Disease Antibody Test Kits* (IDEXX Laboratory, Inc.). A los pollos del grupo de control negativo (no inmunitario) no se les administró ninguna vacuna.

La Figura 8A muestra el cambio del título anti-NDV. La Figura 8B muestra el cambio del título anti-IBDV. El HVT recombinante doble que utiliza dos sitios indujo establemente títulos tanto de anti-NDV como de anti-IBDV.

Experimento 7: Eficacia de rHVT/ND/IBD en pollos SPF contra el NDV

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

3,000 UFP/200µL/ave de rHVT/ND se inocularon subcutáneamente en la parte trasera de diez pollos SPF de un día (LineM, Japan Biological Laboratories) usando una jeringa de calibre 20. Tres semanas después de la vacunación, se recogió el suero de las aves vacunadas y se midió el título de anticuerpos anti-NDV por un kit ELISA comercial (IDEXX, kit ELISA para diagnosticar la enfermedad de Newcastle).

Los pollos del grupo de control positivo fueron vacunados cuando tenían 14 días con una vacuna viva de NDV comercial de acuerdo con la recomendación del vendedor. A los pollos del grupo de control negativo no se les administró ninguna vacuna.

Cuando tenían 43 días (42 días después de la vacunación), los pollos de los siete grupos fueron inoculados con 10^3 dosis infectiva de 50% de los huevos (abreviadamente EID_{50} por sus siglas en inglés) de NDV-TexasGB, la cepa estándar para la prueba de virulencia en Estados Unidos, intramuscularmente hasta la región femoral. Los pollos sometidos a la prueba de virulencia se observaron diariamente para verificar la mortalidad y para detectar cualquier síntoma de la enfermedad de Newcastle.

Tabla 2. Experimentos de la prueba de virulencia con NDV virulento en pollos SPF vacunados con rHVT/ND/IBD

Vacunación	Dosis (UFP/pollo)	Número de pollos	Número de síntomas/total (%)	Título HI (ELISA) al salir del cascarón	Título de ELISA en la prueba de virulencia
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 viva comercial contra NDV	En la etiqueta	10	0/10 (0)		1,089
Controles con prueba de virulencia	N/A	10	11/12 (92)		0,089
Controles sin prueba de virulencia	N/A	10	0/5 (0)		N/A

Como se muestra en la Tabla 2, los pollos vacunados con rHVT/ND/IBD de la invención no mostraron signos clínicos y el título de ELISA en el día de la prueba de virulencia fue significativamente elevado. Como se esperaba, tanto los pollos vacunados con FW137 (donde dos secuencias de nucleótidos recombinantes estaban insertadas en el mismo sitio de inserción) o FW135 (en donde el promotor de Bac estaba insertado entre UL44 y UL45) muestran signos clínicos y el título de ELISA era débil.

Experimento 8: Eficacia del rHVT/ND/IBD en pollos SPF contra el IBDV.

La eficacia de FW129 y FW141 (HVT/45-46 PecF/44-45 Mcmv ie1 VP2) como vacuna para la IBD se evaluó mediante la prueba de virulencia con IBDV STC.

En primer lugar, se inocularon 2.000 UFP de rHVT/ND/IBD en huevos de pollo embrionarios SPF el día 18 o subcutáneamente en la parte posterior de pollos SPF de un día. Cuando tenían tres semanas, los pollos vacunados fueron sometidos a la prueba de virulencia por vía oral con $10^{3.5}$ EID_{50}/ave de IBDV STC. Una semana más tarde, todos los pollos fueron pesados y necropsiados para recuperar las bolsas de Fabricio, que se observaron para detectar cualquier lesión causada por la bursitis Infecciosa.

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

Tabla 3. Experimentos de la prueba de virulencia con IBDV virulento en pollos SPF vacunados con rHVT/ND/IBD

Vacunación		Nº de protegido/total
Vacuna	Vía	(%)
FW129	SQ	7/8 (88%)
FW141	SQ	8/8 (100%)
FW023	SQ	8/8 (100%)
FW129	In ovo	8/10 (80%)
FW141	In ovo	9/10 (90%)
FW023	In ovo	9/10 (90%)
Ninguna	N/A	0/4 (0%)
Ninguna	N/A	5/5 (100%)

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

Experimento 9: Ensayo de prueba de virulencia con IBDV a las 8 semanas en pollos MDA+

Grupos:
G1: NINC (ni vacunados ni sometidos a la prueba de virulencia)
G2: NICC (no vacunados y sometidos a la prueba de virulencia)
G3: FW141
G4: FW144
G5: FW 023 (control positivo)

Polluelos

Aves con anticuerpos derivados maternalmente (abreviadamente MDA+ por sus siglas en inglés) (capas), 16 a 17 aves/grupo en cada grupo.

Se inocularon subcutáneamente tres mil UFP de vacunas en la parte trasera de 16 a 17 pollos MDA+ de un día. Cuando tenían 8 semanas, los pollos vacunados fueron sometidos a la prueba de virulencia por vía oral con 10^3 dosis infectiva en 50% de cultivo de tejidos (abreviadamente $TCID_{50}$ por sus siglas en inglés/ave de IBDV STC. Una semana más tarde, todos los pollos fueron pesados y necropsiados para recuperar las bolsas de Fabricio, que se observaron para detectar cualquier lesión causada por la bursitis Infecciosa.

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

	n	**Índice B/B**	**Muertos**	**Lesionados**	**% de protección**
NINC	16	1,00	0	0/16	-
NICC	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 prueba de virulencia de NDV a las 8 semanas en pollos MDA+

Grupo
G1: control de la prueba de virulencia
G2: FW141
G3: FW144
G4: FW145
G5: FW 029 (control positivo)

Polluelos

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

Se inocularon subcutáneamente tres mil UFP de vacunas en la parte trasera de 17 pollos MDA+ de un día. Cuando tenían 8 semanas, los pollos vacunados fueron sometidos a la prueba de virulencia con 10^3 EID_{50} de NDV-TexasGB, la cepa estándar para la prueba de virulencia en Estados Unidos, intramuscularmente hasta la región femoral. Los pollos sometidos a la prueba de virulencia se observaron diariamente para verificar la mortalidad y para detectar cualquier síntoma de la enfermedad de Newcastle. Los resultados se presentan a continuación.

	Inmunizados	Sometidos a la prueba de virulencia	Muertos	Síntoma*	% de protección
Control con prueba de virulencia	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 protección eficaz *in vivo* contra el NDV y el IBDV. La protección es fuerte y estable.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CEVA SANTE ANIMALE

<120> Herpesvirus aviares recombinantes multivalentes y vacunas para inmunizar a especies aviares

<130> B1326PC00

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1506
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> promotor Bac

<400> 1

```
tgcagctcag tgcatgcacg ctcattgccc atcgctatcc ctgcctctcc tgctggcgct        60

ccccgggagg tgacttcaag gggaccgcag gaccacctcg ggggtggggg gagggctgca       120

cacgcggacc ccgctccccc tccccaacaa agcactgtgg aatcaaaaag gggggagggg       180

ggatggaggg gcgcgtcaca cccccgcccc acaccctcac ctcgaggtga gccccacgtt       240

ctgcttcact ctccccatct ccccccccctc cccaccccca attttgtatt tatttatttt       300

ttaattattt tgtgcagcga tgggggcggg ggggggggggg gcgcgcgcca ggcggggcgg       360

ggcggggcca ggggcggggc ggggcgaggc ggagaggtgc ggcggcagcc aatcagagcg       420

gcgcgctccg aaagtttcct tttatggcga ggcggcggcg gcggcggccc tataaaaagc       480

gaagcgcgcg gcgggcggga gtcgctgcgc gctgccttcg ccccgtgccc cgctccgccg       540

ccgcctcgcg ccgcccgccc cggctctgac tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc       600

gggacggccc ttctcctccg ggctgtaatt agcgcttggt ttaatgacgg ctcgtttctt       660

ttctgtggct gcgtgaaagc cttaaagggc tccgggaggg ccctttgtgc ggggggggagc      720

ggctcggggg gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg ctccgcgctg       780

cccggcggct gtgagcgctg cgggcgcggc gcggggcttt gtgcgctccg cagtgtgcgc       840

gaggggagcg cggccggggg cggtgccccg cggtgcgggg ggggctgcga ggggaacaaa       900

ggctgcgtgc ggggtgtgtg cgtgggggggg tgagcagggg gtgtgggcgc ggcggtcggg      960

ctgtaacccc cccctgcacc cccctccccg aagttgctga gcacggcccg gcttcgggtg      1020

cggggctccg tgcggggcgt ggcgcggggc tcgccgtgcc gggcgggggg tggcggcagg      1080

tgggggtgcc gggcggggcg gggccgcctc gggccgggga gggctcgggg gaggggcgcg      1140

gcggcccccg gagcgccggc ggctgtcgag gcgcggcgag ccgcagccat tgccttttat      1200

ggtaatcgtg cgagagggcg cagggacttc ctttgtccca aatctgtgcg gagccgaaat      1260
```

ctgggaggcg ccgccgcacc ccctctagcg ggcgcggggc gaagcggtgc ggcgccggca 1320

ggaaggaaat gggcggggag ggccttcgtg cgtcgccgcg ccgccgtccc cttctccatc 1380

tccagcctcg gggctgtccg caggggggacg gctgccttcg gggggggacgg ggcagggcgg 1440

ggttcggctt ctggcgtgtg accggcgggg tttatatctt cccttctctg ttcctccgca 1500

gccccc 1506

<210> 2
<211> 557
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> promotor Pec
<400> 2

tgcagagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagy 60

tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgccggctga ccgcccaacg acccccgccc 120

attgacgtca ataatgacgt atgytcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg 180

tcaatgggtg gagtayttac ggtaaactgc ccattggcag tacatcaagt gtatcatatg 240

ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatgga tgcagtattt tgtgcagcga 300

tgggggcggg gggggggggc gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg 360

ggcgaggcgg agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt 420

tatggcgagg cggcggcggc ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc gggcgggagt 480

cgctgcgcgc tgccttcgcc ccgtgccccg ctccgccgcc gcctcgcgcc gcccgccccg 540

gctctgactg accgcgt 557

<210> 3
<211> 541
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> promotor Mcmv ie1
<400> 3

tactgagtca ttagggactt tccaatgggt tttgcccagt acataaggtc aataggggtg 60

aatcaacagg aaagtcccat tggagccaag tacactgagt caatagggac tttccattgg 120

gttttgccca gtacaaaagg tcaatagggg gtgagtcaat gggtttttcc cattattggc 180

acgtacataa ggtcaatagg ggtgagtcat tgggtttttc cagccaattt aattaaaacg 240

ccatgtactt tcccaccatt gacgtcaatg ggctattgaa actaatgcaa cgtgaccttt 300

aaacggtact ttcccatagc tgattaatgg gaaagtaccg ttctcgagcc aatacacgtc 360

aatgggaagt gaaagggcag ccaaaacgta acaccgcccc ggttttcccc tggaaattcc 420

atattggcac gcattctatt ggctgagctg cgttctacgt gggtataaga ggcgcgacca 480

gcgtcggtac cgtcgcagtc ttcggtctga ccaccgtaga acgcagagct cctcgctgca 540

g 541

<210> 4
<211> 589
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> promotor Hcmv

<400> 4
gagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg 120

acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa 180

tgggtggagt atttacggta aactgcccat tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa 240

gtacgccccc tattgacgtc aatgacggta aatggcgcgc ctggcattat gcccagtaca 300

tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca 360

tggtgatgcg 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> DNA
<213> artificial
<220>
<223> promotor SV40
<400> 5
gcgcagcacc atggcctgaa ataacctctg aaagaggaac ttggttaggt accttctgag 60

gcggaaagaa ccagctgtgg aatgtgtgtc agttagggtg tggaaagtcc ccaggctccc 120

cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaagt 180

ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca 240

tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc gcccagttcc gcccattctc 300

cgccccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc cgaccgcctc ggcctctgag 360

ctattccaga agtagtgagg aggcttttt 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> DNA
<213> artificial
<220>
<223> promotor RSV

<400> 6
tgcatctgct ccctgcttgt gtgttggagg tcgctgagta gtgcgcgagc aaaatttaag 60

ctacaacaag gcaaggcttg accgacaatt gcatgaagaa tctgcttagg gttaggcgtt 120

ttgcgctgct tcgcgatgta cgggccagat atacgcgtat ctgaggggac tagggtgtgt 180

ttaggcgaaa agcggggctt 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 aataccgcat tgcagagata attgtattta agtgcctagc 480

tcgatacaat aaacgccatt tgaccattca ccacattggt gtgcacctgg ctag 534

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> cebador
<400> 7
ccccgaattc atggaagaaa tttcc 25
<210> 8
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> cebador
<400> 8
cgcgggccaa taaggccaac atcgggacgt acatc 35
<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> cebador
<400> 9
gcgcggcctt attggcctta ataccgcgt ttggag 36
<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> cebador
<400> 10
ccccaagctt tcaagtgata ctgcgtga 28
<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> cebador
<400> 11
gggaattcga agagcccccg cggacgcatg 30
<210> 12
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> cebador
<400> 12
ccgctagcgg ccgcaagttc cttcaccatg accag 35

<210> 13
<211> 43
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> cebador
<400> 13
gcggccgcta gcggccttat tggccgtagc ataaagacgc agg 43
<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> cebador
<400> 14
ccaagcttct agtacatata tatacatgac 30
<210> 15
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> cebador
<400> 15
gggggaattc attatcccat ctaacagtta tatacg 36
<210> 16
<211> 33
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> cebador
<400> 16
gccgctagcg gccgccttta ttaacaacct tac 33
<210> 17
<211> 43
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> cebador
<400> 17
gcggccgcta gcggccttat tggccgttta ttctatgtaa gac 43
<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> cebador
<400> 18
cccaagctta agttccttca ccatg 25
<210> 19
<211> 572
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> promotor Mcmv ie1

<400> 19
ggccaataag gctgcagtac tgagtcatta gggactttcc aatgggtttt gcccagtaca 60

taaggtcaat aggggtgaat caacaggaaa gtcccattgg agccaagtac actgagtcaa 120

tagggacttt ccattgggtt ttgcccagta caaaaggtca atagggggtg agtcaatggg 180

tttttcccat tattggcacg tacataaggt caataggggt gagtcattgg gtttttccag 240

ccaatttaat taaaacgcca tgtactttcc caccattgac gtcaatgggc tattgaaact 300

aatgcaacgt gacctttaaa cggtactttc ccatagctga ttaatgggaa agtaccgttc 360

tcgagccaat acacgtcaat gggaagtgaa agggcagcca aaacgtaaca ccgccccggt 420

tttcccctgg aaattccata ttggcacgca ttctattggc tgagctgcgt tctacgtggg 480

tataagaggc gcgaccagcg tcggtaccgt cgcagtcttc ggtctgacca ccgtagaacg 540

cagagctcct cgctgcaggc ggccgctcta ga 572

<210> 20
<211> 87
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> SPA
<400> 20
ctgcaggcgg ccgctctaga gtcgacaata aaagatcttt attttcatta gatctgtgtg 60

ttggtttttt gtgtggccaa taaggcc 87

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> VP2 STC-F
<400> 21
caccgtcctc agcttaccca catc 24

<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> VP2 STC-R
<400> 22
acgacggatc ctgttgccac tct 23

<210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> NDV-F-F
<400> 23
ctagcagtgg cagttgggaa gat 23

<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> NDV-F-R
<400> 24
gttaaggcag gggaagtgat ttgt 24

<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> 45/46-F
<400> 25
ggggaagtct tccggttaag ggac 24
<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> 45/46-R
<400> 26
ggtgcaattc gtaagaccga tggg 24
<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> 44/45-F
<400> 27
gtactataga atgtgttcc 19
<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> 44/45-R
<400> 28
gtatccaacg cctcaagatc 20

REIVINDICACIONES

1. Un herpesvirus aviar recombinante de pavos (rHVT), que comprende al menos una primera y una segunda secuencias de nucleótidos recombinantes, dichas primera y segunda secuencias de nucleótidos recombinantes codifican péptidos antigénicos distintos procedentes de uno o más patógenos aviares, en donde la primera secuencia de nucleótidos recombinante está insertada bajo el control de un promotor Pec en una región no codificadora del genoma viral situada entre UL45 y UL46, y la segunda secuencia de nucleótidos recombinante está insertada en una región no codificadora del genoma viral situada entre UL44 y UL45 entre US10 y SORF3 o entre SORF3 y US2.

2. El rHVT de la reivindicación 1, en el que los péptidos antigénicos se seleccionan entre proteínas de superficie, proteínas secretadas o proteínas estructurales de dichos uno o más patógenos aviares.

3. El rHVT de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los péptidos antigénicos se eligen entre un péptido antigénico de paramixovirus aviar de tipo 1, preferiblemente la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) o uno de sus fragmentos antigénicos, un péptido antigénico del virus de la enfermedad de Gumboro, preferiblemente la proteína VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV) o uno de sus fragmentos antigénicos, un péptido antigénico del virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV), preferiblemente la proteína gB o uno de sus fragmentos antigénicos, un péptido antigénico de *Mycoplasma gallisepticum*, preferiblemente la proteína 40K o uno de sus fragmentos antigénicos, y un péptido antigénico del virus de la gripe aviar, preferiblemente una proteína de superficie hemaglutinina (HA) o uno de sus fragmentos antigénicos.

4. El rHVT de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de nucleótidos recombinante insertada en la región situada entre UL45 y UL46 tiene la misma orientación de transcripción que UL46, opuesta a la orientación de transcripción de UL45.

5. El rHVT de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende insertada entre UL45 y UL46 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) o un fragmento antigénico de la misma bajo el control del promotor Pec, e insertada entre UL44 y UL45 una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la proteína VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV) o un fragmento antigénico de la misma bajo el control de un promotor ie1 de Mcmv.

6. Una vacuna multivalente que comprende una cantidad inmunizante eficaz de un rHVT de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

7. Un rHVT de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en inmunizar a un ave, contra un patógeno.

8. Un rHVT para el uso de la reivindicación 7, donde el ave es un ave de corral, preferiblemente pollos.

9. Una vacuna multivalente de la reivindicación 6, para su uso en un método para vacunar un ave simultáneamente contra al menos dos patógenos.

10. Un kit de vacunación que comprende los siguientes componentes:
    a. una cantidad eficaz de la vacuna de la reivindicación 6, y
    b. un medio para administrar dicha vacuna a un ave.

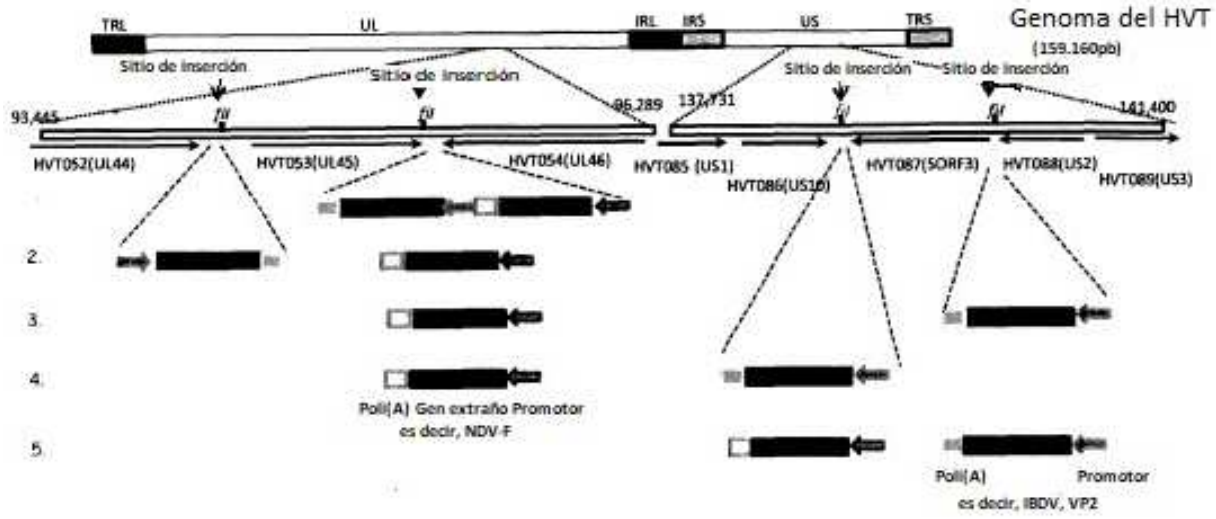
TRL
UL
IRL
IRS
US
TRS
Genoma del HVT
(159.160pb)
Sitio de inserción
Sitio de inserción
Sitio de inserción
Sitio de inserción
93,445
96.289
137,731
141,400
HVT052(UL44)
HVT053(UL45)
HVT054(UL46)
HVT085 (US1)
HVT086(US10)
HVT087(SORF3)
HVT088(US2)
HVT089(US3)
2.
3.
4.
5.
Poli(A) Gen extraño Promotor
es decir, NDV-F
Poli(A)
Promotor
es decir, IBDV, VP2

Fig. 1

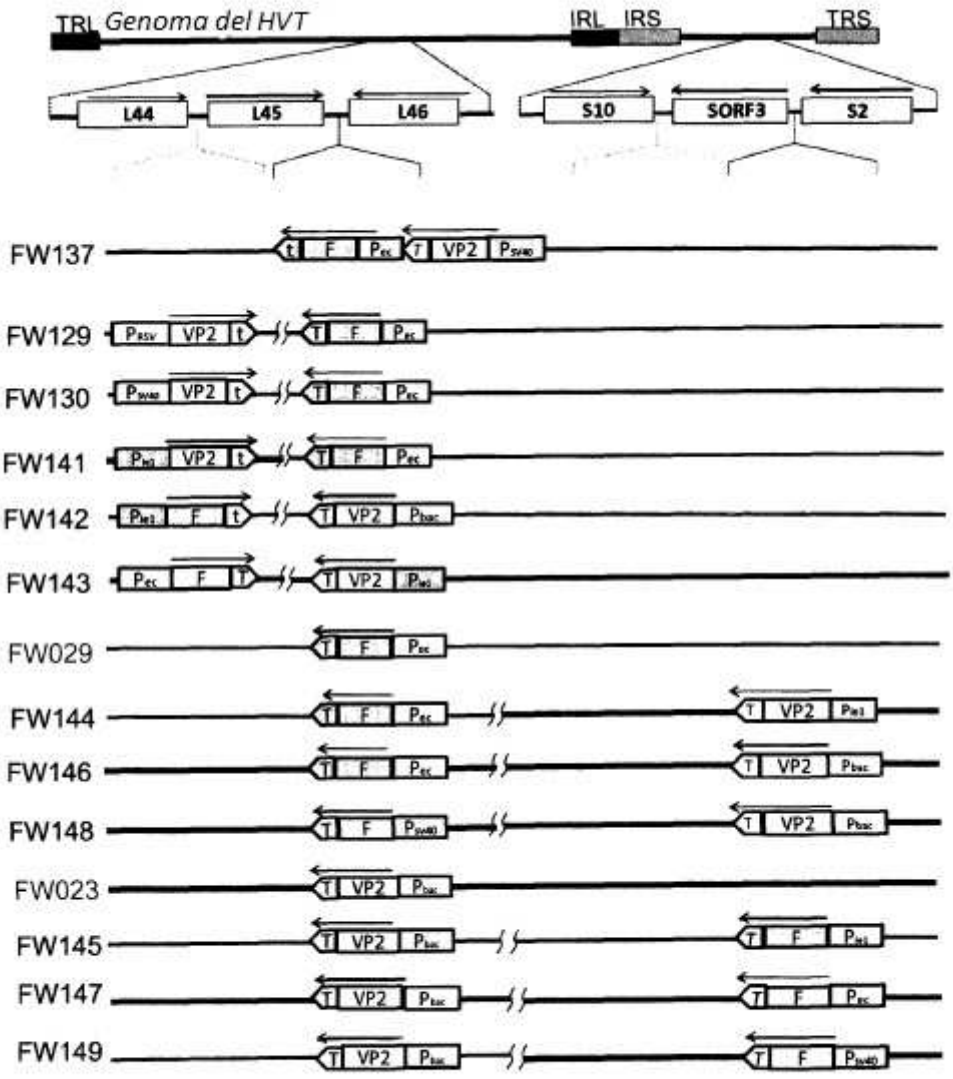
TRL
Genoma del HVT
IRL
IRS
TRS
L44
L45
L46
S10
SORF3
S2
FW137
FW129
FW130
FW141
FW142
FW143
FW029
FW144
FW146
FW148
FW023
FW145
FW147
FW149
VP2
F

Fig. 2A

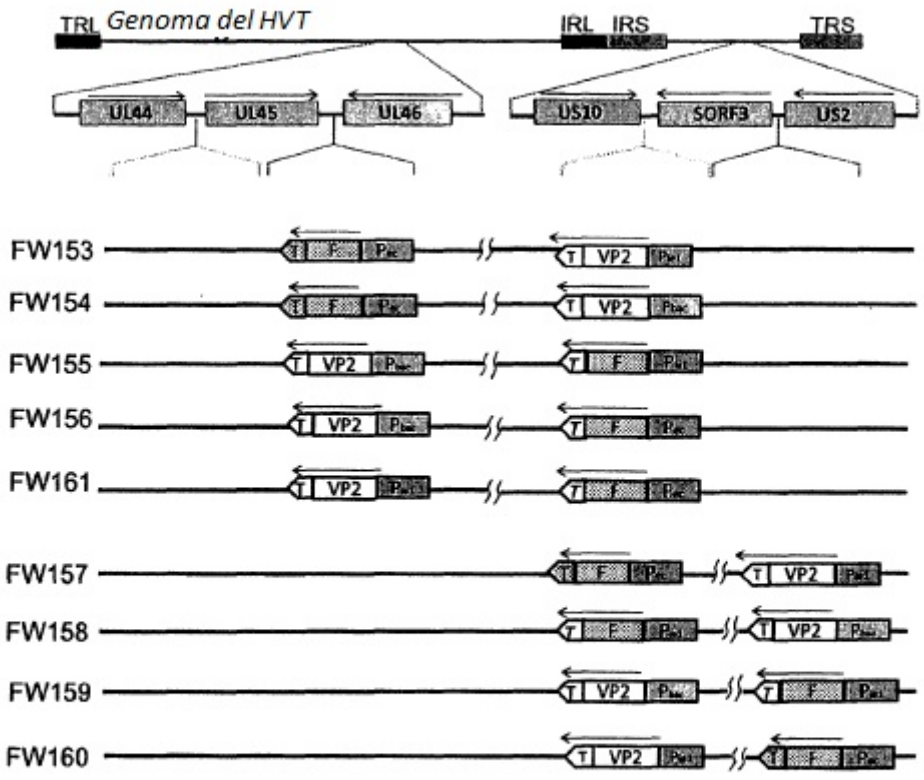
TRL
Genoma del HVT
IRL
IRS
TRS
UL44
UL45
UL46
US10
SORF3
US2
FW153
FW154
FW155
FW156
FW161
FW157
FW158
FW159
FW160
VP2

Fig. 2B

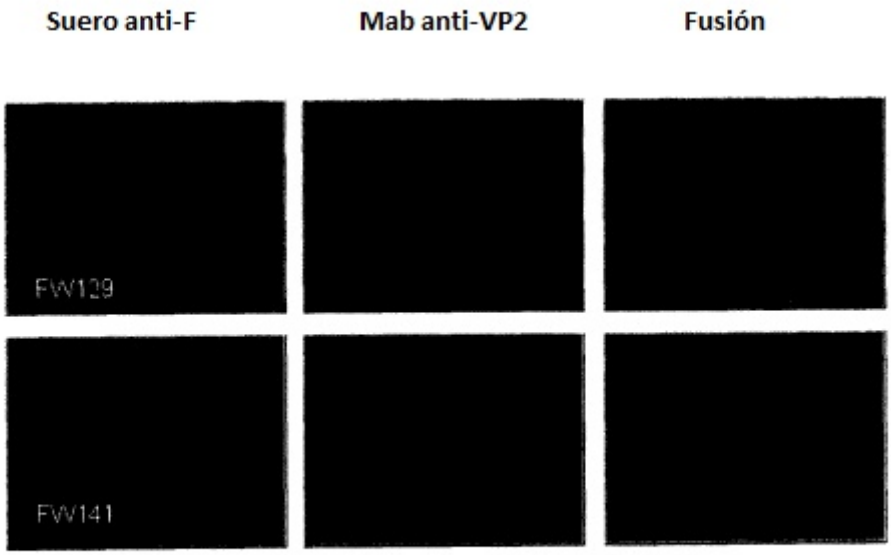
Suero anti-F
Mab anti-VP2
Fusión
FW129
FW141

Fig. 3

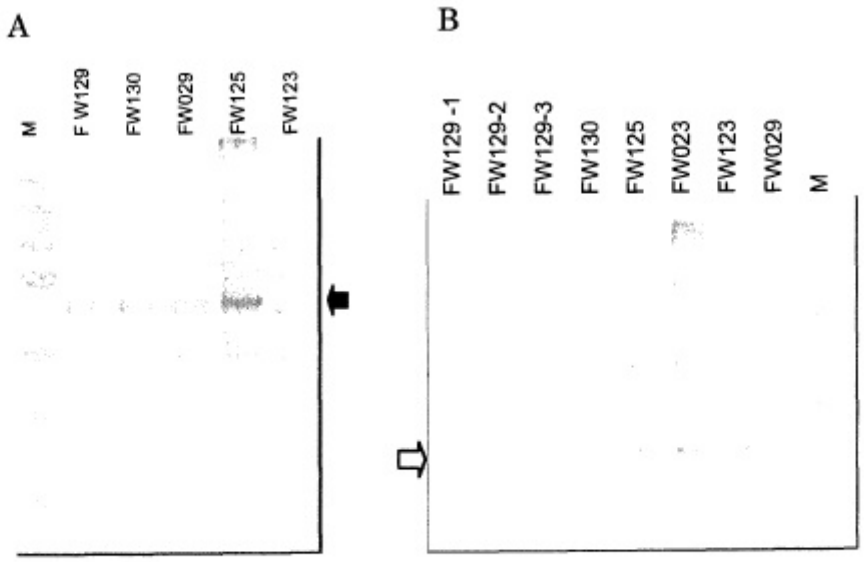
A
M
F W129
FW130
FW029
FW125
FW123
B
FW129 -1
FW129-2
FW129-3
FW130
FW125
FW023
FW123
FW029
M

Fig. 4

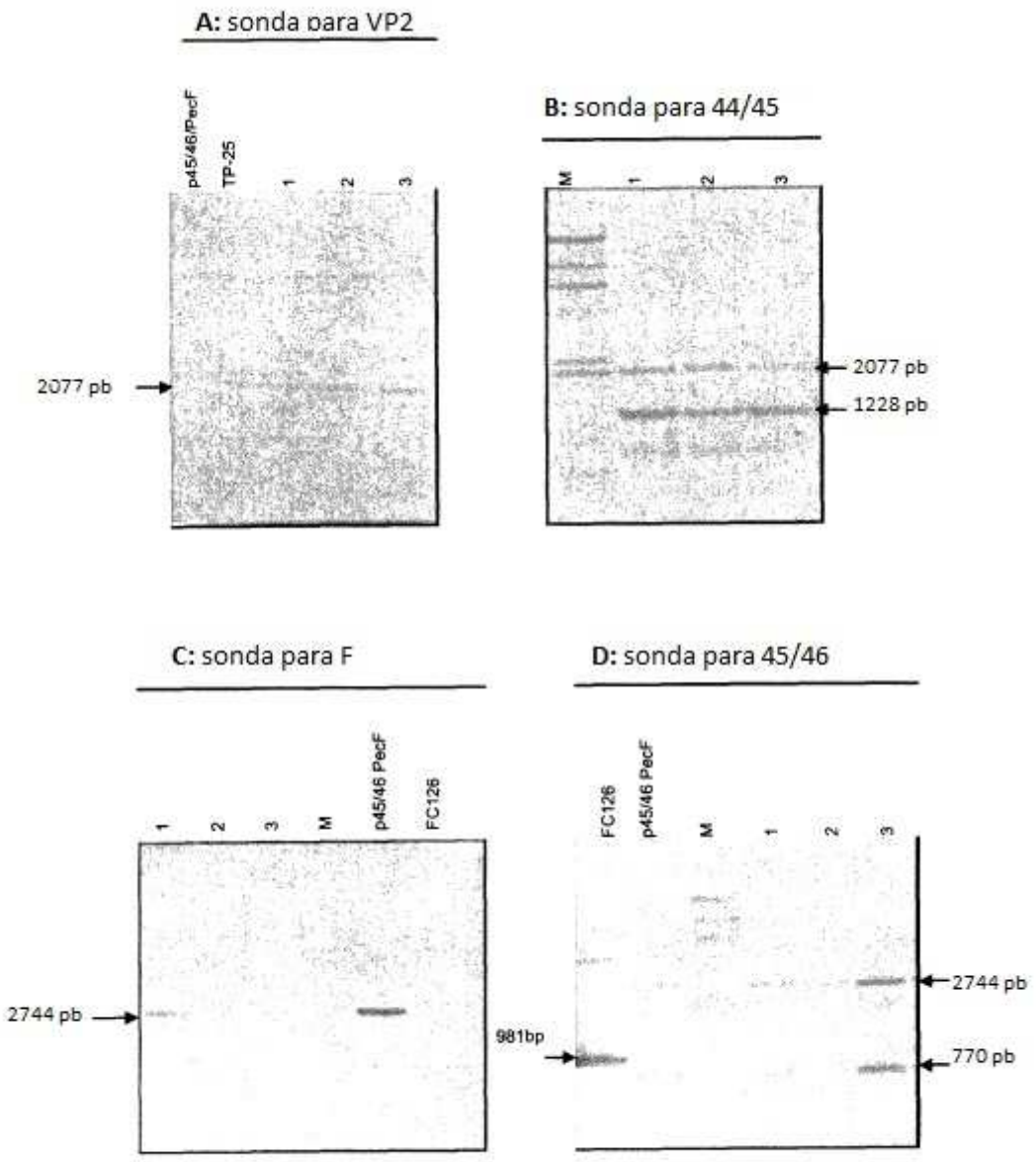
A: sonda para VP2
p45/46/PecF
TP-25
1
2
3
2077 pb
B: sonda para 44/45
M
1
2
3
2077 pb
1228 pb
C: sonda para F
1
2
3
M
p45/46 PecF
FC126
2744 pb
D: sonda para 45/46
FC126
p45/46 PecF
M
1
2
3
2744 pb
981bp
770 pb

Fig. 5

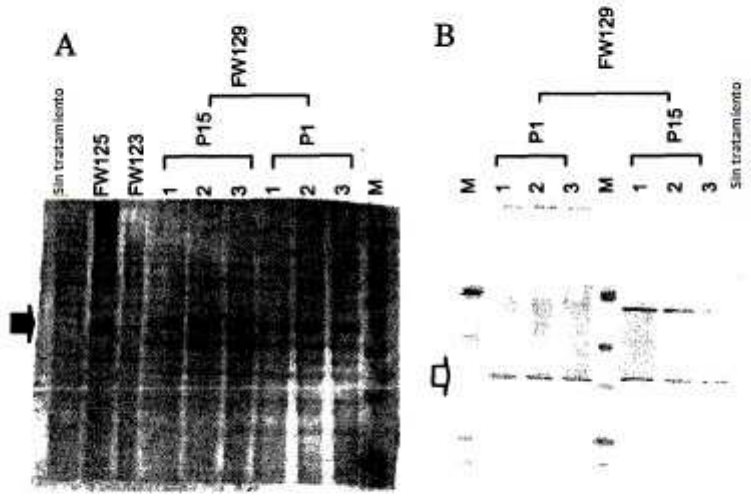
A
Sin tratamiento
FW125
FW123
P15
FW129
P1
1
2
3
1
2
3
M
B
FW129
P1
P15
M
1
2
3
M
1
2
3
Sin tratamiento

Fig. 6

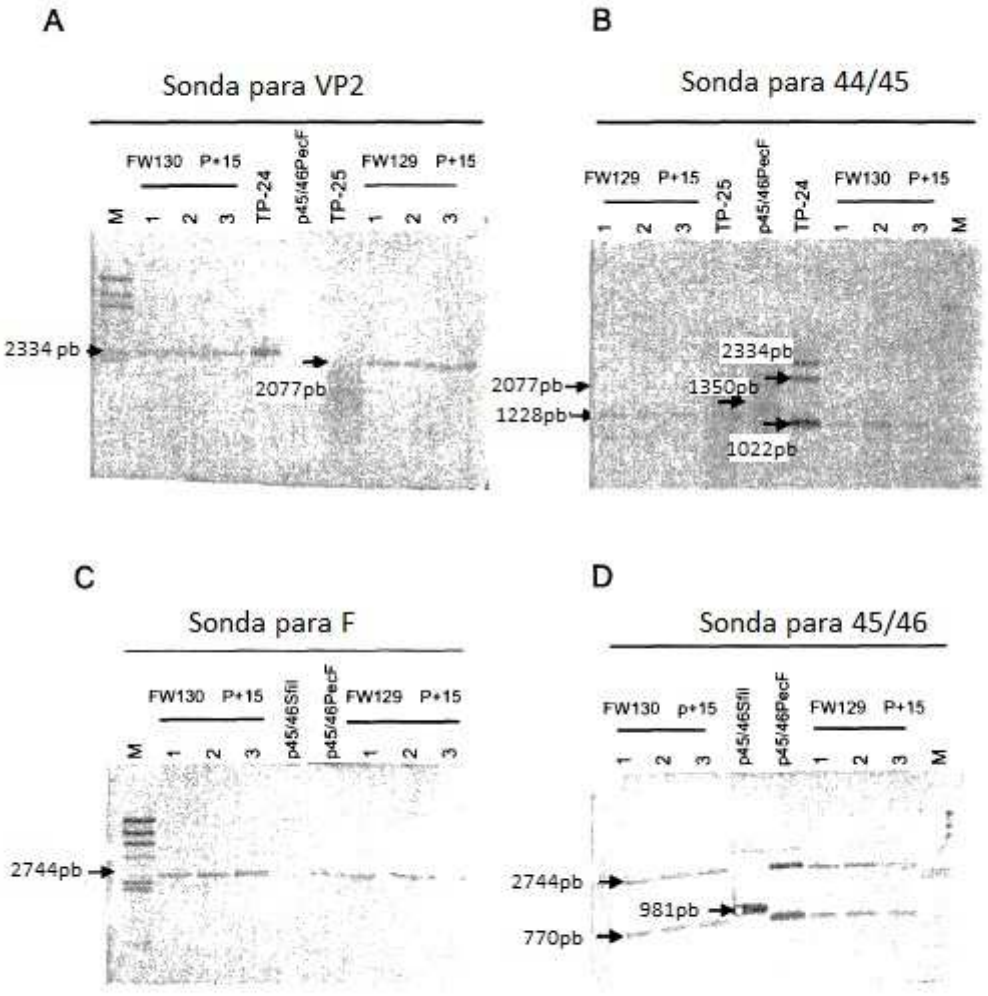
A
Sonda para VP2
FW130 P+15
TP-24
p45/46PecF
TP-25
FW129 P+15
M 1 2 3 1 2 3
2334 pb
2077pb
B
Sonda para 44/45
FW129 P+15
TP-25
p45/46PecF
TP-24
FW130 P+15
1 2 3 1 2 3 M
2334pb
2077pb
1350pb
1228pb
1022pb
C
Sonda para F
FW130 P+15
p45/46SfiI
p45/46PecF
FW129 P+15
M 1 2 3 1 2 3
2744pb
D
Sonda para 45/46
FW130 p+15
p45/46SfiI
p45/46PecF
FW129 P+15
1 2 3 1 2 3 M
2744pb
981pb
770pb

Fig. 7

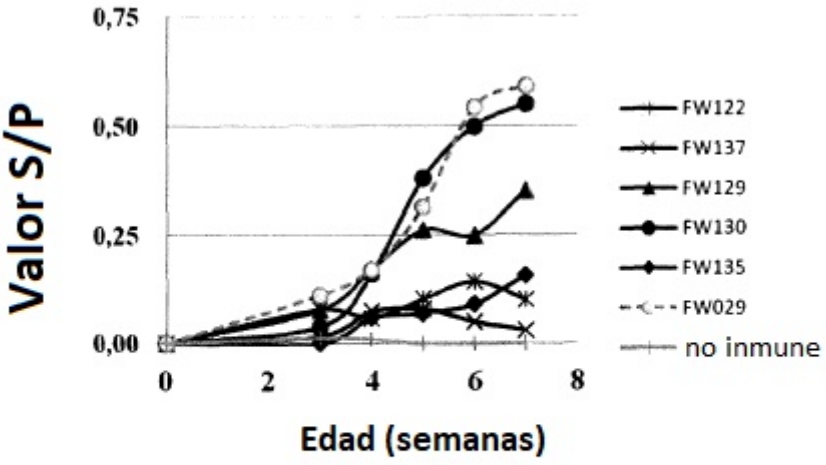
0,75
0,50
0,25
0,00
Valor S/P
0
2
4
6
8
Edad (semanas)
FW122
FW137
FW129
FW130
FW135
FW029
no inmune

Fig. 8 A

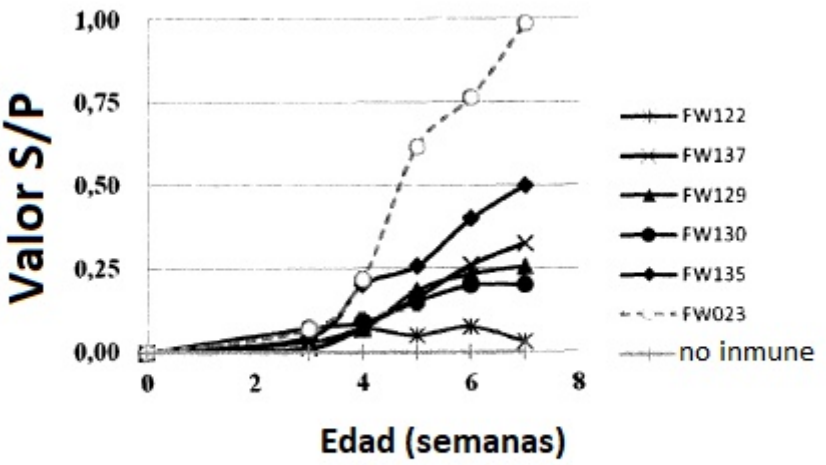
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
Valor S/P
0
2
4
6
8
Edad (semanas)
FW122
FW137
FW129
FW130
FW135
FW023
no inmune

Fig. 8B