

REIVINDICACIONES

1. Un virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2) que expresa un polinucleótido heterólogo que codifica y expresa un gen o antígeno de un patógeno aviar, insertado en la región intergénica UL45/UL46 y en las regiones génicas US2 de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2).
2. El virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2) de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2) se selecciona entre las cepas no oncogénicas: SB-1, 301B/1, y HPRS-24.
3. El virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2) de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque las secuencias de polinucleótidos heterólogos que pueden ser insertadas en el genoma *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2) son: (i) gen de fusión (F) (SEQ. ID. NO. 3) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) genotipo XII, o al menos otro gen hemaglutinina neuraminidasa (HN), (ii) las glicoproteínas D e I (gD-I) (SEQ. ID. NO. 20) de laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV) o al menos un gen de los siguientes genes gB, gE, y gC., (iii) la proteína VP2 (SEQ. ID. NO. 34) de la enfermedad infecciosa de Gumboro (IBDV) o al menos un gen de los siguientes genes VP3, VP4 de IBDV, (iv) el gen de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de H5N1, H5N9, de influenza aviar (AIV), bronquitis infecciosa aviar (IBV) al menos un gen Spike (S), S1, y S2,
4. El virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2), que expresa el gen de fusión (F) de NDV genotipo XII, las glicoproteínas D e I de ILT, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la inserción del gen de F de NDV y glicoproteínas D e I de ILT, es insertado en la región intergénica no codificante entre UL45/46 del genoma de *Gallid alphaherpesvirus 3*, que tiene la SEQ ID NO. 2.
5. El virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2), que expresa el gen de la proteína VP2 de IBDV, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la inserción del gen de VP2 de IBDV, es insertado en la región génica US2 no

esencial para el genoma de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2), que tiene la SEQ ID NO. 33.

6. El virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2) que expresa el gen de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) genotipo XII de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque el sitio de clivaje o de corte polibásico (¹¹²RRQKRF¹¹⁷) es modificado a dibásico (¹¹²GRQGRL¹¹⁷).
7. El virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2) que expresa el gen de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) genotipo XII de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia sintética del casete F (genotipo XII) es almacenada en el plásmido pUC57-F, la secuencia del casete F y HN de NDV.
8. Una composición inmunogénica caracterizada porque comprende el virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2), que expresa el gen F de NDV genotipo XII identificado con la SEQ ID NO. 5 y excipientes farmacéuticamente aceptables.
9. Una composición inmunogénica caracterizada porque comprende el virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2), que expresa las glicoproteínas D e I de ILTV cepa VFAR-043 identificado con la SEQ ID NO.22 y excipientes farmacéuticamente aceptables.
10. Una composición inmunogénica caracterizada porque comprende el virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2), que expresa el gen VP2 de IBDV cepa Faragher 52/70, identificado con la SEQ ID NO.36 y excipientes farmacéuticamente aceptables.
11. Un procedimiento para generar un virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2), que expresen genes antigénicos contra diferentes enfermedades aviares NDV, ILTV, IBDV, IBV, AIV, en donde el procedimiento comprende:
 - a) Diseño y construcción de los gRNAs y del plásmido donador;
 - b) Generación de recombinantes;
 - c) Recuperación de los virus recombinantes;

- e) Selección y caracterización de los virus recombinantes que contienen el casete GFP + el casete de interés (antígeno protector), por PCR convencional amplificando el casete completo insertado y las zonas de unión entre el genoma del virus recombinante obtenido y del propio genoma del virus modificado;
- f) Remover el casete de expresión del gen reportero fluorescente “GFP” por el sistema de Cre-Lox y selección de clones recombinantes utilizando PCR convencional;
- g) Detección de expresión de proteínas de interés en células infectadas con los virus recombinantes mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI);
- h) Determinación de expresión de genes por Western blot (WB);
- i) Evaluación de estabilidad genética del casete insertado en el genoma del virus por PCR convencional y/o Western blot (WB); y
- j) Medir las propiedades de crecimiento *in vitro*.

12. Un kit que comprende una vacuna o composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 3, 4 y 5 y un medio.

13. Una composición inmunogénica que comprende un virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2) de conformidad con la reivindicación 3, 4, y 5, caracterizada además porque la concentración de virus que se requiere para lograr la respuesta antigénica es de 3000 unidades formadoras de placa por ave (UFP/ave).

14. Un vector viral que comprende un virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2) según la reivindicación 3, 4, y 5, útil en el control contra el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), contra el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa o Gumboro (IBDV), contra el virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV), contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV) y contra el virus de influenza aviar (IAV).

15. Una composición inmunogénica que comprende el virus recombinante de *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV-3; MDV-2) de conformidad con la reivindicación 3, 4, y 5,

caracterizada además porque el *Gallid alphaherpesvirus 3* (GaHV3; MDV-2), se selecciona entre las cepas no oncogénicas: SB-1, 301B/1, y HPRS-24.