

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 508 916**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2007 E 07820367 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2066342**

54 Título: **Mutante del Virus de la Diarrea Viral Bovina para uso en una vacuna**

30 Prioridad:

22.09.2006 EP 06121147

22.09.2006 US 846662 P

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

16.10.2014

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL BV (100.0%)
WIM DE KÖRVERSTRAAT 35
5831 AN BOXMEER, NL**

72 Inventor/es:

**BEER, MARTIN;
REIMANN, ILONA y
KOENIG, PATRICIA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 508 916 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mutante del Virus de la Diarrea Viral Bovina para uso en una vacuna

5 La presente invención se refiere a una vacuna que comprende un mutante de un pestivirus, expresando dicho mutante todas las proteínas estructurales del pestivirus y al uso de dicha vacuna para proteger la vida del ganado frente a la infección con un pestivirus.

10 Los animales se pueden proteger frente a los pestivirus mediante vacunación, sin embargo, las vacunas vivas inactivas o modificadas convencionales presentan desventajas con respecto a la seguridad así como a la eficacia. Por lo tanto, se deberían desarrollar nuevos tipos de vacunas.

15 Los pestivirus se pueden dividir en dos biotipos diferentes, virus citopatógenos (cp) y no citopatógenos (ncp), respectivamente. El virus de la diarrea viral bovina (BVDV), un miembro del género *Pestivirus* dentro de la familia *Flaviviridae* es el agente causal de la diarrea bovina, una enfermedad económicamente importante del ganado vacuno en todo el mundo. Especies de virus muy relacionadas, genética y estructuralmente, son el Virus Clásico de la Peste Porcina (CSFV) y el Virus de la Enfermedad de la Fronteras en ovinos (BDV). Los pestivirus pueden inducir varias enfermedades con pérdidas económicas notables en todo el mundo. Las principales pérdidas económicas causadas por las infecciones con BVDV son fertilidad reducida, abortos y la generación de terneros infectados persistentemente, que pueden desarrollar la "Enfermedad de las Mucosas" mortal. El genoma del pestivirus consiste en un ARN monocatenario de orientación positiva. El ARN tiene una longitud de aproximadamente 12,3 kb y contiene una fase de lectura abierta (ORF) grande, que está flanqueada por regiones sin traducir (NTR) en ambos extremos del genoma. La ORF pestiviral se traduce en una poliproteína, que se procesa de forma co- y post-traducción en 12 proteínas maduras mediante proteasas virales y celulares. En NS3 del BVDV cp se expresa de forma más eficaz, por ejemplo, debido a inserciones que permiten una escisión más eficaz de las proteínas NS2 y NS3 no estructurales. Por lo tanto, el BVDV cp se caracteriza por cantidades más elevadas notables de NS3 detectable en cultivos de células infectadas. La primera proteína de la ORF pestiviral es la Npro (proteasa N-terminal). La Npro es una autoproteasa no estructural que se escinde por sí misma del resto de la poliproteína codificada por la ORF, y de ese modo crea su propio extremo C y además el extremo N correcto para la primera proteína estructural en la ORF, la proteína C (núcleo). La Npro no tiene equivalentes en otros flavivirus. La proteína C en la ORF va seguida de otras proteínas estructurales: E^{RNS}, E1, E2 (en ese orden). En conjunto, la proteína de la cápside (C) y las tres proteínas de envoltura glicosiladas (E^{RNS}, E1, E2) constituyen el virión pestiviral. Las proteínas estructurales van seguidas de las proteínas no estructurales (p7, NS2-NS3 y NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B). La NS3 (serina proteasa) y la NS5 (actividad de polimerasa de ARN dependiente de ARN) están implicadas directamente en la replicación viral.

40 Los pestivirus se pueden clasificar diferentes formas. Para el BVDV, se pueden distinguir diferentes genotipos (BVDV-1 y BVDV-2). Además, se pueden distinguir dos biotipos diferentes después de la infección de células cultivadas, denominadas cepas citopáticas (cp) y cepas no citopáticas (ncp).

Los genotipos se basan en la divergencia en la secuencia del genoma viral. La infección de las células cultivadas con una cepa cp conduce a la lisis de las células, mientras que la infección con una cepa ncp no parece que cause ningún daño celular. Por lo general se cree que las cepas cpBVDV se desarrollan a partir de cepas ncpBVDV mediante la reestructuración del genoma viral. Para BVDV, en aislados de ncp se observa principalmente NS2-NS3 sin procesar, aunque se pueden detectar cantidades bajas de NS3. Por el contrario, en aislados de cp la parte de C terminal de NS2-3 aparece en cantidades más elevadas, la proteína NS3. En CP7 aislado de BVDV, se demostró que una inserción de 27 nucleótidos en la región que codifica a NS2 era suficiente para mediar una escisión de NS2-3 eficaz, y transmitía citopatogenia (Tautz *et al.*, J. Virol., 73 (11), 9422-9432, 1999).

55 Los biotipos diferentes de BVDV se han asociado con diferentes formas de enfermedad. Además, la infección con BVDV tiene la capacidad de causar una infección persistente (PI) en el feto en desarrollo. Cuando el ganado en estado de gestación, susceptible a la infección, se expone a un BVDV no citopático (entre 42 y 110 días de gestación) puede nacer un ternero infectado de forma persistente (PI). Los terneros infectados de forma persistente son inmunotolerantes a la cepa del BVDV que infectó al feto. Por lo tanto, los terneros PI son portadores eficaces para toda la vida del virus y son la causa más importante de difusión del virus en el ganado susceptible en todo el mundo. Por lo tanto, este síndrome de PI crea una necesidad de altos niveles de inmunidad hacia BVDV a partir de vacunas para evitar estas infecciones.

60 Para BVDV, se puede hacer una subdivisión en cepas BVDV-1 y cepas BVDV-2. BVDV-1 y -2 se pueden distinguir entre sí por PCR diferencial o por secuenciación de ácidos nucleicos. Recientemente, los dos genotipos se han subdividido adicionalmente en todos subgenotipos tales como BVDV1a, BVDV1b, BVDV2a y BVDV 2b. Se conocen más de 11 subtipos de BVDV 1.

65

Los estudios sobre la replicación de pestivirus se han visto facilitados de forma considerable mediante sistemas de genética inversa y el descubrimiento de ARN subgenómicos de replicación de forma autónoma (replicones). (Behrens *et al.*, J. Virol., 72, 2364-272, 1998; Meyers *et al.*, J. Virol., 70, 8606-8613, 1996).

5 Los requisitos mínimos para la replicación del CSFV se investigaron, por ejemplo, mediante la creación de genomas del CSFV defectuosos que carecen de las secuencias génicas para las proteínas estructurales. Se encontró que los genomas del CSFV defectuosos aún se replicaban y se podrían empaquetar en partículas virales cuando se introducían en células SK-6 junto con ARN de A187-CAT auxiliar (Moser *et al.*, J. Virol., 7787-7794, 1999).

10 Se describieron un genoma del BVDV defectuoso de replicación de forma autónoma, que carece de parte de la secuencia génica de Npro así como los genes que codifican C, E^{rns}, E1, E2, p7 y NS2 (Behrens *et al.*, J. Virol., 72, 2364-2372, 1998). Kupfermann *et al.*, crearon mutantes de BVDV a partir de las cepas SD-1 y CP 13 de BVDV en las que los primeros 12 aminoácidos de Npro se mantenían, pero el resto se suprimía, junto con las proteínas estructurales (excepto para AA 551-560 de la proteína E1).

15 Se ha sugerido que la región de codificación 5' del gen de Npro representa parte de BVDV IRES (Tautz *et al.*, mencionado anteriormente; Behrens *et al.*, mencionado anteriormente; Meyers *et al.*, J. Virol., 75 (9), 4226-4238, 2001), y es esencial para la replicación.

20 La presente invención tiene como objetivo proporcionar nuevos mutantes de pestivirus para uso en vacunas. Una vacuna se dirige principalmente a la provocación de la respuesta inmune. Una vacuna, por otro lado, debería ser capaz de provocar una respuesta inmune protectora, aunque, por otro lado, no debería provocar, por supuesto, de la enfermedad (viral) en el animal o animales de contacto inoculados. La respuesta inmune inducida normalmente se dirige principalmente frente a las proteínas de envoltura del virus. Pero, si se usa un replicón a partir del cual se han suprimido todas las secuencias estructurales, más en particular, todas las secuencias que codifican proteínas de envoltura, dichas proteínas no se producen a partir del replicón y no se obtiene ninguna respuesta inmune a estas proteínas. Los anticuerpos del BVDV se dirigen frente a E^{rns}, E2 y NS3. La actividad de neutralización se demostró predominantemente para anticuerpos específicos de E2.

25 Las vacunas se pueden basar en todo el virus, de tipo silvestre, que se ha inactivado (vacunas inactivas). Además, las vacunas se pueden basar en una proteína del virus en particular, que se puede producir *in vitro* mediante técnicas de ADN recombinante. Normalmente, dicha proteína será una proteína de envoltura del virus (vacuna subunitaria). La presente invención se refiere a una tercera categoría de vacunas, vacunas vivas atenuadas, basadas en un mutante viral que provoca una respuesta inmune protectora en el animal huésped, pero que no provoca la enfermedad viral, debido a mutaciones en su genoma.

30 Los mutantes de pestivirus en los que se suprimió (parte de) un gen estructural se conocen en la técnica. Por ejemplo, en el documento de patente EP1161537, se describen los mutantes del CSFV a partir de los que se ha suprimido la proteína Erns (y complementado *in trans*). Maurer *et al.*, Vaccine 23, 3318-3328, 2005, describieron CSFV con una supresión parcial o completa de la proteína E2.

40 Se ha sugerido el uso de mutantes de supresión de Npro del CSFV y del BVDV como candidatos a vacuna.

45 Un mutante Npro del CSFV ya se desveló en Tratschin *et al.*, J. Virol., 72 (9), páginas 7681-7684, septiembre de 1998. Tratschin *et al.*, sustituyeron el gen de Npro con secuencias de ubiquitina de murino (el mutante se denominó vA187-Ubi) y concluyeron que la actividad proteolítica de Npro (generación del extremo N correcto de la proteína C) es esencial para la replicación viral, pero que esta actividad se puede sustituir con la actividad proteolítica de la ubiquitina. Se encontró que el mutante era totalmente avirulento en cerdos.

50 Tratschin *et al.*, encontraron que no se obtenía ningún virus viable cuando el gen de Npro se suprimía y no se reemplazaba con otra proteasa. Además, estos mutantes, en los que Npro estaba reemplazada con ubiquitina de murino, se sometieron a ensayo para su uso como una vacuna atenuada viva (Mayer *et al.*, Vaccine 22, 317-328, 2004). Sin embargo, se encontró que un mutante basado en una cepa del CSFV altamente virulenta inducía viremia en cerdos inoculados 7 días después de la vacunación. Por lo tanto, se recomendó el uso de un mutante basado en una cepa avirulenta del CSFV.

55 En proyectos de investigación adicionales, se suprimió la secuencia completa de codificación de BVDV-Npro, y el mutante resultante se propuso como candidato a vacuna. En el documento de patente EP1013757, se describe un mutante con supresión de Npro del BVDV, basado en la cepa NADL citopática, que carece de toda la secuencia de Npro. Se indicó que el mutante resultante era mucho menos infeccioso en cultivo celular y se replicaba de forma lenta en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Se sugirió que su velocidad de crecimiento lento transmitía un fenotipo atenuado. Además, Lai *et al.*, J. Virol., 74 (14), 6339-6347, 2000 describieron un mutante que ha perdido la función de Npro del BVDV basado en la cepa de NADL. Era altamente defectuoso en la replicación y conseguía un nivel de producción de al menos 10 veces inferior que el virus de tipo silvestre. Se sugirió que el mutante, debido a su capacidad de replicación restringida, puede ser un candidato para la vacuna.

65 Sin embargo, debido a su falta de replicación, puede ser difícil producir este tipo de mutante en cantidades suficientes. Además, es cuestionable si el mutante se replicará en el animal objetivo hasta un punto en el que pueda provocar una respuesta inmune protectora.

En el documento de patente WO2005111201, se desvelan mutantes del BVDV, en los que se hicieron supresiones tanto en el gen Npro como en el gen Erns. Se concluyó que solamente una mutación en Npro o una mutación en Erns no era suficiente para prevenir la infección del feto en novillas en estado de gestación. Solamente en mutantes dobles, basados en una cepa NY93 de tipo 2 del BVDV, se podría prevenir la infección del feto en novillas en estado de gestación (sin embargo, el mutante doble solamente se sometió a ensayo frente a la prueba de tipo 2, con otra cepa de tipo 2, y no frente a una prueba de tipo 1 del BVDV).

Los mutantes sometidos a ensayo carecían de todos excepto de los 4 aminoácidos N-terminales de la secuencia de Npro.

Se indicó que el crecimiento de los mutantes era considerablemente menor que para el virus del tipo silvestre. Para obtener mejor crecimiento, se formaron mutantes de virus en los que un fragmento del gen de ubiquitina bovina o un fragmento de la secuencia de codificación de LC3 bovino reemplazaba la mayor parte del gen Npro.

Los presentes inventores tenían como objetivo proporcionar un mutante de pestivirus para uso en vacunas, cuyo genoma aún codifica y expresa todas las proteínas estructurales, y por lo tanto de envoltura, de los pestivirus.

Los presentes inventores trabajaron con mutantes de pestivirus que contienen mutaciones en la región de codificación de la proteína Npro del virus.

Los mutantes para uso en la vacuna de acuerdo con la presente invención se caracterizan por que el mutante se basa en una cepa cp del virus en la que parte se suprime de la secuencia génica que codifica la región Npro, en la que dicha parte suprimida no incluye la secuencia de codificación para los doce aminoácidos N-terminales de la proteína Npro. El pestivirus es el Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV).

Especialmente para el BVDV se encontró que una vacuna de acuerdo con la invención es un candidato a vacuna segura y eficaz.

Los mutantes proporcionan una protección adecuada frente a la infección con el virus de tipo silvestre y no dan lugar a terneros infectados de forma persistente.

Se mostró que la presencia de la secuencia de codificación para los doce aminoácidos terminales restantes de la Npro era suficiente para permitir la replicación del virus. Las cinéticas de crecimiento solo estaban ligeramente alteradas, y las valoraciones finales se redujeron en 0,5-1,0 log₁₀. La propagación del virus sobre células convencionales fue posible con rendimientos de titulación de aproximadamente 1-5,6 x 10⁶ TCID₅₀/ml.

Los mutantes para uso en la vacuna de la invención pueden contener mutaciones adicionales dentro que su secuencia genómica, dentro de regiones de codificación o dentro de regiones de no codificación. Dichas mutaciones pueden atenuar adicionalmente el virus. Sin embargo, los mutantes para uso en la vacuna de acuerdo con la invención expresan todas las proteínas estructurales del virus.

Los mutantes para uso en la vacuna de acuerdo con la presente invención se basan en cepas cp del virus. En la técnica se conocen diversas cepas cp del BVDV y se pueden usar con la presente invención, tales como NADL, Oregon C24V, Osloss, CP7, etc. Preferentemente, se usa la cepa 7 cp. La intensidad del efecto citopatógeno de las numerosas cepas del BVDV cp es diferente. Algunas cepas inducen apoptosis muy pronto después de 24 a 48 h, mientras que otras necesitan más de 72 horas para inducir daño celular detectable. Se tiene la hipótesis de que esto se correlaciona con la inmunogenicidad: cuanto más se tarda en inducir cp, mejor es la respuesta inmune evocada. Como consecuencia, se seleccionó la cepa cp 7, que induce un efecto cp muy tardío, para garantizar una alta eficacia de la vacunación.

La secuencia de los doce aminoácidos N-terminales varía para los diferentes aislados del BVDV. Por ejemplo, la secuencia puede ser MELITNELLYKT, que además es la secuencia para los doce aminoácidos N terminales de la proteína N pro de la cepa cp7.

Los doce aminoácidos de Npro se pueden unir directamente a los aminoácidos C terminales de la proteína C. Como alternativa, se pueden introducir otros tramos de aminoácidos. Por ejemplo, aminoácidos derivados de un fragmento de restricción usado en la formación del mutante o secuencias de unión.

Se ha encontrado que los mutantes para uso en la vacuna de acuerdo con la invención se pueden usar en la preparación de una vacuna para proteger al ganado frente a la infección con un pestivirus de tipo silvestre.

Por lo tanto, la invención se refiere una vacuna para la protección del ganado frente a la infección por BVDV, vacuna que comprende un mutante tal como se define en las reivindicaciones y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la técnica se conocen vehículos adecuados. Por ejemplo, el virus mutante para uso en la vacuna de acuerdo con la invención se puede liofilizar y reconstituir en una solución salina fisiológicamente aceptable adecuada, o la vacuna puede contener al mutante en una solución estéril líquida preparada previamente, que contiene adicionalmente aditivos de vehículo conocidos tales como estabilizantes, etc.

Preferentemente, el mutante se basa en la cepa CP7 del BVDV, en la que se suprimen todos los genes de Npro, excepto para la secuencia de codificación de los doce aminoácidos N-terminales de la proteína Npro.

Por lo tanto, la invención se refiere a una vacuna para la protección del ganado frente a la infección por el Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV), caracterizada por que la vacuna comprende un mutante del BVDV, mutante que se basa en una cepa citopatógena (cp) del virus en la que se suprimen todas las secuencias génicas de Npro, excepto para la secuencia de codificación de los doce aminoácidos N-terminales de la proteína Npro, y en la que el mutante expresa todas las proteínas estructurales del virus, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la invención se refiere a una vacuna de acuerdo con la invención caracterizada por que los doce aminoácidos N-terminales de la proteína Npro son MELITNELLYKT.

En una realización adicional, la invención se refiere a una vacuna de acuerdo con la invención, en la que el mutante se basa en la cepa CP7 del BVDV.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1: Formación de mutante de supresión de Npro del BVDV.
- Figura 2: Preparación de ensayo animal (ensayo I) en el que se vacunaron terneros sin tratamiento previo con una vacuna que contenía un mutante de supresión de Npro de CP7.
- Figura 3: Media de los recuentos de leucocitos después de la vacunación e infección de prueba (ensayo I).
- Figura 4: Resultados de ELISA para bloqueo de NS3 del BVDV, ensayo I.
- Figura 5: Resultados del ensayo de neutralización del BVDV, ensayo I.
- Figura 6: Diseño de un ensayo animal II en el que novillas sin tratamiento previo para el BVDV en estado de gestación se vacunaron con el mutante de supresión de Npro CP7 del BVDV.
- Figura 7: Desarrollo de anticuerpos específicos para BVDV en el ensayo animal II tal como se mide con ELISA para bloqueo de NS3 del BVDV.
- Figura 8: Media de los recuentos de leucocitos después de la vacunación (ensayo II).

Ejemplos

Ejemplo 1: Formación de un mutante de supresión de Npro del BVDV.

El clon CP7ΔNpro del ADNc del BVDV se formó basándose en el clon infeccioso pA/BVDV de longitud total (Meyers *et al.*, 1996) en un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, un fragmento de PCR del plásmido pA/BVDV/CP7 se amplificó con el par cebador cp7_208_XhoI y cp7_406R-PacI (Tabla 1), digerido con KpnI y XhoI y ligado posteriormente en el plásmido pA/BVDV/CP7 digerido con KpnI/2447/3797 y XhoI/208. En una segunda etapa, el plásmido pA/BVDV/CP7ΔNpro-p7 resultante y un fragmento de PCR amplificado con los cebadores cp7_873_PacI y cp7_4913R a partir de pA/BVDV/CP7 se separaron con PacI y NotI y se ligaron. La supresión comprende la mayor parte de Npro (nt 407-872; secuencia de NCP7), mientras que los primeros 36 nucleótidos que se solapan con el BVDV-IRES no se retiraron (Figura 1A y B).

TABLA 1: Cebadores de PCR usados para formación de plásmidos

Cebador	Secuencia (5' a 3') ^a	Región genómica (nucleótidos) ^b
cp7_208_XhoI	AAGCCTCGAGATGCCACGTGG	204-224 (sentido +)
cp7_406R_PacI	TCTAGGTATCC AGTTAATTAATGTTTTGTATAAAAGTTCATTTGTG	380-406 (sentido -)
cp7_873_PacI	TACCTTAATTA ACTCCGACACAAAAGATGAAGGGGTG	873-896 (sentido +)
cp7_4913R	CCGTGGCGGCCGCATTTAGGGCA	4893-4915 (sentido -)

^a Los sitios de enzima de restricción están subrayados, los nucleótidos adicionales para la unión *en fase* de lectura están impresos en negrita
^b posición del nucleótido en la secuencia BVDV-CP7

Ejemplo 2: Mutante de supresión de Npro CP7 como una vacuna viva en terneros

En un primer ensayo de inoculación de la vacuna, se mostró que los terneros se protegían totalmente de una infección mediante inoculación de tipo I del BVDV heterólogo después de una sola inmunización intramuscular con CP7 ΔNpro. No se detectó secreción nasal del virus de la vacuna por aislamiento del virus en cultivo celular. 1 de 4 animales mostraron viremia durante un día. La inmunización indujo una inmunidad estéril. No se observó ni secreción nasal del virus ni viremia después de la infección mediante inoculación de tipo I del BVDV.

Preparación del ensayo:

La preparación del ensayo se ilustra en la figura 2.

Se vacunaron terneros sin tratamiento previo para el BVDV (n = 4 por grupo) o se vacunaron de forma simulada y 52 días más tarde, se realizó una infección por inoculación con la cepa virulenta SE5508 de tipo lb del BVDV (Wolfmeyer *et al.*, 1997). Los terneros se vacunaron con una sola dosis de $6,7 \log_{10}$ TCID₅₀ CP7 ΔNpro del BVDV i.m. (5 ml). Para la vacunación simulada, se usó un sobrenadante i.m. de cultivo celular sin infectar (5 ml). Para la infección por inoculación, los terneros recibieron 2 ml de $6,5 \log_{10}$ TCID₅₀ SE5508 (lb) del BVDV i.n., usando un nebulizador.

- Los síntomas clínicos de los terneros se controlaron diariamente y la temperatura corporal se controló diariamente.
- Durante 14 días, después de la vacunación y después de la infección por inoculación, la viremia y la secreción nasal del virus en los terneros se comprobaron diariamente.
- Las respuestas serológicas se controlaron en intervalos semanales.

RESULTADOS

Se purificaron glóbulos blancos a partir de EDTA-sangre después de lisados alcalinos de eritrocitos. Se inocularon 100 μl de hisopo fluido o 3×10^6 leucocitos se inocularon en células de bovino en 4 paralelas. Después de 5-6 días del co-cultivo, la replicación del virus se verificó por ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IIFT). Se realizó un paso ciego adicional de los sobrenadantes (6 d → IIFT).

En 1 de 4 terneros vacunados, se detectó viremia unida a células. Se podrían volver a aislar cantidades bajas de ΔNpro de CP7 en el día 4 después de la vacuna después del primer paso de cultivo celular.

No se registró secreción nasal del virus de la vacuna.

Después de la infección por inoculación, no se detectó secreción nasal de SE5508 del BVDV en los animales vacunados. Todos los animales vacunados se protegieron completamente frente a la viremia, y ningún virus inoculado se volvió a aislar a partir de glóbulos blancos purificados ("inmunidad estéril").

Por el contrario, todos los terneros de control presentaron secreción nasal del BVDV durante 6-8 días, así como viremia unida a células durante 6-8 días.

Después de la vacunación, todos los animales inmunizados con CP7 ΔNpro presentaron una caída muy moderada de los recuentos leucocitarios con recuperación a valores anteriores a la vacuna hasta 7 días después de la inoculación (Figura 3A).

Después de infección por inoculación, no se observó una disminución significativa de los glóbulos blancos en los terneros inmunizados. La media de los recuentos de células sanguíneas permaneció dentro del intervalo fisiológico. En los animales de control, se observó una leucopenia notable con un inicio a los 3 días después del estímulo. El promedio de recuentos leucocitarios permaneció bajo durante más de dos 2 semanas (Figura 3B).

En comparación con las temperaturas anteriores a la vacuna, solamente se registró un leve aumento de las temperaturas corporales rectales después de la vacunación.

Después de la infección por inoculación (c), los animales inmunizados no mostraron alteraciones de las curvas de temperatura. Con respecto a una respuesta a la temperatura, los animales estaban claramente protegidos del BVD clínico.

En todos los terneros de control, se produjo una elevación moderada de las temperaturas a los 3 días después de la inoculación. Después de más de una semana, las temperaturas corporales volvieron a los niveles anteriores a la inoculación.

Las condiciones generales alteradas y los síntomas respiratorios o gastrointestinales habituales en el BVDV se controlaron en todos los animales.

Durante todo el día del periodo de observación (4 semanas antes de la inmunización hasta 12 semanas a partir de ese momento), principalmente en los animales vacunados, se observó una alternancia de síntomas respiratorios leves tales como secreción nasal y tos esporádicas. Después de la vacunación, no se produjeron reacciones clínicas adversas. En las vacunas, no se observó un agravamiento de las puntuaciones anteriores a la vacunación. Después de la infección por inoculación, los animales inmunizados no mostraron síntomas clínicos. En los terneros de control, se registraron síntomas respiratorios leves y la ingesta de alimento se redujo durante 1-2 días. Los animales no mostraron ni trastornos gastrointestinales ni lesiones en las mucosas.

Las respuestas serológicas de los animales se controlaron usando un ELISA para el BVDV (bloqueo de NS3; Figura 4) así como ensayo específico de neutralización de tipo 1 y de tipo 2 del BVDV (Figura 5).

Todos los animales se inocularon con CP7 Δ Npro sero-convertido para anticuerpos específicos de NS3 del BVDV hasta 3 semanas después de la vacunación, y se sometieron al ensayo con el ELISA Ceditest para BVDV (Cedi diagnostics). Los terneros de control permanecieron negativos hasta 2-3 semanas después de la infección por inoculación (Figura 4).

5 Después de la vacunación, todos los animales desarrollaron anticuerpos de neutralización de tipo1 del BVDV en titulaciones moderadas (Figura 5). Después de la infección por inoculación (c), los animales inmunizados no mostraron un refuerzo pronunciado de los títulos de anticuerpos de neutralización. Los animales vacunados de forma simulada se sometieron a ensayo negativo hasta 2 semanas después de la infección por inoculación con la cepa SE5508 de tipo 1 del BVDV. Además, también se indujeron anticuerpos de neutralización específicos de tipo 2 del BVDV (cepa US980) en titulaciones más bajas después de la vacunación. Los títulos de anticuerpos de neutralización eran comparables con los valores de los animales de control a las 3 semanas después de la inoculación con la cepa de campo SE5508 de tipo I del BVDV.

Ejemplo 3. Mutante de supresión de CP7 Npro como una vacuna viva en novillas en estado de gestación

15 La programación del ensayo del animal con la cepa mutante CP7 Δ Npro de supresión de Npro del BVDV se representa en la figura 6. Novillas sin tratamiento previo para el BVDV (n = 4 por grupo) se inocularon por vía intramuscular o por vía intravenosa y por vía intranasal con la cepa mutante CP7 Δ Npro del BVDV entre el día 68 y 88 de la gestación (= primer trimestre).

20 Aplicación de 6,02 log₁₀ TCID₅₀ de CP7 Δ Npro del BVDV en un volumen de 4 ml

3 ml i.v. + 1 ml i.n.: ("el peor de los casos")

4 ml i.m.: ("imitando la vacuna viva")

25 Durante el ensayo, se controlaron los siguientes parámetros:

Diariamente:

- investigación clínica
- control de las temperaturas corporales rectales

Diariamente durante 10-12 días después de la infección:

- viremia, secreción nasal del virus

A intervalos semanales:

- respuestas serológicas
- aborto clínico
- fetopatogenia
- detección del virus en órganos fetales (exclusión de fetos infectados de forma persistente) a los 4 meses después de la inoculación.

45 Además, tres terneros Holstein-Frisean con una edad de aproximadamente 4 meses se incluyeron como animales de contacto y se controlaron los anticuerpos específicos del BVDV en intervalos semanales.

Resultados

50 Durante 10 a 12 días después de la inoculación con el virus, se controló la viremia y la secreción nasal del virus de las novillas. Se inocularon 100 μ l de fluido de hisopo o 3 x 10⁶ leucocitos sanguíneos purificados en células de bovino en 4 paralelas. Después de 5 a 6 días de co-cultivo, la replicación del virus se verificó mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IIFT) de los cultivos inoculados. Además, se realizó un paso ciego adicional de todos los sobrenadantes y se sometió a ensayo con IIFT después de 6 días de incubación.

55 Independientemente de la vía de inoculación, no se observó secreción nasal del virus. Se pudo detectar viremia con titulaciones virales muy bajas en un día en 2 de 4 animales después de la aplicación simultánea intravenosa e intranasal de CP7 Δ Npro y en 1 animal después de la infección intramuscular.

60 El desarrollo de anticuerpos específicos para el BVDV se controló con un ELISA de bloqueo específico de NS3 disponible en el mercado (ELISA para el BVDV Ceditest; Cedi Diagnostics, Holanda). Todos los animales inoculados se seroconvirtieron para anticuerpos específicos de NS3 hasta 2 a 3 semanas expresé la vacunación (Figura 7). Todos los animales de contacto permanecieron seronegativos durante todo el periodo de observación, que también se confirmó mediante el ensayo de neutralización de suero.

65 En ambos grupos, no se observó una disminución notable de los recuentos de leucocitos después de la inoculación. La media relativa de recuentos de leucocitos disminuyó en menos de un 20 % con una recuperación a valores

anteriores a la infección en 8 días (Figura 8). Un efecto de rebote con mayores valores de leucocitos se observó en todos los animales hasta el final del periodo de observación después de 4 semanas. Después de la infección intramuscular, con el mutante de supresión de CP7 Npro del BVDV, una reducción de leucocitos más retardada fue evidente con el inicio a los 4 días p.i. y una regresión a los 8 d p.i. Los valores de reducción entre los 2 grupos eran comparables (Figura 8).

5 En comparación con las temperaturas corporales antes de la inoculación, no se registró elevación de las temperaturas corporales rectales después de la aplicación del mutante de supresión de Npro.

10 En todos los animales se controlaron las condiciones generales y síntomas clínicos específicos de BVDV. En todos los animales (animales inoculados y controles de contacto) se observó una secreción ocular leve no específica en todo el periodo. Después de la infección, no se produjeron reacciones adversas y no se observaron signos clínicos de enfermedad.

15 Las novillas se adquirieron en 3 explotaciones diferentes. Cuatro de cinco animales procedentes de la misma granja presentaban problemas con el sistema musculoesquelético, que no estaban relacionados con la aplicación de los virus de la vacuna. Por lo tanto, los animales se sacrificaron en diferentes puntos temporales antes del final propuesto para el estudio.

20 Uno de los animales abortó a los 54 días después de la infección. Todos los fetos, incluyendo el abortado, se encontraron con un peso y desarrollo normales. No se registraron hallazgos patológicos en la necropsia.

25 El aislamiento del virus en cultivo celular se realizó a partir de 0,3 g de material orgánico (congelado inmediatamente, molido con arena de mar) seguido de 1 paso consecutivo de los sobrenadantes en caso de primeros resultados negativos.

30 El aislamiento del virus se realizó en células MDBK y en células MDBK deficientes en interferón. Los análisis de inmunofluorescencia de los cultivos no mostraron tinción para BVDV. 1 ml de una muestra de lavado de médula ósea cuestionable también se inóculo en placas de cultivo de tejidos de 7 cm². Incluso después de 3 pasos adicionales, los cultivos eran negativos para la replicación del virus.

Los tejidos fetales se identificaron sistemáticamente para la presencia de proteínas del BVDV con un ELISA de antígeno comercial (BVDV Ag / Serum plus, Idexx Europe B.V.). Piel, riñón, amígdalas, suero, así como leucocitos, dieron un ensayo claramente negativo para antígeno del BVDV.

35 Los órganos fetales y los tejidos también se sometió a análisis de RT-PCR en tiempo real. Después de interrupción y homogeneización de las muestras con un TissueLyser®, se extrajo ARN de riñón, cerebelo, leucocitos y timo con el kit RNeasy@mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. No se detectaron equivalentes del genoma viral en una RT-PCR en tiempo real altamente sensible posterior [Hoffmann B, Depner K, Schirrmeyer H, Beer M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. J Virol Methods. 2006; 136 (1-2): 200-209].

40

Conclusión:

45 En conclusión, se podría demostrar claramente que la aplicación intravenosa/intranasal o la intramuscular de títulos elevados del mutante CP7ΔNpro del BVDV era inocua para el ganado también durante el periodo de gestación inicial. No se pudieron observar ni signos clínicos de las novillas ni infección persistente de los fetos. A pesar del hecho, que aún no está claro, de que el montante de supresión de CP7 Npro era realmente capaz de cruzar la barrera placentaria o si los fetos eran capaces de limpiar la infección con CP7ΔNpro, no se volvió a aislar ningún virus infeccioso a partir de un gran panel de órganos fetales. Además, no se pudieron detectar genomas de virus en leucocitos sanguíneos purificados y en numerosos órganos de los fetos. No se observaron efectos fetopatógenos

50 después de la infección de novillas en estado de gestación en el primer trimestre de la gestación con el virus CP7 ΔNpro vivo modificado. En resumen, la infección experimental de novillas en estado de gestación proporciona una buena evidencia de que CP7ΔNpro es un candidato a vacuna para el BVDV altamente atenuado y seguro.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna para la protección del ganado frente a la infección por el Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV), **caracterizada por que** la vacuna comprende un mutante del BVDV, mutante que se basa en una cepa citopatógena (cp) del virus, en la que se suprime toda la secuencia génica de Npro, excepto para la secuencia de codificación para los doce aminoácidos N-terminales de la proteína Npro, y en la que el mutante expresa todas las proteínas estructurales del virus, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** los doce aminoácidos N-terminales de la proteína Npro son MELITNELLYKT.
3. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el mutante se basa en la cepa CP7 del BVDV.

FIGURA 1

Formación de CPANpro

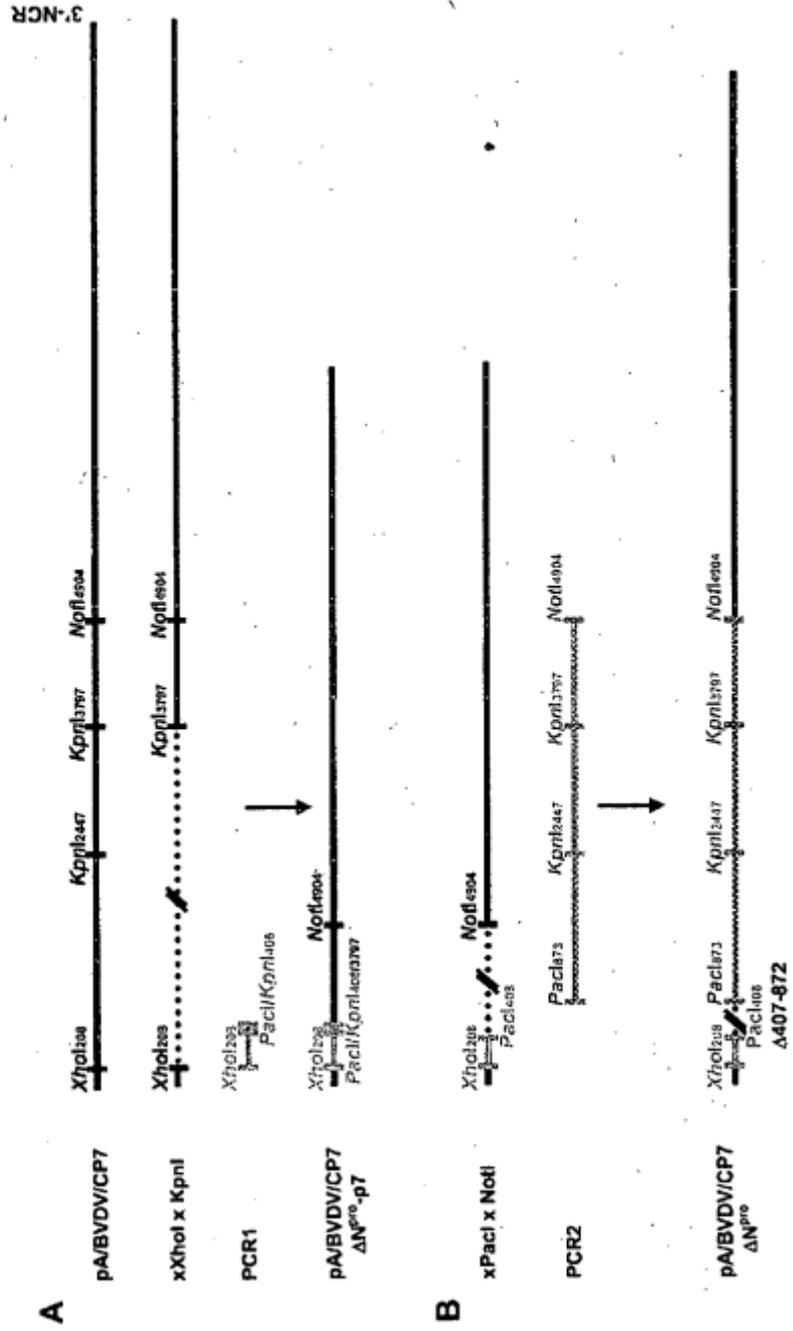


FIGURA 2.

Diseño del ensayo I de CP7 Δ N^{pro}

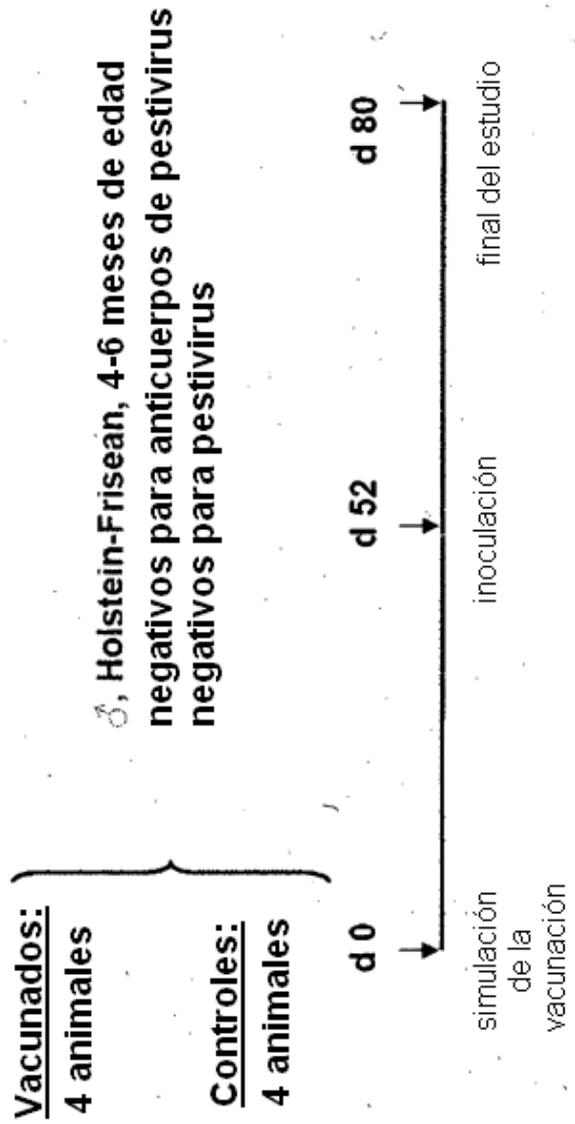


FIGURA 3

Media de valores leucocitarios después de la vacunación e infección por inoculación

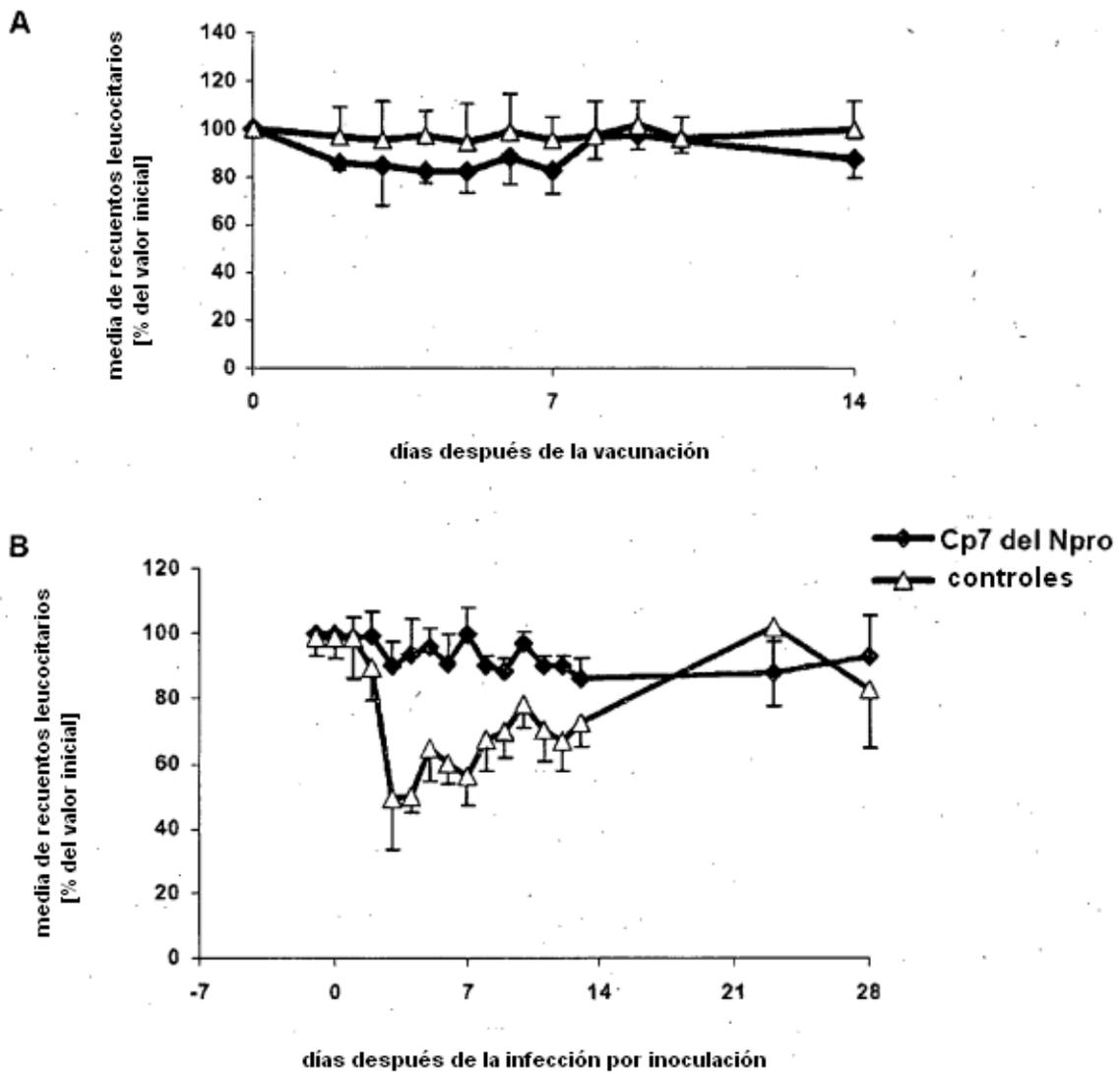


FIGURA 4

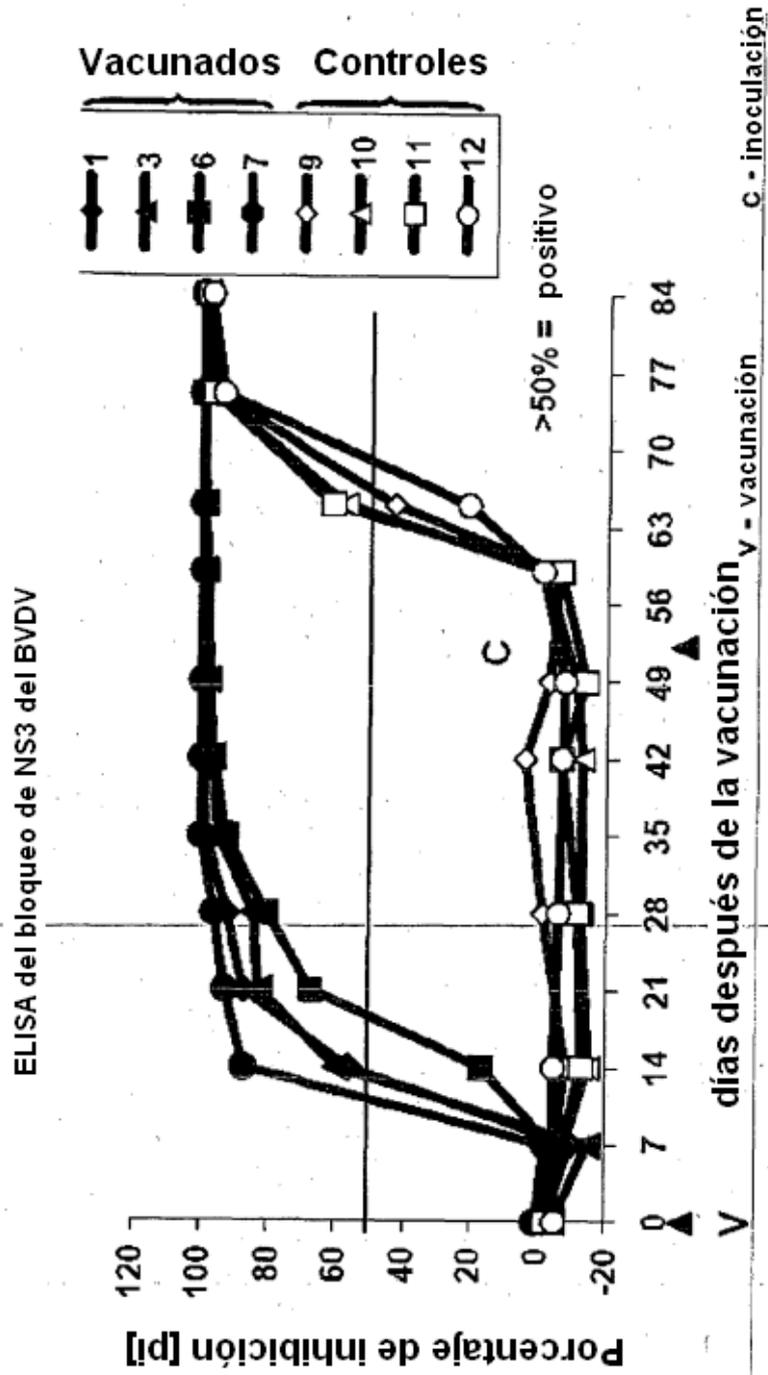


FIGURA 5

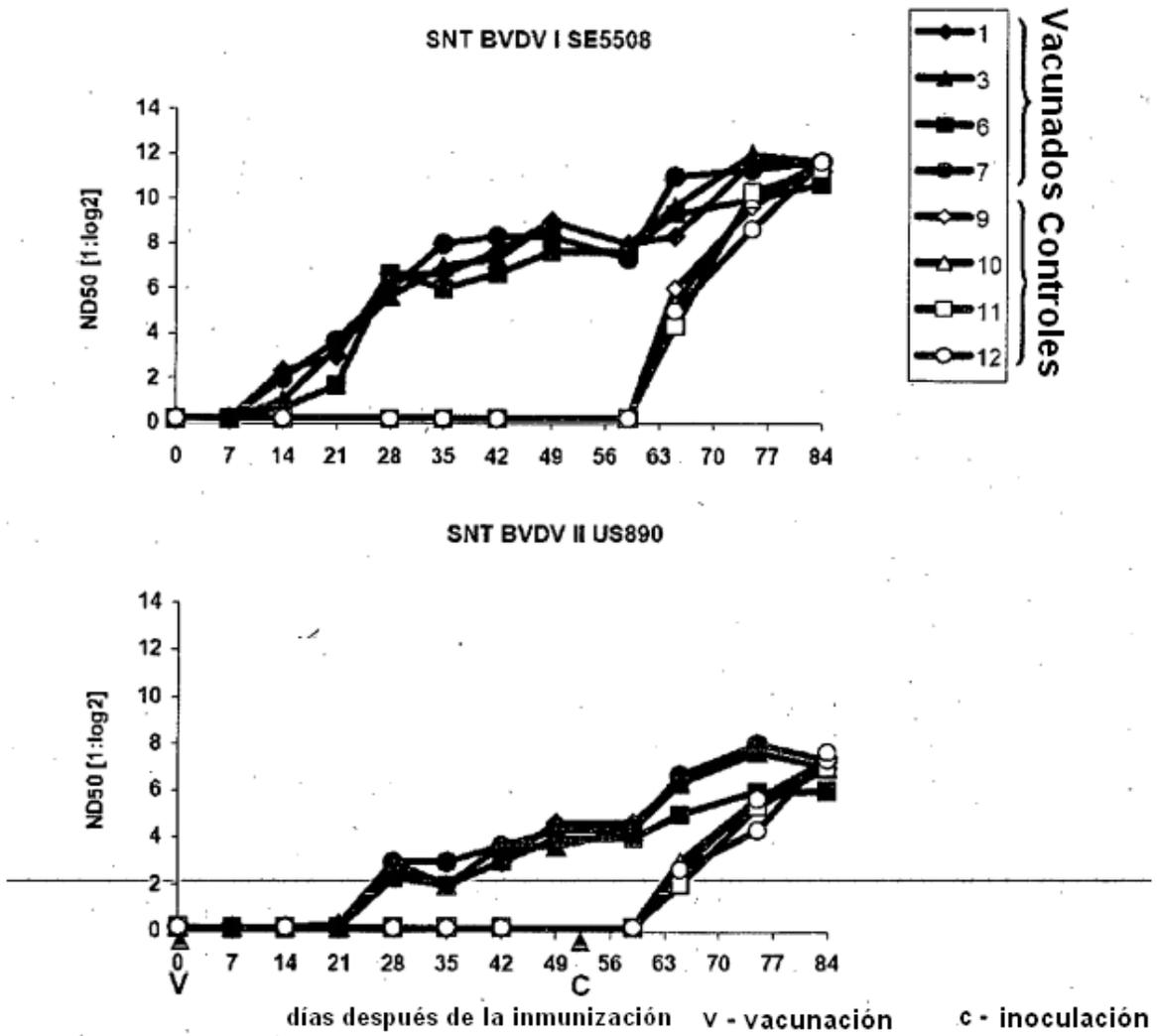


FIGURA 6

Diseño del ensayo II de CP7 ΔN^{pro}

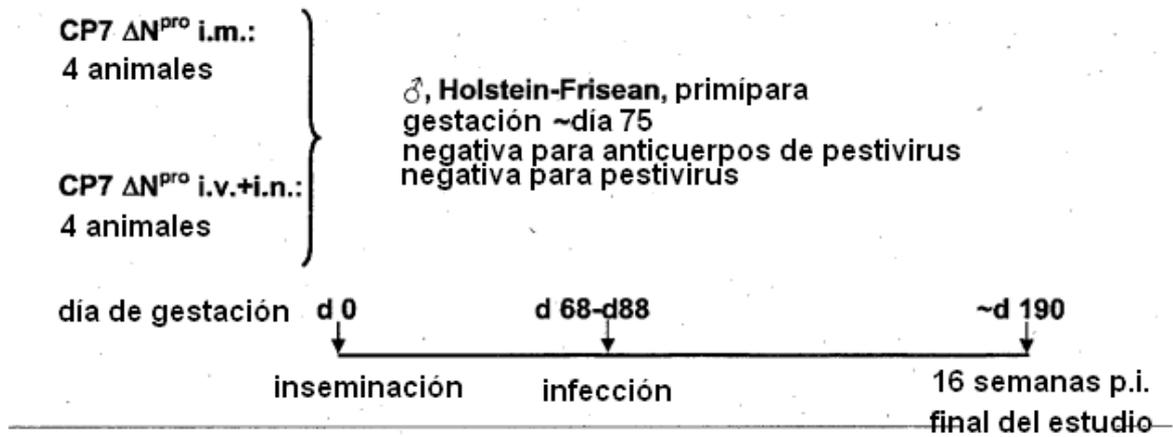


FIGURA 7

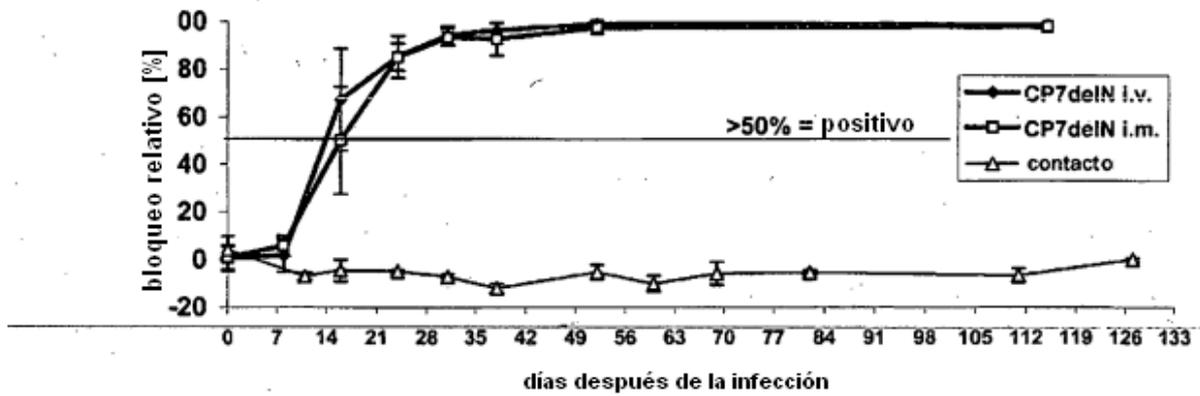
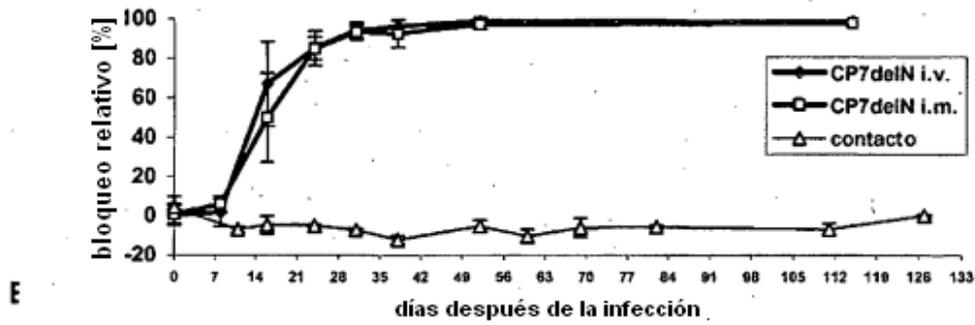


FIGURA 8

Media de recuentos leucocitarios después de la inoculación de **CP7 ΔNpro** (ensayo II)

