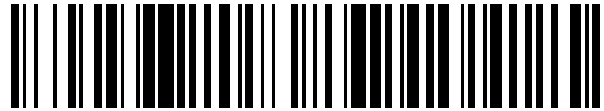


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 033**

51 Int. Cl.:

A61K 39/23 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2011 E 11706253 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2542260**

54 Título: **Parvovirus recombinante atenuado**

30 Prioridad:

05.03.2010 US 311032 P
05.03.2010 EP 10155646

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2016

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

SPIBEY, NORMAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 566 033 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

Parvovirus recombinante atenuado

5 **Campo de la invención**

La invención se sitúa en el campo de las vacunas contra virus para la protección de animales contra la infección por parvovirus, su producción y uso. Más en particular, la invención se relaciona con una vacuna que comprende un tipo de parvovirus canino de tipo 2 atenuado que comprende una proteína de la cápside o un fragmento de la misma obtenido de un aislado de parvovirus canino de tipo 2c.

Antecedentes de la invención

El parvovirus pertenece a la familia de virus de ADN de cadena sencilla. Los parvovirus pueden causar enfermedades en algunos animales como gatos, perros y cerdos. Debido a que los virus requieren células en división activa para replicarse, el tipo de tejido infectado varía con la edad del animal. El tracto gastrointestinal y el sistema linfático pueden verse afectados a cualquier edad, provocando vómitos, diarrea e inmunosupresión, pero la hipoplasia cerebelosa sólo se observa en los gatos que fueron infectados en el útero o que tienen menos de dos semanas de edad y la miocarditis se observa en los cachorros infectados entre las edades de tres y ocho semanas.

El parvovirus canino es una enfermedad particularmente mortal entre los cachorros, en alrededor del 80 % es mortal, causando daños en el tracto gastrointestinal y deshidratación, así como un síndrome cardíaco en cachorros muy pequeños. Se transmite por contacto con las heces de un perro infectado. Los síntomas incluyen letargo, diarrea intensa, fiebre, vómitos, pérdida de apetito y deshidratación. El parvovirus porcino causa una enfermedad reproductiva en el ganado porcino conocida como SMEDI, que es el acrónimo de muerte fetal, momificación, muerte embrionaria e infertilidad, *stillbirth, mummification, embryonic death, and infertility*. La panleucopenia felina es común en gatos y causa fiebre, bajo recuento de leucocitos, diarrea y muerte. La infección del feto del gato y de los gatitos de menos de dos semanas de edad provoca hipoplasia cerebelosa. El virus de la enteritis del visón es similar en efecto a la panleucopenia felina, excepto que no causa hipoplasia cerebelosa. Un parvovirus diferente provoca la enfermedad aleutiana en visones y otros mustélidos, caracterizada por linfadenopatía, esplenomegalia, glomerulonefritis, anemia y muerte. El diagnóstico más exacto del parvovirus es por ELISA. Los perros, gatos y cerdos pueden ser vacunados contra el parvovirus.

A nivel de ADN, se sabe que los parvovirus canino, felino y porcino tienen un genoma muy homólogo. El parvovirus canino (PVC2) es un virus que es responsable de enteritis aguda y algunas veces mortal en perros (Kelly, Aust. Vet. J. 54; 593, 1978; Appel et al., Vet. Rec. 105; 156-159, 1979). El virus, que apareció por primera vez alrededor de 1977, probablemente surgió a partir de un virus estrechamente relacionado con el de los gatos, el virus de la panleucopenia felina (FPLV) a través de un pequeño número de mutaciones en la única proteína de la cápside; un salto entre especies que puede haber implicado el paso intermedio a través de otros carnívoros como el visón o el mapache (Truyen et al., Virology 215, 186-189, 1996).

Ya en 1979 aparecieron las primeras variantes del PVC2, como la denominada PVC2a, y que fueron seguidas rápidamente por la aparición de PVC2b en 1984. (Parrish et al., Science 230, 1046-1048, 1985 y J. Virol. 65; 6544-6552, 1991).

El virus de tipo 2 original ahora ha desaparecido del campo después de haber sido reemplazado por las variantes 2a y 2b; aunque las proporciones relativas de estos dos tipos varía de un país a otro (Truyen et al., *supra*; Chinchkar et al., Arch. Virol. 151, 1881-1887, 2006; Pereira et al., Infect. Genet. Evol. 3, 399-409, 2007). Los cambios de aminoácidos en la proteína de la cápside (VP2), que caracterizan el paso de 2 a 2a y a 2b, son muy limitados. Las sustituciones en las posiciones 87 (Met a Leu), 300 (Gly a Ala), 305 (Tyr a Asp) y 555 (Val a Ile) se produjeron en la evolución de 2 a 2a y 426 (Asn a Asp) y 555 (Ile a Val) en la aparición de 2b a partir de 2a (Parrish et al., *supra*; Truyen et al., J. Virol. 69, 4702-4710, 1995). Recientemente, se ha informado de cepas 2a que carecen de la sustitución de Val por Ile en la posición 555 (Wang et al., Virus Genes 31, 171-174, 2005; Martella et al., Virus Genes 33, 11-13, 2006). Al parecer, un solo cambio de aminoácido puede diferenciar las secuencias de VP2 de PVC2a y PVC2b.

Más recientemente han surgido cepas en Italia en las que el aminoácido de la posición 426 (Asn en 2a y 2b en Asp) se ha convertido en un resto de ácido glutámico (Glu) (Buonavoglia et al., J. Gen. Virol. 82, 3021-3025, 2001; Martella et al., J. Clin. Microbiol. 42, 1333-1336, 2004). El hecho de que estas variantes Glu 426, denominadas virus PVC2c, estén circulando y coexistan con otros tipos de PVC en Italia y en otros países europeos (Decaro et al., J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health 53, 468-472, 2006) y de que también se hayan aislado en países geográficamente tan diversos como Vietnam y Escocia (Nakamura et al., Arch Virol. 149, 2261-2269, 2004, Spibey et al., Vet. Microbiol 128, 48-55, 2008) sugiere que tienen una ventaja en al menos una proporción de la población de perros.

La relativamente rápida evolución del parvovirus canino ha dado lugar a la pérdida y la posterior recuperación de tipos de hospedadores felinos (Truyen et al., 1996 *supra*) y esta capacidad recuperada de replicarse en gatos bien puede dar cuenta de la sustitución del virus de tipo 2 original con las variantes 2a, 2b y 2c. A finales de los 70 y principios de los 80 se utilizaron vacunas contra la panleucopenia felina vivas e inactivadas para proteger a los perros contra la infección por el PVC debido a que los antígenos compartidos estimulaban la protección cruzada, sin embargo los niveles de protección que ofrecían eran deficientes y la duración de la inmunidad era breve. Estas vacunas fueron sustituidas por las vacunas del PVC vivas atenuadas, que proporcionan una excelente protección y mayor duración de la inmunidad. Actualmente las vacunas vivas atenuadas derivan de aislados PVC2b o del virus de tipo 2 original. Dado que el virus de tipo 2 ha sido sustituido en su totalidad en el campo por los virus 2a, 2b y ahora 2c, existe preocupación por el nivel de protección ofrecido por las vacunas de tipo 2 atenuadas (Pratelli et al., Clin. Diag. Lab. Immunol. 8, 612-615, 2001; Truyen, Vet. Microbiol. 69, 47-50, 1999).

Sin embargo, basándose en los estudios con anticuerpos monoclonales existentes cada nueva variante antigénica ha perdido por lo menos un epítipo neutralizante en comparación con la variante anterior (Strasheim et al., Virology 198, 175-184, 1994; Pereira et al., *supra*). Anteriormente se había demostrado que la vacuna contra el PVC2 viva atenuada era capaz de proteger a los perros frente a las exposiciones a las variantes de campo 2a y 2b (Greenwood et al., Vet. Record. 136, 63-67, 1995) a pesar de que los estudios de neutralización cruzada *in vitro* llevados a cabo usando sueros generados contra los diversos tipos antigénicos sí mostraban diferencias notables (Pratelli et al., *supra*).

El documento WO2008157236 describe formulaciones de vacunas que comprenden variantes del PVC dominantes emergentes.

Recientemente, se demostró que la vacuna de tipo 2 viva atenuada (Nobivac-Intervet) era capaz de proteger a los perros frente a la exposición a la variante más reciente del PVC, PVC2c (Spibey et al., Vet. Microbiol 128, 48-55, 2008).

Sin embargo existe una necesidad en el campo de vacunas que mejoren la inmunidad de los animales, en particular, gatos, perros y cerdos contra la infección con nuevos tipos de parvovirus. Sin embargo, tales vacunas no están disponibles, en particular, no están disponibles vacunas específicas del parvovirus canino de tipo 2c.

Sumario de la invención

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

La presente invención proporciona una solución al problema anterior en el sentido de que proporciona una vacuna que comprende un parvovirus recombinante atenuado que comprende como genoma una secuencia de ADN de un parvovirus canino de tipo 2 atenuado, en el que el ADN que codifica la proteína de la cápside o un fragmento de la misma se sustituye por un ADN que codifica una proteína de la cápside o un fragmento de la misma procedente de un parvovirus canino de tipo 2c.

Sorprendentemente, se observó que tal vacuna era capaz de inducir altos títulos de anticuerpos protectores contra una exposición al parvovirus canino de tipo 2c manteniendo al mismo tiempo una buena inmunidad contra las cepas de tipo 2 y permaneciendo los parvovirus caninos atenuados recombinantes.

Descripción detallada de la invención

El ADN viral que codifica la proteína de la cápside de un parvovirus canino de tipo 2c puede obtenerse a partir de una cepa aislada en el campo mediante el uso de las habilidades ordinarias de una persona experta en la técnica. El ADN viral de un parvovirus canino atenuado también está disponible en la técnica, los ejemplos muestran el aislamiento de un virus de tipo 2 original contenido en una cepa de la vacuna obtenida de Intervet (Nobivac parvo).

Más en particular, se obtuvo el ADN viral a partir de un aislado de campo de PVC de tipo 2c. Cada preparación de ADN fue digerida con una enzima de restricción diferente de tal manera que de cada preparación se generaron dos fragmentos solapantes. Los fragmentos se purificaron y se separaron. A continuación los fragmentos seleccionados se transfectoron en células susceptibles. Esto se muestra esquemáticamente en la figura 1.

Tras la recombinación natural de los dos fragmentos, se obtuvo un virus híbrido que contenía la proteína de la cápside de un aislado de tipo 2c en el contexto de la secuencia de ADN de un virus de tipo 2 convencional atenuado. Este virus fue aislado, purificado y mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable y utilizado como una vacuna.

Los perros que recibieron la nueva vacuna fueron expuestos a aislados de campo del PVC de tipo 2c y con el virus parental de la vacuna de tipo 2.

Sorprendentemente, la nueva vacuna proporcionó un título de anticuerpos suficiente contra los aislados convencionales de tipo 2 y una protección mejorada contra el PVC de tipo 2c.

5 Dicha vacuna se puede usar ventajosamente en la protección de perros contra la infección por el parvovirus canino de tipo 2, en particular, el de tipo 2c.

10 Por lo tanto, la invención se refiere a un parvovirus recombinante que comprende una secuencia de ADN obtenible a partir de un parvovirus canino de tipo 2 atenuado en el que el ADN que codifica la proteína de la cápside o un fragmento de la misma de dicho parvovirus se sustituye por una proteína de la cápside o un fragmento derivable de un parvovirus canino de tipo 2c.

15 Las proteínas de la cápside del parvovirus de tipo 2 y de tipo 2c deben ser diferentes en al menos un aminoácido. La expresión "proteína de la cápside o un fragmento de la misma" en este contexto significa una proteína de la cápside de longitud completa o una parte de la misma que comprende la diferencia en la proteína de la cápside entre el parvovirus de tipo 2 y de tipo 2c.

Preferiblemente, la proteína de la cápside de longitud completa del parvovirus de tipo 2 se sustituye por la proteína de la cápside de longitud completa del parvovirus de tipo 2c.

20 Las expresiones "de longitud completa" y "esencialmente de longitud completa", como se usan en la presente memoria, pretenden indicar que la proteína o secuencia de ácido nucleico contiene todos los elementos necesarios para llevar a cabo su función, preferentemente, la secuencia debe contener todos los elementos (aminoácidos o nucleótidos) de la secuencia natural.

25 El parvovirus recombinante de acuerdo con la invención puede emplearse ventajosamente en una vacuna para la protección de animales contra la infección por parvovirus de tipo 2 o de tipo 2c. Se observó que tales vacunas protegían a los animales contra la infección con los virus de tipo 2, así como el de tipo 2c, mientras que la vacuna recombinante quedó atenuada de tal modo que no podía inducir signos clínicos de infección por parvovirus.

30 La invención también se refiere a un método para obtener un parvovirus recombinante de acuerdo con la invención que comprende las etapas de:

- a. Obtener al menos un primer fragmento de ADN a partir de una cepa de parvovirus canino de tipo 2 atenuada, no codificando dicho primer fragmento de ADN una proteína de la cápside
- 35 b. Obtener al menos un segundo fragmento de ADN de una cepa de parvovirus canino de tipo 2c, codificando dicho segundo fragmento de ADN para una proteína de la cápside
- c. Transfectar una célula permisiva para el parvovirus con los fragmentos de ADN obtenidos en las etapas a y b
- d. Permitir la recombinación de los fragmentos de ADN
- 40 e. Seleccionar un virus recombinante atenuado que codifica una proteína de la cápside viral derivada del parvovirus canino de tipo 2c en el contexto genético del genoma del parvovirus canino de tipo 2
- f. Cultivar la célula en condiciones que permitan la producción de parvovirus en un cultivo celular
- g. Obtener los parvovirus recombinantes a partir del cultivo de células.

45 Esto da como resultado una vacuna que protege a los perros contra infecciones con el parvovirus de tipo 2 así como con el parvovirus de tipo 2c manteniendo al mismo tiempo sus propiedades atenuadas.

50 Con el fin de mostrar de forma inequívoca que un sitio de atenuación no reside en la proteína de la cápside, el gen de la proteína de la cápside en una cepa atenuada fue reemplazado por una versión sintetizada químicamente, cuya secuencia se derivó de un aislado de campo 2c virulento. Este método también produjo un virus atenuado de acuerdo con la invención.

Leyendas de las figuras

55 Figura 1: Representación esquemática del método de recombinación natural (no MG) de obtención de un aislado de virus híbrido 2/2c. Dos fragmentos solapantes de la vacuna de tipo 2 y del virus de campo de tipo 2c se transfectaron en las células y tras recombinación homóloga se aislaron los virus.

Figura 2: Representación esquemática del clon de plásmido infeccioso de la cepa del PVC 154att que muestra los sitios de las enzimas de restricción Pac I y Xmn I. Los cuadros sombreados ilustran las secuencias palindrómicas terminales.

60 Figura 3: Esquema que muestra el producto seleccionado de la digestión parcial de Pac I / Xmn I que fue seleccionado para su posterior manipulación

Figura 4: Plásmido que contiene el ADN del virus de la vacuna 154att en el que el gen de la cápside está sustituido por una secuencia de la cápside del PVC2c virulento.

65

Ejemplos

Ejemplo 1: generación de virus recombinante

5 La cepa 154 att se obtuvo de una fuente disponible en el mercado Nobivac Parvo C (Intervet Schering-Plough Animal Health) y la cepa Jess era un aislado de campo de un virus de tipo 2c.

10 Los virus se cultivaron en células caninas adherentes o en células renales felinas (por ejemplo, A72 y CrFK) usando medio M6B8 que contiene suero fetal bovino al 5 %. La forma replicativa (FR) del ADN se preparó a partir de cultivos celulares infectados usando una modificación del método estándar "Hirt" (McMaster et al 1981).

15 El ADN de la FR preparado a partir de la cepa 154 att se digirió con la enzima de restricción Pst I y los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa. La banda del par de bases (pb) 3055 (correspondiente al extremo izquierdo del PVC) se escindió del gel y se purificó usando las columnas de extracción en gel Qiagen Qiaquick. El ADN de la FR aislada de las células infectadas con el PVC Jess se digirió con la enzima de restricción Xmn I. Una vez más los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en gel de agarosa seguido de la purificación de una banda de aproximadamente 2750 pb (correspondiente al extremo derecho del PVC que incluye la secuencia de la cápside) utilizando columnas de extracción en gel Qiagen Qiaquick.

20 Los fragmentos de 3055 pb y 2750 pb purificados de 154att y Jess se combinaron y se transfectaron en A72 o en células CrFK en cultivo. Las transfecciones se realizaron usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con aproximadamente 3 µg de cada fragmento, siguiendo las instrucciones del fabricante.

25 Después de la transfección, las células se sometieron a pases y se controlaron mediante un ensayo de hemaglutinación (HA). El virus fue detectado por HA en el paso 4. La determinación de la secuencia del ADN del virus híbrido se llevó a cabo usando protocolos de secuenciación de ADN estándar utilizando el ADN de la FR o moldes de fragmentos de PCR. El virus se purificó por dilución limitante en células caninas o felinas susceptibles adherentes.

30 Ejemplo 2: Virus recombinante construido a partir de ADN viral clonado

El virus recombinante se generó a partir de fragmentos clonados. El genoma de la cepa del virus 154att se clonó en el vector de clonación estándar pBluescript (Stratagene Inc.). A fin de mantener las secuencias terminales palindrómicas intactas, el plásmido fue propagado en el hospedador bacteriano DL795 que es defectuoso en varios sistemas de recombinación. La clonación de los genomas de parvovirus se ha descrito en la literatura y las técnicas requeridas son conocidas por alguien experto en la materia.

40 El clon obtenido de 154att (p154) se digirió con la enzima de restricción Pac I de tal forma que no se permitió la finalización de la digestión, es decir, la digestión de la enzima de restricción fue sólo parcial. Los fragmentos digeridos se sometieron a continuación a la digestión con la enzima de restricción Xmn I. Los fragmentos de ADN digeridos fueron seguidamente separados por electroforesis en gel de agarosa y el fragmento indicado en el diagrama de abajo se escindió del gel y se purificó usando columnas de extracción en gel Qiagen Qiaquick. Los sitios Xmn I y Pac I a mano derecha flanquean la región de la cápside en el genoma de parvovirus.

45 El gen de la cápside de 154 att fue sustituido por el gen de la cápside de una cepa virulenta de PVC como sigue. El sitio Xmn I y Pac I a mano derecha indicados en la Figura 2 se encuentran fuera de los límites del gen de la cápside. La secuencia de aproximadamente 110 pb entre el sitio Pac I y el extremo del gen de la cápside difiere significativamente entre la cepa 154att y los aislados virulentos. Hasta el momento no se han registrado cambios de secuencia en la secuencia corta (~55 pb) entre el sitio de Xmn I y el inicio del gen de la cápside. Por lo tanto con el fin de limitar el intercambio de material sólo para la secuencia de la cápside, la secuencia de la cápside del PVC virulento fue sintetizada químicamente y se conservó la secuencia específica de la vacuna entre el sitio Pac I y la señal de parada de la cápside. A continuación, se muestra la secuencia sintetizada químicamente que contiene el gen de la cápside del PVC. La secuencia que se muestra a continuación se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO: 1.

55

AGAGGCAGACCTGAGAGCCATCTTTACTTCTGAACAATTGGAAGAAGATTTTCGAGA

Xmn I

CGACTTGGATTAAGGTACGATGGCACCTCCGGCAAAGAGAGCCAGGAGAGGTAAGGGTGT
GTTAGTAAAGTGGGGGAGAGGAAAGATTTAATAACTTAACTAAGT**ATGTGTTTTTTTAT**
AGGACTTGTGCCTCCAGGTTATAAATATCTTGGGCCTGGGAACAGTCTTGACCAAGGAGA
ACCAACTAACCCTTCTGACGCCGCTGCAAAGAACACGACGAAGCTTACGCTGCTTATCT
TCGCTCTGGTAAAAACCCATACTTATATTTCTCGCCAGCAGATCAACGCTTTATAGATCA
AACTAAGGACGCTAAAGATTGGGGGGGAAAATAGGACATTATTTTTTTAGAGCTAAAAA
GGCAATTGCTCCAGTATTAAGTATACACCAGATCATCCATCAACATCAAGACCAACAAA
ACCAACTAAAAGAAGTAAACCACCACCTCATATTTTCATTAATCTTGCAAAAAAAAAAAAA
AGCCGGTGCAGGACAAGTAAAAAGAGACAATCTTGCACCAATGAGTGATGGAGCAGTTCA
ACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCAACAGGATCTGGGAACGGGTG
TGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTCTGGGGGTGGGGATTTCTACGGGTACTTTCAATAA
TCAGACGGAATTTAAATTTTTGGAAAACGGATGGGTGGAAATCACAGCAAACCTCAAGCAG
ACTTGTACATTTAAATATGCCAGAAAGTAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAATTT
GGATAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGATGATACTCATGCACAAATTGTAAC
ACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTTAAATCCAGGAGATTGGCA
ACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAA
TGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAA
TGATTTAACTGCATCATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCC
AGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATACCAACTCC
ATGGAGATATTATTTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAACAGTGG
CACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGA
AAATCTGTGCCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTT
TTTTGATTGTAAACCATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTT
ACCACCATTTCTAAATCTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGTAACCTTTGGTTATATAGG
AGTTCAACAAGATAAAAGACGTGGTGAACCTCAAATGGGAAATACAACTATATTACTGA
AGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATTCTTTTGAGGC
GTCTACACAAGGGCCATTTAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGAGCGCAAACAGA
TGAAAATCAAGCAGCAGATGGTGATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAA
AACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATACAGG
AAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAATATTAACCTTAACTTCCCTGTAACAGAAGA
TAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAACATACTAATAT
ATTTAATACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTTATCCAAATGG
TCAAATTTGGGATAAAGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACC
ATTTGTTTGTCAAAATAATTGCCTGGTCAATTTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAAC
AAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTCAGATTT
TTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCC
AATTCAACAAATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGG
AGGTATGAAAATTGTATATGAAAAATCTCAGCTAGCACCTAGAAAATTATATTAAACATAC

TTACTATGTTTTTATGTTTATTACATATCAACTAACACCTAGAAAATTATATTAATATAC
 TTACTATGTTTTTATGTTTATTACATATTATTTAAGATTTAATTAAGGCGCGCC

PacI

Los sitios Xmn I y Pac I se indican subrayados. Se indica el codón de parada (TAA) de la región codificante de la cápside. La secuencia codificante de la cápside (Vp1/Vp2) se muestra en negrita.

5 El fragmento sintetizado se liberó del plásmido en el que se encontraba usando las enzimas Xmn I y Pac I, se ligó al fragmento mostrado en la Figura 3. Se transformaron *E. coli* competentes (cepa DL795) con la mezcla de ligadura utilizando protocolos estándar y se aislaron e identificaron las bacterias que albergan los plásmidos recombinantes. El plásmido p1542c resultante ilustrado más abajo (Figura 4) se preparó después a partir de *E. coli* clonada.

10 El virus híbrido se preparó como sigue. El ADN del plásmido p1542c se transfectó en células A72 o CrFK en cultivo. Las transfecciones se realizaron usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con aproximadamente 3 microgramos de ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la transfección, las células se sometieron a pases y se controlaron mediante un ensayo de hemaglutinación (HA). El virus fue detectado por HA en el paso 4. La determinación de la secuencia del ADN de los virus híbridos se llevó a cabo usando protocolos de secuenciación de ADN estándar utilizando el ADN de la FR o moldes de fragmentos de PCR. El virus se purificó por dilución limitante en células caninas o felinas susceptibles adherentes.

Ejemplo 3: ensayo in vivo

20 Se inoculó a tres grupos de cachorros no vacunados (libres de patógenos específicos) de 6 semanas de edad nacidos de madres no vacunadas y, por lo tanto, carentes de cualquier anticuerpo de origen materno dirigido contra el PVC, con el virus híbrido 2/2c y cada uno de los virus parentales (vacuna de tipo 2 y virus de campo de tipo 2c). Los animales fueron controlados clínicamente y se tomaron muestras de sangre.

25 El grupo 1 contenía 5 perros vacunados por vía subcutánea con Parvo C, una vacuna de Intervet convencional que comprende un PVC de tipo 2. El grupo 2 contenía 5 perros vacunados por vía subcutánea con la vacuna contra el nuevo híbrido 2/2c de 107,5 TCID50 por ml.

30 Se observó que los perros del grupo 1 presentaban un título más alto de anticuerpos específicos contra el virus de tipo 2 que contra el híbrido. Por el contrario, los perros del grupo 2, mostraban títulos más altos de inhibición de la hemaglutinación (HAI), así como de títulos de sueroneutralización (SN) contra el virus híbrido.

35 Por lo tanto, se puede concluir que la cepa del virus híbrido proporciona una mayor protección contra la infección con el PVC de tipo 2c manteniendo al mismo tiempo una protección adecuada frente a las cepas del virus de tipo 2 convencionales.

40 Ninguno de los perros inoculados con la vacuna existente mostró signos de enfermedad, mientras que los perros de control que fueron inoculados con virus de campo mostraban enteritis hemorrágica grave. Por lo tanto, hemos observado sorprendentemente que las principales mutaciones atenuantes del PVC se encuentran fuera del gen de la proteína de la cápside.

Ejemplo 4: ensayos de seguridad

45 Se realizó un estudio para examinar la seguridad del virus híbrido 2/2c en cachorros que habían adquirido anticuerpos maternos (AM). Todos los cachorros vacunados permanecieron completamente normales durante todo el estudio. Por otra parte, los perros que habían sido vacunados con el virus híbrido desarrollaron una buena respuesta serológica, lo que indica que el virus híbrido fue capaz de superar los niveles normales de AM, un requisito esencial de una vacuna contra el parvovirus canino eficaz.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Intervet International B.V.
- <120> Parvovirus
- 55 <130> 2010 002
- <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 2451
- 60 <212> ADN
- <213> *Canine parvovirus*
- <400> 1

ES 2 566 033 T3

agaggcagac	ctgagagcca	tctttacttc	tgaacaattg	gaagaagatt	ttcgagacga	60
cttggattaa	ggtacgatgg	cacctccggc	aaagagagcc	aggagaggta	aggggtgtgtt	120
agtaaagtgg	ggggagagga	aagattttaat	aacttaacta	agtatgtgtt	tttttatagg	180
acttgtgcct	ccaggttata	aatatcttgg	gcctgggaac	agtcttgacc	aaggagaacc	240
aactaacctt	tctgacgccg	ctgcaaaaga	acacgacgaa	gcttacgctg	cttatcttcg	300
ctctggtaaa	aaccatact	tatatttctc	gccagcagat	caacgcttta	tagatcaaac	360
taaggacgct	aaagattggg	gggggaaaat	aggacattat	tttttttagag	ctaaaaaggc	420
aattgctcca	gtattaactg	atacaccaga	tcatccatca	acatcaagac	caacaaaacc	480
aactaaaaga	agtaaacccac	cacctcatat	tttcattaat	cttgcaaaaa	aaaaaaaaagc	540
cgggtgcagga	caagtaaaaa	gagacaatct	tgcaccaatg	agtgatggag	cagttcaacc	600
agacggtggt	caacctgctg	tcagaaatga	aagagcaaca	ggatctggga	acgggtctgg	660
aggcgggggt	ggtggtggtt	ctgggggtgt	ggggatttct	acgggtactt	tcaataatca	720
gacggaatth	aaatthtttg	aaaacggatg	ggtggaaatc	acagcaaact	caagcagact	780
tgtacattta	aatatgccag	aaagtgaaaa	ttatagaaga	gtggttgtaa	ataatthtga	840
taaaactgca	gttaacggaa	acatggcttt	agatgatact	catgcacaaa	ttgtaacacc	900
ttggtcattg	gttgatgcaa	atgcttgggg	agtttggttt	aatccaggag	attggcaact	960
aattgttaat	actatgagtg	agttgcattt	agtttagttt	gaacaagaaa	tttttaatgt	1020
tgttttaaag	actgthtcag	aatctgctac	tcagccacca	actaaagttt	ataataatga	1080
tttaactgca	tcattgatgg	ttgcattaga	tagtaataat	actatgccat	ttactccagc	1140
agctatgaga	tctgagacat	tgggtthtta	tccatggaaa	ccaaccatac	caactccatg	1200
gagatattat	thtcaatggg	atagaacatt	aataccatct	catactggaa	ctagtggcac	1260
accaacaaat	atataccatg	gtacagatcc	agatgatgth	caatthttata	ctattgaaaa	1320
ttctgtgcca	gtacacttac	taagaacagg	tgatgaatth	gctacaggaa	cattthtttt	1380
tgattgtaaa	ccatgtagac	taacacatac	atggcaaaaa	aatagagcat	tgggcttacc	1440
accatttcta	aattctthtc	ctcaagctga	aggaggtact	aactthtggt	atataggagt	1500
tcaacaagat	aaaagacgtg	gtgtaactca	aatgggaaat	acaaactata	ttactgaagc	1560
tactattatg	agaccagctg	aggthtggtta	tagtgcacca	tattattctt	ttgaggcgtc	1620
tacacaaggg	ccattthaaa	cacctattgc	agcaggacgg	gggggagcgc	aaacagatga	1680
aatcaagca	gcagatggtg	atccaagata	tgcattthgt	agacaacatg	gtcaaaaaac	1740
taccacaaca	ggagaaacac	ctgagagatt	tacatatata	gcacatcaag	atacaggaag	1800
atatccagaa	ggagattgga	thcaaaatth	taactthaac	cttcctgtaa	cagaagataa	1860
tgtattgcta	ccaacagatc	caattggagg	thaaacagga	attaactata	ctaatatatt	1920
taatacttht	ggtcctthta	ctgcattaaa	thaatgtacca	ccagthttatc	caaatggtca	1980
aattthggat	aaagaatthg	atactgactt	aaaaccaaga	cttcatgtaa	atgcaccatt	2040
tgtthgtcaa	aataatthtc	ctggtcaatt	atthtgtaaaa	gthgctgctta	atthtaacaaa	2100
tgaatatgat	cctgatgcat	ctgctaataat	gtcaagaatth	gthacttact	cagatthtttg	2160
gtggaaaggt	aaattagtat	thaaagctaa	actaaagacc	tctcatactt	ggaatccaat	2220
tcaacaaatg	agtattaatg	tagataacca	atthtaactat	gtaccaagta	atattggagg	2280
tatgaaaatt	gtatatgaaa	aatctcagct	agcacctaga	aaattatatt	aacatactta	2340
ctatgthttt	atgthttatta	catatcaact	aacacctaga	aaattatatt	aatatactta	2400
ctatgthttt	atgthttatta	catattatth	thagattaat	thaggcgcgc	c	2451

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un parvovirus recombinante atenuado que comprende como genoma una secuencia de ADN de un parvovirus canino de tipo 2 atenuado, en el que el ADN que codifica la proteína de la cápside o un fragmento de la misma se sustituyen por un ADN que codifica una proteína de la cápside o un fragmento de la misma de un parvovirus canino de tipo 2c.
- 10 2. Parvovirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de ADN del parvovirus canino de tipo 2 atenuado es esencialmente de longitud completa.
3. Parvovirus recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que dicha proteína de la cápside del parvovirus canino de tipo 2c es esencialmente de longitud completa.
- 15 4. Vacuna para la protección de animales contra la infección con parvovirus, comprendiendo dicha vacuna un parvovirus recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. Método de obtención de un parvovirus recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, comprendiendo dicho método las etapas de:
- a. Obtener al menos un fragmento de ADN a partir de una cepa de parvovirus canino de tipo 2 atenuada, no codificando dicho fragmento de ADN una proteína de la cápside
 - b. Obtener al menos un fragmento de ADN de una cepa de parvovirus canino de tipo 2c, codificando dicho fragmento de ADN una proteína de la cápside
 - 25 c. Transfectar una célula permisiva para el parvovirus los fragmentos de ADN obtenidos en las etapas a y b
 - d. Permitir la recombinación de los fragmentos de ADN
 - e. Seleccionar un virus recombinante atenuado que codifica una proteína de la cápside viral derivada del parvovirus canino de tipo 2c en el contexto genético del genoma del parvovirus canino de tipo 2
 - f. Cultivar la célula en condiciones que permitan la producción de parvovirus en un cultivo celular
 - 30 g. Obtener los parvovirus recombinantes a partir del cultivo de células.
6. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso en la protección de los animales contra la infección con parvovirus canino.

FIGURA 1

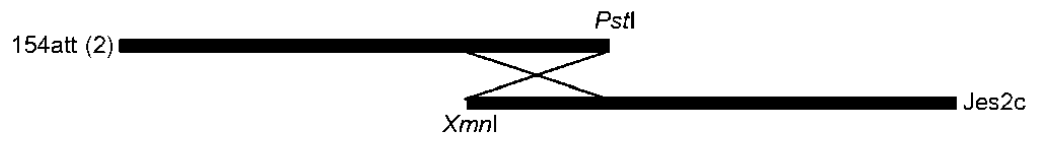


FIGURA 2

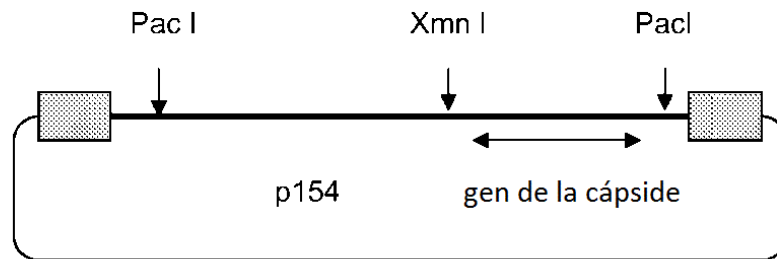


FIGURA 3

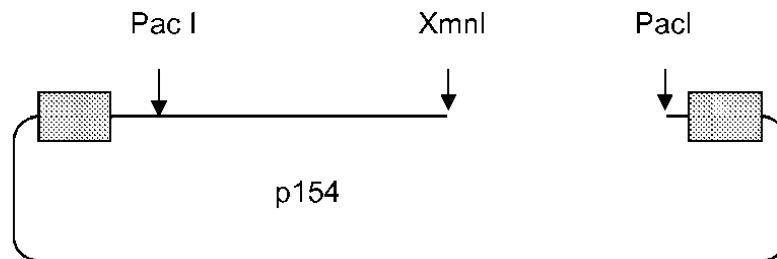


FIGURA 4

