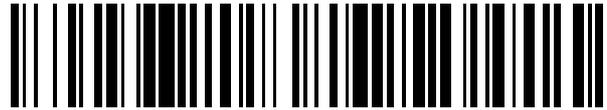


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 044**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2002 E 02759818 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 1377660**

54 Título: **Vacuna contra el virus de la fiebre del Nilo**

30 Prioridad:

06.04.2001 FR 0104737

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

08.04.2016

73 Titular/es:

**MERIAL (100.0%)
29 avenue Tony Garnier
69007 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**LOOSMORE, SHEENA MAY;
AUDONNET, JEAN-CHRISTOPHE FRANCIS y
MINKE, JULES MAARTEN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 566 044 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

Vacuna contra el virus de la fiebre del Nilo

- 5 **[0001]** La presente invención tiene por objeto composiciones inmunógenas y vacunas contra la fiebre del Nilo que comprenden uno o varios virus recombinados avipox y que expresan al menos las proteínas prM, M y E del virus de la fiebre del Nilo.
- [0002]** Se describen también procedimientos de inmunización y de vacunación contra este virus.
- 10 **[0003]** El virus de la fiebre del Nilo (West Nile Virus o WNV) fue identificado por primera vez en 1937 en el hombre en Uganda en la provincia del Nilo Occidental (Zeller H. G., Med. Trop., 1999, 59, 490-494).
- [0004]** Muy extendido en África, y encontrado también en la India, Pakistán y en la cuenca mediterránea, se ha identificado en los EE.UU. por primera vez en la ciudad de Nueva York en 1999 (Anderson J. F. y col., Science, 1999, 286, 2331-2333).
- 15 **[0005]** El virus de la fiebre del Nilo afecta tanto a las aves como a los mamíferos y el hombre.
- 20 **[0006]** La enfermedad se caracteriza en las aves por afectación del sistema nervioso central y la muerte. Las lesiones incluyen encefalitis, hemorragias en el miocardio y hemorragias y necrosis en el tracto intestinal.
- [0007]** En los pollos, infecciones experimentales por inoculaciones subcutáneas de virus de la fiebre del Nilo aislados en cornejas han conllevado necrosis del miocardio, nefritis y neumonías de 5 a 10 días después de la inoculación y encefalitis, moderadas o graves, 21 días después de la inoculación (Senne D. A. y col., Avian Disease, 2000, 44, 642-649).
- 25 **[0008]** El virus de la fiebre del Nilo afecta también a los caballos, especialmente en África del Norte y en Europa (Cantile C. y col., Equine Vet. J., 2000, 32(1), 31-35). Estos caballos muestran signos de ataxia, debilidad de las extremidades posteriores, paresia que evoluciona hacia tetraplejia y muerte. Los caballos y los camélidos son los principales animales que manifiestan signos clínicos en forma de encefalitis.
- [0009]** Se han detectado anticuerpos anti-WNV en algunos roedores, en el ganado, especialmente en bovinos y ovinos, animales domésticos, especialmente el perro (Zeller H. G., Med. Trop., 1999, 59, 490-494; 35 Lundstrom J. O., Journal of Vector Ecology, 1999, 24(1), 1-39).
- [0010]** La especie humana no se salva del virus de la fiebre del Nilo, con numerosos síntomas (Sampson B. A., Human Pathology, 2000, 31(5), 527-531; Marra C. M., Seminars in Neurology, 2000, 20(3), 323-327).
- 40 **[0011]** El virus de la fiebre del Nilo es transmitido a las aves y los mamíferos por ciertos mosquitos (por ejemplo, *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*) y garrapatas.
- [0012]** Las aves silvestres y domésticas son un reservorio para el virus de la fiebre del Nilo y un vector de propagación por sus migraciones.
- 45 **[0013]** Los viriones del virus de la fiebre del Nilo son partículas esféricas de 50 nm de diámetro constituidas por una envoltura lipoproteica que rodea a una nucleocápside icosaédrica que contiene un ARN monocatenario de polaridad positiva.
- 50 **[0014]** Un único marco abierto de lectura (ORF, del inglés *open read framing*) codifica el conjunto de proteínas víricas en forma de una poliproteína. La segmentación y la maduración de esta poliproteína conduce a la producción de una decena de proteínas víricas diferentes. Las proteínas estructurales son codificadas por la parte 5' del genoma y corresponden a la nucleocápside denominada C (14 kDa), la glucoproteína de envoltura denominada E (50 kDa), la proteína de premembrana denominada prM (23 kDa) y la proteína de membrana denominada M (7 55 kDa). Las proteínas no estructurales son codificadas por la parte 3' del genoma y corresponden a las proteínas NS1 (40 kDa), NS2A (19 kDa), NS2B (14 kDa), NS3 (74 kDa), NS4A (15 kDa), NS4B (29 kDa) y NS5 (97 kDa).
- [0015]** Parrish C. R. y col. (J. Gen. Virol., 1991, 72, 1645-1653), Kulkarni A. B. y col. (J. Virol., 1992, 66(6), 3583-3592) y Hill A. B. y col. (J. Gen. Virol., 1992, 73, 1115-1123) han construido, a partir del virus de la vacuna,

vectores de expresión *in vivo* que contienen diversos insertos correspondientes a secuencias nucleotídicas que codifican proteínas no estructurales del virus Kunjin asociadas en su caso a proteínas estructurales. Estos vectores han sido administrados al ratón para evaluar la respuesta inmunitaria celular. Los autores insisten en la importancia de la respuesta celular, respuesta que es estimulada esencialmente por las proteínas no estructurales y en particular por NS3, NS4A y NS4B. Estos artículos ponen de manifiesto la dificultad de evidenciar cuál sería la estrategia adecuada para la vacunación contra la fiebre del Nilo.

[0016] En la actualidad, no existe vacuna para prevenir la infección por el virus WN.

10 **[0017]** La presente invención tiene por objeto proponer un medio de prevención y/o de lucha contra las enfermedades causadas por el virus WN que pueda emplearse en los equinos.

[0018] Otro objeto de la divulgación consiste en proponer procedimientos de inmunización y de vacunación de las especies diana.

15

[0019] Otro objeto de la divulgación consiste en proponer dichos medios y procedimientos que permitan asegurar un diagnóstico diferencial.

RESUMEN DE LA INVENCION

20

[0020] En su sentido más amplio, la invención se refiere a:

1. Una composición inmunógena para su uso en la protección de los equinos contra el virus de la fiebre del Nilo (WNV) o una vacuna para su uso en la protección de los equinos contra el virus de la fiebre del Nilo (WN), que comprende uno o varios virus recombinados avipox y que expresa las proteínas prM, M y E del virus WN, comprendiendo los virus recombinados uno o varios polinucleótidos que codifican una o varias proteínas prM, M y E, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Según una forma de realización en particular, la invención se refiere a:

2. Composición inmunógena o vacuna para su uso según 1, caracterizada porque comprende un virus recombinado avipox que expresa las tres proteínas prM, M y E.

3. Composición inmunógena o vacuna para su uso según 1, caracterizada porque incluye un virus recombinado avipox que comprende un polinucleótido que forma una fase de lectura que codifica prM-M-E.

35

4. Composición inmunógena o vacuna según 1, 2 ó 3, para su uso según 1, caracterizada porque el virus recombinado es un canarypox.

5. Composición inmunógena o vacuna según 1, 2 ó 3 para su uso según 1, caracterizada porque el virus recombinado es un fowlpox.

40

6. Composición inmunógena o vacuna según una de 1 a 5 para su uso según 1, caracterizada porque el polinucleótido codifica también un péptido de señal.

7. Composición inmunógena o vacuna según 6 para su uso según 1, caracterizada porque se trata de un péptido de señal del virus WN.

8. Composición inmunógena o vacuna según 6 para su uso según 1, caracterizada porque se trata de un péptido de señal heterólogo.

50

9. Composición inmunógena o vacuna según 8 para su uso según 1, caracterizada porque se trata del péptido de señal del activador tisular del plasminógeno humano.

10. Composición inmunógena o vacuna según una cualquiera de 1 a 9, para su uso según 1 caracterizada porque comprende otro polinucleótido que codifica una proteína de otra cepa de virus WN y/o de otro agente patógeno y/o una citocina.

55

11. Composición inmunógena o vacuna según una cualquiera de 1 a 10, para su uso según 1 caracterizada porque comprende otro vector de expresión que comprende otro polinucleótido que codifica una proteína de otra cepa de

virus WN y/o de otro agente patógeno y/o una citocina.

12. Composición inmunógena o vacuna según una cualquiera de 1 a 11, para su uso según 1 caracterizada porque comprende además un adyuvante.

5

13. Composición inmunógena o vacuna según 12, para su uso según 1 caracterizada porque el adyuvante se elige entre (1) polímeros del ácido acrílico o metacrílico y polímeros de anhídrido maleico y de derivado de alqueno, (2) secuencias inmunoestimulantes, (3) una emulsión de aceite en agua, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, (5) citocinas.

10

14. Composición inmunógena o vacuna según 13, para su uso según 1 caracterizada porque el adyuvante es un carbómero.

15. Composición inmunógena o vacuna según 10 ó 13, para su uso según 1 caracterizada porque la citocina es una citocina de equino o una citocina aviar.

16. Composición inmunógena o vacuna según 15, para su uso según 1 caracterizada porque la citocina se elige entre interleucina 18, interleucina 12, interleucina 15, MIP-1a, GM-CSF.

20 17. Composición inmunógena o vacuna según 15, para su uso según 1 caracterizada porque la citocina es el GM-CSF equino.

25 18. Composición inmunógena o vacuna según una cualquiera de 1 a 17, para su uso según 1 que forma una composición inmunógena o una vacuna multivalente, caracterizada porque comprende un componente de composición inmunógena o vacuna contra otro agente patógeno.

19. Composición inmunógena o vacuna según 18, para su uso según 1 caracterizada porque el componente contra otro agente patógeno incluye el antígeno en forma de subunidad, en la forma de agente inactivado o en la forma de agente atenuado.

30

20. Composición inmunógena o vacuna según 18 ó 19, para su uso según 1 caracterizada porque comprende un componente de composición inmunógena o vacuna contra el virus de la rinoneumonía equina, contra el virus de la gripe equina, contra el virus de la encefalitis del este, contra el virus de la encefalitis del oeste, contra el virus de la encefalitis venezolana, contra Clostridium tetani, y mezclas de los mismos.

35

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0021] La divulgación tiene como primer objeto los vectores de expresión *in vitro* y/o *in vivo* que comprenden un polinucleótido que codifica la proteína de envoltura E del virus WN. Estos vectores comprenden además los

40

[0022] Además del polinucleótido que codifica E, los vectores de expresión para su uso según la invención comprenden uno o varios otros polinucleótidos que codifican otras proteínas del virus WN, especialmente la proteína de premembrana prM y la proteína de membrana M.

45

[0023] El vector comprende preferentemente un polinucleótido que forma una única fase de codificación que corresponde por ejemplo a prM-E, M-E y más en particular a prM-M-E. Un vector que comprende varios polinucleótidos separados que codifican las diferentes proteínas (por ejemplo, prM y/o M y E) entra también en el marco de la presente invención. El vector, en particular *in vivo*, puede comprender también polinucleótidos que

50

corresponden a más de una cepa de virus WN, en particular dos o más polinucleótidos que codifican E o prM-M-E de cepas diferentes. Tal como se verá más adelante, el vector, en particular *in vivo*, puede comprender también una o varias secuencias nucleotídicas que codifican inmunógenos de otros agentes patógenos y/o citocinas.

[0024] Según una forma de realización preferida, el vector de expresión comprende un polinucleótido que

55

codifica prMM-E y preferentemente en una única fase de lectura.

[0025] Por polinucleótido que codifica una proteína del virus WN, se entiende principalmente un fragmento de ADN que codifica esta proteína, o la cadena complementaria de este fragmento de ADN. No se excluye un ARN.

- [0026]** En el sentido de la divulgación, el término proteína engloba los fragmentos, comprendidos los péptidos y polipéptidos. Por definición, el fragmento de proteína es inmunológicamente activo en el sentido de que una vez administrado al hospedador, es susceptible de desencadenar una respuesta inmunitaria de tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. Preferentemente, el fragmento de proteína es de tal forma que posee sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína entera. Un fragmento de proteína según la invención comprende así al menos un epítipo o determinante antigénico. El término epítipo se refiere a un sitio de la proteína capaz de inducir una reacción inmunitaria de tipo humoral (linfocitos B) y/o de tipo celular (linfocitos T).
- [0027]** La estructura mínima del polinucleótido es así la que codifica un epítipo o determinante antigénico de la proteína considerada. Un polinucleótido que codifica un fragmento de la proteína total comprende especialmente como mínimo 21 nucleótidos, especialmente al menos 42 nucleótidos y preferentemente al menos 57, 87 ó 150 nucleótidos consecutivos de la secuencia de la que es extraído. Las técnicas de determinación de los epítopos son bien conocidas por el experto en la materia, se pueden usar especialmente bancos de péptidos solapados (Hemmer B. y col., *Immunology Today*, 1998, 19(4), 163-168), Pepsican (Geysen H. M. y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1984, 81(13), 3998-4002; Geysen H. M. y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1985, 82(1), 178-182; Van der Zee R. y col., *Eur. J. Immunol.*, 1989, 19(1), 43-47; Geysen H. M., *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 1990, 21(4), 523-533; Multipin® Peptide Synthesis Kits de Chiron), algoritmos (De Groot A. y col., *Nature Biotechnology*, 1999, 17, 533-561).
- [0028]** En particular los polinucleótidos comprenden la secuencia nucleotídica que codifica uno o los dos dominios de transmembrana, preferentemente los dos, situados en la parte C terminal de la proteína E. Para la cepa WNV NY99 estos dominios corresponden a las secuencias de aminoácidos 742 a 766 y 770 a 791 de GenBank AF196835.
- [0029]** Están presentes los elementos necesarios para la expresión del o de los polinucleótidos, se trata como mínimo de un codón de inicio (ATG), de un codón de terminación y de un promotor, así como una secuencia de poliadenilación para los plásmidos y los vectores víricos diferentes de poxvirus. Cuando el polinucleótido codifica un fragmento de la poliproteína, por ejemplo, prM-E, M-E, prM-M-E, se coloca un ATG en posición 5' de la fase de lectura y se coloca un codón de terminación en la posición 3'. Tal como se explicará más adelante, podrán estar presentes otros elementos, que permiten el control de la expresión, tales como secuencias de activación (en inglés «enhancer»), secuencias de estabilización y secuencias de señal que permiten la secreción de la proteína.
- [0030]** La presente divulgación tiene también por objeto preparaciones que comprenden dichos vectores de expresión. Más en particular, se refiere a preparaciones que comprenden uno o varios vectores de expresión *in vivo*, que comprenden y que expresan uno o varios de los polinucleótidos citados anteriormente, entre ellos los que codifican E, los de prM y los de M en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- [0031]** Según una primera modalidad el o los otros vectores en la preparación comprenden y expresan una o varias otras proteínas del virus WN, por ejemplo prM, M, prM-M.
- [0032]** Según otra modalidad, el o los otros vectores en la preparación comprenden y expresan una o varias proteínas de una o varias otras cepas de virus WN. Especialmente, la preparación comprende al menos dos vectores que expresan, en particular *in vivo*, polinucleótidos de cepas WN diferentes, que codifican las mismas proteínas y/o proteínas diferentes, preferentemente las mismas proteínas. Se trata preferentemente de vectores que expresan *in vivo* E o prM-M-E de dos, tres o más cepas WN diferentes. La divulgación se refiere también a las mezclas de vectores que expresan prM, M, E, prM-M, prM-E o M-E de cepas diferentes.
- [0033]** Según otra modalidad más, y como se verá en detalle más adelante, el o los otros vectores en la preparación comprenden y expresan una o varias citocinas y/o uno o varios inmunógenos de uno o varios otros agentes patógenos.
- [0034]** La divulgación se refiere también a las diversas combinaciones de estas diferentes modalidades.
- [0035]** Las preparaciones que comprenden un vector de expresión *in vitro* o *in vivo* que comprende y que expresa un polinucleótido que codifica prM-M-E constituyen una forma de realización preferida de la divulgación
- [0036]** Según una forma de realización en particular de la divulgación, los vectores de expresión *in vivo* o *in vitro* comprenden como único o únicos polinucleótidos del virus WN, un polinucleótido que codifica la proteína E, asociado a prM y/o M, preferentemente que codifica prM-M-E, y en su caso una secuencia de señal del virus WN.

[0037] Según una forma de realización en particular, se expresan una o varias de las proteínas no estructurales NS2A, NS2B y NS3, conjuntamente con las proteínas estructurales, ya sea a través del mismo vector de expresión, o bien a través de un vector de expresión propio. Se expresan preferentemente en conjunto a partir de un único polinucleótido.

[0038] La divulgación tiene así también por objeto un vector de expresión, *in vivo* o *in vitro*, que comprende el polinucleótido que codifica NS2A, NS2B, NS3, sus combinaciones, y preferentemente NS2A-NS2B-NS3. En la base, este vector puede ser uno de los vectores descritos anteriormente, que comprende un polinucleótido que codifica una o varias proteínas estructurales, especialmente E o prM-M-E. Como variante, la divulgación se refiere a una preparación tal como se ha descrito anteriormente, que incluye además al menos uno de estos vectores que expresa una proteína no estructural y en su caso un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0039] Para realizar los vectores de expresión el experto en la materia dispone de diferentes cepas del virus WN y de la descripción de la secuencia nucleotídica de su genoma. Véase especialmente Savage H. M. y col. (Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999, 61(4), 600-611), tabla 2, que menciona 24 cepas de virus WN y da las referencias de acceso a secuencias polinucleotídicas en GenBank.

[0040] Se puede por ejemplo, hacer referencia a la cepa NY99 (GenBank AF196835). En GenBank, para cada proteína se precisa la secuencia de ADN correspondiente (nucleótidos 466-741 para prM, 742-966 para M, 967-2469 para E, 466-2469 o bien para prM-M-E, 3526-4218 para NS2A, 4219-4611 para NS2B y 4612-6468 para NS3, o bien 3526-6468 para NS2A-NS2B-NS3). Por comparación y alineación de secuencias, la determinación de un polinucleótido que codifica dicha proteína en otra cepa de WNV es inmediata.

[0041] Se ha indicado anteriormente que por polinucleótido se entendía la secuencia que codifica la proteína o un fragmento o un epítipo, específica del virus WN. Además, por equivalencia, el término polinucleótido engloba también las secuencias nucleotídicas correspondientes de las diferentes cepas de virus WN y las secuencias nucleotídicas que difieren por la degeneración del código.

[0042] En la familia de los virus WN, la identidad entre secuencias de aminoácidos prM-M-E con respecto a la de NY99 es igual o superior al 90%. Están comprendidos así en la divulgación los polinucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos cuya identidad con la secuencia en aminoácidos natural es superior o igual al 90%, especialmente al 92%, preferentemente al 95%, y más en particular todavía al 98%. Se considerarán también como equivalentes los fragmentos de estos polinucleótidos homólogos, que son específicos de los virus WN.

[0043] Así, si se habla de un polinucleótido del virus WN, este término engloba las secuencias equivalentes al sentido de la invención.

[0044] Se ha visto también que el término proteína engloba los polipéptidos y péptidos inmunológicamente activos. Para las necesidades de la invención, esto engloba:

a) las proteínas correspondientes de las diferentes cepas de virus WN;

b) las proteínas que difieren de ellas pero conservan con una proteína natural WN una identidad superior o igual al 90%, especialmente al 92%, preferentemente al 95%, y más en particular todavía al 98%.

[0045] Así, si se habla de una proteína del virus WN, este término engloba las proteínas equivalentes al sentido de la invención.

[0046] Para la recogida están accesibles diferentes cepas de virus WN, especialmente en la American Type Culture Collection (ATCC), por ejemplo, con los números de acceso VR-82 o VR-1267. El virus denominado Kunjin se considera en la práctica un virus WN.

[0047] Se prefiere que el polinucleótido comprenda además una secuencia nucleotídica que codifica un péptido de señal, situado por delante de la proteína expresada para asegurar la secreción. Puede tratarse así de una secuencia endógena, es decir, de la secuencia de señal natural cuando existe (proveniente del mismo virus WN o de otra cepa). Por ejemplo, para el virus WN NY99, la secuencia de señal endógena de E corresponde a los nucleótidos 922 a 966 de la secuencia GenBank; para prM, se trata de los nucleótidos 421 a 465. Puede tratarse también de una secuencia nucleotídica que codifica un péptido de señal heterólogo, especialmente la que codifica el péptido de

señal del activador tisular del plasminógeno humano (tPA) (Hartikka J. y col., Human Gene Therapy, 1996, 7, 1205-1217). La secuencia nucleotídica que codifica el péptido de señal se introduce en fase y por delante de la secuencia que codifica E o sus combinaciones, por ejemplo prM-M-E.

5 **[0048]** Los vectores de expresión *in vivo* son vectores víricos, los avipox (en particular canarypox, fowlpox, pigeonpox, quailpox).

[0049] El vector de expresión es un canarypox o un fowlpox, pudiendo estar estos poxvirus en su caso atenuados. Se puede citar el canarypox disponible comercialmente en ATCC con el número de acceso VR-111. Se han descrito canarypox atenuados en los documentos US-A-5.756.103 y WO-A-01/05.934. Puede accederse a numerosas cepas de vacuna de virus fowlpox, por ejemplo, la vacuna DIFTOSEC CT® comercializada por MERIAL y la vacuna NOBILS® VARIOLE comercializada por Intervet.

15 **[0050]** Para los poxvirus, el experto en la materia puede referirse al documento WO-A-90/12.882, para el fowlpox a los documentos US-A-5.174.993; US-A-5.505.941; US-5.766.599; para el canarypox al documento US-A-5.756.103; para el swinepox al documento US-A-5.382.425; para el raccoonpox al documento WO-A-00/03.030.

20 **[0051]** Los sitios de inserción del o de los polinucleótidos para su expresión están situados en particular en, o constituidos por, los ORF C3, C5 y C6. Los sitios de inserción están situados en particular en, o constituidos por, los ORF F7 y F8.

25 **[0052]** Preferentemente, el polinucleótido que debe expresarse se inserta bajo el control de un promotor específico de los poxvirus, especialmente el promotor de vacuna 7,5 kDa (Cochran y col., J. Virology, 1985, 54, 30-35), el promotor de vacuna I3L (Riviere y col., J. Virology, 1992, 66, 3424-3434), el promotor de vacuna HA (Shida, Virology, 1986, 150, 451-457), el promotor cowpox ATI (Funahashi y col., J. Gen. Virol., 1988, 69, 35-47), o incluso el promotor de vacuna H6 (Taylor J. y col. Vaccine, 1988, 6, 504-508; Guo P. y col. J. Virol., 1989, 63, 4189-4198; Perkus M. y col. J. Virol., 1989, 63, 3829-3836).

30 **[0053]** Preferentemente el vector de expresión es un canarypox.

[0054] Se describen igualmente vectores de expresión usados para expresar *in vitro* las proteínas en un sistema celular apropiado. Las proteínas pueden recogerse a continuación en el sobrenadante de cultivo, después de la secreción o no (si no hay secreción, se procede a una lisis celular), concentradas en su caso por técnicas clásicas de concentración, especialmente por ultrafiltración y/o purificadas por medios de purificación clásicos, especialmente las técnicas de cromatografía de tipo afinidad, intercambio iónico o filtración en gel.

45 **[0055]** La producción se efectúa por transfección de células de mamífero por plásmidos, por replicación de vectores víricos en células de mamífero o células aviares o por replicación de Baculovirus (US-A-4.745.051; Vialard J. y col., J. Virol., 1990, 64(1), 37-50; Verne A., Virology, 1988, 167, 56-71), por ejemplo *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus AcNPV, en células de insectos (por ejemplo, células Sf9 *Spodoptera frugiperda*, depósito ATCC CRL 1711). Como células de mamíferos se pueden usar especialmente células de hámster (por ejemplo, CHO o BHK- 21), células de mono (por ejemplo, COS o VERO). La divulgación cubre así igualmente estos vectores de expresión que incorporan un polinucleótido según la divulgación las proteínas de WN o fragmentos así producidos y las preparaciones que los contienen.

[0056] La presente divulgación, tiene así también por objeto las preparaciones purificadas y/o concentradas de proteínas WN. Cuando el polinucleótido codifica varias proteínas éstas son segmentadas, y las preparaciones anteriores contienen así proteínas segmentadas.

50 **[0057]** La invención tiene por objeto las composiciones inmunógenas y las vacunas contra el virus WN tal como se han descrito en las reivindicaciones para su uso tal como se describe en las reivindicaciones.

[0058] La noción de composición inmunógena recubre todas las composiciones susceptibles, una vez administrada a la especie diana, de inducir una respuesta inmunitaria dirigida contra el virus WN. Por vacuna se entiende una composición capaz de inducir una protección eficaz. Las especies diana son los equinos.

[0059] Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos perfectamente por el experto en la materia. A modo de ejemplo, puede tratarse de solución salina NaCl al 0,9% o de tampón de fosfato. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables engloban también cualquier compuesto o combinación

de compuestos que permiten la facilitación de la administración del vector, especialmente de la transfección, y/o la mejora de la conservación.

[0060] Las dosis y los volúmenes de dosis se definen más adelante en el marco de la descripción general de los procedimientos de inmunización y de vacunación.

[0061] Las composiciones inmunógenas y las vacunas para su uso según la invención comprenden preferentemente uno o varios adyuvantes, elegidos especialmente entre los adyuvantes habituales. En el marco de la presente invención son especialmente convenientes: (1) los polímeros del ácido acrílico o metacrílico, los polímeros de anhídrido maleico y de derivado de alqueno, (2) las secuencias inmunoestimulantes (ISS), especialmente las secuencias de oligodesoxirribonucleótidos que tienen uno o varios motivos CpG no metilados (Klinman D. M. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 2879-2883; documento WO-A1-98/16247), (3) una emulsión de aceite en agua, en particular la emulsión SPT descrita en la página 147 de «Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach» editada por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de la misma obra, (4) los lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, (5) las citocinas, o (6) sus combinaciones o mezclas.

[0062] La emulsión de aceite en agua (3), que está adaptada en particular para los vectores víricos, puede tener especialmente como base:

- aceite de parafina líquida ligera (tipo Farmacopea europea);
- aceite isoprenoide tal como escualano, escualeno;
- aceite resultante de la oligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o de deceno;
- ésteres de ácidos o de alcoholes con grupo alquilo lineal;
- más en particular aceites vegetales, oleato de etilo, di(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri(caprilato/caprato) de glicerol, dioleato de propilenglicol;

de ésteres de ácidos o de alcoholes grasos ramificados, en particular ésteres del ácido isoesteárico.

[0063] El aceite se usa en asociación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferentemente tensioactivos no iónicos, en particular:

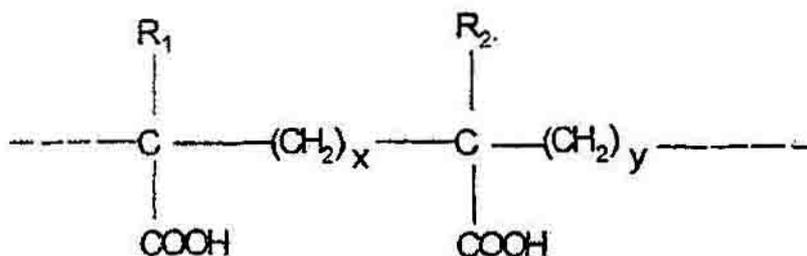
- los ésteres por una parte de sorbitano, de manida (por ejemplo, oleato de manitol anhidro), de glicerol, de poliglicerol o de propilenglicol y por otra parte de ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico, hidroxiesteárico, en su caso con estos ésteres etoxilados,
- los copolímeros de bloque de polioxipropileno-polioxietileno, en particular Pluronic®, especialmente L121.

[0064] Entre los polímeros adyuvantes de tipo (1), se prefieren los polímeros del ácido acrílico o metacrílico reticulados, especialmente reticulados por éteres polialquenílicos de azúcares o de polialcoholes. Estos compuestos son conocidos por el término carbómero (Pharmeuropa vol. 8, n° 2, junio de 1996). El experto en la materia puede referirse también al documento US-A-2.909.462 que describe dichos polímeros acrílicos reticulados por un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferentemente no más de 8, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos sustituidos por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener asimismo otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos con la denominación Carbopol® (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) resultan apropiados en particular. Especialmente están reticulados por una alil-sacarosa o por alilpentaeritritol. Entre ellos, se pueden citar en particular los Carbopol® 974P, 934P y 971P.

[0065] Entre los copolímeros de anhídrido maleico y de derivado de alqueno, se prefieren los EMA® (Monsanto) que son copolímeros de anhídrido maleico y de etileno, lineales o reticulados, por ejemplo, reticulados por diviniléter. Es posible referirse a J. Fields y col., Nature, 186: 778-780,4 de junio de 1960.

[0066] En el plano de su estructura, los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los EMA® están formados

preferentemente por motivos de base de la fórmula siguiente:



5 en la que:

- R₁ y R₂, idénticos o diferentes, representan H o CH₃

- x = 0 ó 1, preferentemente x = 1

10

- y = 1 ó 2, con x + y = 2

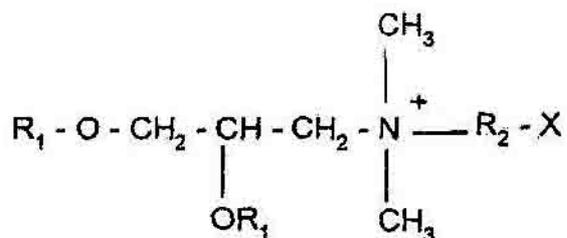
[0067] Para los EMA®, x = 0 e y = 2. Para los carbómeros, x = y = 1.

15 **[0068]** Estos polímeros se disuelven en agua o en agua fisiológica (NaCl a 20 g/l) y el pH se ajusta a 7,3-7,4 con sosa, para dar la solución adyuvante en la que se incorporarán los vectores de expresión.

[0069] La concentración de polímero en la composición de vacuna final puede ir especialmente del 0,01% al 1,5% P/V, más en particular del 0,05 al 1% P/V, preferentemente del 0,1 al 0,4% P/V.

20

[0070] Los lípidos catiónicos (4) que contienen una sal de amonio cuaternario, que están especialmente adaptados pero no de forma exclusiva a los plásmidos, son preferentemente los que responden a la fórmula siguiente:



25

en la que R₁ es un radical alifático lineal, saturado o insaturado, que tiene de 12 a 18 átomos de carbono, R₂ es otro radical alifático, que contiene 2 ó 3 átomos de carbono, y X un grupo hidroxilo o amina.

30 **[0071]** Entre estos lípidos catiónicos, se prefiere DMRIE (N-(2-hidroxi)etil)-N,N=dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propanamónio; el documento WO-A-96/34.109), asociado preferentemente con un lípido neutro, preferentemente DOPE (dioleoilfosfatidil-etanolamina; Behr J. P., 1994, Bioconjugate Chemistry, 5, 382-389), para formar el DMRIE-DOPE.

35 **[0072]** Preferentemente, la mezcla de plásmido con este adyuvante se realiza de forma extemporánea y se prefiere, antes de su administración, dar tiempo para que la mezcla así constituida forme complejo, por ejemplo, durante un tiempo comprendido entre 10 y 60 minutos, especialmente del orden de 30 minutos.

[0073] Cuando está presente DOPE, la razón molar DMRIE:DOPE está comprendida preferentemente entre

95:5 y 5:95, más en particular es de 1:1.

[0074] La relación ponderal plásmido: adyuvante DMRIE o DMRIE-DOPE puede estar comprendida especialmente entre 50:1 y 1:10, en particular entre 10:1 a 1:5, y preferentemente de 1:1 a 1:2.

5

[0075] La o las citocinas (5) pueden ser aportadas en forma de proteína a la composición o vacuna, o estar coexpresadas en el hospedador con el o los inmunógenos. Existe preferencia por la coexpresión de la o de las citocinas, ya sea por el mismo vector que el que se expresa el inmunógeno o por un vector propio.

10 **[0076]** Las citocinas pueden elegirse especialmente entre: interleucina 18 (IL-18), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1 α* ; Marshall E. y col., Br. J. Cancer, 1997, 75(12), 1715-1720), GM-CSF (factor de estimulación de la formación de colonias de granulocitos-macrófagos, o en inglés Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor). Se pueden citar en particular las citocinas aviares, especialmente las del pollo, tales como cIL-18 (Schneider K. y col., J. Interferon Cytokine Res., 2000, 20(10), 879-
15 883), cIL-15 (Xin K.-Q. y col., Vaccine, 1999, 17, 858-866), y las citocinas equinas, especialmente GM-CSF equino (WO-A-00/77210)). De forma preferida, se usan las citocinas de la especie para vacunar.

[0077] El documento WO-A-00/77210 describe la secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos que corresponde al GM-CSF equino, de manera que la producción de GM-CSF *in vitro* y la construcción de vectores
20 (plásmidos y vectores víricos) permiten la expresión del GM-CSF equino *in vivo*. Estas proteínas, plásmidos y vectores víricos, pueden usarse en las composiciones inmunógenas y las vacunas equinas para su uso según la invención. A modo de ejemplo, se puede usar el plásmido pJP097 descrito en el ejemplo 3 de esta solicitud anterior o usar la enseñanza de esta solicitud anterior para producir otros vectores o para producir *in vitro* GM-CSF equino, e
25 incorporar estos vectores o este GM-CSF equino en las composiciones inmunógenas o vacunas de equinos para su uso según la invención.

[0078] El presente documento describe composiciones inmunógenas y vacunas llamadas de subunidades, que comprenden la proteína E, y en su caso una o varias otras proteínas del virus WN, especialmente prM o M, preferentemente producidos por expresión *in vitro* tal como se describe anteriormente, y por otra parte un vehículo o
30 excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0079] Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables son perfectamente conocidos por el experto en la materia. A modo de ejemplo, puede tratarse de solución salina NaCl a 0,9% o de tampón de fosfato.

35 **[0080]** Las composiciones inmunógenas y las vacunas de subunidades descritas comprenden preferentemente uno o varios adyuvantes, elegidos especialmente entre los adyuvantes habituales. Son especialmente convenientes: (1) un polímero del ácido acrílico o metacrílico, un polímero de anhídrido maleico y de derivado de alqueno, (2) una secuencia inmunoestimulante (ISS), especialmente una secuencia de oligodesoxirribonucleótidos que tenga uno o varios motivos CpG no metilados (Klinman D. M. y col., Proc. Natl.
40 Acad. Sci. USA, 1996, 93, 2879-2883; documento WO-A1-98/16247), (3) una emulsión de aceite en agua en particular la emulsión SPT descrita en la página 147 de «Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach» editado por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de la misma obra, (4) una emulsión de agua en aceite (documento EP-A-639 071), (5) saponina, en particular Quil-A, o (6) hidróxido de aluminio o equivalente. Los diferentes tipos de adyuvantes definidos en 1), 2) y 3) han sido descritos
45 anteriormente más en detalle en relación con vacunas a base de vectores de expresión.

[0081] Las dosis y volúmenes de dosis se definen más adelante en el marco de la descripción general de los procedimientos de inmunización y de vacunación.

50 **[0082]** De acuerdo con la invención, la vacunación contra el virus WN puede estar asociada a otras vacunaciones en el marco de los programas de vacunación, en forma de kits de inmunización o de vacunación o incluso en forma de composiciones inmunógenas y de vacunas multivalentes, es decir, que comprende al menos un componente de vacuna contra el virus WN y al menos un componente de vacuna contra al menos otro agente patógeno. Esto incluye también la expresión por un mismo vector de expresión de genes de al menos dos agentes
55 patógenos, incluido el virus WN.

[0083] La invención tiene así por objeto una composición inmunógena multivalente o una vacuna multivalente para su uso en la protección de los equinos contra el virus W.N y contra al menos otro patógeno de la especie diana, usando un mismo vector de expresión *in vivo* que contiene y que expresa las proteínas prM, M y E del virus WN y al

menos un polinucleótido que expresa un inmunógeno de otro patógeno, que comprende uno o varios virus recombinados avipox.

[0084] Por «inmunógeno» así expresado, se entiende especialmente una proteína, glucoproteína, polipéptido o péptido, epítipo o derivado, por ejemplo proteína de fusión, que inducen una respuesta inmunitaria, preferentemente protectora.

[0085] Tal como se ha descrito anteriormente, estas composiciones o vacunas multivalentes comprenden también un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y en su caso un adyuvante.

[0086] La invención tiene igualmente por objeto una composición inmunógena multivalente o una vacuna multivalente que comprende al menos un vector de expresión *in vivo* de tipo virus recombinado avipox que expresa las proteínas prM, M y E del virus WN, en el que se introduce al menos un polinucleótido del virus WN y al menos un segundo vector de expresión en el que se introduce un polinucleótido que codifica un inmunógeno de otro agente patógeno para su uso en la protección de los equinos contra el virus WN y contra al menos otro patógeno de la especie diana. Como se ha descrito anteriormente, estas composiciones o vacunas multivalentes comprenden también un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y en su caso un adyuvante.

[0087] Para las composiciones inmunógenas y las vacunas multivalentes, los otros de dichos patógenos equinos se eligen especialmente entre el grupo que comprende los virus de la rinoneumonía equina EHV-1 y/o EHV-4 (preferentemente se asocia a inmunógenos de EHV-1 y EHV-4), virus de la gripe equina EIV, virus de la encefalitis del este EEV, virus de la encefalitis del oeste WEV, virus de la encefalitis venezolana VEV (se prefiere una combinación de los tres EEV, WEV y VEV), *Clostridium tetani* (tétanos) y mezclas de los mismos. Preferentemente, para EHV se eligen los genes gB y/o gD; para EIV los genes HA, NP y/o N; para los virus de las encefalitis C y/o E2; para *Clostridium tetani* el gen que codifica parte o la totalidad de la subunidad C de la toxina tetánica. Ello incluye el uso de polinucleótidos que codifican un fragmento inmunológicamente activo o un epítipo de este inmunógeno.

[0088] A modo de ejemplo, en una composición inmunógena multivalente o una vacuna multivalente según la invención, en su caso con adyuvante tal como se describe anteriormente, destinado a la especie equina, se puede incorporar uno o varios de los plásmidos descritos en el documento WO-A-98/03.198 y en particular en los ejemplos 8 a 25 de esta solicitud anterior, y los descritos en el documento WO-A-00/77.043 y que se refieren a la especie equina, en particular los descritos en los ejemplos 6 y 7 de esta solicitud anterior.

[0089] Las composiciones inmunógenas o las vacunas recombinadas tal como se han descrito anteriormente pueden asociarse igualmente con al menos una vacuna clásica (inactivada, viva atenuada, subunidades) dirigida contra al menos otro patógeno.

[0090] La presente invención describe también procedimientos de inmunización y de vacunación de las especies diana mencionadas anteriormente.

[0091] Estos procedimientos comprenden la administración de una cantidad eficaz de una composición inmunógena o de una vacuna según la invención. Esta administración puede hacerse especialmente por la vía parenteral, por ejemplo por administración subcutánea, intradérmica, intramuscular, o por la vía oral y/o nasal. Puede realizarse una o varias administraciones, en particular dos.

[0092] Las diferentes vacunas pueden inyectarse mediante un inyector de chorro líquido sin aguja. Para los plásmidos se pueden usar también partículas de oro recubiertas de plásmido y proyectadas de manera que penetren en las células de la piel del sujeto sometido a inmunización (Tang y col. Nature 1992. 356. 152-154).

[0093] Las composiciones inmunógenas y las vacunas para su uso según la invención comprenden una cantidad eficaz de vector de expresión o de polipéptido.

[0094] En el caso de las composiciones inmunógenas o de las vacunas a base de plásmido, una dosis incluye de manera general de 10 µg aproximadamente a 2.000 µg aproximadamente, especialmente de 50 µg aproximadamente a 1.000 µg aproximadamente. Los volúmenes de dosis pueden estar comprendidos entre 0,1 y 2 ml, preferentemente entre 0,2 y 1 ml.

[0095] Estas dosis y volúmenes de dosis están bien adaptados para la vacunación de los equinos.

[0096] En el caso de las composiciones inmunógenas o de las vacunas a base de poxvirus, de manera general una dosis está comprendida entre aproximadamente 10^2 pfu y aproximadamente 10^9 pfu.

[0097] Los volúmenes de dosis de las composiciones inmunógenas y de las vacunas de equinos a base de vectores víricos están comprendidos en general entre 0,5 y 2,0 ml, preferentemente entre 1,0 y 2,0 ml, preferentemente de 1,0 ml.

[0098] El experto en la materia posee también para este tipo de vacuna las competencias necesarias para optimizar el número de administraciones, la vía de administración y las dosis que se usarán para cada protocolo de inmunización. En particular se prevén dos administraciones en el caballo, por ejemplo, con un intervalo de 35 días.

[0099] La divulgación se refiere también al uso de un vector de expresión *in vivo* o de una preparación de vectores o de polipéptidos según la divulgación para la preparación de una composición inmunógena o de una vacuna destinada a proteger las especies diana contra el virus WN y en su caso contra al menos otro agente patógeno. Las diferentes características enunciadas en el resto de la descripción se aplican a este otro objeto de la divulgación

[0100] Una vacuna vírica que expresa una o varias proteínas del virus WN para su uso según la presente invención, no inducirá en el animal vacunado la producción de anticuerpos contra las otras proteínas de este virus que no están representadas en la composición inmunógena o vacuna. Esta característica puede usarse para el desarrollo de procedimientos de diagnóstico diferencial que permiten establecer la distinción entre los animales infectados por el virus patógeno WN y los animales vacunados con ayuda de vacunas según la invención. En estos últimos, estas proteínas y/o anticuerpos dirigidos contra ellas están presentes y pueden ser detectados por una reacción antígeno-anticuerpo. No sucede así en los animales vacunados de acuerdo con la invención que permanecen negativos. Para realizar esta discriminación, se usa una proteína que no está representada en la vacuna (no presente o no expresada), por ejemplo, la proteína C o la proteína NS1, NS2A, NS2B o NS3 cuando no está representada en la vacuna.

[0101] La presente divulgación describe así el uso de los vectores, preparaciones y polipéptidos según la divulgación para la preparación de composiciones inmunógenas y de vacunas según la invención que permite discriminar entre animales vacunados y animales infectados.

[0102] Describe además un procedimiento de inmunización y de vacunación asociado a un procedimiento de diagnóstico que permite esta discriminación.

[0103] La proteína seleccionada para el diagnóstico o uno de sus fragmentos o epítopos se usa como antígeno en la prueba de diagnóstico, y/o se usa para producir anticuerpos, policlonales o monoclonales. El experto en la materia dispone de los conocimientos y de la práctica para producir estos anticuerpos y para implementar antígenos y/o anticuerpos en las técnicas de diagnóstico clásicas, por ejemplo pruebas ELISA.

[0104] A continuación se describirá la invención más en detalle con ayuda de formas de realización tomadas a modo de ejemplos no limitativos.

Ejemplos:

[0105] Todas las construcciones se realizan usando las técnicas estándar de la biología molecular (clonación, digestión por enzimas de restricción, síntesis de un ADN complementario monocatenario, reacción en cadena de la polimerasa, elongación de un oligonucleótido por una ADN polimerasa...) descritas por Sambrook J. y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. Nueva York. 1989). Todos los fragmentos de restricción usados para la presente invención, así como los diversos fragmentos de reacción en cadena de la polimerasa (= RCP o PCR), se aíslan y se purifican usando el kit "GeneClean®" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

Ejemplo 1: Cultivo del virus de la fiebre del Nilo

[0106] Para su amplificación, se cultivan virus de la fiebre del Nilo NY99 (Lanciotti R. S. y col., Science, 1999, 286, 2333-7) en células VERO (células renales de mono, accesibles en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número CCL-81).

[0107] Las células VERO se ponen en cultivo en un matraz de 25 cm² con medio Eagle-MEM suplementado con el 1% de extractos de levadura y con el 10% de suero de ternera que contiene aproximadamente 100.000 células por ml. Las células se cultivan a +37°C, en atmósfera con CO₂ al 5%.

5 **[0108]** Después de 3 días la capa celular llega a la confluencia. El medio de cultivo se sustituye a continuación por medio Eagle-MEM suplementado con el 1% de extractos de levadura y el 0,1% de albúmina de suero de bovino y se añade el virus de la fiebre del Nilo a razón de 5 pfu/célula.

10 **[0109]** Cuando se ha completado el efecto citopatógeno (CPE) (generalmente 48-72 horas después del inicio de la puesta en cultivo), las suspensiones víricas son recogidas, y después aclaradas por centrifugación y congeladas a -70°C. Generalmente se necesitan 3 a 4 pasos sucesivos para la producción de un lote vírico. El lote vírico se almacena a -70°C.

Ejemplo 2: Extracción del ARN vírico del virus de la fiebre del Nilo

15 **[0110]** El ARN vírico contenido en 100 ml de suspensión vírica de la cepa de virus de la fiebre del Nilo NY99 se extrae después de descongelación con las soluciones del kit «High Pure™ Viral RNA Kit» Cat # 1 858 882, Roche Molecular Biochemicals), según las instrucciones del proveedor para las etapas de extracción. El depósito de ARN obtenido al final de la extracción se vuelve a poner en suspensión con 1 a 2 ml de agua destilada estéril sin ARNasa.

Ejemplo 3: Construcción del plásmido pFC101

25 **[0111]** El ADN complementario (ADNc) del virus de la fiebre del Nilo NY99 se sintetiza con el kit «Gene Amp RNA PCR Kit» (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, EE.UU.) usando las condiciones indicadas por el proveedor

[0112] Se realiza una reacción de transcripción inversa, seguida de una reacción de amplificación en cadena (reacción «TI-RCP» o «RT-PCR») con 50 µl de la suspensión de ARN vírico del virus de la fiebre del Nilo NY99 (ejemplo: 2) y con los oligonucleótidos siguientes:

30 FC101 (30 mer) (SEQ ID NO: 1)
5'TTTTTTGAATTCGTTACCCTCTCTAACTTC 3'

35 y FC102 (33 mer) (SEQ ID NO: 2)
5'TTTTTTCTAGATTACCTCCGACTGCGTCTTGA 3'.

40 **[0113]** Este par de oligonucleótidos permite la incorporación de un sitio de restricción EcoRI y de un sitio de restricción XbaI y de un codón de terminación en posición 3' del inserto.

[0114] La síntesis de la primera cadena de ADNc se realiza por elongación del oligonucleótido FC102, después de hibridación de este último en la matriz de ARN.

45 **[0115]** Las condiciones de síntesis de la primera cadena de ADNc son una temperatura de 42°C durante 15 min, después de 99°C durante 5 min, y finalmente de 4°C durante 5 min. Las condiciones de la reacción PCR en presencia del par de oligonucleótidos FC101 y FC102 son una temperatura de 95°C durante 2 min, después 35 ciclos (95°C durante 1 min, después 62°C durante 1 min, y 72°C durante 2 min), y finalmente 72°C durante 7 min para producir un fragmento de 302 pb.

50 **[0116]** Este fragmento es digerido por EcoRI y después por XbaI para aislar, en la electroforesis en gel de agarosa, el fragmento EcoRI-XbaI de aproximadamente 290 pb. Este fragmento se denomina fragmento A.

55 **[0117]** El plásmido de expresión eucariota pVR1020 (C. J. Luke y col. J. of Infectious Diseases. 1997. 175. 95-97), derivado del plásmido pVR1012 (figura 1 y ejemplo 7 del documento WO-A-98/03199; Hartikka J. y col., 1997, Human Gene Therapy, 7, 1205-1217), contiene la fase de codificación de la secuencia-símbol del activador del plasminógeno tisular humano (tPA).

[0118] Un plásmido pVR1020 es modificado por la digestión BamHI-BglII y la inserción de una secuencia que

contiene varios sitios de clonación (BAMHI, NotI, EcoRI, XbaI, PmlI, PstI, BglII) y resultante del emparejamiento de los oligonucleótidos siguientes:

PB326 (40 mer) (SEQ ID NO: 3)

5

5'GATCTGCAGCACGTGTCTAGAGGATATCGAATTCGCGGCC 3' y

PB329 (40 mer) (SEQ ID NO: 4)

10 5' GATCCGCGGGCGCGAATTCGATATCCTCTAGACACGTGCT 3'.

[0119] El vector así obtenido, de un tamaño de aproximadamente 5.105 pares de bases (o pb), se denomina pAB110.

15 **[0120]** El fragmento A se liga con el plásmido de expresión pAB110 digerido previamente por XbaI y EcoRI, para dar el plásmido pFC101 (5376 pb). Este plásmido contiene, bajo el control del promotor precoz del citomegalovirus humano o hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), un inserto que codifica la secuencia-señal del activador del tPA seguida de la secuencia que codifica la proteína prM.

20 **Ejemplo 4: Construcción del plásmido pFC102**

[0121] El ADN complementario (ADNc) del virus de la fiebre del Nilo NY99 se sintetiza con el kit «Gene Amp RNA PCR Kit» (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, EE.UU.) usando las condiciones indicadas por el proveedor.

25

[0122] Se realiza una reacción de transcripción inversa, seguida de una reacción de amplificación en cadena (Reacción «TI-RCP» o «RT-PCR») con 50 µl de la suspensión de ARN vírico del virus de la fiebre del Nilo NY99 (ejemplo 2) y con los oligonucleótidos siguientes:

30 FC103 (30 mer) (SEQ ID NO: 5)

5' TTTTTTGAATTCTCACTGACAGTGCAGACA 3'

y FC104 (33 mer) (SEQ ID NO: 6)

35

5' TTTTTTCTAGATTAGCTGTAAGCTGGGGCCAC 3'.

[0123] Este par de oligonucleótidos permite la incorporación de un sitio de restricción EcoRI y de un sitio de restricción XbaI y de un codón de terminación en posición 3' del inserto.

40

[0124] La síntesis de la primera cadena de ADNc se realiza por elongación del oligonucleótido FC104, después de hibridación de este último en la matriz de ARN.

[0125] Las condiciones de síntesis de la primera cadena de ADNc son una temperatura de 42°C durante 15 min, después de 99°C durante 5 min, y finalmente de 4°C durante 5 min. Las condiciones de la reacción PCR en presencia del par de oligonucleótidos FC103 y FC104 son una temperatura de 95°C durante 2 min, después 35 ciclos (95°C durante 1 min, después 62°C durante 1 min y 72°C durante 2 min), y finalmente 72°C durante 7 min para producir un fragmento de 252 pb.

50 **[0126]** Este fragmento es digerido por EcoRI y después por XbaI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento EcoRI-XbaI de aproximadamente 240 pb. Este fragmento se liga con el plásmido de expresión pAB110 (ejemplo 3) digerido previamente por XbaI y EcoRI, para dar el plásmido pFC102 (5.326 pb). Este plásmido contiene, bajo el control del promotor precoz del citomegalovirus humano o hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), un inserto que codifica la secuencia-señal del activador del tPA seguida de la
55 secuencia que codifica la proteína M.

Ejemplo 5: Construcción del plásmido pFC103

[0127] El ADN complementario (ADNc) del virus de la fiebre del Nilo NY99 se sintetiza con el kit «Gene Amp

RNA PCR Kit» (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, EE.UU.) usando las condiciones indicadas por el proveedor.

[0128] Se realiza una reacción de transcripción inversa, seguida de una reacción de amplificación en cadena (Reacción «TI-RCP» o «RT-PCR») con 50 µl de la suspensión de ARN vírico del virus de la fiebre del Nilo NY99 (ejemplo 2) y con los oligonucleótidos siguientes:

FC105 (30 mer) (SEQ ID NO: 7)

10 5' TTTTTTGAATTCTTCAACTGCCTTGAATG 3'

y FC106 (33 mer) (SEQ ID NO: 8)

5' TTTTTTCTAGATTAAGCGTGCACGTTGACGGA 3'.

15

[0129] Este par de oligonucleótidos permite la incorporación de un sitio de restricción EcoRI y de un sitio de restricción XbaI y de un codón de terminación en posición 3' del inserto.

[0130] La síntesis de la primera cadena de ADNc se realiza por elongación del oligonucleótido FC106, después de hibridación de este último en la matriz de ARN.

[0131] Las condiciones de síntesis de la primera cadena de ADNc son una temperatura de 42°C durante 15 min, después de 99°C durante 5 min, y finalmente de 4°C durante 5 min. Las condiciones de la reacción PCR en presencia del par de oligonucleótidos FC105 y FC106 son una temperatura de 95°C durante 2 min, después 35 ciclos (95°C durante 1 min, después 62°C durante 1 min y 72°C durante 2 min), y finalmente 72°C durante 7 min para producir un fragmento de 1.530 pb.

[0132] Este fragmento es digerido por EcoRI y después por XbaI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento EcoRI-XbaI de aproximadamente 1.518 pb. Este fragmento se liga con el plásmido de expresión pAB110 (ejemplo 3) digerido previamente por XbaI y EcoRI, para dar el plásmido pFC103 (6.604 pb). Este plásmido contiene, bajo el control del promotor precoz del citomegalovirus humano o hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), un inserto que codifica la secuencia-señal del activador del tPA seguida de la secuencia que codifica la proteína E.

35 Ejemplo 6: Construcción del plásmido pFC104

[0133] El ADN complementario (ADNc) del virus de la fiebre del Nilo NY99 se sintetiza con el kit «Gene Amp RNA PCR Kit» (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, EE.UU.) usando las condiciones indicadas por el proveedor.

40

[0134] Se realiza una reacción de transcripción inversa, seguida de una reacción de amplificación en cadena (Reacción «TI-RCP» o «RT-PCR») con 50 µl de la suspensión de ARN vírico del virus de la fiebre del Nilo NY99 (ejemplo 2) y con los oligonucleótidos siguientes:

45 FC101 (30 mer) (SEQ ID NO: 1)

y FC106 (33 mer) (SEQ ID NO: 8).

[0135] Este par de oligonucleótidos permite la incorporación de un sitio de restricción EcoRI y de un sitio de restricción XbaI y de un codón de terminación en posición 3' del inserto.

50

[0136] La síntesis de la primera cadena de ADNc se realiza por elongación del oligonucleótido FC106, después de hibridación de este último en la matriz de ARN.

[0137] Las condiciones de síntesis de la primera cadena de ADNc son una temperatura de 42°C durante 15 min, después de 99°C durante 5 min, y finalmente de 4°C durante 5 min. Las condiciones de la reacción PCR en presencia del par de oligonucleótidos FC101 y FC106 son una temperatura de 95°C durante 2 min, después 35 ciclos (95°C durante 1 min, después 62°C durante 1 min y 72°C durante 2 min), y finalmente 72°C durante 7 min para producir un fragmento de 2.031 pb.

[0138] Este fragmento es digerido por EcoRI y después por XbaI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento EcoRI-XbaI de aproximadamente 2.019 pb. Este fragmento se liga con el plásmido de expresión pAB110 (ejemplo 3) digerido previamente por XbaI y EcoRI, para dar el plásmido pFC104 (7.105 pb). Este plásmido contiene, bajo el control del promotor precoz del citomegalovirus humano o hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), un inserto que codifica la secuencia-señal del activador del tPA seguida de la secuencia que codifica la proteína prM-M-E.

Ejemplo 7: Construcción del plásmido pFC105

10

[0139] El ADN complementario (ADNc) del virus de la fiebre del Nilo NY99 se sintetiza con el kit «Gene Amp RNA PCR Kit» (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT.06859, EE.UU.) usando las condiciones indicadas por el proveedor.

15 **[0140]** Se realiza una reacción de transcripción inversa, seguida de una reacción de amplificación en cadena (Reacción «TI-RCP» o «RT-PCR») con 50 µl de la suspensión de ARN vírico del virus de la fiebre del Nilo NY99 (ejemplo 2) y con los oligonucleótidos siguientes:

FC107 (36 mer) (SEQ ID NO: 9)

20

5' TTTTTTGGATATCACCGGAATTGCAGTCATGATTGGC 3'

y FC106 (33 mer) (SEQ ID NO: 8).

25 **[0141]** Este par de oligonucleótidos permite la incorporación de un sitio de restricción EcoRV y de un sitio de restricción XbaI y de un codón de terminación en posición 3' del inserto.

[0142] La síntesis de la primera cadena de ADNc se realiza por elongación del oligonucleótido FC106, después de hibridación de este último en la matriz de ARN.

30

[0143] Las condiciones de síntesis de la primera cadena de ADNc son una temperatura de 42°C durante 15 min, después de 99°C durante 5 min, y finalmente de 4°C durante 5 min. Las condiciones de la reacción PCR en presencia del par de oligonucleótidos FC106 y FC107 son una temperatura de 95°C durante 2 min, después 35 ciclos (95°C durante 1 min, después 62°C durante 1 min y 72°C durante 2 min), y finalmente 72°C durante 7 min para producir un fragmento de 2.076 pb.

35

[0144] Este fragmento es digerido por EcoRV y después por XbaI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento EcoRV-XbaI de aproximadamente 2.058 pb.

40 **[0145]** Este fragmento se liga con el plásmido de expresión pVR1012, digerido previamente por XbaI y EcoRV, para dar el plásmido pFC105 (6.953 pb). Este plásmido contiene, bajo el control del promotor precoz del citomegalovirus humano o hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), un inserto que codifica la poliproteína prM-M-E.

Ejemplo 8: Construcción del plásmido pFC106

[0146] El ADN complementario (ADNc) del virus de la fiebre del Nilo NY99 se sintetiza con el kit «Gene Amp RNA PCR Kit» (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, EE.UU.) usando las condiciones indicadas por el proveedor.

50

[0147] Se realiza una reacción de transcripción inversa, seguida de una reacción de amplificación en cadena (Reacción «TI-RCP» o «RT-PCR») con 50 µl de la suspensión de ARN vírico del virus de la fiebre del Nilo NY99 (ejemplo 2) y con los oligonucleótidos siguientes:

55 FC108 (36 mer) (SEQ ID NO: 10)

5' TTTTTTGGATATCATGTATAATGCTGATATGATTGAC 3'

y FC109 (36 mer) (SEQ ID NO: 11)

5' TTTTTTCTAGATTAACGTTTTCCCGAGGCGAAGTC 3'.

[0148] Este par de oligonucleótidos permite la incorporación de un sitio de restricción EcoRV y de un sitio de restricción XbaI, de un codón ATG iniciador en posición 5' y de un codón de terminación en posición 3' del inserto.

[0149] La síntesis de la primera cadena de ADNc se realiza por elongación del oligonucleótido FC109, después de hibridación de este último en la matriz de ARN.

10 **[0150]** Las condiciones de síntesis de la primera cadena de ADNc son una temperatura de 42°C durante 15 min, después de 99°C durante 5 min, y finalmente de 4°C durante 5 min. Las condiciones de la reacción PCR en presencia del par de oligonucleótidos FC108 y FC109 son una temperatura de 95°C durante 2 min, después 35 ciclos (95°C durante 1 min, después 62°C durante 1 min y 72°C durante 2 min), y finalmente 72°C durante 7 min para producir un fragmento de 2.973 pb.

15 **[0151]** Este fragmento es digerido por EcoRV y después por XbaI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento EcoRV-XbaI de aproximadamente 2.955 pb.

20 **[0152]** Este fragmento se liga con el plásmido de expresión pVR1012, digerido previamente por XbaI y EcoRV, para dar el plásmido pFC106 (7.850 pb). Este plásmido contiene, bajo el control del promotor precoz del citomegalovirus humano o hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), un inserto que codifica la poliproteína NS2A-NS2B-NS3.

Ejemplo 9: Construcción del plásmido donador para la inserción en el sitio C5 del virus canarypox ALVAC

25 **[0153]** La figura 16 de la patente US-A-5.756.103 muestra la secuencia de un fragmento de 3.199 pb del ADN genómico del virus canarypox. El análisis de esta secuencia ha revelado un marco abierto de lectura (ORF) que ha sido denominado C5L, que comienza en la posición 1.538 y termina en la posición 1.859. La construcción de un plásmido de inserción que lleva a la delección del ORF C5L y a su sustitución por un sitio de clonación múltiple
30 flanqueado por señales de detención de la transcripción y de la traducción se ha realizado tal como se describe a continuación.

[0154] Se ha realizado una reacción PCR a partir de la matriz constituida por el ADN genómico del virus canarypox y con los oligonucleótidos siguientes:

35 C5A1 (42 mer) (SEQ ID NO: 12):

5' ATCATCGAGCTCCAGCTGTAATTCATGGTCGAAAAGAAGTGC 3'
et C5B1 (73 mer) (SEQ ID NO :13) :

5'GAATTCCTCGAGCTGCAGCCCGGGTTTTTATAGCTAATTAGTCAT
TTTTTGAGAGTACCACTTCAGCTACCTC 3'

40 para aislar un fragmento PCR de 223 pb (fragmento B).

[0155] Se ha realizado una reacción PCR a partir de la matriz constituida por ADN genómico del virus canarypox y con los oligonucleótidos siguientes:

45 C5C1 (72 mer) (SEQ ID NO: 14):

5'CCCGGGCTGCAGCTCGAGGAATTCTTTTTATTGATTAAGTCA
TTATAAAGATCTAAAATGCATAATTC 3'

y C5D1 (45 mer) (SEQ ID NO: 15):

5' GATGATGGTACCGTAAACAAATATAATGAAAAGTATTCTAAACTA 3'

5 para aislar un fragmento PCR de 482 pb (fragmento C).

[0156] Los fragmentos B y C se han hibridado conjuntamente para servir de matriz a una reacción PCR realizada con los oligonucleótidos C5A1 (SEQ ID NO: 12) y C5D1 (SEQ ID NO: 15) para generar un fragmento PCR de 681 pb. Este fragmento ha sido digerido por las enzimas de restricción SacI y KpnI, para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, un fragmento SacI-KpnI de 664 pb. Se ha ligado este fragmento con el vector pBlueScript® II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU., Cat # 212205), digerido previamente por las enzimas de restricción SacI y KpnI, para dar el plásmido pC5L. La secuencia de este plásmido se ha verificado por secuenciación. Este plásmido contiene 166 pb de secuencias situadas por delante del ORF C5L («brazo flanqueante izquierdo C5»), una señal de vacuna de detención precoz de transcripción, codones de terminación en las 6 fases de lectura, un sitio de clonación múltiple que contiene los sitios de restricción SmaI, PstI, XhoI y EcoRI, y finalmente 425 pb de secuencias situadas por detrás del ORF C5L («brazo flanqueante derecho C5»).

[0157] El plásmido pMP528HRH (Perkus M. y col. J. Virol. 1989. 63. 3829-3836) se ha usado como matriz para amplificar la secuencia completa del promotor de vacuna H6 (N° de acceso GenBank M28351) con los oligonucleótidos siguientes:

JCA291 (34 mer) (SEQ ID NO: 16)

5' AAACCCGGGTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTG 3'

25 y JCA292 (43 mer) (SEQ ID NO: 17)

5' AAAAGAATTCGTCGACTACGATACAACTTAACGGATATCGCG 3'

30 para amplificar un fragmento PCR de 149 pb. Este fragmento ha sido digerido por las enzimas de restricción SmaI y EcoRI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, un fragmento de restricción SmaI-EcoRI de 138 pb. Este fragmento se ha ligado a continuación con el plásmido pC5L, digerido previamente por SmaI y EcoRI, para dar el plásmido pFC107.

35 Ejemplo 10: Construcción del virus recombinado vCP1712

[0158] Se ha realizado una reacción PCR usando el plásmido pFC105 (ejemplo 7) como matriz y los oligonucleótidos siguientes:

40 FC110 (33 mer) (SEQ ID NO: 18):

5' TTTTCGCGAACCGGAATTGCAGTCATGATTGGC 3'

y FC111 (39 mer) (SEQ ID NO: 19):

45 5' TTTTGTCGACGCGCGCCGCTTAAGCGTGACGTTACGGA 3'

para amplificar un fragmento PCR de aproximadamente 2.079 pb. Este fragmento ha sido digerido por las enzimas de restricción NruI y Sall para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, un fragmento de restricción NruI-Sall de aproximadamente 2.068 pb. Este fragmento se ha ligado a continuación con el plásmido pFC107 (ejemplo 9) digerido previamente por las enzimas de restricción NruI y Sall para dar el plásmido pFC108.

[0159] El plásmido pFC108 se ha linealizado mediante NotI, y después se ha transfectado en células primarias de embriones de pollo infectadas con el virus canarypox (cepa ALVAC) según la técnica de precipitación con fosfato de calcio descrita anteriormente (Panicali y Paoletti Proc. Nat. Acad. Sci. 1982. 79. 4927-4931; Piccini y col. In Methods in Enzymology. 1987. 153. 545-563. Eds. Wu R. and Grossman L. Academic Press). Se han seleccionado intervalos positivos sobre la base de una hibridación con una sonda radiomarcada específica de la secuencia nucleotídica de la glucoproteína de envoltura E. Estos intervalos han experimentado 4 ciclos sucesivos de selección/purificación de intervalos hasta que se haya aislado una población pura. A continuación se ha amplificado

un intervalo representativo de la recombinación *in vitro* entre el plásmido donador pFC108 y el genoma del virus canarypox ALVAC y la reserva de virus recombinado obtenido se ha designado como vCP1712.

Ejemplo 11: Construcción del virus recombinado vCP1713

5

[0160] El plásmido pFC104 (ejemplo 6) es digerido por las enzimas de restricción Sall y PmlI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, un fragmento de restricción PmlI-Sall de aproximadamente 2.213 pb. Este fragmento se liga con el plásmido pFC107 (ejemplo 9) digerido previamente por las enzimas de restricción NruI y Sall para dar el plásmido pFC109.

10

[0161] El plásmido pFC109 se ha linealizado mediante NotI, y después se ha transfectado en células primarias de embriones de pollo infectadas con el virus canarypox (cepa ALVAC) de acuerdo con la técnica del ejemplo 10. Se ha seleccionado un intervalo representativo de la recombinación *in vitro* entre el plásmido donador pFC109 y el genoma del virus canarypox ALVAC sobre la base de una hibridación con una sonda radiomarcada específica de la secuencia nucleotídica de la glucoproteína de envoltura E y a continuación se ha amplificado. La reserva de virus recombinado obtenido se ha designado como vCP1713.

15

Ejemplo 12: Construcción del virus recombinado vCP1714

[0162] El plásmido pFC103 (ejemplo 5) es digerido por las enzimas de restricción Sall y PmlI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, un fragmento de restricción PmlI-Sall de aproximadamente 1.712 pb. Este fragmento se liga con el plásmido pFC107 (ejemplo 9) digerido previamente por las enzimas de restricción NruI y Sall para dar el plásmido pFC110.

[0163] El plásmido pFC110 se ha linealizado mediante NotI, y después se ha transfectado en células primarias de embriones de pollo infectadas con el virus canarypox (cepa ALVAC) de acuerdo con la técnica del ejemplo 10. Se ha seleccionado un intervalo representativo de la recombinación *in vitro* entre el plásmido donador pFC110 y el genoma del virus canarypox ALVAC sobre la base de una hibridación con una sonda radiomarcada específica de la secuencia nucleotídica de la glucoproteína de envoltura E y a continuación se ha amplificado. La reserva de virus recombinado obtenido se ha designado como vCP1714.

30

Ejemplo 13: Construcción del virus recombinado vCP1715

[0164] El plásmido pFC102 (ejemplo 4) es digerido por las enzimas de restricción Sali y PmlI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, un fragmento de restricción PmlI-Sall de aproximadamente 434 pb. Este fragmento se liga con el plásmido pFC107 (ejemplo 9) digerido previamente por las enzimas de restricción NruI y Sall para dar el plásmido pFC111.

[0165] El plásmido pFC111 se ha linealizado mediante NotI, y después se ha transfectado en células primarias de embriones de pollo infectadas con el virus canarypox (cepa ALVAC) de acuerdo con la técnica del ejemplo 10. Se ha seleccionado un intervalo representativo de la recombinación *in vitro* entre el plásmido donador pFC111 y el genoma del virus canarypox ALVAC sobre la base de una hibridación con una sonda radiomarcada específica de la secuencia nucleotídica de la glucoproteína de membrana M y a continuación se ha amplificado. La reserva de virus recombinado obtenido se ha designado como vCP1715.

45

Ejemplo 14: Construcción del virus recombinado vCP1716

[0166] El plásmido pFC101 (ejemplo 3) es digerido por las enzimas de restricción Sall y PmlI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, un fragmento de restricción PmlI-Sall de aproximadamente 484 pb. Este fragmento se liga con el plásmido pFC107 (ejemplo 9) digerido previamente por las enzimas de restricción NruI y Sall para dar el plásmido pFC112.

[0167] El plásmido pFC112 se ha linealizado mediante NotI; y después se ha transfectado en células primarias de embriones de pollo infectadas con el virus canarypox (cepa ALVAC) de acuerdo con la técnica del ejemplo 10. Se ha seleccionado un intervalo representativo de la recombinación *in vitro* entre el plásmido donador pFC112 y el genoma del virus canarypox ALVAC sobre la base de una hibridación con una sonda radiomarcada específica de la secuencia nucleotídica de la glucoproteína de premembrana prM y a continuación se ha amplificado. La reserva de virus recombinado obtenido se ha designado como vCP1716.

55

Ejemplo 15: Construcción del plásmido donador para la inserción en el sitio C6 del virus canarypox ALVAC

[0168] La figura 4 de la patente WO-A-01/05.934 muestra la secuencia de un fragmento de 3.700 pb del ADN genómico del virus canarypox. El análisis de esta secuencia ha revelado un marco abierto de lectura (ORF) que se ha denominado C6L, que comienza en la posición 377 y termina en la posición 2.254. La construcción de un plásmido de inserción que conduce a la delección del ORF C6L y a su sustitución por un sitio de clonación múltiple flanqueado por señales de detención de transcripción y de traducción se ha realizado tal como se describe a continuación.

10 **[0169]** Se ha realizado una reacción PCR a partir de la matriz constituida por el ADN genómico del virus canarypox y con los oligonucleótidos siguientes:

C6A1 (42 mer) (SEQ ID NO: 20):

15 5' ATCATCGAGCTCGCGGCCCTATCAAAAGTCTTAATGAGTT 3'

y C6B1 (73 mer) (SEQ ID NO: 21):

5' GAATTCCTCGAGCTGCAGCCCGGGTTTTTATAGCTAATTAGTCAT TTTTCGTAAGTAAGTATTTTTATTTAA 3'

20

para aislar un fragmento PCR de 432 pb (fragmento D).

[0170] Se ha realizado una reacción PCR a partir de la matriz constituida por el ADN genómico del virus canarypox y con los oligonucleótidos siguientes:

25

C6C1 (72 mer) (SEQ ID NO: 22):

5'CCCGGGCTGCAGCTCGAGGAATTCTTTTTATTGATTAAGTAACTAGTCAAATGAGTATATATAATTGAAAAAGTAA 3'

30 y C6D1 (45 mer) (SEQ ID NO: 23):

5' GATGATGGTACCTTCATAAATACAAGTTTGATTAACTTAAGTTG 3' para aislar un fragmento PCR de 1.210 pb (fragmento E).

35 **[0171]** Se han hibridado los fragmentos D y E conjuntamente para servir de matriz a una reacción PCR realizada con los oligonucleótidos C6A1 (SEQ ID NO: 20) y C6D1 (SEQ ID NO: 23) para generar un fragmento PCR de 1.630 pb. Este fragmento ha sido digerido por las enzimas de restricción SacI y KpnI, para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, un fragmento SacI-KpnI de 1.613 pb. Se ha ligado este fragmento con el vector pBlueScript® II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU., Cat # 212205), digerido previamente por las enzimas de restricción SacI y KpnI, para dar el plásmido pC6L. La secuencia de este plásmido se ha verificado por secuenciación. Este plásmido contiene 370 pb de secuencias situadas por delante del ORF C6L («brazo flanqueante izquierdo C6»), una señal de vacuna de detención precoz de transcripción, codones de terminación en las 6 fases de lectura, un sitio de clonación múltiple que contiene los sitios de restricción SmaI, PstI, XhoI y EcoRI, y finalmente 1.156 pb de secuencias situadas por detrás del ORF C6L («brazo flanqueante derecho C6»).

45

[0172] El plásmido pMPIVC (Schmitt J. F. C. y col., J. Virol., 1988, 62, 1889-1897; Saiki R. K. y col., Science, 1988, 239, 487-491) se ha usado como matriz para amplificar la secuencia completa del promotor de vacuna I3L con los oligonucleótidos siguientes:

50 FC112 (33 mer) (SEQ ID NO: 24):

5' AAACCCGGGCGGTGGTTTTCGATTCCGAAATCT 3'

y FC113 (43 mer) (SEQ ID NO: 25):

55

5' AAAAGAATTCGGATCCGATTAAACCTAAATAATTGTACTTTGT 3'

para amplificar un fragmento PCR de 151 pb. Este fragmento ha sido digerido por las enzimas de restricción SmaI y EcoRI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, un fragmento de restricción SmaI-EcoRI de

aproximadamente 136 pb. Este fragmento se ha ligado a continuación con el plásmido pC6L, digerido previamente por SmaI y EcoRI, para dar el plásmido pFC113.

Ejemplo 16: Construcción de los virus recombinados vCP1717 y vCP1718

5

[0173] Se ha realizado una reacción PCR usando el plásmido pFC106 (ejemplo 8) como matriz y los oligonucleótidos siguientes:

FC114 (33 mer) (SEQ ID NO: 26):

10

5'TTTCACGTGATGTATAATGCTGATATGATTGAC 3'

y FC115 (42 mer) (SEQ ID NO: 27):

15

5'TTTTGGATCCGCGGCCGCTTAACGTTTTCCCGAGGCGAAGTC 3'

para amplificar un fragmento PCR de aproximadamente 2.973 pb. Este fragmento ha sido digerido con las enzimas de restricción PmlI y BamHI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento de restricción PmlI-BamHI de aproximadamente 2.958 pb (fragmento F). El plásmido pFC113 (ejemplo 15) ha sido digerido por las enzimas de restricción PmlI y BamHI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento de restricción PmlI-BamHI de aproximadamente 4.500 pb (fragmento G). A continuación se han ligado conjuntamente los fragmentos F y G para dar el plásmido pFC114.

[0174] El plásmido pFC114 se ha linealizado mediante NotI, y después se ha transfectado en células primarias de embriones de pollo infectadas con el virus canarypox vCP1713 (ejemplo 11) según la técnica de precipitación con fosfato de calcio descrita anteriormente (Panicali y Paoletti Proc. Nat. Acad. Sci. 1982. 79. 4927-4931; Piccini y col. In Methods in Enzymology. 1987. 153. 545-563. Eds. Wu R. and Grossman L. Academic Press). Se han seleccionado intervalos positivos sobre la base de una hibridación con una sonda radiomarcada específica de la secuencia nucleotídica de la glucoproteína de envoltura E. Estos intervalos han experimentado 4 ciclos sucesivos de selección/purificación de intervalos hasta que se haya aislado una población pura. A continuación se ha amplificado un intervalo representativo de la recombinación *in vitro* entre el plásmido donador pFC114 y el genoma del virus canarypox ALVAC y la reserva de virus recombinado obtenido se ha designado como vCP1717.

[0175] El plásmido pFC114 linealizado por NotI ha servido igualmente para transfectar células primarias de embriones de pollo infectadas con el virus canarypox vCP1712 (ejemplo 10) según la técnica descrita anteriormente. La reserva de virus recombinado así obtenido se ha designado como vCP1718.

Ejemplo 17: Construcción del plásmido pFC115

[0176] El ADN complementario (ADNc) del virus de la fiebre del Nilo NY99 se sintetiza con el kit «Gene Amp RNA PCR Kit» (Cat # N 808 0017, Perkin-Elmer, Norwalk, CT 06859, EE.UU.) usando las condiciones indicadas por el proveedor.

[0177] Se realiza una reacción de transcripción inversa, seguida de una reacción de amplificación en cadena (Reacción «TI-RCP» o «RT-PCR») con 50µl de la suspensión de ARN vírico del virus de la fiebre del Nilo NY99 (ejemplo 2) y con los oligonucleótidos siguientes:

FC116 (39 mer) (SEQ ID NO: 28)

50

5' TTTTTTGATATCATGACCGGAATTGCAGTCATGATTGGC 3'

y FC106 (33 mer) (SEQ ID NO: 8).

[0178] Este par de oligonucleótidos permite la incorporación de un sitio de restricción EcoRV y de un sitio de restricción XbaI, de un codón iniciador en posición 5' y de un codón de terminación en posición 3' del inserto.

[0179] La síntesis de la primera cadena de ADNc se realiza por elongación del oligonucleótido FC106, después de hibridación de este último en la matriz de ARN.

[0180] Las condiciones de síntesis de la primera cadena de ADNc son una temperatura de 42°C durante 15 min, después de 99°C durante 5 min, y finalmente de 4°C durante 5 min. Las condiciones de la reacción PCR en presencia del par de oligonucleótidos FC106 y FC116 son una temperatura de 95°C durante 2 min, después 35 ciclos (95°C durante 1 min, después 62°C durante 1 min y 72°C durante 2 min), y finalmente 72°C durante 7 min para producir un fragmento de 2.079 pb.

[0181] Este fragmento es digerido por EcoRV y después por XbaI para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento EcoRV-XbaI de aproximadamente 2.061 pb.

10 **[0182]** Este fragmento se liga con el plásmido de expresión pVR1012, digerido previamente por XbaI y EcoRV, para dar el plásmido pFC115 (6.956 pb). Este plásmido contiene, bajo el control del promotor precoz del citomegalovirus humano o hCMV-IE (human Cytomegalovirus Immediate Early), un inserto que codifica la poliproteína prM-M-E.

15 **Ejemplo 18: Construcción de los virus recombinados vCP2017**

[0183] Se ha realizado una reacción PCR usando el plásmido pFC115 (ejemplo 17) como matriz y los oligonucleótidos siguientes:

20 FC117 (36 mer) (SEQ ID NO: 29):

5' TTTTCGCGAATGACCGGAATTGCAGTCATGATTGGC 3'

y FC111 (39 mer) (SEQ ID NO: 19)

25

para amplificar un fragmento PCR de aproximadamente 2.082 pb. Este fragmento ha sido digerido por las enzimas de restricción NruI y Sall para aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, un fragmento de restricción NruI-Sall de aproximadamente 2.071 pb. Este fragmento se ha ligado a continuación con el plásmido pFC107 (ejemplo 9) digerido previamente por las enzimas de restricción NruI y Sall para dar el plásmido pFC116.

30

[0184] El plásmido pFC116 se ha linealizado mediante NotI, y después se ha transfectado en células primarias de embriones de pollo infectadas con el virus canarypox (cepa ALVAC) de acuerdo con la técnica del ejemplo 10. Se ha seleccionado un intervalo representativo de la recombinación *in vitro* entre el plásmido donador pFC116 y el genoma del virus canarypox ALVAC sobre la base de una hibridación con una sonda radiomarcada específica de la secuencia nucleotídica de la glucoproteína de envoltura E y a continuación se ha amplificado. La reserva de virus recombinado obtenido se ha designado como vCP2017.

35

Ejemplo 19: Producción de vacunas recombinadas

40 **[0185]** Para la preparación de vacunas de equinos, al virus recombinado canarypox vCP1712 (ejemplo 10) se le añade como adyuvante soluciones de carbómero, en concreto Carbopol™ 974P fabricado por BF Goodrich, Ohio, EE.UU. (peso molecular de aproximadamente 3.000.000).

[0186] Se prepara inicialmente una solución de reserva al 1,5% de Carbopol™ 974P en agua destilada que contiene 1 g/l de cloruro de sodio. A continuación se usa esta solución de reserva para la elaboración de una solución a 4 mg/ml de Carbopol™ 974P en agua fisiológica. Se mezcla la solución de reserva con el volumen adecuado de agua fisiológica, bien en una etapa única o bien en varias etapas sucesivas, se ajusta el valor del pH en cada etapa con una solución de hidróxido de sodio 1 N (o aún más concentrada) con el fin de obtener un valor final de pH de 7,3-7,4.

50

[0187] La solución de Carbopol™ 974P lista para su empleo así obtenida se usa para retomar los virus recombinados liofilizados o para diluir soluciones de reserva concentradas de virus recombinados. Por ejemplo, para obtener una suspensión vírica que contiene 10⁸ pfu por dosis de 1 ml, se diluye una solución viral de reserva de manera que se obtenga una valoración de 10^{8.3} pfu/ml, y después se diluye en partes iguales con dicha solución de Carbopol™ 974P preparada para su empleo a 4 mg/ml.

55

[0188] Las vacunas recombinadas pueden producirse igualmente con virus recombinados canarypox vCP1713 (ejemplo 11) o vCP1717 (ejemplo 16) o vCP1718 (ejemplo 16) o vCP2017 (ejemplo 18) o una mezcla de los tres virus canarypox vCP1714 (ejemplo 12), vCP1715 (ejemplo 13) y vCP1716 (ejemplo 14) según la técnica

descrita anteriormente.

Ejemplo 20: Producción de vacunas de ADN para los equinos

- 5 **[0189]** Una solución de ADN que contiene el plásmido pFC104 (ejemplo 6) se concentra por precipitación de etanol tal como se describe en Sambrook y col. (1989). Se recoge el depósito de ADN mediante una solución de NaCl al 0,9% de forma que se obtiene una concentración de 1 mg/ml. Se prepara una solución de DMRIE-DOPE a 0,75 mM por recuperación de un liofilizado de DMRIE-DOPE por un volumen adaptado de H₂O estéril.
- 10 **[0190]** La formación de los complejos ADN plásmido-lípido se realiza por dilución en partes iguales de la solución de 0,75 mM de DMRIE-DOPE (1:1) por la solución de ADN de 1 mg/ml en NaCl al 0,9%. Se introduce la solución de ADN progresivamente con ayuda de una aguja estéril 26G a lo largo de la pared del matraz que contiene la solución de lípido catiónico de forma que se evite la formación de espuma. Se procede a una agitación suave desde que se mezclan las dos soluciones. Se obtiene finalmente una composición que comprende 0,375 mM de
- 15 DMRIE-DOPE y 500 µg/ml de plásmido.

[0191] Es deseable que el conjunto de las soluciones usadas estén a temperatura ambiente para el conjunto de las operaciones descritas anteriormente. Se deja que tenga lugar la formación de complejo ADN/DMRIE-DOPE a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de proceder a la inmunización de los animales.

20

[0192] Las vacunas de ADN pueden producirse igualmente con soluciones de ADN que contienen los plásmidos pFC104 (ejemplo 6) y pFC106 (ejemplo 8), o que contienen los plásmidos pFC105 (ejemplo 7) y pFC106, los plásmidos pFC115 (ejemplo 17) y pFC106, o que contienen los plásmidos pFC101, pFC102 y pFC103 (ejemplos 3 a 5), o que contienen el plásmido pFC105 o pFC115 según la técnica descrita en el presente ejemplo.

25

Ejemplo 21: Pruebas de expresión *in vitro*

[0193] La expresión de las proteínas WN se comprueba para cada construcción mediante los procedimientos clásicos de inmunofluorescencia indirecta y de transferencia Western.

30

[0194] Estas pruebas se efectúan en placas de 96 pocillos que contienen las células CHO cultivadas en monocapas y transfectadas por plásmidos o que contienen las células CEF cultivadas en monocapas e infectadas por virus recombinados.

35

[0195] Las proteínas WN son detectadas mediante el uso de sueros de caballos o de pollos infectados y de antisueros marcados.

[0196] Se compara el tamaño de los fragmentos obtenidos después de migración en gel de agarosa con los esperados.

40

Ejemplo 22: Eficacia en animales

[0197] Las vacunas recombinadas y las vacunas de plásmidos se inyectan en dos tomas con aproximadamente dos semanas de intervalo en pollos EOPS, de aproximadamente 7 días de vida, no vacunados, por vía intramuscular en un volumen de aproximadamente 0,1 ml. En el estudio se incorpora un grupo testigo no vacunado.

45

[0198] Se somete a prueba a los pollos mediante la administración subcutánea en el cuello de 10³⁻⁴TCID₅₀ de virus WN patógeno.

50

[0199] Por una parte se observa la viremia, así como la respuesta de anticuerpos y la mortalidad. Se realizan autopsias para observar las lesiones.

Ejemplo 23: Valoración de los anticuerpos neutralizadores anti-WNV

55

[0200] Se realizan series de dilución para cada suero con una razón de 3 en medio DMEM con adición del 10% de suero de ternera fetal en placas de 96 pocillos de tipo cultivo celular. A 0,05 ml del suero diluido se le añaden 0,05 ml de medio de cultivo que contiene aproximadamente 100 DICC₅₀/ml de WNV. Se incuba esta mezcla durante 2 horas a 37°C en horno en una atmósfera que contiene CO₂ al 5%.

[0201] A continuación se añaden a cada mezcla 0,15 ml de una suspensión de células VERO que contiene aproximadamente 100.000 células por ml. Se observa el efecto citopático (ECP) por microscopia de contraste de fase después de 4-5 días de cultivo a 37°C en una atmósfera que contiene CO₂ al 5%. Las valoraciones de neutralización de cada suero se calculan de acuerdo con el procedimiento de Kärber. Las valoraciones se indican en forma de la dilución más importante que inhibe el efecto citopático para el 50% de los pocillos. Las valoraciones se expresan en log₁₀ VN₅₀. Cada suero se valora al menos dos veces, preferentemente cuatro veces.

Ejemplo 24: Ensayo en caballos de vCP2017

10

[0202] Se han inyectado vacunas recombinadas que contienen ACP2017 (ejemplo 18) formuladas extemporáneamente con 1 ml del adyuvante Carbopol® 974P (4 mg/ml) en dos tomas con 35 días de intervalo en caballos, de más de 3 meses de vida, no vacunados, por vía intramuscular en un volumen de aproximadamente 1 ml. Se ha vacunado a tres grupos de animales, con dosis de 10^{5,8} DICC₅₀ (es decir, 10^{5,64} pfu) para el grupo 1, 10^{6,8} DICC₅₀ (es decir, 10^{6,64} pfu) para el grupo 2 y 10^{7,8} DICC₅₀ (es decir, 10^{7,64} pfu) para el grupo 3. En el estudio se ha incorporado un grupo testigo no vacunado.

15

[0203] Se ha observado la serología. Las valoraciones de anticuerpos de neutralización se han establecido y expresado en log₁₀ VN₅₀ tal como se indica en el ejemplo 23.

20

Grupo	Valoraciones en el día 0	Valoraciones en el día 35	Valoraciones en el día 49
1	<0,6	<0,78	2,66
2	<0,6	1,14	2,58
3	<0,6	1,16	2,26
testigo	<0,6	<0,6	<0,6

LISTADO DE SECUENCIAS

[0204]

25

<110> Merial

<120> Vacuna contra el virus de la fiebre del Nilo.

<130> XXXX

30 <160> 29

<170> Patent In versión 3.0

<210> 1

35

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

40

<223> oligonucleótido

<400> 1

ttttttgaat tggttaccct ctctaacttc
30

45

<210> 2

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

50

<220>

<223> oligonucleótidos

<400> 2

tttttttcta gattacctcc gactgcgtct tga
33

5

<210> 3
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 3

15

gactcgcagc acgtgtctag aggatatcga attcgcggcc
40

<210> 4
<211> 40

20

<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

25

<400> 4

gattcgcggc cgcgaattcg atatcctcta gacacgtgct
40

30

<210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

35

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 5

ttttttgaat tctcaactgac agtgcagaca
30

40

<210> 6
<211> 33
<212> ADN

45

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

50

<400> 6

tttttttcta gattagctgt aagctggggc cac
33

<210> 7
5 <211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> oligonucleótido

<400> 7

ttttttgaat tcttcaactg ccttggaatg
30

15 <210> 8
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 8

25

tttttttcta gattaagcgt gcacgttcac gga
33

<210> 9
<211> 36
30 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
35 <223> oligonucleótido

<400> 9

ttttttgata tcaccggaat tgcagtcatg attggc
36

40 <210> 10
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 10

ttttttgata tcatgtataa tgctgatatg attgac
36

<210> 11
<211> 36
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido
10
<400> 11

tttttttcta gattaacggtt ttcccgagggc gaagtc
36

15 <210> 12
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 12

atcatcgagc tccagctgta attcatgggc gaaaagaagt gc
42

25

<210> 13
<211> 73
<212> ADN
30 <213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido
35 <400> 13

gaattcctcg agctgcagcc cgggttttta tagctaatta gtcatttttt gagagtacca
60

cttcagctac ctc
73

<210> 14
40 <211> 72
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
45 <223> oligonucleótido

<400> 14

cccggggtgc agctcgagga attcttttta ttgattaact agtcattata aagatctaaa
60

atgcataatt tc
72

5 <210> 15
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 15

gatgatggta ccgtaaacia atataatgaa aagtattcta aacta
45

15

<210> 16
<211> 34
<212> ADN
20 <213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

25 <400> 16

aaaccgggt tctttattct atacttaaaa agtg
34

<210> 17
30 <211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
35 <223> oligonucleótido

<400> 17

aaaagaattc gtcgactacg atacaaactt aacggatata gcg
43

40

<210> 18
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 18

ttttcgcgaa ccggaattgc agtcatgatt ggc
33

5

<210> 19
<211> 39
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 19

15

ttttgtcgac gcggccgctt aagcgtgcac gtccaagga
39

<210> 20

<211> 42

20

<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

25

<400> 20

atcatcgagc tcgcccgcgc ctatcaaaag tcttaatgag tt
42

30

<210> 21
<211> 73
<212> ADN
<213> Artificial

35

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 21

gaattcctcg agctgcagcc cgggttttta tagctaatta gtcatttttt cgtaagtaag
60

tatttttatt taa

73

40

<210> 22
<211> 72
<212> ADN
<213> Artificial

45

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 22

cccgggctgc agctcgagga attcttttta ttgattaact agtcaaata gaatatataa
60

ttgaaaaagt aa

5 72

<210> 23

<211> 45

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

15 <400> 23

gatgatgga ccttcataaa tacaagtttg attaaactta agttg
45

<210> 24

20 <211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> oligonucleótido

<400> 24

aaaccgggc ggtggtttgc gattccgaaa tct
33

30

<210> 25

<211> 43

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 25

40

aaaagaattc ggatccgatt aaacctaat aattgtactt tgt
43

<210> 26

<211> 33

45 <212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 26
5

tttcacgtga tgtataatgc tgatatgatt gac
33

<210> 27
<211> 42
10 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido
15
<400> 27

ttttggatcc gggccgctt aacgttttcc cgaggcgaag tc
42

20 <210> 28
<211> 39
<212> ADN
<213> nucleótido artificial

25 <400> 28

ttttttgata tcatgaccgg aattgcagtc atgattggc
39

<210> 29
30 <211> 36
<212> ADN
<213> nucleótido artificial

<400> 29
35

ttttcgcgaa tgaccggaat tgcagtcatg attggc
36

REIVINDICACIONES

1. Composición inmunógena para su uso en la protección de los equinos contra el virus de la fiebre del Nilo (WN) o vacuna para su uso en la protección de los equinos contra el virus de la fiebre del Nilo (WN), que
5 comprende uno o varios virus recombinados avipox y que expresa las proteínas prM, M y E del virus WN, comprendiendo los virus recombinados uno o varios polinucleótidos que codifican una o varias proteínas prM, M y E, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
2. Composición inmunógena o vacuna para su uso según la reivindicación 1, **caracterizada porque**
10 comprende un virus recombinado avipox que expresa las tres proteínas prM, M y E.
3. Composición inmunógena o vacuna para su uso según la reivindicación 1, **caracterizada porque**
incluye un virus recombinado avipox que comprende un polinucleótido que forma una fase de lectura que codifica prM-M-E.
15
4. Composición inmunógena o vacuna según la reivindicación 1, 2 ó 3 para su uso según la
reivindicación 1, **caracterizada porque** el virus recombinado es un canarypox.
5. Composición inmunógena o vacuna según la reivindicación 1, 2 ó 3 para su uso según la
20 reivindicación 1, **caracterizada porque** el virus recombinado es un fowlpox.
6. Composición inmunógena o vacuna según una de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso según la
reivindicación 1, **caracterizada porque** el polinucleótido codifica también un péptido de señal.
- 25 7. Composición inmunógena o vacuna según la reivindicación 6 para su uso según la reivindicación,
caracterizada porque se trata de un péptido de señal del virus WN.
8. Composición inmunógena o vacuna según la reivindicación 6 para su uso según la reivindicación 1,
caracterizada porque se trata de un péptido de señal heterólogo.
30
9. Composición inmunógena o vacuna según la reivindicación 8 para su uso según la reivindicación 1,
caracterizada porque se trata del péptido de señal del activador tisular del plasminógeno humano.
10. Composición inmunógena o vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso
35 según la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende otro polinucleótido que codifica una proteína de otra
cepa de virus WN y/o de otro agente patógeno y/o una citocina.
11. Composición inmunógena o vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso
40 según la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende otro vector de expresión que comprende otro
polinucleótido que codifica una proteína de otra cepa de virus WN y/o de otro agente patógeno y/o una citocina.
12. Composición inmunógena o vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso
según la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende además un adyuvante.
- 45 13. Composición inmunógena o vacuna según la reivindicación 12 para su uso según la reivindicación 1,
caracterizada porque el adyuvante se elige entre (1) polímeros del ácido acrílico o metacrílico y polímeros de
anhídrido maleico y de derivado de alqueno, (2) secuencias inmunoestimulantes, (3) una emulsión de aceite en
agua, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, (5) citocinas.
- 50 14. Composición inmunógena o vacuna según la reivindicación 13 para su uso según la reivindicación 1,
caracterizada porque el adyuvante es un carbómero.
15. Composición inmunógena o vacuna según la reivindicación 10 ó 13 para su uso según la
reivindicación 1, **caracterizada porque** la citocina es una citocina de equino o una citocina aviar.
55
16. Composición inmunógena o vacuna según la reivindicación 15 para su uso según la reivindicación 1,
caracterizada porque la citocina se elige entre interleucina 18, interleucina 12, interleucina 15, MIP-1a, GM-CSF.
17. Composición inmunógena o vacuna según la reivindicación 15 para su uso según la reivindicación 1,

caracterizada porque la citocina es GM-CSF equino.

18. Composición inmunógena o vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su uso según la reivindicación 1, que forma una composición inmunógena o una vacuna multivalente, **caracterizada** 5 **porque** comprende un componente de composición inmunógena o vacuna contra otro agente patógeno.

19. Composición inmunógena o vacuna según la reivindicación 18 para su uso según la reivindicación 1, **caracterizada porque** el componente contra otro agente patógeno incluye el antígeno en forma de subunidad, en la forma de agente inactivado o en la forma de agente atenuado.

10

20. Composición inmunógena o vacuna según la reivindicación 18 ó 19 para su uso según la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende un componente de composición inmunógena o vacuna contra el virus de la rinoneumonía equina, contra el virus de la gripe equina, contra el virus de la encefalitis del este, contra el virus de la encefalitis del oeste, contra el virus de la encefalitis venezolana, contra Clostridium tetani, y mezclas de 15 los mismos.