

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 605**

51 Int. Cl.:

A61K 39/295 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2011 PCT/EP2011/066377**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO12038454**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2011 E 11760764 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2618841**

54 Título: **Vacuna para el BVDV**

30 Prioridad:

21.09.2010 US 385010 P

21.09.2010 EP 10177931

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

24.03.2017

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)

Wim de Körverstraat 35

5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

BEER, MARTIN;

REIMANN, ILONA y

KOENIG, PATRICIA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 606 605 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 para el BVDV

5 La presente invención se refiere al virus de la BVD (sigla del inglés *bovine viral diarrhea*: diarrea vírica bovina) y a sus usos, a las vacunas y las vacunas combinadas que comprenden a tal virus, a su uso como un medicamento, a su uso en el tratamiento de la diarrea vírica bovina y a los métodos para la preparación de tales vacunas.

10 El virus de la diarrea vírica bovina (BVDV: sigla del inglés *bovine viral diarrhea virus*) un miembro del género *Pestivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*, es el agente causal de la diarrea vírica bovina, una enfermedad del ganado importante en todo el mundo desde el punto de vista económico. Los pestivirus se pueden dividir respectivamente en dos biotipos distintos, los virus citopáticos (cp) y los no citopático (ncp). El virus de la fiebre porcina clásica (CSFV, sigla del inglés *classical swine fever virus*) y el virus de la enfermedad de la frontera (BDV, sigla del inglés: *border disease virus*) en ovinos, son especies víricas estrechamente relacionadas genética y
15 estructuralmente.

Las principales pérdidas económicas que provocan las infecciones por el BVDV se deben a la producción de leche reducida, el retardo del crecimiento, el desempeño reproductivo reducido y la aparición aumentada de otras enfermedades, tales como la fiebre del transporte. El desempeño reproductivo reducido está provocado, entre otros,
20 por la fertilidad reducida, el aborto y la generación de terneros infectados de forma persistente, que pueden desarrollar “enfermedad de las mucosas” fatal.

Dentro del BVDV existen dos genotipos principales que están clasificados como especies distintas dentro del género pestivirus: BVDV tipo 1 y tipo 2. El tipo 1 y el tipo 2 pueden provocar infección aguda y persistente, pero se ha descrito que los miembros del tipo 2 provocan síntomas más graves en los animales infectados de forma aguda.
25

Sin embargo, con respecto a la virulencia, en general no hay mucha diferencia entre el tipo 1 y el tipo.

30 El genoma de los pestivirus consiste en un ARN monocatenario de orientación positiva. El ARN tiene una longitud de aproximadamente 12,3 kb y contiene una fase de lectura abierta (ORF), que está flanqueada por regiones no traducidas (NTR) en ambos extremos del genoma. La ORF pestivírica se traduce a una poliproteína, que se procesa de forma cotraduccional y postraduccional a 12 proteínas maduras mediante proteasas víricas y celulares. La primera proteína de la ORF pestivírica es Npro (proteasa N terminal). Npro es una autoproteasa no estructural que se escinde así misma del resto de la poliproteína que codifica la ORF, y de este modo crea su propio extremo C y también el extremo N correcto para la primera proteína estructural en la ORF, la proteína C (núcleo). La proteína C
35 está seguida en la ORF de otras proteínas estructurales: E^{rns}, E1, E2, en ese orden. Juntas, la proteína de la cápside (C) y las tres proteínas de la envoltura glucosiladas (E^{rns}, E1, E2) conforman el virión pestivírico.

40 La proteína E2 es la proteína inmunodominante de los pestivirus, que contiene los epítomos neutralizantes principales. Por lo tanto, es la diana de la respuesta inmunitaria protectora suscitada en el huésped tras la infección natural o después de la inmunización con vacunas de virus vivo o muerto. La proteína E2 forma, junto con las proteínas E^{rns} y E1, las proteínas de superficie que protruyen en la envoltura vírica. En este contexto, el heterodímero E1-E2 es una estructura muy importante para el ensamblaje y la unión del virus.

45 Actualmente, están disponibles en forma comercial tanto las vacunas vivas atenuadas como las de virus muerto. Las vacunas vivas atenuadas tienen la ventaja de que mimetizan una infección natural y en la mayoría de los casos tienen que administrarse solo una vez. Sin embargo, pueden tener alguna virulencia, lo que en ocasiones las hace menos adecuadas para la vacunación de animales jóvenes, y en especial de animales gestantes o de animales en contacto con animales gestantes. Las vacunas de virus muerto se aceptan como seguras, pero habitualmente tienen
50 que administrarse dos veces para proporcionar un adecuado nivel de protección. Además, la eficacia en muchos casos está reducida y a menudo se restringe a cepas y tipos estrechamente relacionados del BVDV.

Actualmente, las vacunas vivas atenuadas son vacunas que se utilizan con frecuencia. Para el BVDV están disponibles vacunas vivas atenuadas para la protección de animales frente a la infección por BVDV tipo 1 y tipo 2.
55 Está claro que, si es solo por razones comerciales, tales vacunas deberían proporcionarse preferentemente como una vacuna combinada, es decir, al mismo tiempo e, incluso más conveniente, mezcladas en la misma jeringa. Sin embargo se encontró que, mientras que las vacunas vivas atenuadas del BVDV tipo 1 o 2 cuando se proporcionan como una vacunación individual proporcionan una excelente protección, una vacuna combinada proporciona un nivel significativamente más bajo de protección. Las vacunas vivas atenuadas individuales proporcionan la denominada inmunidad estéril (= sin excreción de virus y sin viremia), mientras que una vacuna combinada no proporciona inmunidad estéril. Incluso un régimen de vacunación en el que la vacunación con un tipo y la vacunación con otro tipo están separadas en el tiempo por 4 semanas, muestra este efecto desventajoso. El mecanismo para este efecto es desconocido.
60

65 El documento US2003/0194612 divulga un virus BVDV tipo I/tipo II híbrido modificado por ingeniería genética. Por lo tanto, existe una necesidad de mejorar las vacunas combinadas para el BVDV.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar vacunas para el BVDV mejoradas, en las que las desventajas de los efectos negativos mutuos de, por ejemplo, el BVDV de tipos 1 y 2, como se observan en una vacuna combinada, sean menos graves o incluso estén ausentes.

5 Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que si un virus de la BVD de un determinado primer tipo se utiliza en una vacuna combinada para la protección frente al BVDV de un rumiante susceptible, junto con un BVDV quimérico que tiene una estructura del mismo primer tipo, que sin embargo porta un gen E2 de un segundo tipo del BVDV, en lugar de un E2 del primer tipo del BVDV, los efectos mutuos negativos también son menos graves e incluso están ausentes.

10 Posteriormente, tal virus quimérico puede combinarse para fines de vacunación con un virus de la BVD que tenga la misma estructura que el virus quimérico que, sin embargo, porte la E2 original como está presente normalmente en ese virus. Simplemente como ejemplo, el BVDV quimérico puede ser un virus tipo 1 en el que el gen E2 se ha reemplazado por el gen E2 de un virus tipo 2, y puede combinarse con un virus BVDV tipo 1 con su propio (= tipo 1) gen E2.

15 La estructura del BVDV, la parte del virus que no se intercambia, para la comprensión de la invención básicamente está formada de la maquinaria de replicación: los genes no estructurales. Sin embargo, simplemente para dilucidar el concepto de estructura, en los casos en donde solo se reemplaza el gen E2, se podría considerar que la estructura vírica es el genoma vírico completo excepto por E2. En los casos en donde, por ejemplo, además del gen E2 se reemplaza otro gen estructural tal como, por ejemplo, el gen E1, se podría considerar que la estructura vírica es el genoma vírico completo excepto para E2 y E1.

20 Como se dice anteriormente, en principio es posible dejar el gen E2 original del virus quimérico en su lugar. Entonces, el virus quimérico codificaría, por ejemplo, tanto a E2 del BVDV tipo 1 como a E2 del BVDV tipo 2. Preferentemente, sin embargo, habría un reemplazo del gen E2 original por un gen E2 que codifica una E2 de un tipo distinto. Las razones es que una vacuna combinada que comprende 1) un virus de la BVD quimérico de acuerdo con la invención, con un reemplazo del gen E2 original por un gen E2 que codifica una E2 de distinto tipo, y 2) un virus de la BVD que tiene la misma estructura y su tipo de E2 original, garantizaría que (a condición de que se administren cantidades equivalentes de los virus) la cantidad producida de E2 de cada tipo sería aproximadamente comparable.

25 En el caso de un BVDV quimérico que comprende tanto el gen E2 original como un segundo gen E2 de otro tipo, podría ser menos fácil asegurar niveles de expresión equivalentes de ambos genes E2. Esto es debido a que en tal virus uno de los dos genes E2 estaría insertado en el virus fuera de su contexto natural.

30 Como se dice anteriormente, un BVDV de un determinado tipo en el que E2 de ese tipo se reemplaza por otro tipo sería, por los motivos proporcionados anteriormente, muy adecuado para su uso en una vacuna combinada. Por lo tanto, otra realización se refiere a una vacuna combinada para la protección de rumiantes susceptibles frente al BVDV, vacuna que comprende un primer BVDV que pertenece a un primer tipo y que porta un gen E2 del BVDV de ese primer tipo, y un segundo BVDV que también pertenece a un primer tipo, caracterizada sin embargo en que en este segundo BVDV el gen E2 del BVDV que pertenece al primer tipo se reemplaza por un gen E2 del BVDV que pertenece a un segundo tipo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Como se menciona anteriormente, la proteína E2 forma, junto con las proteínas E^{rn}s y E1, las proteínas de superficie que protruyen de la envoltura vírica. En este contexto, el heterodímero E1-E2 es una estructura muy importante para el ensamblaje y unión del virus. Por lo tanto, una forma preferente de una vacuna combinada se refiere a una vacuna combinada de acuerdo con la invención en la que, además, en el segundo BVDV el gen E1 del BVDV que pertenece a dicho primer tipo se reemplaza por un gen E1 del BVDV que pertenece a un segundo tipo. En principio, este sistema puede utilizarse para todos los pestivirus relacionados, también para los atípicos como el grupo de los virus HoBi, que ahora también se denomina como el futuro tipo BVDV-3.

40 Sin embargo, el BVDV tipo 1 y tipo 2 son los tipos comunes que provocan enfermedad. Por lo tanto, preferentemente, la estructura del virus pertenece al tipo de tipo 1 y el gen E2 pertenece al tipo de tipo 2 o viceversa. Por lo tanto, una forma más preferente de esta realización se refiere a una vacuna combinada de acuerdo con la invención, en la que la estructura de los primer y segundo virus de la BVD pertenece al tipo 1 y el gen E2 del BVDV del segundo virus de la BVD pertenece al tipo 2.

45 Una forma igualmente más preferente de esta realización se refiere a una vacuna combinada de acuerdo con la invención, en la que la estructura del primer y segundo virus de la BVD pertenece al tipo 2 y el gen E2 del BVDV del segundo virus de la BVD pertenece al tipo 1.

50 El primer BVDV, el descrito anteriormente como "que pertenece a un primer tipo y porta un gen E2 del BVDV de ese primer tipo", habitualmente sería un virus de la BVD convencional tipo 1 o 2, sin alteraciones en E2. Este primer BVDV preferentemente sería un virus vivo atenuado.

65 El segundo BVDV, descrito anteriormente como "que también pertenece a un primer tipo, caracterizado sin embargo en que en este segundo BVDV el gen E2 del BVDV que pertenece al primer tipo está reemplazado por un gen E2

del BVDV que pertenece a un segundo tipo", habitualmente sería un virus tipo 1 o 2, que ahora porta respectivamente, sin embargo, un gen E2 del BVDV de un tipo 2 o 1. Además, este segundo BVDV preferentemente sería un virus vivo atenuado.

- 5 Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Simplemente como un ejemplo, tal vehículo puede ser agua estéril o una solución tamponadora tal como PBS.

10 Simplemente por razones de facilidad para la producción de una vacuna, sería práctico si tanto el primero como el segundo BVDV tuvieran una estructura idéntica. Como ya se indicó anteriormente, utilizando una y la misma estructura para ambos virus, se podría simplemente añadir la misma cantidad de ambos virus, que tienen una eficacia de replicación y propiedades para la vacuna combinada elevadamente comparables y, haciéndolo así, asumir con seguridad que ambos virus tienen el mismo nivel de atenuación y de capacidad de replicación, que se infectarían con cada uno de los virus aproximadamente la misma cantidad de células y que tanto la proteína E2 tipo 1 como la proteína E2 tipo 2 se expresarían en aproximadamente la misma cantidad de proteína, y que replican una cantidad comparable de moléculas de ARN *in vitro* e *in vivo*.

15 Por lo tanto, una forma preferente de esta realización se refiere a una vacuna combinada de acuerdo con la invención en la que el primer BVDV y el segundo BVDV tienen la misma estructura.

20 Como se menciona anteriormente, las cepas del BVDV para su uso en una vacuna deben ser atenuadas. Se han descrito varias de tales cepas para la vacuna del BVDV atenuada y están disponibles en forma comercial varias cepas de vacuna del BVDV atenuadas. Los tipos de vacuna más prometedores comprenden una delección en el gen N^{pro} y/o en el gen E^{ms}, y son de un biotipo citopático. Las vacunas para los pestivirus a base de tales delecciones se han descrito, entre otros, en la Solicitud de Patente PCT WO 99/64604, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos US 2004/0146854, en la Solicitud de Patente Europea EP 1104676, en la Solicitud de Patente Europea EP 1013757, en la Solicitud de Patente Europea EP 1440149, en la Patente Europea EP 1751276 y por Mayer, D., *et al.*, Vaccine 22: 317-328 (2004).

25 Por lo tanto, una forma más preferente de esta realización se refiere a una vacuna combinada de acuerdo con la invención en la que el primer BVDV y/o dicho segundo BVDV comprende una delección en el gen N^{pro} y/o en el gen E^{ms}.

30 El BVDV es solo uno de varios agentes que provocan enfermedades en los rumiantes. En la práctica, los rumiantes están vacunados frente a varios virus o microorganismos patógenos para los rumiantes. Por lo tanto, es altamente atractivo, tanto por razones prácticas como económicas, combinar la vacuna combinada de acuerdo con la invención con un antígeno adicional de un virus o microorganismo patógenos para los rumiantes, un anticuerpo frente a dicho antígeno o información genética que codifica un polipéptido inmunogénico de dicho virus o microorganismo.

35 Por lo tanto, una forma incluso más preferente de esta realización se refiere a una vacuna combinada de acuerdo con la invención, en la que la vacuna comprende un antígeno adicional de un virus o microorganismo patógenos para rumiantes, un anticuerpo frente a dicho antígeno o información genética que codifica un polipéptido inmunogénico de dicho virus o microorganismo.

40 Los virus patógenos y microorganismos patógenos más habituales para los rumiantes son el rotavirus bovino, el herpesvirus bovino, el virus de parainfluenza tipo 3, el paramyxovirus bovino, el virus de la lengua azul, el virus de la fiebre aftosa, *Pasteurella haemolytica* y el virus respiratorio sincitial bovino.

45 Por lo tanto, una forma incluso aún más preferente de la invención se refiere a una vacuna combinada de acuerdo con la invención, en la que el virus o microorganismo patógenos para los rumiantes se selecciona del grupo del rotavirus bovino, herpesvirus bovino, virus de parainfluenza tipo 3, paramyxovirus bovino, virus de la lengua azul, virus de la fiebre aftosa, *Pasteurella haemolytica* y virus respiratorio sincitial bovino.

50 El antígeno adicional de un virus o un microorganismo puede ser el virus o microorganismo entero (en una forma viva atenuada o en una forma inactivada) o un polipéptido inmunogénico u otra parte inmunogénica del virus o del microorganismo tal como, por ejemplo, un (lipo)polisacárido, que tenga la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria protectora.

55 Las vacunas que comprenden virus vivos atenuados se deben almacenar a baja temperatura o tienen que estar en una forma liofilizada. Las vacunas liofilizadas se pueden mantener en condiciones de refrigeración moderada o incluso a temperatura ambiente. A menudo, la vacuna se mezcla con estabilizadores, por ejemplo para proteger de la degradación de proteínas con tendencia a la degradación, para potenciar la semivida de la vacuna o para mejorar la eficacia del liofilizado. Los estabilizadores útiles son, entre otros, SPGA, carbohidratos, por ejemplo sorbitol, manitol, trehalosa, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa, proteínas tales como albúmina o caseína, o productos de degradación de las mismas, y tampones, tales como fosfatos de metales alcalinos.

60 Por lo tanto, preferentemente, la vacuna combinada de acuerdo con la invención está en una forma liofilizada. Además, la vacuna puede suspenderse en un diluyente fisiológicamente aceptable. Tales tampones puede ser, por ejemplo, agua estéril, un tampón o similar.

65 Se sobreentiende que los diluyentes y compuestos para la emulsificación o estabilización de los virus también están contenidos en la presente invención.

Una cantidad adecuada de cada uno de los BVDV en la vacuna combinada de acuerdo con la invención, estaría entre 10^2 y 10^8 de DICT₅₀, dependiendo del nivel de atenuación del virus utilizado. La bibliografía citada anteriormente y el conocimiento en la técnica proporcionarían al experto una extensa guía para determinar la cantidad de virus necesario. En el caso en el que las cepas de vacuna utilizadas sean a base de cepas del BVDV

5 (cp) existentes, disponibles en forma comercial, que comprenden una delección atenuante, tal como una delección en el gen N^{pro} y/o en el gen E^{ns}, las instrucciones del fabricante serían suficientes para saber cuánto virus debe utilizarse.

Como regla general, para por ejemplo las cepas del BVDV (cp) que portan una mutación en el gen N^{pro} y/o E^{ns}, una cantidad de 10^5 de DICT₅₀ sería una cantidad muy adecuada de virus.

10 Las vacunas combinadas de acuerdo con la invención se pueden administrar a través de vías de administración conocidas. Tales vías comprenden, entre otras, las vías intranasal, intramuscular, intravenosa, intradérmica, oral y subcutánea.

15 Aún otra realización de la presente invención se refiere a métodos para la fabricación de una vacuna de acuerdo con la invención, en la que el método comprende la etapa de mezclar un BVDV que pertenece a un primer tipo, en el que el BVDV es un BVDV quimérico, que porta adicionalmente un gen E2 de un segundo tipo de BVDV, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para finalizar, otra realización de la presente invención se refiere a los métodos para la fabricación de una vacuna combinada de acuerdo con la invención, en el que el método comprende la etapa de mezclar un primer BVDV que pertenece a un primer tipo, un segundo BVDV que también pertenece a ese primer tipo

20 y que porta un gen E2 del BVDV del primer tipo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Leyenda de las figuras.

25 Figura 1: Representación esquemática del genoma del BVDV y de la construcción de pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}.

Figura 2: Representación esquemática del genoma del BVDV y de la construcción de pBVDV-1b_synth de longitud completa.

Figura 3: Representación esquemática del genoma del BVDV y de la construcción de las construcciones quiméricas E2/E1E2 a base de pBVDV-1b_synth.

30 Figura 4: Análisis por IF de células de bovino (KOP-R) transfectadas con un ARN transcrito *in vitro* de las construcciones de ADNc sintéticas

Figura 5: ELISA de bloqueo para NS3 del BVDV

Figura 6: Ensayo de neutralización del BVDV

Referencias

35 Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H. J. y Kümmerer, B. M. (1996). Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* 70, 8606-8613.

Geiser, M., Cebe, R., Drewello, D. y Schmitz, R. (2001). Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase. *Biotechniques* 31, 88-90, 92.

40 Wolfmeyer, A., Wolf, G., Beer, M., Strube, W., Hehnen, H.R., Schmeer, N. y Kaaden, O.R. (1997). Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch. Virol.* 142, 2049-2057.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de clones sintéticos de BVDV

1. Introducción

50 Se sintetizó un virus BVDV tipo 1b a base completamente de una construcción sintética. La secuencia es similar a la secuencia publicada del BVDV 1b cepa prototipo "CP7" y de la secuencia del plásmido pA/BVDV CP7 de longitud completa publicada (Meyers *et al.* 1996; n.º de referencia del Genbank U63479), sin embargo, se han incluido cambios y adaptaciones esenciales. Además, se construyeron dos virus recombinantes a base del clon sintético: un virus con Npro deleccionada así como un virus quimérico que expresa E2 del BVDV tipo 2 en lugar del E2 del BVDV

55 1b.

Datos para la construcción de pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}

60 Se amplificaron los plásmidos en células de *Escherichia coli* DH10B™ (Invitrogen). El ADN plasmídico se purificó utilizando el kit Qiagen Plasmid Mini o Midi. Los procedimientos de digestión con enzimas de restricción y de clonación se realizaron de acuerdo con los protocolos convencionales. La secuenciación se llevó a cabo utilizando el kit de secuenciación Big Dye® Terminator v1.1 Cycle (Applied Biosystems). Las secuencias de nucleótidos se leyeron con un secuenciador automático (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) y se analizaron utilizando el programa informático Genetics Computer Group versión 11.1 (Accelrys Inc., San Diego, USA). La mutagénesis

65 dirigida se realizó utilizando el kit QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) y PCR Phusion (Geiser

et al., 2001), respectivamente.

Los cebadores para la mutagénesis se sintetizaron en MWG-Biotech y biomers.net GmbH y se enumeran en la tabla 1.

5 Tabla 1: Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida y para la PCR Phusion

Cebador	Secuencia 5'→3' ^a	Región genómica
Mut_2009_F	ACAGGGGCGCAAGG <u>ATATCC</u> AGACTGCAAA CCC	2430-2462 ^b (sentido+)
Mut_2009_R	GGGTTTGCAGTCTGG <u>ATATC</u> CTTGCGCCCT GT	2462-2430 ^b (sentido-)
Ph 10375 F	<u>cggaagcaggaattagggtgaaaaattacc</u>	10363-10393 ^b (sentido+)
Ph_10551R	CGTCACTGTAGGTGTGTCTTAGGC	10551-10528 ^b (sentido-)
CP711973F	Gcaagaactagcccagtcacg	11973-11993 ^b (sentido+)
CP7_3C_R	<u>CTAGTGGATCCCCCGGGCTGT</u> TAAAGGTCTT CCC	11843-11824 ^c (sentido-)
Ph_E2CS_F	GCTCATAACAGGGGCGCAAGGG <u>ATTCCCTGA</u> <u>ATGCAAAGAGGG</u>	2423-2444 ^b (sentido+)
Ph E2CS R	cacctgcccatactggacacctatagctactgtctgtgac	3585-3567 ^b (sentido-)
Ph_E1CS_F	catggtttggggcatatgcagcaagtccatactgtgatgtg	1840-1859 ^b (sentido+)
^a los nucleótidos distintos de la secuencia BVDV-1 CP7 (n.º de referencia U63479) están subrayados; las secuencias de BVDV-2 CS8644 (no publicadas) están en cursiva ^b posición de nucleótidos que corresponde a la secuencia de BVDV CP7 ^c posición de nucleótidos que corresponde a pBVDV-1b_synth_ΔN ^{pro}		

10 *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* se constituyó a partir de cinco plásmidos que albergaban los fragmentos de secuencia sintética (1.fragment_pGA15, 2. fragment_pMA, 3. fragment_pMK, 4. fragment_pMA, Syn_Bsal_fragment_pMK_RQ) sintetizados todos *in vitro* por GENEART AG (Regensburg, Alemania). Utilizando los fragmentos sintéticos y sus sitios de restricción exclusivos, se generó una construcción plasmídica de longitud completa. Los procedimientos de digestiones con enzimas de restricción y de clonación se realizaron de acuerdo con protocolos convencionales. Los fragmentos de secuencia sintética se describen a continuación. La construcción del clon de ADNc infeccioso *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* se muestra en la figura 1. El emplazamiento de los sitios de restricción y de las posiciones de nucleótido que corresponden al genoma del BVDV (la cepa más similar es CP7) se indican mediante flechas.

1. fragment_pGA15 contiene los nucleótidos 1 a 3357 (sitio de *Acc65I*) que corresponden a BVDV1bΔN^{pro}. En el NTR 5' se añadió la secuencia del promotor T7 para permitir la transcripción *in vitro* así como los sitios *SnaBI* y *NheI*. Se eliminó un segundo sitio de *Acc65I*²⁰⁰⁷ mediante una mutación silenciosa de GGTACC a ATATCC.
2. fragment_pMA contiene los nucleótidos 3357 a 6228 (sitio de *BlpI*).
3. fragment_pMK contiene los nucleótidos 6288 a 7956 (sitio de *BstBI*).
4. fragment_pMA contiene los nucleótidos 7956 a 11816 (sitio de *SmaI*). Se eliminó un segundo sitio de *BstBI*⁷⁹⁶⁵ mediante una mutación silenciosa de TTCGAA a TTCGAG.

25 Syn_Bsal fragment_pMK_RQ contiene los nucleótidos 11244 a 11816 (sitio de *SmaI*) con el NTR 3' y un sitio de *SmaI* para la linealización del ADN plasmídico antes de la transcripción *in vitro*.

Para la generación de *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* se digirió con *SmaI* y se desfosforiló un plásmido soporte, y se eluyó tras la electroforesis en gel de agarosa.

30 1.Fragment_pMA se digirió con *SnaBI* y *SmaI*, y se aisló el fragmento específico del virus. Ambos fragmentos se ligaron, dando como resultado el plásmido *pAFr1*. Más tarde, el plásmido *pA_Fr1* se linealizó utilizando *Acc65I* y *BlpI* y se insertó el fragmento *Acc65I*³³⁵¹ - *BlpI*⁶²²⁸ aislado del plásmido. 2.fragment_pMA, dando como resultado el plásmido *pA_Fr1/2*. El plásmido *pMA_Fr3/4* se generó mediante ligamiento del plásmido 4.fragment_pMA digerido con *NheI* y *BstBI*⁷⁹⁵⁶ y un fragmento *BlpI*⁶⁶²⁸/*BstBI*⁷⁹⁵⁶ aislado del plásmido 3.fragment_pMK. Este plásmido se digirió posteriormente con *BlpI*⁶⁶²⁸/*SmaI*¹¹⁸¹⁶, y el fragmento *BlpI*⁶⁶²⁸/*SmaI*¹¹⁸¹⁶ resultante se ligó en el plásmido *pA_Fr1/2* *BlpI*⁶⁶²⁸/*SmaI*. Dentro del plásmido *pAFr1/2/3/4* resultante se sustituyó el fragmento *Bsal* por el fragmento *Bsal* aislado del plásmido Syn_Bsal fragment_pMK_RQ, conduciendo a la construcción de ADNc de longitud completa *pAFr1/2/3/4/5*. Para la generación de la progenie de virus infeccioso, se insertaron dos mutaciones mediante

mutagénesis dirigida, G^{2011T} y G^{9948T}, dando como resultado la construcción de ADNc de longitud completa infecciosa *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}*.

Construcción de **pBVDV-1b_synth**

El clon de ADNc de longitud completa *pBVDV-1b_synth* se construyó a base de *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* mediante la inserción de un fragmento *Acc65I*³⁷⁹³ *XhoI*²⁰⁸ del plásmido *pBVDV-1b_deltaNS* (nucleótidos 1-4597) en *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* (Figura 2). Para tal fin, el plásmido *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* se digirió con *Acc65I*³³⁵⁷ y *XhoI*²³¹, y se ligó con el fragmento *Acc65I*³⁷⁹³ *XhoI*²⁰⁸ de *pBVDV-1b_deltaNS*.

Construcción de **pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}_BVDV-2_E2**

El clon de ADNc de longitud completa de BVDV, *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}_BVDV-2_E2*, es una construcción química de BVDV-1b/BVDV-2 que se generó mediante la sustitución de la región genómica que codifica E2 del *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* (nucleótidos 2009-3130) por la región genómica que codifica E2 del BVDV-2 (aislado CS8644; Wolfmeyer *et al.*, 1997).

El clon del pestivirus químico *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}_BVDV-2_E2* se construyó mediante PCR Pushion (Figura 3a). En una primera etapa, se generó un megacebador de E2 mediante PCR utilizando los cebadores Ph-E2CS_F y Ph_E2CS_R. Como molde para la PCR, se utilizó el plásmido pGEM_E1E2_CS, que contiene la región genómica que codifica E1 y E2 del aislado BVDV-2 CS8644. En una segunda PCR, la PCR Phusion, se introdujeron las secuencias de E2-CS8644 en el plásmido de longitud completa *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* utilizando el megacebador de E2 y *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* como molde.

Construcción de **pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}_BVDV-2-E2**

El clon de ADNc de longitud completa del BVDV, *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}_BVDV-2_E1-E2* es una construcción química BVDV-1b/BVDV-2 que se generó mediante la sustitución de la región genómica que codifica E1 y E2 de *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* (nucleótidos 1424-3130) por la región genómica que codifica E1 y E2 del BVDV-2 (aislado CS8644; Wolfmeyer *et al.*, 1997).

El clon de pestivirus químico *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}_BVDV-2_E1-E2* se construyó mediante PCR Pushion (Figura 3b). En una primera etapa, se generó un megacebador de E1-E2 mediante PCR, utilizando los cebadores Ph-E1CS_F y Ph_E2CS_R. Como molde para la PCR se utilizó el plásmido pGEM_E1E2_CS. Mediante PCR Phusion se introdujeron las secuencias de E1 y E2-CS8644 en el plásmido de longitud completa *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* utilizando el megacebador de E1-E2 y *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* como molde.

Fig. 1: Representación esquemática del genoma del BVDV y de la construcción de *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}*. El genoma vírico se sintetizó en cinco fragmentos (Geneart AG), 1.fragment_pGA15, 2.fragment_pMA, 3.fragment_pMK, 4.fragment_pMA y Syn_Bsal_fragment_pMK_RQ (recuadros en azul claro). El plásmido 1.fragmento:pGA15 aloja la delección de N^{pro} (ΔN^{pro}). En el NTR 5' se añadió la secuencia del promotor T7 para permitir la transcripción *in vitro*. Para la linealización del plásmido se introdujo un sitio de restricción de *SmaI* en el NTR 3'. El emplazamiento de los sitios de restricción y de las posiciones de nucleótido que corresponden al genoma de BVDV 1bΔN^{pro} (mayor similitud con la cepa BVDV CP7) se indican mediante flechas negras cortas. La construcción de ADNc de longitud completa *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* se constituyó exclusivamente a partir de los cinco fragmentos sintetizados, como se demuestra mediante las flechas grises y los recuadros azul claro. No se utilizó ARN o ADNc de virus para la construcción. Las etapas de mutagénesis *in vitro* durante la construcción se indican mediante estrellas. Los recuadros sombreados representan la región de las proteínas estructurales del BVDV. Las líneas en los extremos izquierdo y derecho indican las regiones no traducidas. N^{pro}, autoproteasa; C, proteína de la cápside; E^{ms}, E1, E2, proteínas de la envoltura; p7, NS2 a NS5, proteínas no estructurales.

Fig. 2: Representación esquemática del genoma del BVDV y de la construcción *pBVDV-1b_synth* de longitud completa. Los recuadros sombreados representan la región de las proteínas estructurales del BVDV. Las líneas en los extremos izquierdo y derecho indican las regiones no traducidas. N^{pro}, autoproteasa; C, proteína de la cápside; E^{ms}, E1, E2, proteínas de la envoltura; p7, NS2 a NS5, proteínas no estructurales. La construcción de ADNc *pBVDV-1b_synth* de longitud completa se construyó mediante la inserción en *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* de un fragmento *Acc65I*³⁷⁹³ *XhoI*²⁰⁸ del plásmido *pBVDV-1b_deltaNS* que contiene partes de la secuencia de un fragmento del BVDV-1b (nucleótidos 1-4597) que incluye la región genómica que codifica N^{pro}.

Fig. 3: Representación esquemática del genoma del BVDV y de la construcción de las construcciones E2/E1E2 químicas a base de *pBVDV-1b_synth*. Los recuadros sombreados representan la región de las proteínas estructurales del BVDV. Las líneas en los extremos izquierdo y derecho indican regiones no traducidas. N^{pro}, autoproteasa; C, proteína de la cápside; E^{ms}, E1, E2, proteínas de la envoltura; p7, NS2 a NS5, proteínas no estructurales. Los clones del pestivirus químico *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}_BVDV-2_E2* (a) y *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}_BVDV-2_E1E2* (b) se construyeron utilizando el clon de ADNc *pBVDV-1b_synth_ΔN^{pro}* de longitud

ES 2 606 605 T3

Esquema del diseño experimental de CP7 ΔN^{pro} del experimento en animales 1

Se vacunaron o se vacunaron de forma simulada terneros sin tratamiento previo con BVDV (n= 4 por grupo) y 52 días más tarde se realizó una infección de exposición con la cepa SE55508 del BVDV tipo Ib (Wolfmeyer *et al.*, 1997). Vacunación: única aplicación de $6,7 \log_{10}$ DICT₅₀ de BVDV CP7 ΔN^{pro} i.m. (5 ml).
5 Vacunación simulada: sobrenadante de cultivo celular no infectado i.m. (5 ml).
Infección de exposición: $6,5 \log_{10}$ DICT₅₀ de BVDV SE5508 (Ib) i.n., nebulizador, 2 ml.

Resultados

- 10 Se purificaron glóbulos blancos a partir de sangre con EDTA tras la lisis alcalina de los eritrocitos. Se inocularon 100 μ l de fluido de hisopado o 3×10^6 leucocitos en células de bovino en 4 repeticiones. Tras 5-6 días de cocultivo se verificó la replicación del virus mediante prueba de inmunofluorescencia indirecta (PIFI). Se realizó un pase con ocultación adicional de los sobrenadantes (6 d \rightarrow PIFI).
- 15 En 1 de 4 terneros se detectó viremia unida a las células. El día 4 tras la vacunación pudieron reaislarse tras el primer pase en cultivo celular cantidades bajas de CP7 ΔN^{pro} .
No se registró excreción nasal de virus de vacuna.
- 20 Tras la infección de exposición, no se detectó en los animales vacunados presencia nasal del BVDV SE5508. Todos los animales vacunados estaban protegidos de forma completa frente a la viremia, y no se reaisló virus de exposición a partir de glóbulos blancos ("inmunidad estéril").
Por el contrario, todos los terneros de control presentaron excreción nasal de BVDV durante 6-8 días, así como viremia unida a células durante 6-8 días.
- 25 Tras la vacunación, todos los animales inmunizados con CP7 ΔN^{pro} presentaron una caída moderada del recuento de leucocitos, con recuperación de los valores prevacunación hasta 7 días tras la inoculación.
- Tras la infección de exposición no se observó en los terneros inmunizados una disminución significativa de glóbulos blancos. Los recuentos medios de células sanguíneas permanecieron dentro del intervalo fisiológico.
- 30 En los animales de control, se observó una marcada leucopenia con un inicio a los 3 días tras la exposición. Los recuentos de leucocitos promedio se mantuvieron bajos durante más de 2 semanas.
- En comparación con las temperaturas prevacunación, tras la vacunación se registró solo una débil subida de las temperaturas rectales.
- 35 Tras la infección de exposición, los animales inmunizados no mostraron alteración de las curvas de temperatura. Con respecto a la respuesta de temperaturas, los animales claramente estaban protegidos frente a la BVD clínica. En todos los terneros de control se produjo una moderada elevación de las temperaturas a los 3 días tras la inoculación. Después de más de una semana, las temperaturas corporales volvieron a los niveles preexposición.
- 40 Se controlaron en todos los animales los estados generales alterados, y los síntomas respiratorios o gastrointestinales típicos para BVDV.
- Durante todos los días del periodo de observación (4 semanas antes de la inmunización hasta 12 semanas después de eso), principalmente en los animales vacunados se observaron síntomas respiratorios leves variables tales como rinorrea y tos esporádica. Tras la vacunación no se presentaron reacciones clínicas adversas. En las vacunas, no se observó exacerbación de las puntuaciones prevacunación.
- 45 Tras la infección de exposición, los animales inmunizados no mostraron síntomas clínicos. En los terneros de control se registraron síntomas respiratorios leves y se redujo la ingesta de alimentos durante 1-2 días. Los animales no mostraron ni trastornos gastrointestinales ni lesiones de las mucosas.
- 50 Las respuestas serológicas de los animales se controlaron utilizando un ELISA de BVDV (de bloqueo de NS3; Figura 5) así como por un ensayo de neutralización específico de BVDV tipo I y tipo II (Figura 6). Todos los animales inoculados con CP7 ΔN^{pro} seroconvirtieron para anticuerpos específicos para NS3 de BVDV hasta 3 semanas tras la vacunación, y se analizaron mediante ELISA de BVDV Ceditest (Cedi diagnostics). Los terneros de control se mantuvieron negativos hasta 2-3 semanas tras la infección de exposición (Figura 5).
- 55 Tras la vacunación, todos los animales desarrollaron anticuerpos neutralizantes para el BVDV tipo I a títulos moderados (Figura 6). Después de la infección de exposición (e), los animales inmunizados no mostraron un refuerzo pronunciado de los títulos de anticuerpos neutralizantes. Los animales vacunados de forma simulada se evaluaron como negativos hasta 2 semanas tras la infección de exposición con la cepa SE5508 del BVDV tipo I.
- 60 Tras la vacunación también se indujeron anticuerpos neutralizantes específicos para el BVDV tipo II (cepa US980) a títulos bajos. Los títulos de anticuerpos neutralizantes eran comparables a los valores de los animales de control a las 3 semanas tras la inoculación con la cepa de campo SE5508 del BVDV tipo I.

órganos y de sangre.

Las novillas se sacrificaron aproximadamente a las 12 semanas tras la infección con el BVDV. La necropsia global no reveló ningún efecto fetopatológico. El desarrollo, el tamaño y el peso de los fetos eran poco notorio.

5 El aislamiento de virus en cultivo celular se realizó a partir de 0,3 g de material de órganos (congelados de forma instantánea, molidos con arena marina) seguido de 2 pases consecutivos de los sobrenadantes en el caso de primeros resultados negativos.

El aislamiento de virus se llevó a cabo en células KOP-R, células MDBK incompetentes para interferón y en MDBK-clon 6 susceptibles de forma elevada.

Además, se homogeneizó 1 g de material de tejido fetal, y se cultivó en células MDBK incompetentes para interferón y en células MDBK-clon 6 en matraces. Los cultivos, así como 2 pases adicionales, tiñeron de forma negativa para BVDV en los análisis de inmunofluorescencia.

Además los tejidos fetales se sometieron a análisis por RT-PCR cuantitativa tiempo real (qRT-PCR). Hasta el momento los inventores analizaron leucocitos, pulmón y riñón.

Se extrapolaron las copias de genoma para 1,0 g de material tisular, 1 ml de sangre entera o 1 ml de lavado de médula ósea.

La cepa parental NCP7 del BVDV, así como el mutante de delección N^{pro}, cruzaron la placenta y tuvieron la capacidad de establecer infección en todos los fetos. Sin embargo, no se reisoló virus NCP7ΔN^{pro} infeccioso a partir de un gran panel de órganos fetales. Además, no pudieron detectarse genomas de virus en los leucocitos sanguíneos purificados de los fetos con NCP7ΔN^{pro}. En comparación con las cargas de ARN de BVDV NCP7, el número de copias de NCP7ΔN^{pro} estaba de 5.000 veces (pulmones) a 20.000 (riñón) reducido.

Ejemplo 4

20

Comparación de las estrategias de vacunas/vacunación

1^{er} experimento con animales: experimento de vacunación-exposición

Se utilizaron v890FLΔC, cp7ΔN^{pro}; v890FLΔN^{pro} y una combinación de ambos mutantes de N^{pro} en una única aplicación para vacunar grupos de ganado (2 esquemas de vacunación distintos).

2^o experimento con animales: experimento de vacunación-exposición

Se administraron como una vacuna secuencial cp7ΔN^{pro} y v890FLΔN^{pro} (1^a descarga: cp7ΔN^{pro} / 2^a descarga: v890FLΔN^{pro})

3^{er} experimento con animales: experimento de vacunación-exposición

Se utilizó como candidato a vacuna cp7ΔN^{pro}_E2CS8644, una quimera compuesta de cp7ΔN^{pro} como estructura con la E2 de cp7 reemplazada por la región que codifica E2 de la cepa CS8644 del BVDV-2, ya sea solo o en combinación con cp7ΔN^{pro} en una única aplicación.

Cepa de exposición

35

Para los tres experimentos se utilizó un aislado de campo virulento alemán, la cepa HI916 del BVDV-2, la cual provoca signos clínicos reproducibles y claros de enfermedad, como se determinó en un experimento anterior.

Indicaciones adicionales para todas las etiquetas/leyendas de los esquemas y diagramas proporcionados a continuación (si los mutantes no están nombrados de forma explícita):

40

- BVDV-2 o 890 representa v890FL
- BVDV-1 representa cp7ΔN^{pro}
- ΔN representa ΔN^{pro}

Diseño del experimento de vacunación-exposición con cp7ΔN^{pro} / v890FLΔN^{pro} / v890FLΔC

Escala de tiempo, periodos de toma de muestras y diseño experimental del experimento animal 1

día 0	día 25	día 60	día 89
1º 890ΔC 2º 1º	890 ΔC cp7 ΔN 890 ΔN/cp7 ΔN 890 ΔN	infección de exposición HI916	infección de exposición
toma de muestras y control clínico		★ 10 días	★ 14 (resp. 16) días
5 BVDV-2ΔC	5 controls	5 BVDV-1ΔNpro	5 BVDV-2ΔNpro & BVDV-1ΔNpro
1º 1,02 x 10 ⁶ DICT50/animal DICT50/animal i.m.	no vacunados i.m.	9,28 x 10 ⁵ DICT50/animal i.m.	1,26 x 10 ⁶ DICT50/animal i.m.
Infección de exposición 2,25 x 10 ⁶ DICT50/animal i.n. (nebulizador) BVDV-2 HI916 heterólogo (evaluada como cepa de exposición eficaz y virulenta en el experimento anterior)			

Animales:

5 Se vacunaron 25 terneros sin tratamiento previo con BVDV (n= 5 por grupo) de acuerdo con el protocolo y 60 días más tarde se llevó a cabo una infección de exposición con la cepa HI916 del BVDV-2 (aislado de campo alemán, establecida como cepa de exposición en un experimento con animales anterior).

Vacunación

10 doble aplicación de BVDV v890FLΔC: 1ª descarga: $1,02 \times 10^6$ / 2ª descarga: $6,32 \times 10^5$ DICT50 (2 ml i.m.)
aplicación única de $9,28 \times 10^5$ DICT50 de BVDV cp7ΔN^{pro} (2 ml i.m.)
aplicación única de $9,28 \times 10^5$ DICT50 de BVDV v890FLΔN^{pro} (2 ml i.m.)
aplicación única de $1,26 \times 10^6$ DICT50 de BVDV cp7ΔN^{pro} y v890FLΔN^{pro} (2 ml i.m.)

Infección de exposición:

15 $2,25 \times 10^6$ DICT50 de BVDV-2 HI916 por vía intranasal - utilizando un nebulizador

Periodos de toma de muestras

- 20
- diario durante 10 días tras la vacunación (grupo de v890FLΔC: durante 8 días tras la 1ª vacunación, sin toma de muestras tras la 2ª vacunación / sin toma de muestras del grupo control)
 - todos los grupos durante 14 d tras la infección de exposición

Resultados I

25 **I.I. vacunación:**

v890FLΔC (vacunación d 0 y d 25)

30 1ª vacunación (d 0)

Signos clínicos y hemograma:

- 35
- los animales no mostraron ni reacciones adversas ni una elevación de la temperatura o signos clínicos de enfermedad.
 - no se pudo observar leucopenia.

aislamiento de virus:

- 40
- no fueron detectable mediante aislamiento de virus ni presencia de virus a través de rinorreas ni viremia de pseudoviriones → por lo tanto, no se tomó muestras del grupo después de la segunda vacunación

serología:

- 45
- el ELISA de bloqueo específico para NS3 (Prionics) aplicado desarrolló solo una elevación insignificante de los niveles de inhibición y se mantuvo negativo hasta la vacunación de refuerzo
- 50
- los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a las tres cepas analizadas (BVDV-1: SE5508 / BVDV-2: 890 y HI916) no fueron detectables tras la primera vacunación

2ª vacunación (d 25):

- 55
- no se tomaron muestras para av y hemograma

serología:

- 60
- mostró un claro refuerzo del desarrollo de anticuerpos, siendo positiva para ELISA tan pronto como 7 días tras su segunda vacunación
 - se mantuvo en niveles de títulos neutralizantes basales a no detectables hasta la infección de exposición - muy baja a no existente - incluso frente a la cepa parental BVDV-2 890

cp7ΔN^{pro} (vacunación d 25)

signos clínicos y hemograma:

- 5
- un animal mostró una pequeña elevación de la temperatura para un día (día 28)
 - alguna reacción clínica posvacunación; los animales tuvieron valores medios de puntuaciones clínicas ligeramente elevados durante 2 días (día 28 y día 35), debido a síntomas respiratorios leves
- 10
- descenso corto y monofásico en los recuentos de leucocitos (hasta el 20 % de reducción el día 29/30)
 - los recuentos de trombocitos también disminuyó de ligeramente en paralelo a los recuentos de leucocitos, aislamiento de virus:
- 15
- sin presencia de virus nasal y viremia de virus de vacuna (3 animales, 2 días) muy limitada, serología:
 - positiva en el ELISA de bloqueo de NS3 desde el día 14 p. vac.
- 20
- se encontraron títulos de anticuerpos neutralizantes en todos los grupos inmunizados tan pronto como 14 días tras la vacunación:
- 25
- BVDV-1 SE5508: los títulos más elevados entre todos los grupos
 - BVDV-2 HI916: títulos medios
 - BVDV-2 890: valores similares y tendiendo a los de HI916

v890FLΔN^{pro} (vacunación d 25)

signos clínicos y hemograma:

- 30
- un animal mostró una elevación pequeña de la temperatura durante dos días (día 31, día 32).
 - puntuaciones clínicas no elevadas
- 35
- descenso corto y monofásico en sus recuentos de leucocitos (hasta el 20 % de reducción el día 30).
 - recuentos de trombocitos también ligeramente disminuidos en paralelo a los recuentos de leucocitos, aislamiento de virus:
- 40
- se detectó virus de vacuna en la muestra de hisopado nasal procedente de un animal inmunizado en un único día (día 32, tras el pase con ocultación) - 2 animales con viremia muy limitada del virus de vacuna, 3 a 4 días
- serología:
- 45
- positiva en el ELISA de bloqueo de NS3 desde el día 14 p. vac.
 - títulos de anticuerpos neutralizantes tan pronto como 14 días después de la vacunación
- 50
- BVDV-1 SE5508: se mantuvieron basales en sus títulos
 - BVDV -2 HI916: los mayores títulos

BVDV-2 890: valores similares y tendencias como frente a H916

cp7ΔN^{pro} y v890FLΔN^{pro} (vacunación d 25)

signos clínicos y hemograma:

- 55
- sin elevación de la temperatura tras la vacunación
 - puntuaciones clínicas no elevadas
 - descenso corto y monofásico en sus recuentos de leucocitos (máx. el 28 %)
 - recuentos de trombocitos también ligeramente disminuidos en paralelo a los recuentos de leucocitos, aislamiento de virus:
- 60
- sin presencia nasal de virus y viremia del virus de vacuna muy limitada (3 animales, 1 a 2 días), serología:
 - positiva en un ELISA de bloqueo de NS3 desde el día 14 p. vac.
 - se encontraron títulos de anticuerpos neutralizantes tan pronto como 14 días tras la vacunación

BVDV-1 SE5508: los títulos más elevados
BVDV -2 HI916: títulos elevados (más bajos que el grupo de solo aplicación de BVDV-2Npro)
BVDV-2 890: valores y tendencias similares

5 **controles (no vacunados)**

- se mantuvieron seronegativos, durante el periodo de vacunación se mantuvieron basales en sus títulos

10 **I.II. infección de exposición (día 60)**

controles:

signos clínicos y hemograma:

- 15
- elevación bifásica de las temperaturas corporales: una ligera en el día 3 y una pronunciada en los días 8 y 9 p. exp. con valores de grupo medios máximos de hasta 41 °C.
 - mostraron signos típicos y claros de enfermedad clínica: elevación distinguible de las puntuaciones clínicas, llegando a un máximo en los días 8 y 10: síntomas respiratorios notables (tos y rinorrea mucopurulenta), depresión con apetito reducido, 2 animales tuvieron una diarrea acuosa durante 2 a 3 días
- 20
- desarrollaron una leucopenia severa: disminución bi- a trifásica (días 3, 7 y 13 p. exp.) en los recuentos de leucocitos, con niveles máximos de reducción del 48 % en el día 7 p. exp.
- 25
- los recuentos de trombocitos no estaban tan fuertemente afectados como se esperaba: reducción media hasta un máximo del 35 % en el día 3 p. exp. Recuentos notablemente aumentados tras la infección aguda en los controles (hasta valores medios del 195 %), lo que corresponde a la gravedad de la infección y la enfermedad

aislamiento de virus:

- 30
- el virus de exposición fue detectable en las muestras de hisopado nasal en todos los animales de control desde el día 61 hasta el día 71 - viremia de virus de exposición larga y distinguible en el grupo de control durante hasta 11 días (día 62 – día 73)

35 serología:

- todos los animales de control puntuaron de forma positiva en el ELISA de bloqueo de NS3 desde el día 14 p. exp. en adelante
- 40
- títulos neutralizantes detectables desde el día 14 en adelante frente a las tres cepas; títulos más altos frente a las cepas de BVDV-2

BVDV-2ΔC

45 signos clínicos y hemograma

- elevación de la temperatura corporal el día 7 pero se mantuvo en el intervalo fisiológico
 - los efectos clínicos de la infección de exposición estaban claramente reducidos en comparación con los controles
- 50
- solo un único descenso de los recuentos de leucocitos: disminución máxima de aproximadamente el 12 % en el día 4 p. exp.; se recuperó rápidamente hasta los recuentos preinfección (día 7 p. exp.)
 - recuentos de trombocitos: una única disminución menos notable.
- 55

aislamiento de virus:

- duración y niveles de la presencia nasal de virus notablemente reducidos: todos los animales lo presentaron en los días 1 a 4 - viremia de virus de exposición: BVDV-2ΔC también claramente reducido en tiempo y cantidad: 4 animales, 1 día
- 60

serología:

- los anticuerpos para NS3 estaban ligeramente reforzados; se alcanzaron valores de bloqueo medios del 100 % en el día 89
- 65

- refuerzo en los títulos de anticuerpos neutralizantes, detectable tras 7 resp. 14 días posexposición y alcanzaron un máximo en el día 14 hasta el día 28 p. exp.

5 aumentados para BVDV-1 SE5508, pero los valores medios alcanzaron un máximo a un nivel notablemente más bajo que frente a las cepas de BVDV-2
cepa 890 del BVDV-2: títulos tras 7 días; al finalizar el estudio los títulos finales fueron muy similares en todos los grupos
cepa HI916 de BVDV-2: los títulos se mantuvieron ligeramente más bajos que frente a la cepa 890

10 BVDV-1 Δ N^{pro}

signos clínicos y hemograma

- elevación de la temperatura corporal el día 7 p. exp. hasta los 40 °C
- los efectos clínicos de la infección de exposición estaban claramente reducidos; se apreciaron síntomas respiratorios moderados
- solo un único descenso de los recuentos de leucocitos (disminución máxima de aproximadamente el 12 % 4 p. exp.); los animales se recuperaron rápidamente hasta los recuentos preinfección (día 7 p. exp.)
- recuentos de trombocitos: sin disminución notable; tras la infección aguda aumentaron de forma notable (el 175 %), aislamiento de virus:
- presencia nasal de virus: duración (día 62 - día 68) y niveles notablemente reducidos: 4 animales, 1 a 3 días - viremia del virus de exposición: clara reducción en tiempo (día 63 - día 68) y cantidad: todos los animales, 1 a 5 días;

serología:

- anticuerpos para NS3 (ELISA de bloqueo (Prionics)): ligeramente reforzados; valores de bloqueo medio del 100 % alcanzados el día 89
- efecto de refuerzo en los títulos de anticuerpos neutralizantes, alcanzando un máximo el día 14 el día 28 p. exp.

35 BVDV-1 SE5508: títulos máximos alcanzados 14 días posexposición
BVDV-2 890: títulos máximos 14 días posexposición; al finalizar el estudio los títulos finales eran muy similares entre los grupos
40 BVDV-2 HI916: títulos máximos 14 días posexposición; se mantuvieron ligeramente más bajos que frente a la cepa 890

BVDV-2 Δ N^{pro}

signos clínicos y hemograma

- sin elevación de la temperatura corporal
- sin efectos clínicos
- sin disminución de los recuentos en sangre de leucocitos
- recuentos de trombocitos: una única disminución de hasta el 20 % en el día 4 posexposición.

aislamiento de virus:

- ni presencia de virus de exposición ni viremia de virus de exposición

serología:

- anticuerpos para NS3 (ELISA de bloqueo (Prionics)): ligeramente reforzados; se alcanzaron valores de bloqueo medio del 100 % el día 89
- efecto de refuerzo de los títulos de anticuerpos neutralizantes que alcanzaron un máximo en el día 14 hasta el día 28 p. exp.

65

BVDV-1 SE5508: aumentados, pero los valores medios alcanzaron un máximo a un nivel notablemente más bajo que los grupos que recibieron BVDV-1.

BVDV-2 890: títulos máximos a los 14 días posexposición; al finalizar el estudio los títulos finales eran muy similares entre los grupos

5 BVDV-2 HI916: títulos máximos 14 días posexposición; similar a los títulos frente a BVDV-2 890

BVDV-1 Δ N^{pro} + BVDV-2 Δ N^{pro}

signos clínicos y hemograma:

- 10
- elevación única de la temperatura corporal en el día 7 (39,8 °C)
 - los efectos clínicos de la infección de exposición estaban claramente reducidos; sin elevación de las puntuaciones clínicas
- 15
- descenso único de los recuentos de leucocitos (disminución máxima del 24 % en el día 10 p. exp.), los recuentos de leucocitos reducidos persistieron hasta el final del experimento (día 89 - reducción media del 20 %)
 - recuentos de trombocitos: disminución única del 25 % en el día 5 posexposición; aumentados tras el día 10.

20 aislamiento de virus:

- presencia nasal de virus: duración y niveles notablemente reducidos: 2 animales, 1 a 2 días - viremia de virus de exposición: reducción clara en tiempo y cantidad: 2 animales, 1 a 3 días

25 serología:

- anticuerpos para NS3 (ELISA de bloqueo (Prionics)): ligeramente reforzados; valores de bloqueo medio del 100 % alcanzados en el día 89
- efecto de refuerzo en los títulos de anticuerpos neutralizantes alcanzando un máximo el día 14 hasta el día 28 p. exp.

35 BVDV-1 SE5508: aumentados, pero los valores medios alcanzaron un máximo a un nivel notablemente más bajo que en los grupos que reciben BVDV-1.

BVDV-2 890: títulos máximos 14 días posexposición; al término del estudio los títulos finales fueron muy similares entre los grupos

BVDV-2 HI916: títulos máximos 14 días posexposición; similares a los títulos frente a BVDV-2 890

40 En general:

- No pudieron observarse en este experimento efectos clínicos como diarrea con sangre, petequia o hematomas en los sitios de inyección/lesión.
- Los ensayos de neutralización llevados a cabo en este estudio mostraron que los títulos de los animales expuestos a BVDV-2 frente a las cepas de BVDV-2 eran más bajos que los de los animales vacunados con BVDV-1 frente a la cepa de BVDV-1 utilizada.
- Debido a los resultados ampliamente distintos del ELISA específico para NS3 y el ensayo de neutralización para el grupo inmunizado con BVDV-2 Δ C, los inventores secuenciaron la región del replicón que codifica la proteína E2. La proteína E2 es el inmunógeno principal del BVDV y el inductor predominante de anticuerpos neutralizantes. Los inventores encontraron un cambio de nucleótido en comparación con la secuencia correspondiente del clon de ADNc de longitud completa parental. Se emplazaba en la posición de nucleótido 2736 con respecto al ADNc de longitud completa y conduce a un cambio de aminoácido de leucina a histidina.

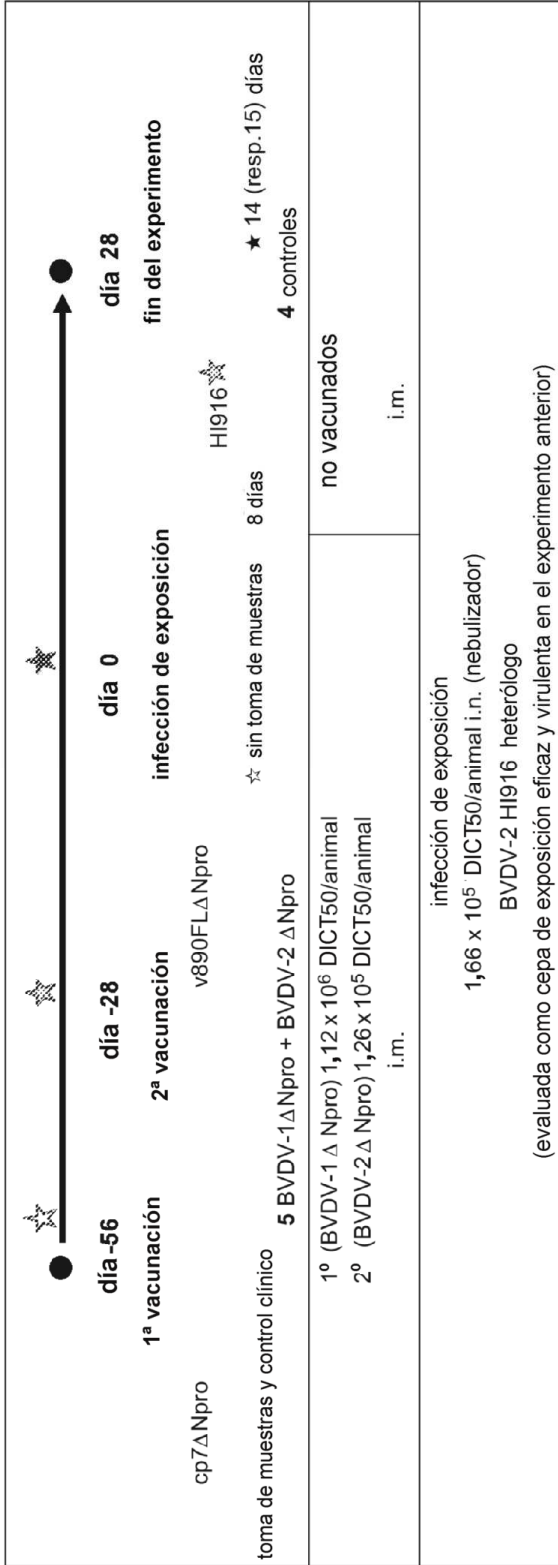
55 Conclusiones:

Todos los candidatos de vacuna para BVDV probados para la seguridad y la eficacia redujeron de forma notoria el resultado de la infección de exposición con BVDV-2 heterólogo en el ganado, mientras mostraron efectos protectores graduados con respecto a los síntomas clínicos, presencia nasal de virus y viremia. El mutante v890FL Δ N^{pro} proporcionó protección completa que condujo a una "inmunidad estéril" en todos los animales inmunizados frente a la exposición al BVDV-2 elevadamente virulento. Una vacuna que comprende tanto a la cepa cp7 Δ N^{pro} como la v890FL Δ N^{pro} no proporciona inmunidad estéril frente a la misma exposición con BVDV-2 elevadamente virulento.

65

Diseño del experimento de vacunación secuencial -exposición con cp7 Δ N^{pro} / v890FL Δ N^{pro}

Escala de 2 tiempos, periodos de toma de muestras y diseño experimental del experimento con animales



Animales:

5 9 terneros sin tratamiento previo con el BVDV (n = 5 vacunados / n = 4 grupo de control no vacunados) se vacunaron de forma secuencial; 2 descargas con un intervalo de 28 días de acuerdo con el protocolo, y 28 días tras la 2ª vacunación se llevó a cabo una infección de exposición con la cepa HI916 del BVDV-2 (aislado de campo alemán, establecido como cepa de exposición en un experimento con animales anterior).

Vacunación:

10 1ª descarga de CP7 ΔNpro: 1,12x10⁶ DICT50 / animal (2 ml i.m.)
2ª descarga de v890FLΔNpro: 1,26x10⁵ DICT50 / animal (2 ml i.m.)

Infección de exposición:

15 1,66x10⁵ DICT50 de BVDV-2 HI916 por vía intranasal - utilizando un nebulizador

Resultados II

II.I vacunación (día 56 y día 28)

20 cp7ΔN^{pro} / v890FLΔN^{pro}

1ª vacunación d -56 (cp7ΔN^{pro})

25 signos clínicos y hemograma:

- las temperaturas corporales de los animales se mantuvieron en el intervalo fisiológico
- no se produjeron reacciones clínicas adversas; los síntomas clínicos ligeros (principalmente respiratorios) 7-8 días tras la vacunación condujeron a una puntuación elevada pero estaban asociados con la vacunación de forma poco probable, como los síntomas leves respiratorios variables tales como rinorrea y tos esporádica que se observaron durante el periodo entero de control de ambos grupos
- recuentos de leucocitos (a intervalos semanales): descendieron durante las primeras 4 semanas
- recuentos de trombocitos (intervalos semanales): se mantuvieron no afectados, serología:
- positiva en el ELISA de anticuerpos (IDEXX) aplicado desde el d 14 posvacunación
- anticuerpos neutralizantes detectables en los ensayos de neutralización desde el día 15 p. vac.

40 BVDV-1 SE5508: clara elevación desde el día 14 p. vac.
BVDV-2 890: títulos bajos a medios detectables el día 14
BVDV-2 HI916: títulos basales a no detectables hasta la segunda vacunación

2ª vacunación d -28 (v890FLΔN^{pro})

signos clínicos y hemograma:

- las temperaturas corporales de los animales se mantuvieron en el intervalo fisiológico
- sin elevación de la puntuación clínica
- recuentos de leucocitos (intervalos semanales): un descenso muy ligero (alrededor del 5 %) presentado en una curva con picos bifásica, entre el día -26 y -21
- recuentos de trombocitos (intervalos semanales): se mantuvieron no afectados, aislamiento de virus:
- no se pudo observar presencia de virus de vacuna ni viremia de virus de vacuna, serología:
- claro de efecto de refuerzo en el ELISA de anticuerpos desde el d 7 después de la segunda vacunación
- los anticuerpos neutralizantes claramente se reforzaron desde el día 7 p. 2ª vac.

55 BVDV-1 SE5508: refuerzo claro; títulos máximos ya alcanzados antes de la infección de exposición
BVDV-2 890: refuerzo claro
BVDV-2 HI916: refuerzo no detectable, pero títulos muy bajos

controles:

60 serología:

- se mantuvieron seronegativos durante todo el periodo de toma de muestras (ELISA y los AN)

En general:

El descenso general en los recuentos de leucocitos en ambos grupos durante las 4 primeras semanas del periodo de vacunación podría ser un indicio de los recuentos elevados al inicio del experimento provocados por, por ejemplo, una infección anterior (general).

II.II. infección de exposición (día 0):

controles:

signos clínicos y hemograma:

- elevación bifásica de sus temperaturas corporales: una muy ligera en los días 2 y 4 (permaneciendo en el intervalo fisiológico) y una moderada en los días 8 y 9 p. exp., con valores medios de grupo máximos de 39,7 °C.
- mostraron signos típicos y claros de enfermedad clínica: elevación de las puntuaciones clínicas alcanzando un máximo en los días 8 a 10: síntomas respiratorios (tos y rinorrea mucopurulenta), ligera depresión con apetito reducido
- desarrollaron una leucopenia clara: disminución bi a trifásica (días 3, 7 y 11 p. exp.) de los recuentos de leucocitos, con niveles máximos del 45 % de reducción en el día 7 p. exp.
- los recuentos de trombocitos no estaban tan fuertemente afectados como se esperaba: caída bifásica (día 7 y 11) con una reducción media de hasta un máximo del 40-50 %, tras lo cual los recuentos aumentaron en los controles de forma notable hasta el día 21 después de la infección agua (hasta valores medios de 270 %), aislamiento de virus:
- el virus de exposición fue detectable en las muestras de hisopado nasal en todos los animales de control desde el día 1 hasta el día 10 - viremia del virus de exposición prolongada y distinguible en el grupo de control durante hasta 10 días (día 2 - día 11)

serología:

- los animales puntuaron de forma positiva en el ELISA de anticuerpo desde el día 14 p. exp. en adelante
- títulos neutralizantes frente a las tres cepas detectables desde el día 14 en adelante, títulos más elevados frente a las cepas de BVDV-2
 - B VDV-1 SE5508: positivos, pero bajos títulos hasta el final del experimento
 - B VDV-2 890: refuerzo claro
 - B VDV-2 HI916: refuerzo claro

CP7ΔNpro / v890FLΔNpro

signos clínicos y hemograma:

- ligera elevación de la temperatura corporal el día 8, pero se mantuvo en el intervalo fisiológico
- los efectos clínicos de la infección de exposición estaban claramente reducidos en comparación con los controles; la infección no condujo a una elevación de las puntuaciones clínicas medias
- descenso bifásico de los recuentos de leucocitos en el día 3 y 12: máxima disminución de aproximadamente el 12 % en el día 3 p. exp.; tras cada caída se recuperaron rápidamente hasta los recuentos preinfección (día 7/resp. día 14 p. exp.).
- recuentos de trombocitos: dos disminuciones muy ligeras (de aproximadamente el 10 %) en el día 3 y 11, en paralelo con la fórmula leucocitaria.

aislamiento de virus:

- duración y niveles de la presencia nasal de virus notablemente reducidos: un animal fue av positivo en 2 días (día 3 y 5); viremia de virus de exposición: también muy claramente reducida en tiempo y cantidad: 2 animales, 1 a 2 días.

serología:

- los anticuerpos estaban claramente reforzados, las DO máximas se alcanzaron 14 días posexposición
- refuerzo de los títulos de anticuerpos neutralizantes observable tras 7 resp. 14 días, alcanzando todos un

máximo el día 28 p. exp., al final del experimento se encontraron títulos similares frente a las tres cepas

BVDV-1 SE5508: solo aumenta ligeramente

cepa 890 del BVDV-2: refuerzo hasta títulos finales similares a los de los controles

- 5 cepa HI916 del BVDV-2: refuerzo claro de los únicos títulos de anticuerpo neutralizante bajos desarrollados antes de la infección de exposición

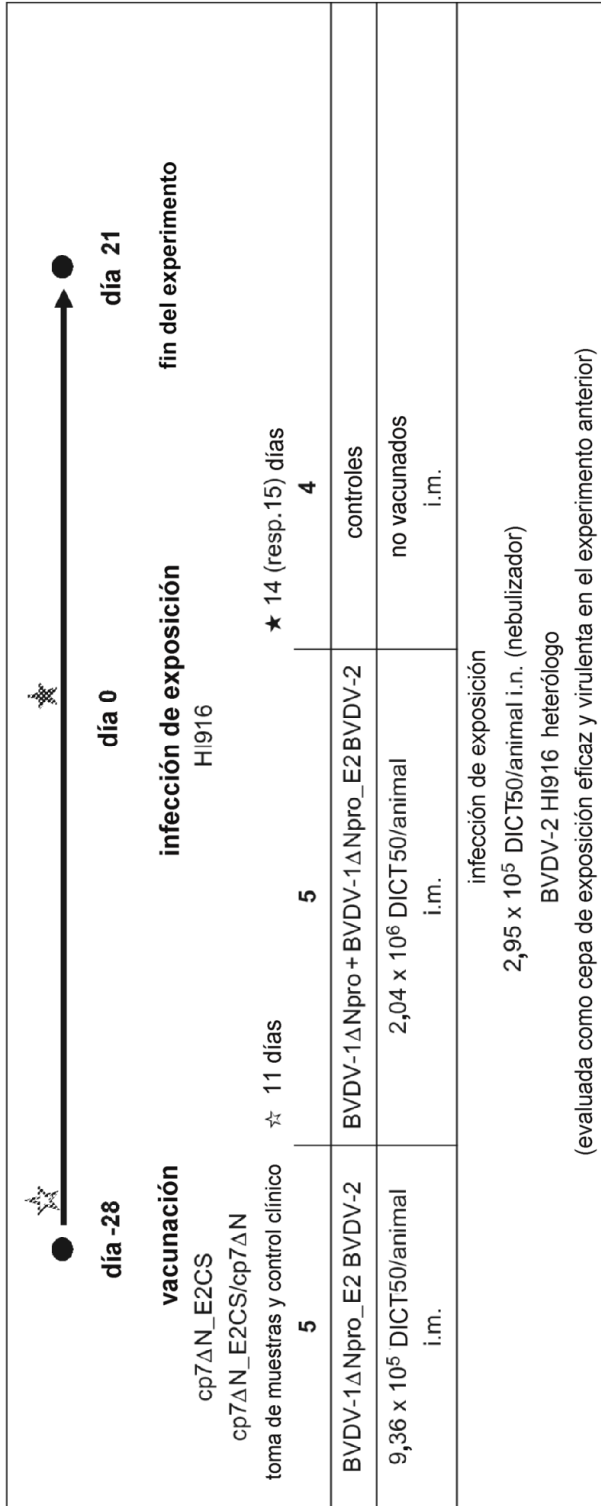
Conclusiones:

- 10 En este experimento no se observó ni viremia ni presencia del virus de vacuna. Otra vez, tras la vacunación no pudieron observarse en los animales reacciones clínicas y fiebre.

- 15 Las disminuciones de los recuentos de leucocitos tras la segunda vacunación no fueron pronunciadas y, además, la reducción de leucocitos tras la infección de exposición no fue prominente (~12 %). Los títulos de anticuerpos neutralizantes se desarrollaron a niveles similares al que estaban en la aplicación mixta de cp7 Δ N^{pro} / v890FL Δ N^{pro}. La viremia (2 animales, 1-2 días) y la presencia (1 animal, 2 días) de virus de exposición no pudo obstaculizarse de forma completa y fueron similares que en el grupo que recibió la aplicación mixta única - no obstante, claramente reducidas en comparación con el grupo de control. La vacunación secuencial de cp7 Δ N^{pro} y v890FL Δ N^{pro} no condujo a una inmunidad estéril en todos los animales, como lo hizo la vacunación con el mutante v890FL Δ N^{pro} solo.

- 20 **Diseño del experimento de vacunación-exposición con la quimera de BVDV-1/2 (cp7 Δ N^{pro}_E2CS8644)**

Escala en 3 tiempos, periodos de tomas de muestras y diseño experimental del experimento con animales



Animales:

5 Se vacunaron de acuerdo con el protocolo 14 terneros sin tratamiento previo con el BVDV (n = 5 por grupo vacunado / n = 4 controles no vacunados) y 28 días posvacunación, se llevó a cabo una infección de exposición con la cepa HI916 del BVDV-2 (aislado de campo alemán, establecido como cepa de exposición en un experimento con animales anterior).

Vacunación:

10 grupo 1: cp7 Δ Npro_E2CS8644: $9,36 \times 10^5$ DICT50 / animal (2 ml i.m.)
grupo 2: cp7 Δ Npro_E2CS8644 + cp7 Δ Npro: $2,04 \times 10^6$ DICT50 / animal (3 ml i.m.)

Infección de exposición:

15 $1,66 \times 10^5$ DICT50 del BVDV-2 HI916 por vía intranasal - utilizando un nebulizador

Periodos de toma de muestras:

- 20
- a diario durante 11 días tras la vacunación (sin toma de muestras del grupo de control)
 - todos los grupos durante 14 d tras la infección de exposición

Resultados

25 **III.I vacunación (día 28):**

En general:

serología después de la vacunación:

30 se realizaron ensayos de neutralización frente a las cepas parentales de la quimera (BVDV-1 cp7 y BVDV-2 CS8644)

cp7 Δ Npro_E2CS8644

35 signos clínicos y hemograma:

- las temperaturas corporales de los animales se mantuvieron en el intervalo fisiológico a lo largo de todo el periodo de vacunación
- 40 • no se produjeron reacciones clínicas adversas; los síntomas clínicos (respiratorios) ligeros a lo largo de todo el periodo de vacunación condujeron de forma intermitente a una puntuación elevada (días de valores máximos - 25, -15, -11, -10 y -8), pero esto estaba de forma poco probable asociado con la vacunación, dado que los síntomas respiratorios leves tales como la rinorrea y la tos esporádica, variables en intensidad, se observaron durante todo el periodo de control en ambos grupos vacunados
- 45 • recuentos de leucocitos: un descenso bifásico ligero (alrededor del 10 %, los días 3 y 7 posvacunación); en el día 19 los animales habían alcanzado sus niveles de prevacunación otra vez
- recuento de trombocitos: durante el periodo de vacunación hubo una disminución constante - total del 25-30 % en ambos grupos vacunados, los descensos tras la vacunación fueron solo mínimos (hasta el 5 %)

aislamiento de virus:

- 50
- no pudo observarse presencia de virus de vacuna - el virus de vacuna se aisló a partir de leucocitos de un animal en un día (d -24)

serología:

- 55
- en el ELISA de bloqueo de NS3 (Prionics) aplicado el grupo se mantuvo negativo hasta la infección de exposición
 - los anticuerpos neutralizantes frente a BVDV-1 (cp7) y BVDV-2 (CS8644)

60 BVDV-1 cp7: títulos detectados de forma insignificante 3 semanas p. vac.; se mantuvieron bajos hasta la infección de exposición
BVDV-2 CS8644: detectados 3 semanas p. vac.; más elevados en el día 0

cp7 ΔNpro_E2CS8644 + cp7ΔNpro

signos clínicos y hemograma:

- 5
- las temperaturas corporales de los animales se mantuvieron en el intervalo fisiológico a lo largo de todo el periodo de vacunación
 - no se produjeron reacciones clínicas adversas; los síntomas clínicos (respiratorios) ligeros a lo largo de todo el periodo de vacunación condujeron de forma intermitente a una puntuación elevada, pero esto estaba de forma poco probable asociado con la vacunación, dado que los síntomas respiratorios leves tales como la rinorrea y la tos esporádica de intensidad variable se observaron durante todo el periodo de control de ambos grupos vacunados
- 10
- recuentos de leucocitos: ligero descenso 3 a 7 días posvacunación con un máximo en el d 7 p.vac. (alrededor del 20 %); aumentó en el día 19 pero el 10 % más bajo que los niveles prevacunación
 - recuento de trombocitos: durante el periodo de vacunación hubo una disminución constante - el 25-30 % total en ambos grupos vacunados, los descensos tras la vacunación no fueron claramente discernibles
- 15

aislamiento de virus:

- no pudo observarse presencia de virus de exposición ni viremia del virus de exposición, serología:
- 20
- ELISA de bloqueo de NS3 (Prionics): positivo de forma insignificante 3 semanas tras la inmunización; claramente positivo el día de la infección de exposición
 - anticuerpos de neutralización frente a BVDV-1 (cp7) y BVDV-2 (CS8644)

- 25
- BVDV-1 cp7: detectados desde el día 14 p. vac., que se elevaron hasta la infección de exposición
 - BVDV-2 CS8644: detectados 3 semanas p. vac.; pero títulos claramente más bajos que frente a BVDV-1

controles:

serología:

- 30
- se mantuvieron seronegativos durante todo el periodo de toma de muestras (ELISA y los AN)

En general:

- 35
- recuentos de leucocitos: hubo un descenso de aproximadamente el 20 % en ambos grupos vacunados, que se mantuvieron en un nivel constante hasta la infección de exposición (los recuentos se establecieron en el 100 % antes de la exposición)

III.II infección de exposición (día 0)

40

En general:

serología tras la infección de exposición:

- 45
- se realizó un ensayo de neutralización adicional frente a la cepa de exposición (BVDV-2 HI916)

controles:

signos clínicos y hemograma:

- 50
- elevación bifásica de sus temperaturas corporales: una ligera en el día 3 y una pronunciada en los días 7 y 8 p. exp., con valores medios máximos de grupo de hasta 40,1 °C.

- 55
- mostraron signos típicos y claros de enfermedad clínica: elevación distinguible de las puntuaciones clínicas que alcanzaron un máximo en los días 8 a 11: síntomas respiratorios notables (tos y rinorrea mucopurulenta), depresión con apetito reducido (pronunciada en 2 animales)

- desarrollaron una leucopenia grave: disminución trifásica (días 3, 7 y 11 p. exp.) en los recuentos de leucocitos, con niveles máximos del 44 % de reducción en el día 3 p. exp.

- 60
- recuentos de trombocitos: reducción durante 9 días después de la exposición, hasta un máximo del 48 % en el día 9 p. exp. Tras eso los recuentos aumentaron rápidamente de forma aguda, hasta valores medios de 115 % al final del experimento

- 65
- aislamiento de virus:

ES 2 606 605 T3

- el virus de exposición fue detectable en las muestras de hisopado nasal de todos los animales de control en los días 2 y 3, y el día 5 hasta 13 - viremia del virus de exposición durante hasta 12 días (día 2 - día 13)

serología:

- 5
- todos los animales de control puntuaron de forma positiva en el ELISA de bloqueo de NS3 desde el día 14 p. exp. en adelante
- 10
- títulos neutralizantes frente a todas las cepas detectables desde el día 14 posexposición, títulos más elevados frente a las cepas de BVDV-2

cp7 Δ Npro_E2CS8644

signos clínicos y hemograma:

- 15
- temperaturas corporales: una elevación única pero pronunciada que alcanzó el máximo en el día 7, con valores medios máximos de grupo de hasta 40,5 °C
 - sin elevación pronunciada o clara de las puntuaciones clínicas, en comparación con los niveles del periodo de vacunación
- 20
- recuentos de leucocitos: descenso único (el 22 % en el día 3 posexposición); recuperación rápida otra vez hasta sus niveles de prevacunación (día 7 posexposición)
 - recuentos de trombocitos: reducción durante 7 días después de la exposición; máximo del 19 % en el día 7 p. exp., tras eso los recuentos aumentaron rápidamente

25 aislamiento de virus:

- presencia de virus de exposición: 2 animales en el día 3 - viremia de virus de exposición en 2 animales durante 1-2 días (día 3 a 5)

30 serología:

- claro refuerzo por ELISA de bloqueo de NS3 (Prionics), valores de bloqueo de aproximadamente el 100 % al final del experimento
 - se reforzaron los anticuerpos neutralizantes frente a BVDV-1 (cp7) y BVDV-2 (CS8644 y HI916); los títulos frente a BVDV-1 se mantuvieron más bajos que en el grupo de aplicación mixta
- 35

cp7 Δ Npro_E2CS8644 + cp7 Δ Npro

signos clínicos y hemograma:

- 40
- temperaturas corporales: única elevación que alcanzó un máximo en el día 7, con valores medios de grupo máximos de hasta 39,6 °C
 - sin elevación pronunciada o clara de las puntuaciones clínicas en comparación con los niveles del periodo de vacunación
- 45
- recuentos de leucocitos: único descenso (el 15 % en el día 4 posexposición); que se recupera rápidamente hasta sus niveles de prevacunación otra vez (día 7 posexposición)
 - recuentos de trombocitos: reducción durante 7 días después de la exposición; máximo del 22 % en el día 7 p. exp., tras eso recuentos aumentados rápidamente

50 aislamiento de virus:

- no pudo observarse ni presencia de virus de exposición ni viremia de virus de exposición, serología:
 - claro refuerzo por ELISA de bloqueo de NS3 (Prionics), valores de bloqueo de aproximadamente el 100 % al final del experimento
- 55
- los anticuerpos neutralizantes frente a BVDV-1 (cp7) y BVDV-2 (CS8644 y HI916) estaban reforzados; los títulos frente a BVDV-1 eran más elevados que en el grupo que recibió solo la quimera

Conclusiones

- 60
- Aunque en ambos grupos vacunados pudo observarse una reacción clínica muy leve tras la infección de exposición (cp7 Δ Npro_E2CS8644 fiebre, mientras que en el grupo con la aplicación mixta solo subió la temperatura), la vacunación con cp7 Δ N^{pro}_E2CS8644 + cp7 Δ N^{pro} en una única aplicación condujo a la inmunidad estéril tras la infección de exposición.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Intervet International B.V.	
5	<120> Vacuna para el BVDV	
	<130> 2010.027	
	<160> 9	
10	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 33	
15	<212> ADN	
	<213> virus de la diarrea vírica bovina	
	<400> 1	
20	acaggggagc aaggatatcc agactgcaaa ccc	33
	<210> 2	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> virus de la diarrea vírica bovina	
25	<400> 2	
	gggtttgcag tctggatatc cttgcgcccc tgt	33
	<210> 3	
30	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> virus de la diarrea vírica bovina	
	<400> 3	
35	cggaagcagg aattaggttg gaaaaattac c	31
	<210> 4	
	<211> 24	
	<212> ADN	
40	<213> virus de la diarrea vírica bovina	
	<400> 4	
	cgtcactgta ggtgtgtctt aggc	24
45	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> virus de la diarrea vírica bovina	
50	<400> 5	
	gcaagaacta gccagtcac g	21
	<210> 6	
	<211> 34	
55	<212> ADN	
	<213> virus de la diarrea vírica bovina	
	<400> 6	
60	ctagtgatc ccccggtg ttaaaggct tccc	34
	<210> 7	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> virus de la diarrea vírica bovina	
65	<400> 7	

ES 2 606 605 T3

gctcataaca ggggcgcaag ggattccctg aatgcaaaga ggg 43

<210> 8
<211> 41
5 <212> ADN
<213> virus de la diarrea vírica bovina

<400> 8
10 cacctgcccc atactggaca cctatagcta ctgctctga c 41

<210> 9
<211> 41
<212> ADN
15 <213> virus de la diarrea vírica bovina

<400> 9
catggtttgg ggcatatgca gcaagtccat actgtgatg g 41

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna combinada para la protección de rumiantes susceptibles frente al BVDV, **caracterizada por que** la vacuna comprende un primer BVDV que pertenece a un primer tipo y porta un gen E2 del BVDV de dicho primer tipo, un segundo BVDV que pertenece a un primer tipo, en el que el gen E2 del BVDV que pertenece a dicho primer tipo se reemplaza por el gen E2 del BVDV que pertenece a un segundo tipo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y en la que dicho primer BVDV y dicho segundo BVDV tienen la misma estructura.
- 10 2. Vacuna combinada de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que**, además, en el segundo BVDV el gen E1 del BVDV que pertenece a dicho primer tipo se reemplaza por un gen E1 del BVDV que pertenece a un segundo tipo.
- 15 3. Vacuna combinada de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** la estructura del primer y del segundo virus de la BVD pertenece al tipo 1 y el gen E2 del BVDV del segundo virus de la BVD pertenece al tipo 2.
- 20 4. Vacuna combinada de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** la estructura del primer y del segundo virus de la BVD pertenece al tipo 2 y el gen E2 del BVDV del segundo virus de la BVD pertenece al tipo 1.
- 25 5. Vacuna combinada de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, **caracterizada por que** dichos primer y segundo BVDV son virus vivos atenuados.
- 30 6. Vacuna combinada de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** dicha misma estructura es el BVDV tipo 1.
- 35 7. Vacuna combinada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, **caracterizada por que** dicho primer BVDV y/o dicho segundo BVDV comprenden una deleción en el gen N^{pro} y/o una deleción en el gen E^{ms}.
- 40 8. Vacuna combinada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, **caracterizada por que** dicha vacuna combinada comprende un antígeno adicional de un virus o un microorganismo patógenos para rumiantes, un anticuerpo frente a dicho antígeno o información genética que codifica un polipéptido inmunogénico de dichos virus o microorganismo.
- 45 9. Vacuna combinada de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada por que** dichos virus o microorganismo patógenos para rumiantes se seleccionan del grupo de: rotavirus bovino, herpesvirus bovino, virus de parainfluenza tipo 3, paramixovirus bovino, virus de la lengua azul, virus de la fiebre aftosa, *Pasteurella haemolytica* y virus respiratorio sincitial bovino.
10. Vacuna combinada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, **caracterizada por que** está en una forma liofilizada.
11. Método para la fabricación de una vacuna combinada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, **caracterizado por que** dicho método comprende la etapa de mezclar un primer BVDV que pertenece a un primer tipo y que porta un gen E2 del BVDV de dicho primer tipo, un segundo BVDV que pertenece a un primer tipo, en el que el gen E2 del BVDV que pertenece a dicho primer tipo se reemplaza por el gen E2 del BVDV que pertenece a un segundo tipo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

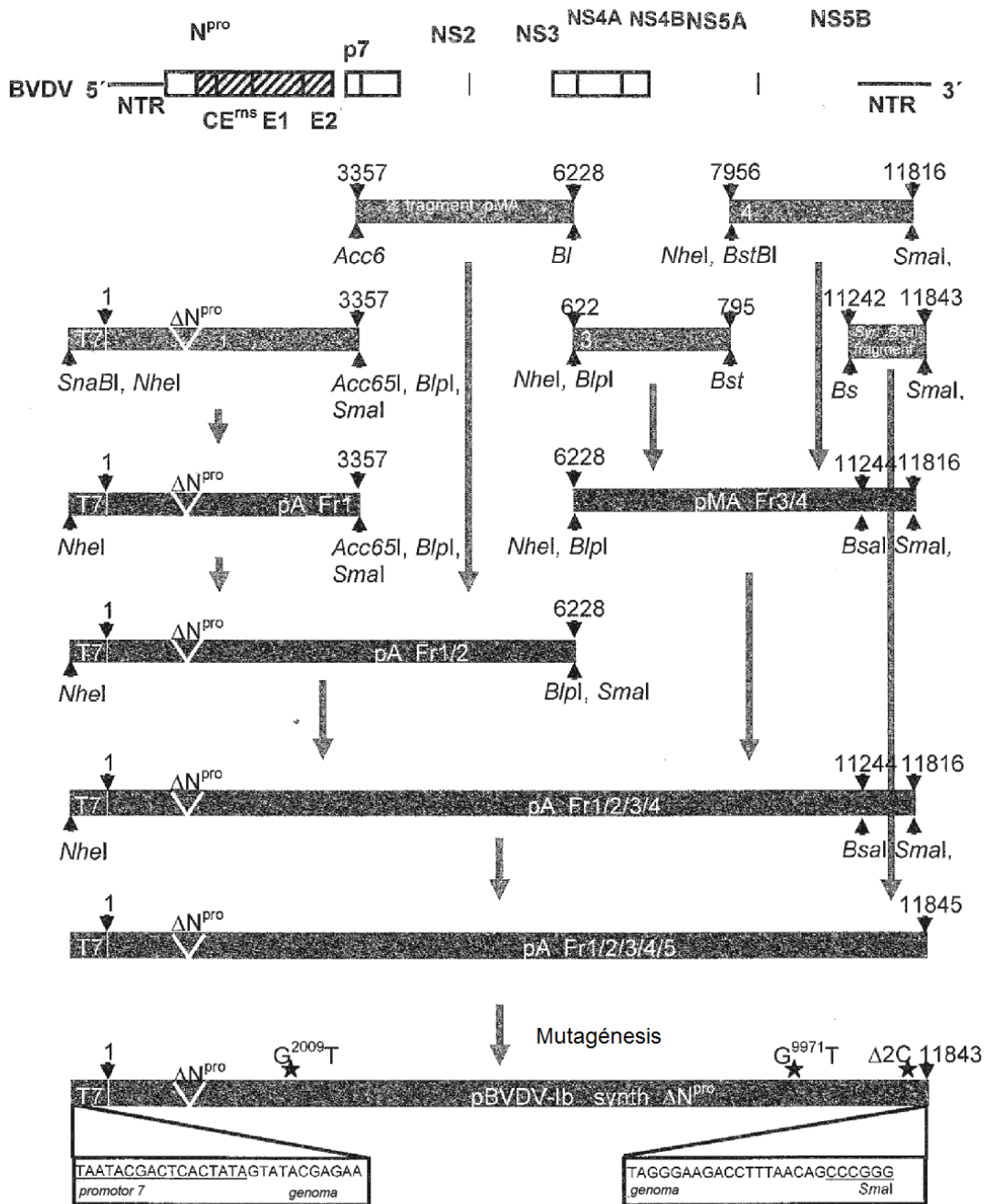


Figura 1

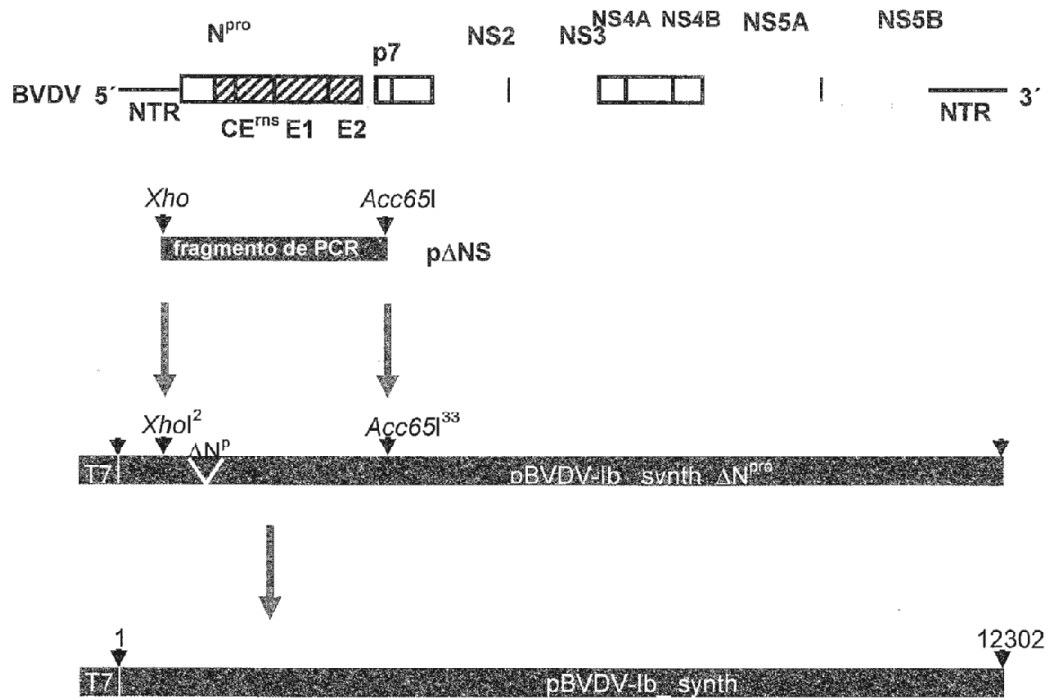
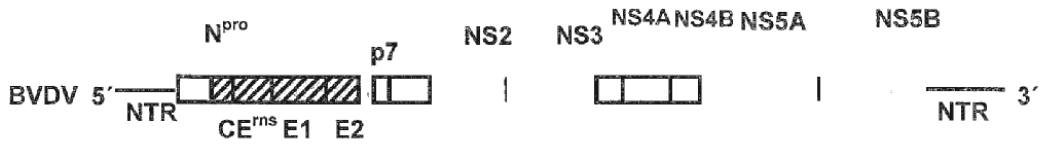
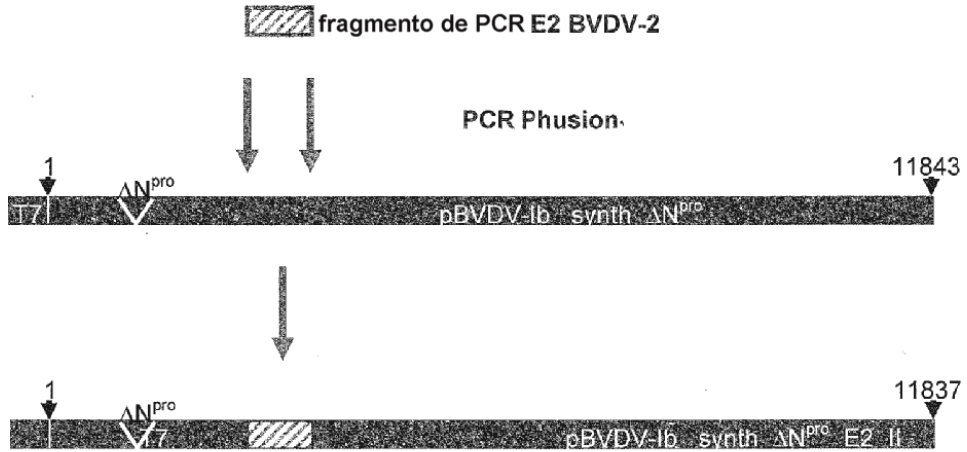


Figura 2



a)



b)

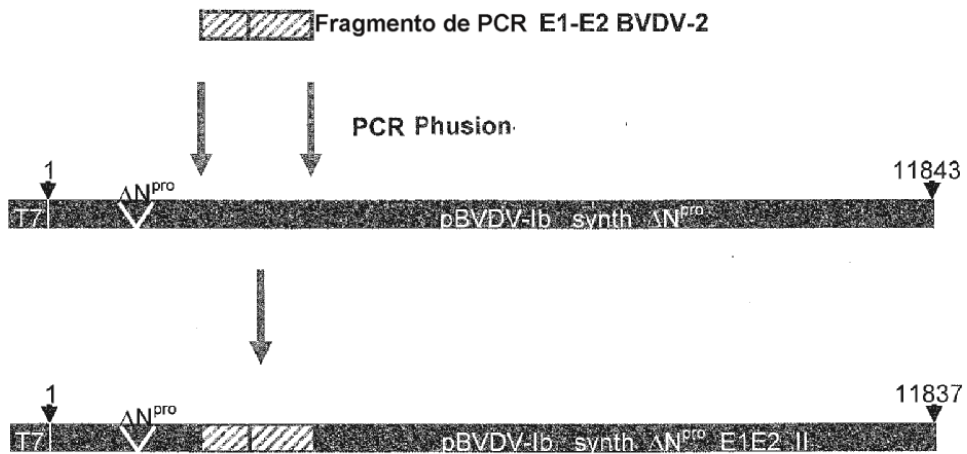


Figura 3

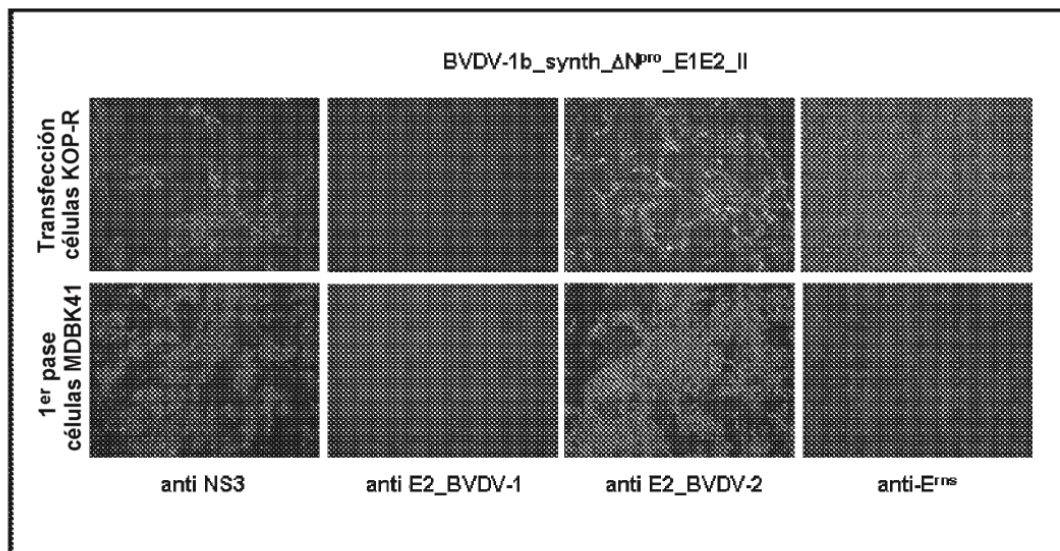
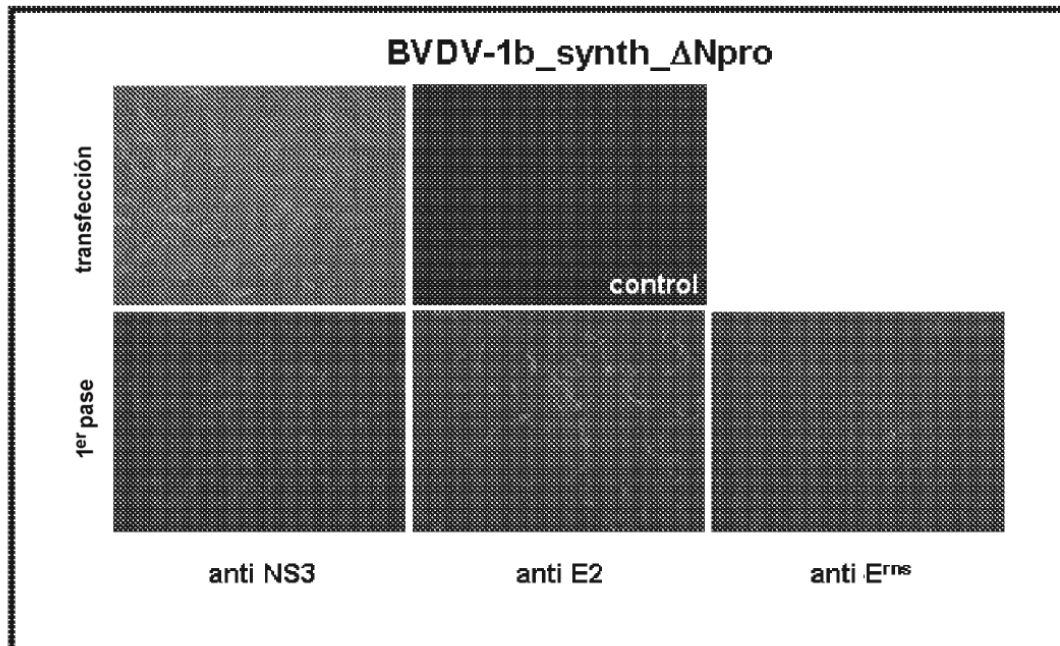


Figura 4

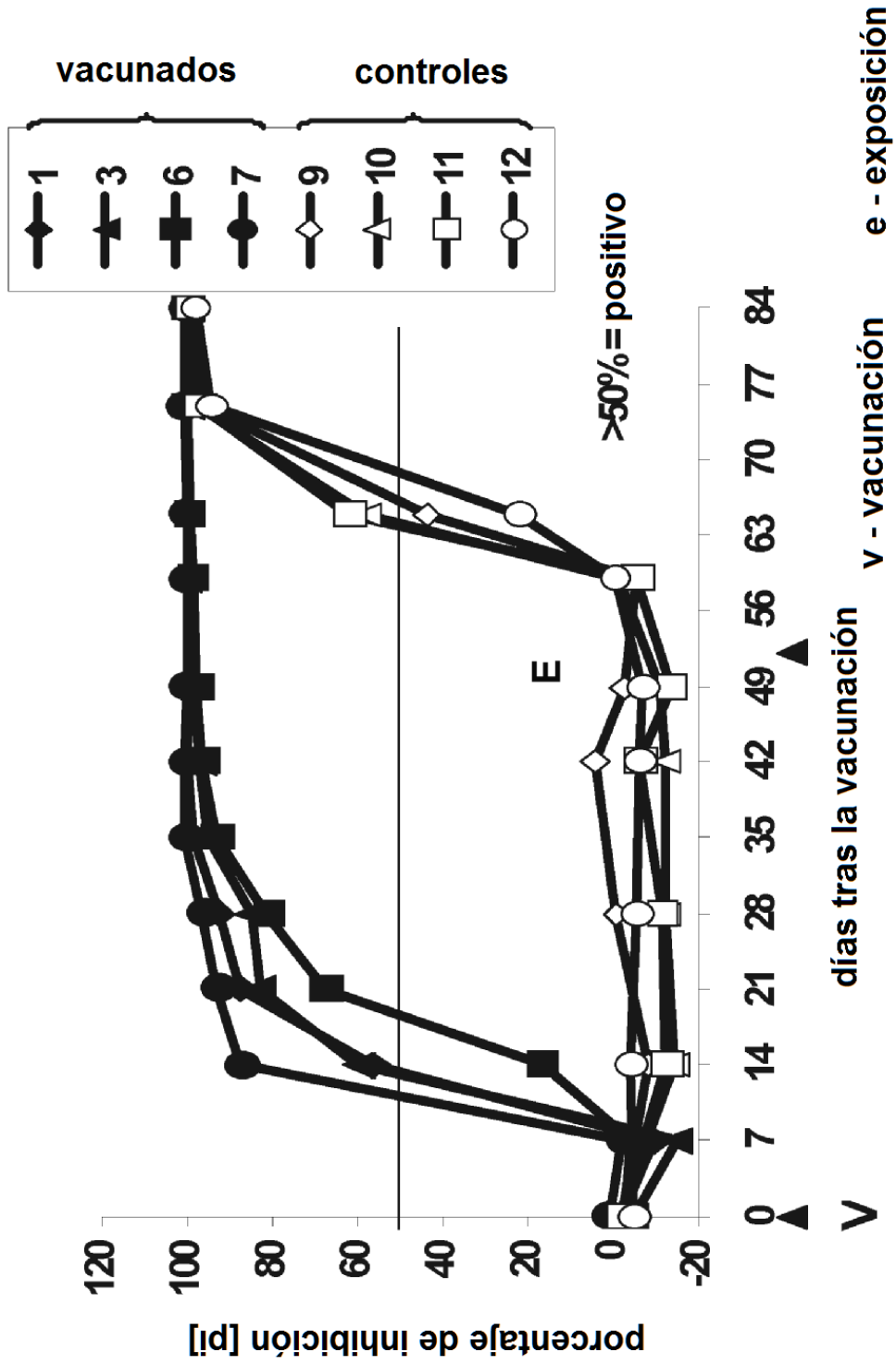


Figura 5

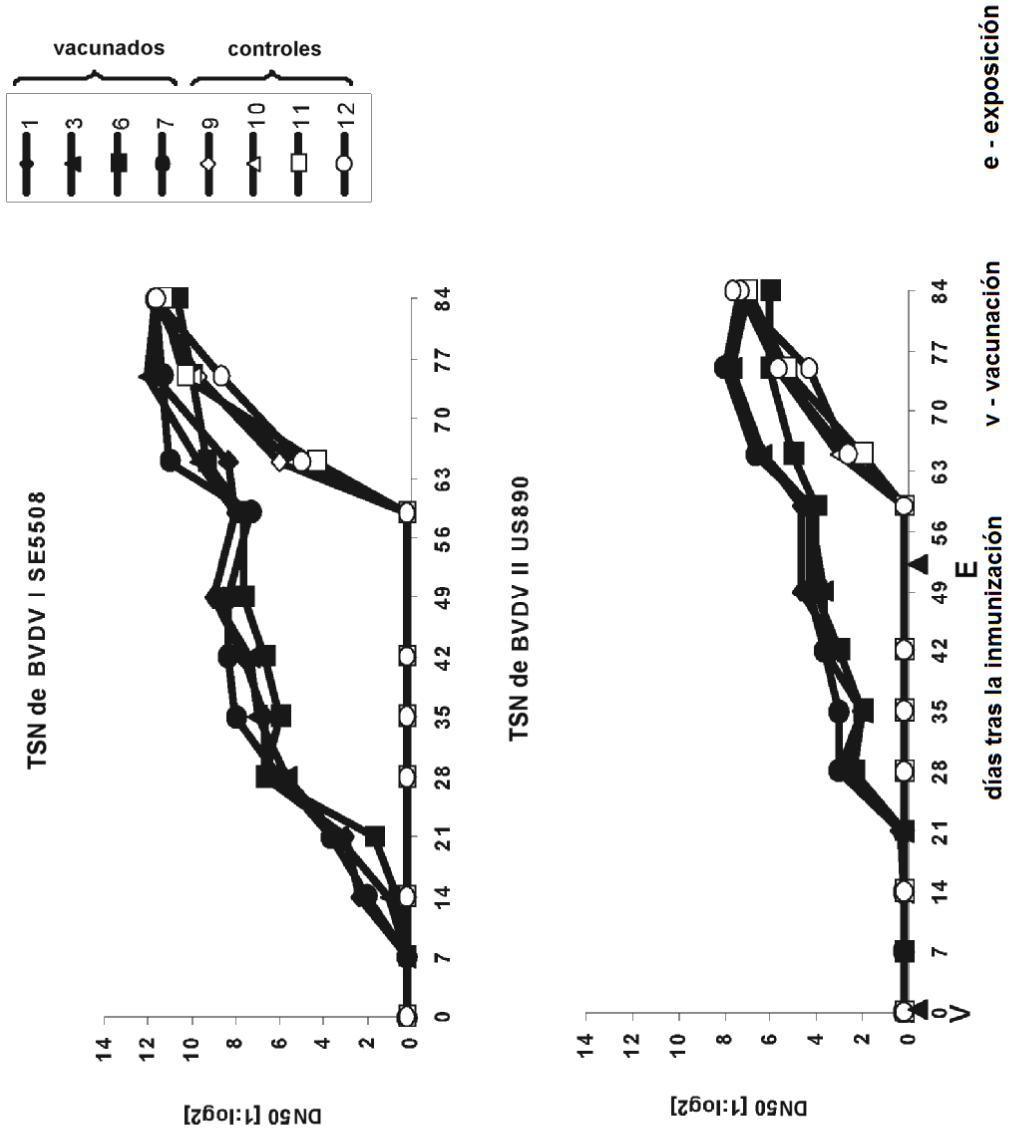


Figura 6