

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 149**

51 Int. Cl.:

A61K 39/23 (2006.01)

C07K 14/015 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2011 PCT/EP2011/062203**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12007589**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2011 E 11732480 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2593136**

54 Título: **Parvovirus atenuado vivo**

30 Prioridad:

19.07.2010 US 365684 P
16.07.2010 EP 10169872

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SPIBEY, NORMAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 623 149 T3

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

DESCRIPCIÓN

Parvovirus atenuado vivo

- 5 La invención se refiere a parvovirus atenuados vivos, sus usos, vacunas que comprende tales parvovirus atenuados vivos, así como métodos para su producción.

10 El Parvovirus pertenece a la familia de los virus de ADN de cadena sencilla. Los parvovirus pueden causar enfermedad en diversos animales tales como gatos, perros y cerdos. Debido a que los virus requieren células que se dividan activamente para replicarse, el tipo de tejido infectado varía con la edad del animal. El tracto gastrointestinal y el sistema linfático pueden estar afectados a cualquier edad, conduciendo a vómitos, diarrea e inmunosupresión, pero la hipoplasia cerebelar solamente se observa en gatos que se infectan en el útero o al menos con dos semanas de vida, y la enfermedad del miocardio se observa en cachorros infectados entre las tres y ocho semanas de vida.

15 El parvovirus canino (CPV) es una enfermedad particularmente mortal en cachorros, mortal aproximadamente en el 80 %, que causa daño en el tracto gastrointestinal y deshidratación, así como un síndrome cardiaco en muchos cachorros jóvenes. Se propaga por contacto con heces de perros infectados. Los síntomas incluyen letargo, diarrea grave, fiebre, vómitos, pérdida de apetito y deshidratación. El parvovirus porcino causa una enfermedad reproductora en cerdo conocida como SMEDI, lo cual significa nacido muerto, momificación, muerte embrionaria e infertilidad. La panleucopenia felina, comúnmente conocida como moquillo felino, es una infección vírica que afecta a los gatos, causada por el parvovirus felino (FPV), un pariente cercano del parvovirus canino. La panleucopenia felina es común en gatitos y causa fiebre, bajo recuento de glóbulos blancos, diarrea, y muerte. La infección del feto de gato y gatitos de menos de dos semanas de vida causa hipoplasia cerebelar. El virus de la enteritis de visón es similar en efecto a la panleucopenia felina, excepto que no causa hipoplasia cerebelar. Un parvovirus diferente causa Enfermedad de Aleutian en visones y otros mustélidos, caracterizada por linfadenopatía, esplenomegalia, glomerulonefritis, anemia y muerte. El diagnóstico más grave de parvovirus es por ELISA. Perros, gatos y cerdos frecuentemente son vacunados frente a parvovirus.

30 A nivel de ADN, se sabe que los parvovirus caninos, felinos y porcinos tienen un genoma altamente homólogo. El parvovirus canino CPV2 es un virus que es responsable de una enteritis aguda y a veces mortal en perros (Kelly, *Aust. Vet. J.* 54; 593, 1978; Appel y col., *Vet. Rec.* 105; 156-159, 1979). El virus, el cual apareció primero alrededor de 1977, probablemente surgió de un virus muy estrechamente relacionado en gatos, el virus de la panleucopenia felina (FPLV) por un número pequeño de mutaciones en la proteína única de la cápside; un salto de especie que puede haber implicado paso intermedio en otros carnívoros tales como visones o mapaches (Truyen y col., *Virology* 35 215, 186-189, 1996).

Ya en 1979 aparecieron las primeras variantes de CPV2, llamadas CPV2a, y rápidamente fueron seguidas por la aparición de CPV2b en 1984. (Parrish y col., *Science* 230, 1.046-1.048, 1985, y *J. Virol.* 65; 6.544-6.552, 1991).

40 El virus tipo 2 original ya ha desaparecido del campo habiéndose reemplazado por los tipos 2a y 2b, aunque las proporciones relativas de estos dos tipos varía de país en país (Truyen y col., supra; Chinchkar y col., *Arch. Virol.* 151, 1.881-1.887, 2006; Pereira y col., *Infect. Genet. Evol.* 3, 399-409, 2007). Los cambios de aminoácidos en la proteína de la cápside (VP2), los cuales caracterizan el cambio desde 2 a 2a y a 2b, están muy limitados. Substituciones en las posiciones 87 (Met a Leu), 300 (Ala a Gly), 305 (Asp a Tyr) y 555 (Val a Ile) se dieron en la evolución de 2 a 2a y 426 (Asn a Asp) y 555 (Ile a Val) en el surgimiento de 2b a partir de 2a (Parrish y col., supra; Truyen y col., *J. Virol.* 69, 4.702-4.710, 1995). Recientemente, se ha informado que las cepas 2a carecen de la sustitución de Val a Ile en la posición 555 (Wang y col., *Virus Genes* 31, 171-174, 2005; Martella y col., *Virus Genes* 33, 11-13, 2006). Tal parece que un cambio único de aminoácido puede diferenciar las secuencias de VP2 de CPV2a y CPV2b.

50 Más recientemente han surgido cepas en Italia en las que el aminoácido en la posición 426 (Asn en 2a y Asp en 2b) ha llegado a ser un residuo de ácido glutámico (Glu) (Buonavoglia y col., *J. Gen. Virol.* 82, 3.021-3.025, 2001; Martella y col., *J. Clin. Microbiol.* 42, 1.333-1.336, 2004). El hecho de que estas variantes Glu 426, llamadas virus CPV2c, estén circulando y coexistiendo con otros tipos de CPV en Italia y otros países europeos (Decaro y col., *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 468-472, 2006) y que también se hayan aislado en países tan geográficamente diversos como Vietnam y Escocia (Nakamura y col., *Arch. Virol.* 149, 2.261-2.269, 2004, Spibey y col., *Vet. Microbiol* 128, 48-55, 2008) sugiere que tienen una ventaja en al menos una proporción de la población canina.

60 La evolución relativamente rápida del parvovirus canino ha dado como resultado la pérdida y, a continuación, la recuperación del rango de hospedador felino (Truyen y col., 1996 supra), y esta capacidad recuperada de replicarse en gatos puede explicar bien el reemplazamiento del virus tipo 2 original con las variantes 2a, 2b y 2c. A finales de los años 70 y comienzos de los años 80 vacunas de FPL tanto vivas como inactivadas se usaron para proteger a los perros frente a la enfermedad de CPV debido a los antígenos compartidos que estimulaban la protección cruzada, sin embargo, el nivel de protección que proporcionaban era malo y la duración de la inmunidad era corta. Estas vacunas se reemplazaron por vacunas de CPV atenuadas vivas, las cuales proporcionaron buena protección y

mayor duración de la inmunidad. Actualmente las vacunas atenuadas vivas se derivan de o bien aislados de CPV2b o el virus tipo 2 original. Puesto que el virus tipo 2 se ha reemplazado completamente en el campo por los virus 2a, 2b y ahora 2c ha habido una preocupación sobre el nivel de protección proporcionado por las vacunas tipo 2 atenuadas (Pratelli y col., *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 8, 612-615, 2001; *Truyen, Vet. Microbiol.* 69, 47-50, 1999).

5 Sin embargo, basándose en estudios con anticuerpos monoclonales disponibles cada nueva variante antigénica ha perdido al menos un epítipo neutralizante en comparación con la variante antigua (Strassheim y col., *Virology* 198, 175-184, 1994; Pereira y col., supra). Previamente se ha demostrado que la vacuna con CPV2 atenuado vivo es capaz de proteger a los perros frente a las exposiciones en campo a 2a y 2b (Greenwood y col., *Vet. Record.* 136, 63-67, 1995) aunque estudios de neutralización cruzada conducidos *in vitro* que usan suero cultivado frente a diversos tipos antígenos muestran diferencias marcadas (Pratelli y col., supra).

10 Recientemente, se demostró que la vacuna tipo 2 atenuada viva (Nobivac-Intervet) era capaz de proteger a los perros de la exposición a la variante de CPV más reciente, CPV2c (Spibey y col., *Vet. Microbiol* 128, 48-55, 2008).

15 No obstante, existe una necesidad en el campo de las vacunas que combinen la inducción de un nivel suficiente de inmunidad en animales, en particular gatos, perros y cerdos frente a infección con parvovirus con un comportamiento altamente atenuado. Un alto nivel de atenuación es sinónimo de seguridad, especialmente en animales jóvenes y viejos.

20 Es un objetivo de la presente invención proporcionar nuevos parvovirus vivos que están atenuados, aunque son aún inmunógenos. Tales virus proporcionan una base para vacunas seguras.

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

A este respecto, una realización de la presente invención se refiere a parvovirus CPV2 atenuado vivo, caracterizada por que dicho CPV2 comprende un gen de la cápside del serotipo de CPV2 2a, 2b o 2c que codifica un aminoácido distinto de Isoleucina en la posición de aminoácido 219 de la proteína de la cápside y/o un aminoácido distinto de Glutamina en la posición de aminoácido 386 de la proteína de la cápside, y se caracteriza por que un fragmento de ADN de una parte de la región de no cápside de dicho CPV2 se reemplaza por un fragmento de ADN homólogo de una parte de la región de no cápside derivado de un segundo parvovirus, en el que dicho fragmento de ADN homólogo de dicho segundo parvovirus lleva una mutación atenuante.

30 El parvovirus CPV2 atenuado vivo de la invención no es el CPV que está presente en la vacuna con parvovirus canino Nobivac Parvo C. Una secuencia comprendida en el CPV de la vacuna con parvovirus canino Nobivac Parvo C está dada en SEQ ID NO: 1.

35 Sorprendentemente se encontró, que estos dos sitios, en la posición de aminoácido 219 y 386 del gen de la cápside, juegan un papel importante en la atenuación del virus. Hasta ahora se asumía que principalmente los aminoácidos fuera de la región de la cápside están implicados en la virulencia/atenuación del virus.

40 La localización de la Isoleucina en la posición de aminoácido 219 de la proteína de la cápside y una Glutamina en la posición de aminoácido 386 de la proteína de la cápside es idéntica en tanto parvovirus caninos como felinos, sin reparar en el serotipo.

45 La técnica anterior describe el CPV que está presente en la vacuna con parvovirus canino Nobivac Parvo C (Intervet Schering-Plough Animal Health) que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 1.

50 Simplemente para indicar la localización de la Isoleucina en la posición de aminoácido 219 y la Glutamina en la posición de aminoácido 386, a continuación, se muestran los dos aminoácidos (en caracteres en negrita) en un ejemplo del contexto secuencial encontrado en la mayoría de las cepas CPV y FPV.

yfqwdrtlpshtgtsg (Isoleucina 219 = en negrita)
yafgrqhgqktttget (Glutamina 386 = en negrita)

55 Dependiendo de la cepa que se use como material de partida para la sustitución de uno o ambos aminoácidos según la invención, puede ser que una sustitución sencilla del aminoácido en la posición 219 o 386 no sea suficiente para, por ejemplo, hacer al virus seguro en animales muy jóvenes. Si se requiere una atenuación adicional, se prefiere la sustitución de tanto el aminoácido en la posición 219 como 386.

60 Por lo tanto, una forma preferida de esta realización se refiere a un CPV2 atenuado vivo según la invención que comprende un gen de la cápside que codifica un aminoácido distinto de Isoleucina en la posición de aminoácido 219 de la proteína de la cápside y un aminoácido distinto de Glutamina en la posición de aminoácido 386 de la proteína de la cápside.

65

Una forma más preferida de esta realización se refiere a un CPV2 atenuado vivo según la invención, que comprende un gen de la cápside que codifica una Valina en la posición de aminoácido 219 de la proteína de la cápside y/o una Lisina en la posición de aminoácido 386 de la proteína de la cápside.

5 Una forma incluso más preferida de esta realización se refiere a un CPV2 atenuado vivo según la invención, que comprende un gen de la cápside que codifica una Valina en la posición de aminoácido 219 de la proteína de la cápside y una Lisina en la posición de aminoácido 386 de la proteína de la cápside.

10 Un parvovirus que ya tiene una mutación atenuante localizada fuera de la región de la cápside se puede usar como el material de partida para la introducción de una sustitución de aminoácido para preparar un CPV2 atenuado vivo según la invención. Una alternativa puede ser el reemplazamiento de un fragmento de ADN de una parte de la región de no cápside de un virus que comprende un gen de la cápside del serotipo de CPV2 2a, 2b o 2c que codifica un aminoácido distinto de Isoleucina en la posición de aminoácido 219 de la proteína de la cápside y/o un aminoácido distinto de Glutamina en la posición de aminoácido 386 de la proteína de la cápside, con una región de no cápside homóloga de una cepa de parvovirus que lleva una atenuación en esa región. Los parvovirus que llevan una atenuación en una parte de la región de no cápside son, por ejemplo, la vacuna con parvovirus canino comercialmente disponible Nobivac Parvo C (Intervet Schering-Plough Animal Health).

15 La ventaja de tal planteamiento es, que tales virus tienen un nivel de atenuación incluso mayor que un parvovirus CPV2 que comprende dicha mutación atenuante en la región de no cápside pero un gen de la cápside del serotipo de CPV2 2a, 2b o 2c que codifica Isoleucina en la posición de aminoácido 219 y Glutamina en la posición de aminoácido 386 de la proteína de la cápside.

20 Un fragmento de ADN homólogo de una parte de la región de no cápside de un segundo parvovirus es un fragmento de ADN que tiene la misma función que el fragmento de ADN del parvovirus CPV2 que comprende un gen de la cápside del serotipo de CPV2 2a, 2b o 2c según la invención, pero difiere de ese fragmento de ADN en que lleva una mutación que conduce a un comportamiento atenuado del virus. Simplemente como ejemplo, si un fragmento de ADN comprende una mutación atenuante en un fragmento de ADN entre dos sitios de restricción específicos, y estos dos sitios de restricción también están presentes en la misma localización en un virus que no tiene esa mutación, el fragmento de restricción que lleva la mutación se considerará homólogo al mismo fragmento del virus que no tiene esa mutación.

25 Una forma altamente preferida de esta realización se refiere a un parvovirus CPV2 atenuado vivo según la invención en el que el fragmento de ADN homólogo de dicho segundo parvovirus lleva una mutación atenuante en la región no estructural, en la región desde la posición 2.061 a 2.070 de SEQ ID NO: 1.

30 El gen de la cápside del virus según la invención codifica una proteína de la cápside del serotipo de CPV 2a, 2b o 2c que comprende un aminoácido distinto de Isoleucina en la posición de aminoácido 219 y/o un aminoácido distinto de Glutamina en la posición de aminoácido 386.

35 Otra realización de la presente invención se refiere a vacunas para la protección de animales frente a infección con parvovirus CPV2, en la que tales vacunas comprenden un parvovirus CPV2 atenuado vivo según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Una cantidad adecuada de parvovirus según la invención, para su uso en una vacuna estará en muchos casos dentro del intervalo de 10^3 a 10^9 TCID₅₀, dependiendo del nivel de atenuación y las características de replicación del virus. Una dosis infecciosa del virus que está por debajo de 10^3 TCID₅₀ se considerará en muchos casos que es demasiado baja, puesto que el virus tardará mucho tiempo en replicarse a un nivel suficientemente alto para desencadenar el sistema inmune. Cantidades que superasen el 10^9 TCID₅₀ no serían atractivas, únicamente por razones comerciales.

45 Una dosis muy adecuada estaría en el intervalo de 10^5 a 10^8 TCID₅₀, incluso mejor entre 10^6 a 10^8 TCID₅₀.

50 Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Simplemente como ejemplo; tal vehículo puede ser tan simple como agua estéril o una solución tampón tal como PBS.

55 Las vacunas según la invención se pueden administrar de diversas maneras. Puesto que la vacuna comprende un virus atenuado vivo, muchas maneras de administración, tal como administración oral, intranasal, intramuscular y subcutánea son viables. Una vía de administración preferida es la administración subcutánea.

60 Animales susceptibles a la infección por parvovirus tales como, entre otros gatos y perros son frecuentemente vacunados frente a varias otras enfermedades a la vez. Por lo tanto, sería práctico combinar una vacuna según la invención con un antígeno adicional de un virus o microorganismo patógeno a perros y gatos o información genética codificadora de dicho antígeno.

65

Por tanto, otra realización de la invención se refiere a una vacuna de combinación que comprende una vacuna según la invención y un antígeno adicional de un virus o microorganismo patógeno a animales o información genética codificadora de un polipéptido inmunogénico de dicho virus o microorganismo.

5 El antígeno adicional de un virus o un microorganismo puede ser el virus o microorganismo completo (en una forma atenuada viva o en una forma inactivada) o un polipéptido inmunogénico u otra parte inmunogénica de ese virus o microorganismo tal como, por ejemplo, un (lipo-)polisacárido, capaz de inducir una respuesta inmune protectora.

10 Preferiblemente, el virus o microorganismo patógeno a animales se selecciona entre el grupo de *Ehrlichia canis*, *Babesia gibsoni*, *vogeli*, *rossi*, *Leishmania donovani-complex*, adenovirus canino, coronavirus canino, virus del moquillo canino, *Leptospira interrogans serovar canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *grippotyphosa*, *bratislava*, virus de la hepatitis canina, virus paragripal canino, virus de la rabia, *Hepatozoon canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella bronchiseptica*, virus del Herpes felino, calicivirus felino, panleucopenia felina y *Chlamydomphila felis*.

15 Las vacunas que comprende virus atenuados vivos deben ser almacenadas a baja temperatura, o tienen que estar en una forma liofilizada. Las vacunas liofilizadas se pueden mantener bajo condiciones de enfriamiento moderado o incluso a temperatura ambiente. Con frecuencia, la vacuna se mezcla con estabilizadores, por ejemplo, para proteger a las proteínas propensas a degradación de ser degradadas, para aumentar la semivida de la vacuna, o para mejorar la eficacia de la liofilización. 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 los mismos, y tampones, tales como fosfatos de metales alcalinos.

20 Por lo tanto, preferiblemente, la vacuna (de combinación) según la invención está en una forma liofilizada. Además, la vacuna se puede suspender en un diluyente fisiológicamente aceptable. Tales tampones pueden ser, por ejemplo, agua estéril, un tampón y similares.

No hace falta decir, que los diluyentes y compuestos para la emulsión o estabilización de virus también están incorporados en la presente invención.

30 Además, otra realización de la invención se refiere a métodos para la fabricación de una vacuna (de combinación) según la invención en la que estos métodos comprenden la mezcla de un parvovirus CPV2 atenuado vivo según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Otra realización más de la invención se refiere a parvovirus CPV2 atenuado vivo según la invención para su uso como un medicamento. Más específicamente, esta realización se refiere a parvovirus CPV2 atenuado vivo según la invención para su uso en el tratamiento de la infección por parvovirus.

40 Finalmente, otra realización de la presente invención se refiere a métodos para la preparación de un mutante de parvovirus CPV2 según la invención, en la que dichos métodos comprenden el intercambio en un gen que codifica una proteína de la cápside del serotipo de CPV2 2a, 2b o 2c de un parvovirus canino que ya está atenuado en una parte además de la parte codificadora de la cápside de un fragmento de ADN codificador de al menos parte de la proteína de la cápside de parvovirus que tiene en la posición de aminoácido 219 un codón que codifica Isoleucina y/o que tiene en la posición de aminoácido 386 un codón que codifica Glutamina, por un fragmento de ADN codificador de al menos parte de la proteína de la cápside del parvovirus que tiene en la posición de aminoácido 219 un codón que codifica un aminoácido distinto de Isoleucina y/o que tiene en la posición de aminoácido 386 un codón que codifica un aminoácido distinto de Glutamina.

50 Tal intercambio de ADN se puede hacer usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida, intercambio de fragmentos de restricción y similares. Hay varias maneras de realizar la sustitución de isoleucina 219 una X1 o glutamina 386 una X2. Tales cambios se podrán introducir por síntesis química o PCR seguida de recombinación del fragmento nuevamente sintetizado con ADN vírico.

Ejemplos

55 Ejemplo 1: Producción del Clon de parvovirus canino 630att

Materiales de partida

Virus

60

Virus	Fuente	Sustrato celular	Otra información
Nobivac parvo	Intervet (vial de vacuna Nobivac parvo C)	A72	El virus es una cepa de tipo 2 datada de antes de 1979
Aislado "Jes"	Intervet inc. Millsboro EEUU	CrFK	Virus tipo 2c aislado en EEUU en 2008. La clasificación se realizó por análisis de secuencia de ADN

Cepas de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* JC811 obtenidas a partir del centro de reserva genético de *E. coli* (EEUU) y cepa DL795 (Kramel Biotech UK) se seleccionaron para la propagación de plásmido de clones infecciosos completos.

Síntesis de ADN

La síntesis de ADN a medida se realizó por Eurofins MWG GmbH. El fragmento de ADN sintetizado se suministró en el plásmido de clonación pBluescript.

La construcción del clon 630att de parvovirus canino fue un proceso multietapas y está descrito en el presente documento en sus etapas separadas.

1) Construcción de un clon molecular infeccioso de Nobivac Parvo C (p154att)

El ADN vírico de forma replicativa (RF) se obtuvo a partir de células A72 infectadas con células infectadas por Nobivac Parvo C usando un método de preparación "Hirt" modificado (Parrish y col 1988, *Virology* 166, 293-307). El ADN vírico se digirió con un número de enzimas de restricción y el genoma se ensambló en pBluescript usando metodología de clonación rutinaria. El esquema de clonación está representado en la figura 1 a 4.

El ADN de RF de CPV 154att primero se sometió a "relleno de extremo" usando la ADN polimerasa de T4. A continuación, se digirió el ADN con EcoRI y SpeI. Estas enzimas cortaron una vez en las posiciones 1.099 y 3.459 respectivamente. La digestión dio como resultado tres fragmentos marcados A, B y C en orden de su tamaño. Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel y, a continuación, el fragmento EcoRI/SpeI (fragmento A) se clonó en el plásmido pBluescript que se había preparado por digestión con las mismas enzimas (véase la figura 1). El fragmento terminal EcoRI (fragmento C) del producto de digestión de ADN de RF, a continuación, se clonó en pBluescript digerido con EcoRI y EcoRV para producir pCPV C (véase la figura 2).

Los fragmentos de parvovirus canino A y C se subclonaron juntos dentro del mismo plásmido. Los plásmidos pCPV A y pCPV C se digirieron con SpeI y EcoRI. El inserto de CPV se purificó del pCPV A y la porción de vector se tomó del pCPV C. A continuación, la ligación dio como resultado un plásmido en el que se "reunieron" los fragmentos A y C (véase la figura 3). A continuación, se clonó el fragmento terminal SpeI (fragmento B) del producto de digestión de ADN de RF de CPV dentro del pCPV AC. El plásmido pCPV AC se digirió con SpeI y una enzima HincII que corta dejando un extremo romo. Los fragmentos se ligaron y clonaron. (véase la figura 4).

El plásmido resultante se llamó p154att.

La confirmación de que se había ensamblado un clone completo se consiguió mediante la transfección del ADN del plásmido a las células A72 dando como resultado la producción de virus infecciosos.

Se realizó el análisis de secuencia de ADN del clon del plásmido; se mostró que esta secuencia era idéntica a la determinada a partir del ADN vírico extraído de células infectadas, como se muestra más a continuación.

2) Construcción de 2/2c Híbrido D9

El ADN vírico se obtuvo a partir de tanto células infectadas por Nobivac parvo C como por separado de células infectadas por CPV2c "Jes". Las preparaciones de ADN vírico se digirieron cada una con una única enzima de restricción para producir 2 fragmentos de ADN de cada una. Las digestiones enzimáticas se hicieron de tal manera que el fragmento a la izquierda del genoma de Nobivac y el fragmento a la derecha del genoma de "Jes" compartían >200 pb de secuencia solapante. Los fragmentos del extremo izquierdo de Nobivac y del extremo derecho de "Jes" se separaron, purificaron y mezclaron (Figura 7).

La transfección de las células A72 y CrFK con estos fragmentos solapantes permitió que el virus infeccioso se produjera por recombinación natural. Los virus resultantes se clonaron por dilución limitante y se llamaron 2/2c híbrido D9.

3) Construcción del Clon 630.

El clon 630 se desarrolló a partir del clon de plásmido infeccioso p154att y ADN preparado a partir del 2/2c híbrido D9.

La enzima de restricción PaeI corta el genoma de CPV en dos lugares alrededor de las posiciones 561 y 4.651; los extremos alejados derecho e izquierdo del genoma. Por lo tanto, el plásmido p154att se digirió con PaeI y el fragmento PaeI de alrededor 4 kpb que contenía más del 80 % del genoma se separó del vector y las secuencias terminales y se reemplazó con el obtenido a partir del ADN del 2/2c híbrido D9. El plásmido resultante se llamó p630. Esto está ilustrado en la Figura 5.

Como se predijo, la transfección de las células A72 o CrFK con p630 da como resultado la generación de virus infeccioso, este virus se llama 630.

El virus 2/2c híbrido D9 tipo 630 mantenía un bajo nivel de patogenicidad.

5

4) Construcción del Clon 630att

El virus 630 mostró algunas señales clínicas de bajo nivel cuando se inyectó en perros.

10 Una parte del gen de la cápside se sintetizó químicamente incorporando cambios de aminoácidos observados en Nobivac parvo C pero no se encontró que se diera en cepas de campo. A continuación, este fragmento se substituyó por la misma región en el plásmido p630 para crear el plásmido p630att; esto está ilustrado en la Figura 6.

15 Se sintetizó la secuencia de ADN correspondiente a la de entre las posiciones 3.356 y 4.029 en el genoma de CPV. La secuencia de ADN exacta, proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: 2, se muestra a continuación

```

1   agatctgaga cattgggttt ttatccatgg aaaccaacca taccaactcc
   atggagatat tattttcaat gggatagaac attagtagca tctcatactg
101 gaactagtgg cacaccaaca aatatatacc atggtagaca tccagatgat
   gttcaatttt atactattga aaattctgtg ccagtacact tactaagaac
201 aggtgatgaa tttgctacag gaacattttt ttttgattgt aaaccatgta
   gactaacaca tacatggcaa acaaatagag cattgggctt accaccattt
301 ctaaattctt tgcctcaagc tgaaggagggt actaactttg gttatatagg
   agttcaacaa gataaaagac gtggtgtaac tcaaatggga aatacaaaact
401 atattactga agctactatt atgagaccag ctgaggttgg ttatagtgca
   ccatattatt cttttgaggc gtctacacaa gggccattta aaacacctat
501 tgcagcagga cggggggggag cgcaaacaga tgaaaatcaa gcagcagatg
   gtgatccaag atatgcattt ggtagacaac atggtaaaaa aactaccaca

601 acaggagaaa cacctgagag atttacaat atagcacatc aagatacagg
   aagatatcca gaaggagatt gg
    
```

20 Los sitios de la enzima de restricción Bgl II y XcmI están mostrados en negrita y subrayados.

La secuencia se liberó del plásmido en el que se proporcionó por digestión con Bgl II y XcmI. Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en gel de agarosa y el fragmento de 672 pb se aisló y se purificó.

25 La transfección de las células A72 o CrFK con p630att dio como resultado la generación de virus infeccioso (630att) que cuando se administra a cachorros no da señales clínicas.

En un estudio comparativo, se compararon una vacuna que comprendía el clon 630 y una vacuna que comprendía el clon 630att. Se vacunaron subcutáneamente cinco perros MDA negativos $10^{8.0}$ a $10^{8.3}$ TCID₅₀ del clon 630 por 1 ml.

30 Esto condujo a señales leves a moderadas en todos los perros. El cambio de peso durante el periodo de 5 días fue de -6 % en promedio en los 5 perros, de la siguiente manera a partir de la tabla de a continuación.

	día -1	día +3	día +4	día +5	Cambio	
Clon 630	964	7145	6740	6440	6650	-7
	320	7840	7625	7270	7060	-10
	148	6115	5915	5665	5740	-6
	761	5740	5525	5595	5530	-4
	959	5040	4890	5030	4910	-3
	Media	6376	6139	6000	5978	-6

Se vacunaron subcutáneamente perros MDA negativos $10^{8.0}$ a $10^{8.3}$ TCID₅₀ del Clon 630att por 1 ml.

35

En este grupo, no se observaron síntomas clínicos, aumentos de temperatura, leucopenia, diarrea o vómitos. Además, hubo una ganancia sustancial de peso en este grupo, de la siguiente manera a partir de la tabla de a continuación.

	Ganancia de peso %		
	Días -4 a 0	Días 0 a +7	Días +7 a +14
Grupo 1 630att	7	13	11

Por lo tanto, se concluyó que las vacunas basadas en el clon 630att verdaderamente se comportan atenuadas cuando se comparan con el clon 630, y tienen un excelente perfil de seguridad.

5 **Ejemplo 2: generación de un virus recombinante que tiene una mutación atenuante fuera del gen de la cápside**

10 La cepa 154att se obtuvo a partir de un Nobivac Parvo C comercialmente disponible (Intervet Schering-Plough Animal Health) y la cepa Jess era un aislado de campo de un virus tipo 2c.

Los virus se cultivaron en células de riñón caninas o felinas adherentes (por ejemplo, A72 y CrFK) usando medio M6B8 que contenía suero fetal bovino al 5 %. El ADN de forma replicativa (RF) se preparó a partir de cultivos de célula infectada usando una modificación del método "Hirt" estándar (McMaster y col. 1891).

15 El ADN de RF preparado a partir de la cepa 154att se digirió con la enzima de restricción PstI y los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa. La banda de 3.055 pares de bases (pb) (correspondiente al extremo a la izquierda del CPV) se escindió del gel y se purificó usando columnas de extracción en gel Qiagen Qiaquick. El ADN de RF aislado de las células infectadas por CPV Jess se digirió con la enzima de restricción XmnI. De nuevo se separaron los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa seguido de una purificación de una banda de aproximadamente 2.750 pb (correspondiente al extremo a la derecha del CPV que incluye la secuencia de la cápside) usando columnas de extracción en gel Qiagen Qiaquick.

20 Los fragmentos de 3.055 pb y 2.750 pb purificados de 154att y Jess se combinaron y se sometieron a transfección dentro de células A72 y CrFK en cultivo. Las transfecciones se realizaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con aproximadamente 3 µg de cada fragmento, siguiendo las instrucciones del fabricante.

25 Después de la transfección, las células se sometieron a subcultivo y a seguimiento mediante el ensayo de hemaglutinación (HA). El virus se detectó por HA en el subcultivo 4. La determinación de la secuencia de ADN de los virus híbridos se realizó usando los protocolos de secuenciación de ADN estándares que usan o bien modelos de fragmento de PCR o ADN de RF. El virus se purificó mediante dilución limitante en células caninas o felinas susceptibles adherentes.

30 **Ejemplo 3: Virus recombinante construido a partir del ADN vírico clonado**

35 El virus recombinante se generó a partir de fragmentos clonados. El genoma de la cepa 154att de virus se clonó dentro del vector de clonación estándar pBluescript (Stratagene inc.). Para mantener las secuencias terminales palindrómicas intactas el plásmido se propagó en el hospedador bacteriano DL795 que es defectuoso en un número de sistemas de recombinación.

40 La clonación de genomas de parvovirus se ha descrito en la bibliografía y las técnicas requeridas son conocidas por algunos expertos en la técnica.

45 El clon de 154att obtenido (p154att) se digirió con la enzima de restricción Pac I de manera que no se permitió que la digestión llegara a finalización, es decir, la digestión de la enzima de restricción era solamente parcial. A continuación, los fragmentos digeridos se sometieron a digestión con la enzima de restricción Xmn I. A continuación, los fragmentos de ADN digeridos se separaron por electroforesis en gel de agarosa y el fragmento indicado en el diagrama de más adelante se escindió del gel y se purificó usando columnas de extracción en gel Qiagen Qiaquick. Los sitios Pac a la derecha y Xmn I flanquean la región de la cápside en el genoma de parvovirus. El gen de la cápside de 154att se reemplazó por el gen de la cápside de una cepa virulenta de CPV como sigue. El sitio Xmn I y el Pac I a la derecha indicados en la figura 8 caen fuera de las fronteras del gen de la cápside. La secuencia de aproximadamente 110 pb entre el sitio Pac I y el extremo del gen de la cápside difiere significativamente entre la cepa 154att y los aislados virulentos. Hasta ahora no hay cambios de secuencia registrados en la secuencia corta (-55 pb) entre el sitio Xmn I y el comienzo del gen de la cápside. Por lo tanto, para limitar el intercambio de material justo a la secuencia de la cápside; se sintetizó químicamente la secuencia de la cápside de CPV virulenta y se mantuvo la secuencia específica a vacuna entre el sitio PacI y la señal de parada de la cápside.

55 A continuación, se muestra la secuencia químicamente sintetizada que contiene el gen de la cápside de CPV. La secuencia como se muestra a continuación se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 3.

60

ES 2 623 149 T3

AGAGGCAGACCTGAGAGCCATCTTTACTTCTGAACAATTGGAAGAAGATTTTTCGAGA

Xmn I

CGACTTGGATTAAGGTACGATGGCACCTCCGGCAAAGAGAGCCAGGAGAGGTAAGGGTGT
GTTAGTAAAGTGGGGGGAGAGGAAAGATTTAATAACTTAACTAAGTATGTGTTTTTTTTAT
AGGACTTGTGCCTCCAGGTTATAAATATCTTGGGCCTGGGAACAGTCTTGACCAAGGAGA
ACCAACTAACCCCTTCTGACGCCGCTGCAAAAAGAACACGACGAAGCTTACGCTGCTTATCT
TCGCTCTGGTAAAACCCATACTTATATTTCTCGCCAGCAGATCAACGCTTTATAGATCA
AACTAAGGACGCTAAAGATTGGGGGGGAAAATAGGACATTATTTTTTTTAGAGCTAAAA
GGCAATTGCTCCAGTATTAAGTACGATACACCAGATCATCCATCAACATCAAGACCAACAAA
ACCAACTAAAAGAAGTAAACCACCACCTCATATTTTCATTAATCTTGCAAAAAAAAAAAAA
AGCCGGTGCAGGACAAGTAAAAAGAGACAATCTTGCACCAATGAGTGATGGAGCAGTTCA
ACCAGACGGTGGTCAACCTGCTGTCAGAAATGAAAGAGCAACAGGATCTGGGAACGGGTC
TGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTTCGGGGGTGTGGGGATTCTACGGGTACTTTCAATAA
TCAGACGGAATTTAAATTTTTGGAAAACGGATGGGTGAAAATCACAGCAAACCTCAAGCAG
ACTTGTACATTTAAATATGCCAGAAAGTAAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAATAATTT
GGATAAACTGCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAGATGATACTCATGCACAAATTGTAAC
ACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTAATCCAGGAGATTGGCA
ACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGTTAGTTTGAACAAGAAATTTTTAA
TGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAA
TGATTTAACTGCATCATTGATGGTTGCATTAGATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCC
AGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATAACCAACTCC
ATGGAGATATTATTTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAAGTAGTGG
CACACCAACAAATATATACCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGA
AAATTCCTGTGCCAGTACACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTT
TTTTGATTGTAACCATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAATAGAGCATTGGGCTT
ACCACCATTTCTAAATTTTGCCTCAAGCTGAAGGAGGTACTAAGTTTGGTTATATAGG
AGTTCAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAACTATATTAAGTGA
AGCTACTATTATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTATAGTGCACCATATTATCTTTTGGAGGC
GTCTACACAAGGGCCATTTAAAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGGAGCGCAAACAGA
TGAAAATCAAGCAGCAGATGGTGATCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAA

AACTACCACAACAGGAGAAACACCTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATACAGG
 AAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCAAAATATTAACCTTAACTTTCCTGTAACAGAAGA
 TAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAACATACTAATAT
 ATTTAATACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGG
 TCAAATTTGGGATAAAGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACC
 ATTTGTTTGTCAAAATAATTGTCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAAC
 AAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGAATTGTAACCTACTCAGATTT
 TTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCC
 AATTCAACAAATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGG
 AGGTATGAAAATTGTATATGAAAATCTCAGCTAGCACCTAGAAAATTATATTAACATAC
 TTACTATGTTTTTATGTTTTATTACATATCAACTAACACCTAGAAAATTATATTAATATAC
 TTACTATGTTTTTATGTTTTATTACATATTATTTTAAGATTAATTAAGGCGCGCC

PacI

Los sitios Xmn I y Pac I están indicados y subrayados. El codón de parada (TAA) de la región codificadora de la cápside La secuencia codificadora de la cápside (Vp1/Vp2) está en negrita.

5 El fragmento sintetizado se liberó del plásmido en el cual se proporcionó usando las enzimas Xmn I y Pac I, a continuación, se ligó al fragmento mostrado en la Figura 9. La *E. coli* (cepa DL795) competente se transformó con la mezcla de ligación usando protocolos estándares y bacterias portadoras de los plásmidos recombinantes aislados y purificados. A continuación, el plásmido resultante p1542c ilustrado más adelante (Figura 10) se preparó a partir de la *E. coli* clonada.

10 El virus híbrido se preparó como sigue. El ADN del plásmido p1542c se sometió a transfección dentro de células A72 o CrFK en cultivo. Las transfecciones se realizaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con aproximadamente 3 microgramos de ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la transfección, las células se sometieron a subcultivo y a seguimiento mediante ensayo de hemaglutinación (HA). El virus se detectó por HA en el subcultivo 4. La determinación de la secuencia de ADN de los virus híbridos se realizó usando protocolos de secuenciación de ADN estándares que usan o bien modelos de fragmento de PCR o ADN de RF. El virus se purificó por dilución limitante en células caninas o felinas susceptibles adherentes.

20 Leyenda de las figuras.

- Figura 1: Construcción de pCPV A
- Figura 2: Construcción de pCPV C
- Figura 3: Construcción de pCPV AC
- Figura 4: Construcción de pCPV 154att
- 25 Figura 5: Construcción de p630
- Figura 6: Construcción de p630att
- Figura 7: representación esquemática del método de recombinación natural (no GM) de obtención de un aislado de virus híbrido 2/2c. Dos fragmentos solapantes de la vacuna tipo 2 y el virus de campo tipo 2c se sometieron a transfección dentro de células y virus aislados después de la recombinación homóloga.
- 30 Figura 8: representación esquemática del clon de plásmido infeccioso de la cepa de CPV 154att que muestra los sitios de enzima de restricción Pac I y Xmn I. Los recuadros sombreados ilustran las secuencias palíndromo terminales.
- Figura 9: esquema que muestra el producto seleccionado de la digestión parcial Pac I/Xmn I que se seleccionó para la manipulación adicional.
- 35 Figura 10: plásmido que contiene el ADN del virus de vacuna 154att en el que el gen de la cápside está sustituido por una secuencia de la cápside de CPV2c virulenta.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> Intervet International B.V.
- <120> Parvovirus atenuado vivo
- <130> 2010.016

ES 2 623 149 T3

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 5003
 <212> ADN
 <213> parvovirus

10 <400> 1

```

atcaatgttt agaaccaact gaccaagttc acgtacgtat gacgtgatga cgcgcgctgc      60
gcgcgctgcc tacggcagtc acacgtcata cgtacgctcc ttggtcagtt ggttctaag      120
aatgataggc ggtttgtgtg tttaaacttg ggcgggaaaa ggtggcgggc taattgtggg      180
cgtggttaaa ggtataaaaag acaaaaccata gaccgttact gacattcgct tcttgtcttt      240
gacagagtga acctctctta ctttgactaa ccatgtcttg caaccagtat actgaggaag      300
ttatggaggg agtaaatggg ttaaagaaac atgcagaaaa tgaagcattt tcgtttgttt      360
ttaaagtga caacgtccaa ctaaatggaa aggatgttcg ctggaacaac tataccaaac      420
caattcaaaa tgaagagcta acatctttaa ttagaggagc acaaacagca atggatcaaa      480
ccgaagaaga agaaatggac tgggaatcgg aagttgatag tctcgccaaa aagcaagtac      540
aaacttttga tgcattaatt aaaaaatgtc tttttgaagt ctttgtttct aaaaatatag      600
aaccaaatga atgtgtttgg tttattcaac atgaatgggg aaaagatcaa ggctggcatt      660
gtcatgtttt acttcatagt aagaacttac aacaagcaac tggtaaattg ctacgcagac      720
aatgaatat gtattggagt agatggttgg tgactctttg ttcggtaaac ttaacaccaa      780
ctgaaaagat taagctcaga gaaattgcag aagatagtga atgggtgact atattaacat      840
acagacataa gcaaacaaaa aaagactatg ttaaaatggt tcattttgga aatatgatag      900
catattactt tttaacaaag aaaaaaattg tccacatgac aaaagaaagt ggctattttt      960
taagtactga ttctggttgg aaatttaact ttatgaagta tcaagacaga caaattgtca     1020
gcacacttta cactgaacaa atgaaaccag aaaccgttga aaccacagtg acgacagcac     1080
aggaacaaaa gcgcgggaga attcaaaacta aaaaggaagt gtcaatcaaa tgtactttgc     1140
gggacttggg tagtaaaaga gtaacatcac ctgaagactg gatgatgtta caaccagata     1200
gttatattga aatgatggca caaccaggag gtgaaaatct ttaaaaaaat acacttgaaa     1260
tttgtacttt gactttagca agaacaaaaa cagcatttga attaatactt gaaaagcag     1320
ataatactaa actaactaac tttgatcttg caaattctag aacatgtcaa atttttagaa     1380
tgcacggatg gaattggatt aaagtttgc acgctatagc atgtgtttta aatagacaag     1440
gtggtaaaaag aaatacagtt ctttttcatg gaccagcaag tacaggaaaa tctatcattg     1500
ctcaagccat agcacaagct gtgggtaatg ttggttgta taatgcagca aatgtaaatt     1560
ttccatttaa tgactgtacc aataaaaatt taatttgat tgaagaagct ggtaactttg     1620
gtcaacaagt taatcaattt aaagcaattt gttctggaca aacaattaga attgatcaaa     1680
aaggtaaagg aagtaagcaa attgaaccaa ctccagtaat tatgacaact aatgaaaata     1740
taacaattgt gaggattgga tgtgaagaaa gacctgaaca tacacaacca ataagagaca     1800
gaatgttgaa cattaagtta gtatgtaagc ttcaggaga ctttggtttg gttgataaag     1860
  
```

ES 2 623 149 T3

aagaatggcc tttaatatgt gcatggtag ttaaacatgg ttatgaatca accatggcta 1920
actatacaca lcattgggga aaagtaccag aatgggatga aaactyggcg gagcctaaa 1980
tacaagaagg tataaattca ccaggttga aagacttaga gacacaagcg gcaagcaatc 2040
ctcagagtca agaccaagtt cacgtacgta tgactccgga cgtagtggac cttgcaactgg 2100
aacctgtggag tactocagat acgocattg cagaaactgc aaatcaacaa tcaaccaaac 2160
ttggcggttac tcacaagac gtgcaagcga gtccgacgtg gtccgaaata gaggcagacc 2220
tgagagccat otttacttct gaacaattgg aagaagattt tcgagacgac ttggattaag 2280
gtacgatggc acctccgga aagagagcca ggagaggtaa ggggtgtgta gtaaagtggg 2340
gggagaggaa agatttaata acttaactaa gtatgtgitt ttttatagga cttgtgcctc 2400
caggttataa atatcttggg cctgggaaca gtcttgacca aggagaacca actaacctt 2460
ctgacgccgc tgcaaaagaa cacgacgaag cttacgctgc ttatcttcgc tetggtaaaa 2520
accatactt atatttttcg ccagcagatc aacgctttat agatcaaac aaggacgcta 2580
aagattgggg ggggaaaata ggacattatt ttttagago taaaaaggca attgctccag 2640
tattaactga tacaccagat catccatcaa catcaagacc aacaaaacca actaaaagaa 2700
gtaaacacc acctcatatt ttcacatc ttgcaaaaa aaaaaagcc ggtgcaggac 2760
aagtaaaaag agacaatctt gcaccaatga gtgatggagc agttcaacca gacgggtggtc 2820
aacctgctgt cagaaatgaa agagctacag gatctgggaa cgggtctgga ggcgggggtg 2880
gtggtggttc tgggggtgtg gggatttcta cgggtacttt caataatcag acggaattta 2940
aatttttggg aaacggatgg gtggaatca cagcaaacctc aagcagactt gtacatttaa 3000
atatgccaga aagtgaaaat tatagaagag tggttgtgaa taatatggat aaaactgcag 3060
ttaacggaaa catggcttta gatgatattc atgcacaaat tgtaaacacct tggtcattgg 3120
ttgatgcaaa tgcttgggga gtttggttta atccaggaga ttggcaacta attgtaata 3180
ctatgagtga gttgcattta gttagtttg aacaagaaat ttttaatggt gttttaaga 3240
ctgtttcaga atctgctact cagccacca ctaaagttta taataatgat ttaactgcat 3300
cattgatggt tgcattagat agtaataata ctatgccatt tactccagca gctatgagat 3360
ctgagacatt gggtttttat ccatggaaac caaccatacc aactccatgg agatattatt 3420
ttcaatggga tagaacatta gtaccatctc atactggaac tagtggcaca ccaacaata 3480
tataccatgg tacagatcca gatgatgttc aattttatac tattgaaaat tctgtgccag 3540
tacacttact aagaacaggt gatgaatttg ctacaggaac attttttttt gattgtaaac 3600
catgtagact aacacataca tggcaacaa atagagcatt gggcttacca ccatttetaa 3660
attctttgcc tcaatctgaa ggagctacta actttggtga tataggagt caacaagata 3720
aaagacgtgg tgtaactcaa atgggaaata caaactatat tactgaagct actattatga 3780
gaccagctga ggttggttat agtgcaccat attattcttt tgagacgtct acacaagggc 3840
catttaaac acctattgca gcaggacggg ggggagcgca aacagatgaa aatcaagcag 3900
cagatggtaa tccaagatat gcatttggtg gacaacatgg taaaaaaact accacaacag 3960
gagaacacc tgagagattt acatataag cacatcaaga tacaggaaga tatccagaag 4020
gagattggat tcaaaatatt aactttaacc ttctgtaac aaatgataat gtattgctac 4080
caacagatcc aattggaggt aaaacaggaa ttaactatac taatatattt aatacttatg 4140
gtcctttaac tgcattaaat aatgtaccac cagtttatcc aaatggtaaa atttgggata 4200
aagaatttga tactgactta aaaccaagac ttcattgtaa tgcaccattt gtttgcataa 4260

ES 2 623 149 T3

ataattgtcc tggccaatta ttgtaaaag ttgcgcctaa ttaacaaat gaatatgatc 4320
ctgatgcac tgctaatatg tcaagaattg taacttactc agatttttgg tggaaaggta 4380
aattagtatt taaagctaaa ctaagagcct ctcatacttg gaatccaatt caacaaatga 4440
gtattaatgt agataaccaa ttaactatg taccaagtaa tattggaggt atgaaaattg 4500
tatatgaaaa atctcaacta gcacctagaa aattatatta acatacttac tatgttttta 4560
tgtttattac atatcaacta acacctagaa aattatatta atatacttac tatgttttta 4620
tgtttattac atattatfff aagattaatt aaattacagc atagaaatat tgtacttgta 4680
tttgatatag gatttagaag gtttgttata tggatataca taactgtaag aatagaaga 4740
acatttagat catagttagt agtttgtfff ataaaatgta ttgtaaacta ttaatgtatg 4800
ttgttatggt gtgggtggtt ggttggtttg cccttagaat atgttaagga ccaaaaaaa 4860
tcaataaaag acatttaaaa ctaaattggc tcgtatactg tctataaggt gaactaacct 4920
taccataagt atcaatctgt ctttaagggg ggggtgggtg ggagatgcac aacatcagta 4980
gactgactgg cctggttggt tgc 5003

5 <210> 2
<211> 672
<212> ADN
<213> parvovirus

<400> 2

agatctgaga cattgggttt ttatccatgg aaaccaacca taccaactcc atggagatat 60
tattttcaat gggatagaac attagtacca tctcatactg gaactagtgg cacaccaaca 120
aatatatacc atggtacaga tccagatgat gttcaatfff atactattga aaattctgtg 180
ccagtacact tactaagaac aggtgatgaa ttgtctacag gaacattfff ttttgattgt 240
aaacatgta gactaacaca tacatggcaa acaaatagag cattgggctt accaccattt 300
ctaaattctt tgcctcaagc tgaaggaggt actaactttg gttatatagg agttcaacaa 360
gataaaagac gtggtgtaac tcaaatggga aatacaaaact atattactga agctactatt 420
atgagaccag ctgaggttgg ttatagtgca ccatattatt cttttgaggc gtctacacaa 480
gggccattta aaacacctat tgcagcagga cgggggggag cgcaaacaga tgaaaatcaa 540
gcagcagatg gtgatccaag atatgcattt ggtagacaac atggtaaaaa aactaccaca 600
acaggagaaa cacctgagag atttacatat atagcacatc aagatacagg aagatatoca 660
gaaggagatt gg 672

10
15 <210> 3
<211> 2451
<212> ADN
<213> parvovirus

<400> 3

ES 2 623 149 T3

agaggcagac ctgagagcca tctttacttc tgaacaattg gaagaagatt ttcgagacga	60
cttggattaa ggtacgatgg cacctccggc aaagagagcc aggagaggta aggggtgtgtt	120
agtaaagtgg ggggagagga aagatttaat aacttaacta agtatgtgtt tttttatagg	180
acttgtgcct ccaggttata aatatcttgg gcctgggaac agtcttgacc aaggagaacc	240
aactaacctt tctgacgccg ctgcaaaaga acacgacgaa gcttacgctg cttatcttcg	300
ctctggtaaa aaccatact tatatcttc gccagcagat caacgcttta tagatcaaac	360
taaggacgct aaagattggg gggggaaaat aggacattat ttttttagag ctaaaaggc	420
aattgctcca gtattaactg atacaccaga tcatccatca acatcaagac caacaaaacc	480

ES 2 623 149 T3

```

aactaaaaga agtaaaccac cacctcatat ttccattaat cttgcaaaaa aaaaaaaagc      540
cgggtgcagga caagtaaaa gagacaatct tgcaccaatg agtgatggag cagttcaacc      600
agacgggtggt caacctgctg tcagaaatga aagagcaaca ggatctggga acgggtctgg      660
aggcgggggt ggtgggtggt ctgggggtgt ggggatttct acgggtactt tcaataatca      720
gacggaattt aaatTTTTGG aaaacggatg ggtggaaatc acagcaaaact caagcagact      780
tgtacattta aatatgccag aaagtgaaaa ttatagaaga gtggttgtaa ataatttggga      840
taaaactgca gttaacggaa acatggcttt agatgatact catgcacaaa ttgtaacacc      900
ttggtcattg gttgatgcaa atgcttgggg agtttggttt aatccaggag attggcaact      960
aattgttaat actatgagtg agttgcattt agttagtttt gaacaagaaa tttttaatgt    1020
tgTTTTaaag actgtttcag aatctgctac tcagccacca actaaagttt ataataatga    1080
tttaactgca tcattgatgg ttgcattaga tagtaataat actatgccat ttactccagc    1140
agctatgaga tctgagacat tgggttttta tccatggaaa ccaaccatac caactccatg    1200
gagatattat tttcaatggg atagaacatt aataccatct catactggaa ctagtggcac    1260
accaacaaat atataccatg gtacagatcc agatgatggt caatTTTata ctattgaaaa    1320
ttctgtgcca gtacacttac taagaacagy tgatgaattt gctacaggaa cattTTTTTT    1380
tgattgtaaa ccatgtagac taacacatac atggcaaaaca aatagagcat tgggcttacc    1440
accatttcta aattcTTTTc ctcaagctga aggaggTact aactttggtt atataggagt    1500
tcaacaagat aaaagacgtg gtgtaactca aatgggaaat acaaaactata ttactgaagc    1560
tactattatg agaccagctg aggttgggta tagtgacca tattattctt ttgaggcgtc    1620
tacacaaggg ccatTTaaaa cacctattgc agcaggacgg gggggagcgc aacagatga    1680
aaatcaagca gcagatggtg atccaagata tgcatttggg agacaacatg gtcaaaaaac    1740
taccacaaca ggagaaacac ctgagagatt tacatatata gcacatcaag atacaggaag    1800
atatccagaa ggagattgga ttcaaaatat taactTTaac ctctctgtaa cagaagataa    1860
tgtattgcta ccaacagatc caattggagg taaaacagga attaactata ctaatatatt    1920
taatacttat ggtcTTTTaa ctgcattaaa taatgtacca ccagtttata caaatggtca    1980
aatttgggat aaagaatttg atactgactt aaaaccaaga ctctcatgtaa atgcaccatt    2040
tgTTTgtcaa aataattgtc ctggtcaatt atttgtaaaa gttgcgccta atttaacaaa    2100
tgaatatgat cctgatgcat ctgctaatat gtcaagaatt gtaacttact cagatttttg    2160
gtggaaggtt aaattagtat ttaaagctaa actaagagcc tctcactatt ggaatccaat    2220
tcaacaaatg agtattaatg tagataacca atttaactat gtaccaagta atattggagg    2280
tatgaaaatt gtatatgaaa aatctcagct agcaoctaga aaattatatt aacatactta    2340
ctatgTTTTt atgtttatta catatcaact aacacctaga aaattatatt aatatactta    2400
ctatgTTTTt atgtttatta catattttt taagattaat taaggcgcgc c                2451

```

5 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> parvovirus
 <400> 4

ES 2 623 149 T3

Tyr Phe Gln Trp Asp Arg Thr Leu Val Pro Ser His Thr Gly Thr Ser
1 5 10 15

Gly

5 <210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> parvovirus

<400> 5

Tyr Ala Phe Gly Arg Gln His Gly Lys Lys Thr Thr Thr Thr Gly Glu
1 5 10 15

10 Thr

REIVINDICACIONES

1. Parvovirus CPV2 atenuado vivo, **caracterizado por que** dicho CPV2 comprende un gen de la cápside de los serotipos 2a, 2b o 2c de CPV2 que codifica un aminoácido distinto de Isoleucina en la posición de aminoácido 219 de la proteína de la cápside y/o un aminoácido distinto de Glutamina en la posición de aminoácido 386 de la proteína de la cápside, y **caracterizado por que** un fragmento de ADN de una parte de la región de no cápside de dicho CPV2 está reemplazado por un fragmento de ADN homólogo de una parte de la región de no cápside derivado de un segundo parvovirus, en donde dicho fragmento de ADN homólogo de dicho segundo parvovirus lleva una mutación atenuante.
2. El CPV2 atenuado vivo según la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho CPV2 comprende un gen de la cápside que codifica un aminoácido distinto de Isoleucina en la posición de aminoácido 219 de la proteína de la cápside y un aminoácido distinto de Glutamina en la posición de aminoácido 386 de la proteína de la cápside.
3. El CPV2 atenuado vivo según la reivindicación 2, **caracterizado por que** dicho CPV2 comprende un gen de la cápside que codifica una Valina en la posición de aminoácido 219 de la proteína de la cápside y/o una Lisina en la posición de aminoácido 386 de la proteína de la cápside.
4. El parvovirus CPV2 atenuado vivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** dicho fragmento de ADN homólogo de dicho segundo parvovirus lleva una mutación atenuante en la región no estructural, en la región desde la posición 2.061 a 2.070 de la SEQ ID NO: 1.
5. Vacuna para la protección de animales frente a infección con parvovirus CPV2, **caracterizada por que** dicha vacuna comprende un parvovirus CPV2 atenuado vivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Vacuna de combinación para la protección de animales frente a patógenos, **caracterizada por que** dicha vacuna de combinación comprende una vacuna según la reivindicación 5 y un antígeno adicional de un virus o de un microorganismo patógeno a animales o información genética codificadora de una proteína inmunogénica de dichos virus o microorganismo.
7. Vacuna de combinación según la reivindicación 6, **caracterizada por que** dichos virus o microorganismo patógeno a animales se seleccionan entre el grupo que consiste en *Ehrlichia canis*, *Babesia gibsoni*, *vogeli*, *rossi*, *Leishmania donovani-complex*, adenovirus canino, coronavirus canino, virus del moquillo canino, *Leptospira interrogans serovar canicola*, *icterohaefraorrhagiae*, *pomona*, *grippotyphosa*, *bratislava*, virus de la hepatitis canina, virus paragripal canino, virus de la rabia, *Hepatozoon canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella bronchiseptica*, virus del Herpes felino, calicivirus felino, panleucopenia felina y *Chlanrydophila felis*.
8. Método para la fabricación de una vacuna según la reivindicación 5 o una vacuna de combinación según las reivindicaciones 6 o 7, **caracterizado por que** dicho método comprende la mezcla de un parvovirus CPV2 atenuado vivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. El parvovirus CPV2 atenuado vivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como medicamento.
10. El parvovirus CPV2 atenuado vivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de infección por parvovirus.
11. Método para la preparación de un mutante del parvovirus CPV2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el método comprende la etapa de alteración en un gen que codifica una proteína de la cápside de los serotipos 2a, 2b o 2c de CPV2 de un parvovirus canino que ya está atenuado en una parte distinta de la parte codificadora de la cápside mediante técnicas de ADN recombinante de un codón en la posición de aminoácido 219 que codifica Isoleucina y/o un codón en la posición de aminoácido 386 que codifica Glutamina, en un codón en la posición de aminoácido 219 que codifica un aminoácido distinto de Isoleucina y/o un codón que codifica un aminoácido distinto de Glutamina en la posición de aminoácido 386.
12. Método para la preparación de un mutante del parvovirus CPV2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el método comprende el intercambio en un gen que codifica una proteína de la cápside de los serotipos 2a, 2b o 2c de CPV2 de un parvovirus canino que ya está atenuado en una parte distinta de la parte codificadora de la cápside de un fragmento de ADN codificador de al menos parte de la proteína de la cápside del parvovirus que tiene en la posición de aminoácido 219 un codón que codifica Isoleucina y/o que tiene en la posición de aminoácido 386 un codón que codifica Glutamina, por un fragmento de ADN codificador de la misma parte de la proteína de la cápside del parvovirus que tiene ahora en la posición de aminoácido 219 un codón que codifica un aminoácido distinto de Isoleucina y/o que tiene en la posición de aminoácido 386 un codón que codifica un aminoácido distinto de Glutamina.

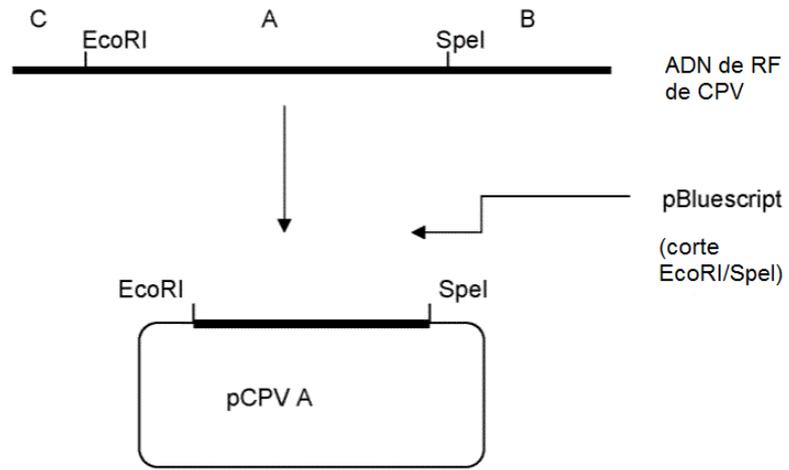


Figura 1

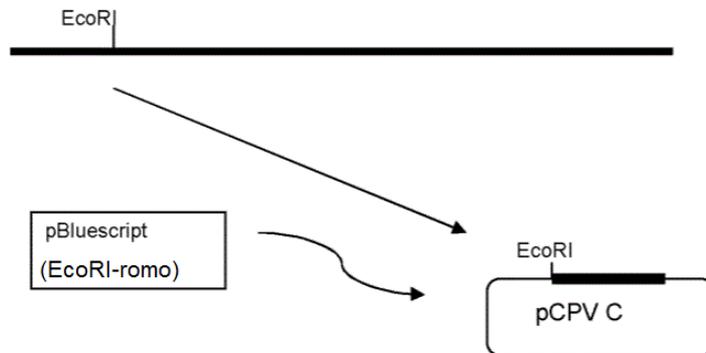


Figura 2

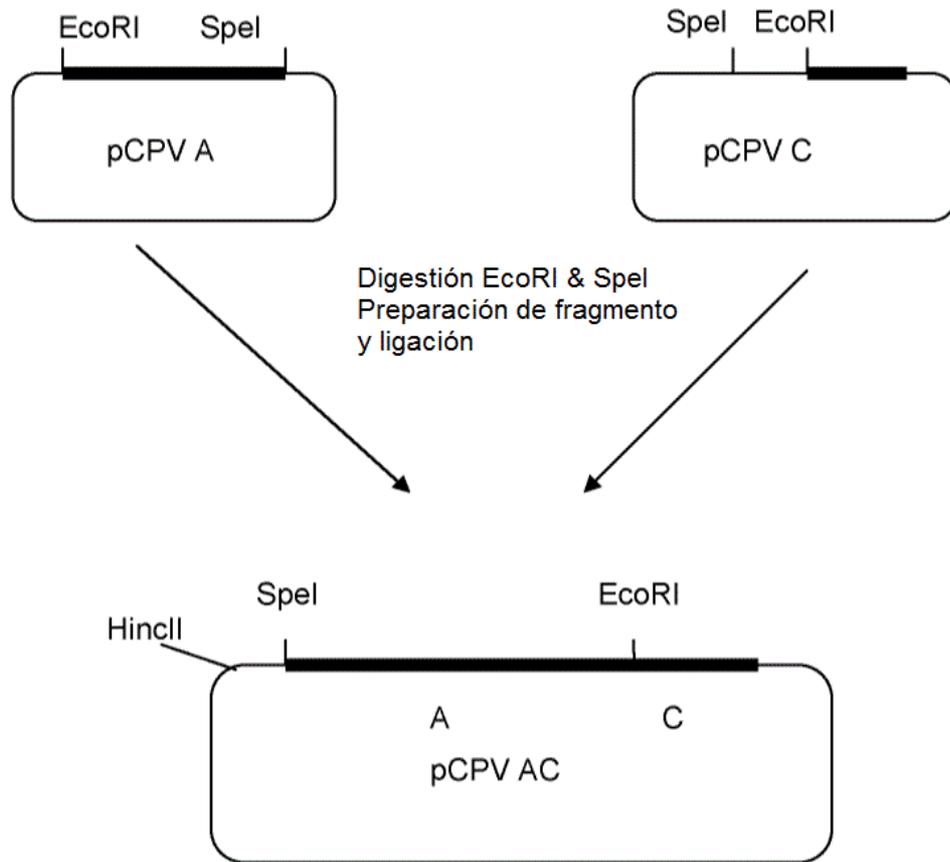


Figura 3

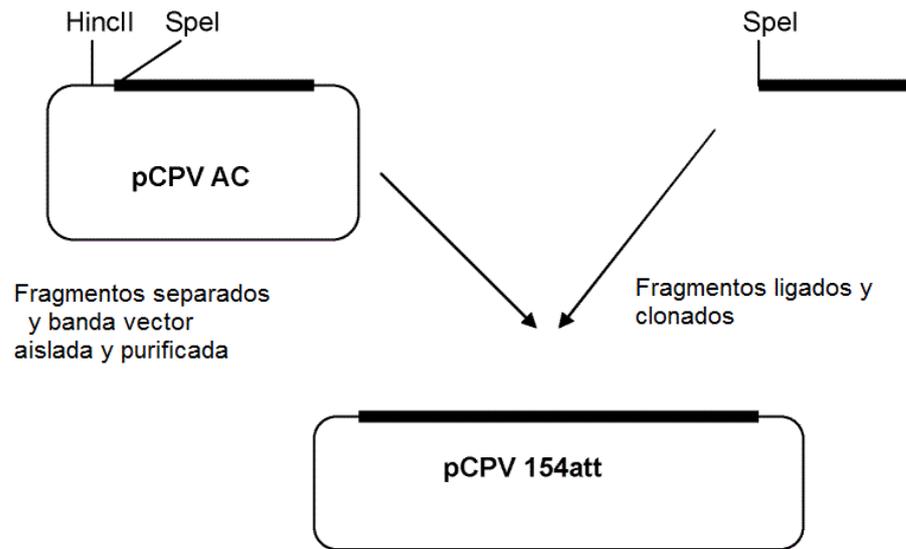


Figura 4

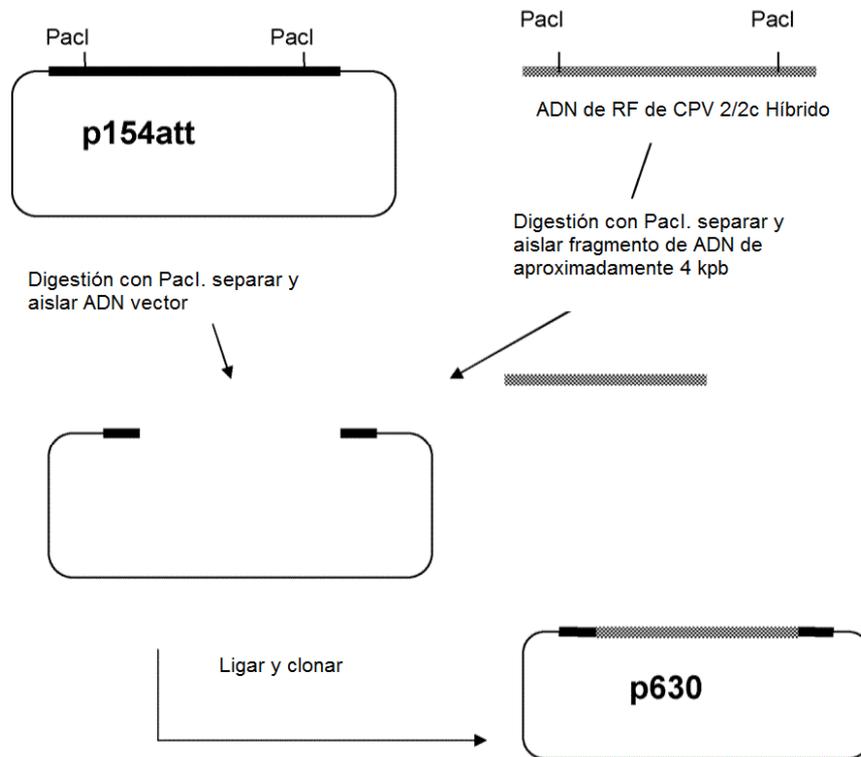


Figura 5

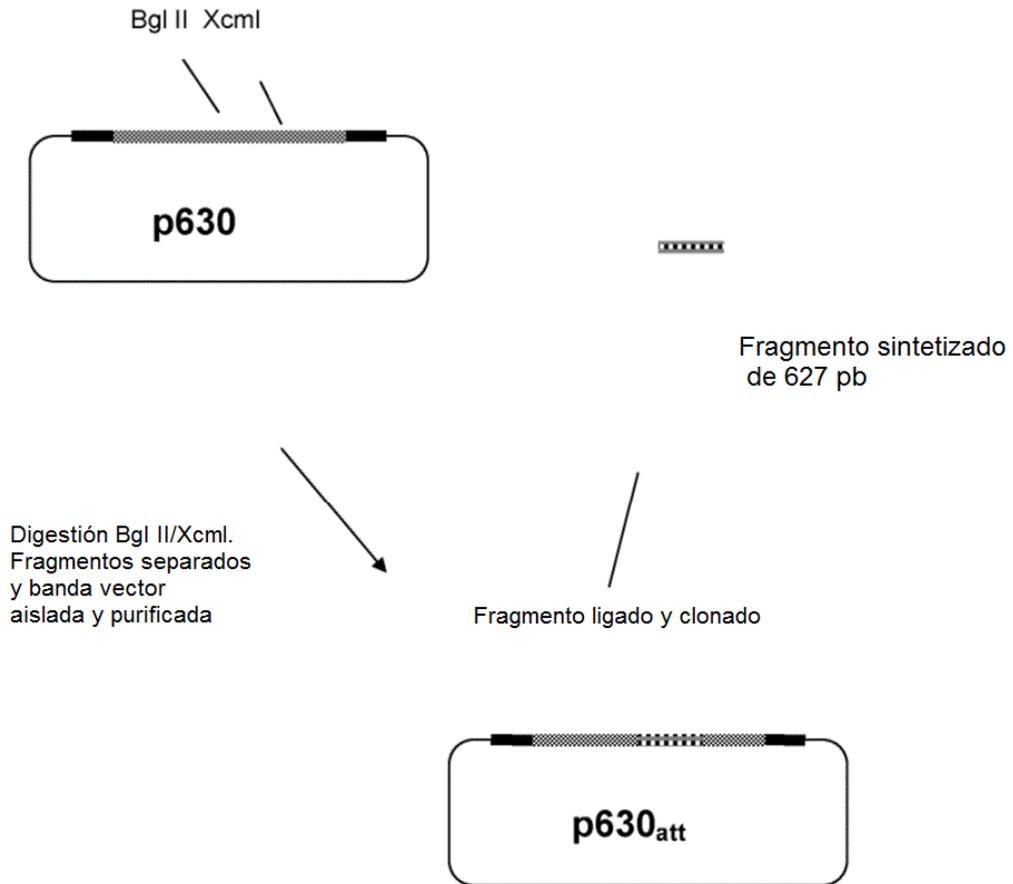


Figura 6

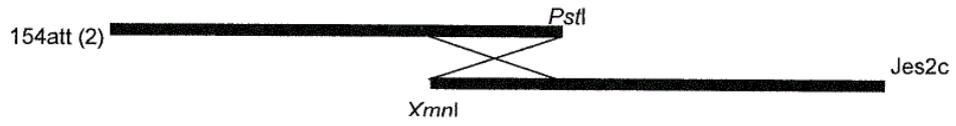


Figura 7

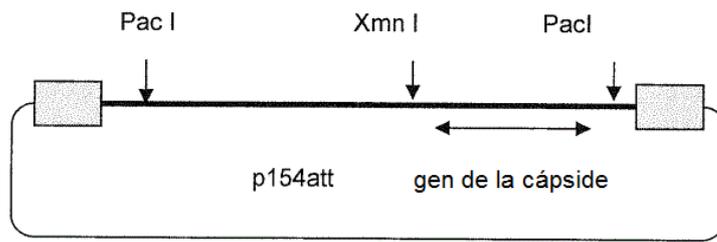


Figura 8

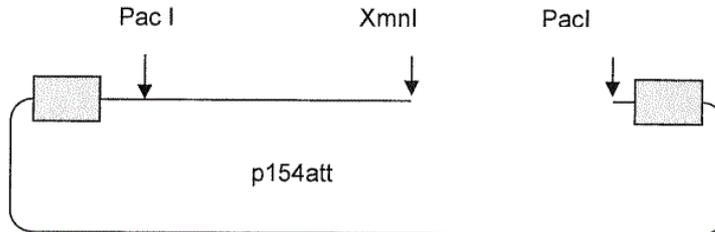


Figura 9

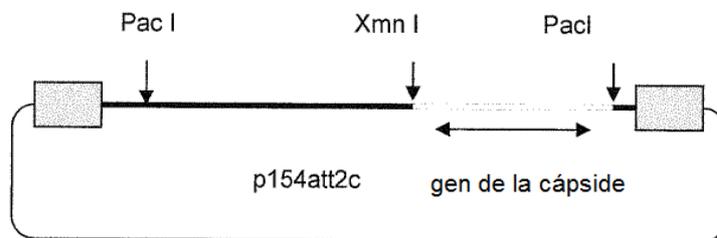


Figura 10