

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 622**

51 Int. Cl.:

A61K 39/23	(2006.01)
C12N 7/00	(2006.01)
C12Q 1/70	(2006.01)
A61P 31/20	(2006.01)
G01N 33/569	(2006.01)
C07K 14/005	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2009 PCT/US2009/056930**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2010 WO10033486**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2009 E 09815049 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2331117**

54 Título: **Vacunas que contienen variantes genéticas de parvovirus canino**

30 Prioridad:

16.09.2008 US 211174

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

19.01.2018

73 Titular/es:

**THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA
STATE UNIVERSITY (100.0%)
Oklahoma State University 203 Whitehurst
Stillwater, OK 74078, US**

72 Inventor/es:

**KAPIL, SANJAY y
COOPER, EMILY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 650 622 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

Vacunas que contienen variantes genéticas de parvovirus canino

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La invención por lo general se refiere a formulaciones de vacuna de parvovirus canino (CPV) mejoradas y ensayos de diagnóstico. En particular, la invención proporciona formulaciones de vacuna de CPV mejoradas y ensayos de diagnóstico que comprenden variantes de CPV dominantes de nueva aparición que circulan en la actualidad en poblaciones caninas.

15 Antecedentes de la invención

20 El parvovirus canino (CPV) es principalmente un patógeno entérico que infecta a los perros, especialmente a los perros jóvenes. La infección por parvovirus se caracteriza por diarrea aguda, fiebre y leucopenia en perros y cachorros de más de 4 a 5 semanas de vida y enfermedad miocárdica en cachorros más jóvenes. La tasa de mortalidad por la enfermedad en perros no vacunados es muy alta. Aunque hay disponibilidad de vacunas contra el CPV, dado que el CPV es un virus de ADN monocatenario y tiene una capacidad extrema de mutar, el virus muestra una notable capacidad de variar antigénicamente y de ese modo eludir la protección inmunológica proporcionada por las vacunas. Por lo tanto, es necesario un control constante del tipo antigénico y del genotipo del agente causal.

25 El CPV se aisló por primera vez en 1978 y se denominó "CPV-2" para distinguirlo del virus del parvovirus diminuto canino (CMV o CPV-1). Generalmente se cree que el CPV-2 es una variante genética del virus de la panleucopenia felina (FPV) o del virus entérico del visón (MEV) y está genética y antigénicamente muy relacionado con los parvovirus que infectan a visones, zorros, mapaches y otros carnívoros. La cápside del CPV contiene un genoma de ADN monocatenario de aproximadamente 5200 bases con solo dos marcos de lectura abiertos, aunque al menos cuatro proteínas están codificadas debido a un corte y empalme de ARNm alternativo. La cápside del parvovirus está formada por dos proteínas virales (VP), VP1 y VP2, siendo VP2 la principal proteína de la cápside inmunitaria del parvovirus. Una variante genética del aislado del CPV original se identificó en 1979-1980 y se denominó CPV tipo 2a. A mediados de la década de 1980, se identificó otra variante, tipo 2b, y desde entonces, los tipos 2a y 2b parecen haber desplazado completamente al CPV-2 original. Las vacunas actuales están dirigidas solo contra las variantes 2a y 2b, pero la variante 2a ya no se detecta en Estados Unidos. Para una revisión del descubrimiento y evolución del CPV, véase Parrish y Kawaoka, 2005.

35 CPV-2b se diferencia de CPV-2a solo en dos posiciones de aminoácidos: Asn-426 en 2a (codificado por AAT) es Asp en 2b (codificado por GAT) e Ile-555 en 2a es Val en 2b. El cambio de Ile-555 a Val es en realidad una reversión a la secuencia original de tipo 2. Parecía que los tipos antigénicos CPV-2a y 2b eran relativamente estables durante varios años. Sin embargo, en 2000 se describió una variante "2c" en la que la posición 426 está codificada con Glu por GAA (la posición 555 sigue siendo Val). La variante 2c ha sido informada en Italia (Buonavoglia *et al.*, 2001), Vietnam (Nakamura *et al.*, 2001) y otros países, incluyendo España (Nakamura *et al.*, 2004; Decaro *et al.*, 2006), pero hasta ahora no ha habido informes confirmados de la variante 2c en Estados Unidos, y las vacunas de CPV no se han actualizado para incluir las variantes de este tipo. Esto es de especial importancia porque, a diferencia de las variantes descritas anteriormente que infectan principalmente a cachorros, CPV2c tiene la capacidad de infectar a perros adultos. Además, la secuencia de una variante 2b con variaciones de codón en las posiciones 494 y 572 se presentó en GenBank (gi: 54646340) en 2003 y fue informada por Shackleton *et al.*, en 2005 (Proceedings National Academy Sciences 102: 379-384), pero no se propusieron alteraciones en la vacuna de CPV o las composiciones de diagnóstico basadas en las secuencias de este tipo. Esto se puede deber en parte a la naturaleza de las mutaciones, que son "silenciosas" con respecto a los aminoácidos codificados, es decir, la secuencia de aminoácidos traducida de 2b y la variante 2b con variaciones del codón en las posiciones 494 y 572 son las mismas. Sin embargo, los estudios recientes con respecto al sesgo del codón (Enserink, 2008. Science 320: 1709; Coleman 2008, Science 320: 1784-87) muestran que el sesgo del codón puede ser una herramienta evolutiva muy importante de los organismos. Enserink afirma que "... muchos organismos, incluidos los virus, tienen un sesgo hacia ciertos codones en sus genes. Esto puede deberse a que esos codones son más fáciles de traducir en los ribosomas ... lo que acelera la producción de proteínas ...". Por lo tanto, para combatir enfermedades con éxito para las que los virus son el agente etiológico, es aconsejable controlar continuamente las variantes de reciente aparición e incluir variantes prevalentes en preparaciones de vacunas nuevas y actualizadas, incluso si los cambios que se detectan no dan como resultado un cambio en una secuencia de aminoácidos traducida.

60 Aparecen varios problemas cuando las vacunas no se actualizan. En primer lugar, incluso los perros vacunados pueden ser susceptibles de infección por variantes de CPV que no están incluidas en la vacuna. En segundo lugar, cuando los perros vacunados enferman, sus dueños frecuentemente afirman que las cepas virales en la vacuna causaron la enfermedad. Frecuentemente esto ha dado como resultado el pago de una compensación a los propietarios, ya que no existe una forma práctica para que la compañía de vacunas proporcione evidencias al contrario.

Se han propuesto varias preparaciones de vacuna de CPV:

Los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 4.193.990 y 4.193.991 de Appel *et al.*, describen vacunas de virus heterotípico e inactivado ("muerto"), respectivamente, en los que la vacuna a modo de ejemplo proporcionaba contra el CPV original.

El documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.303.645 de Carmichael *et al.*, describe una vacuna que comprende un CPV atenúa lo producido mediante pasaje en serie prolongado del virus en líneas de células no oncogénicas. La vacuna a modo de ejemplo también protege contra el aislado de CPV original.

Tanto el documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.971.793 de Wood *et al.*, como el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.882.652 de Valdes *et al.*, describen vacunas de subunidad recombinante que comprenden la proteína VP-2 del CPV producida en baculovirus recombinante. La proteína VP-2 no es de tipo o subtipo especificado.

El documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.885.585 de Parrish *et al.*, describe una vacuna de CPV que comprende una forma atenuada de una variante 2b.

El documento WO2008/157236 se refiere a vacunas de parvovirus canino y diagnósticos y métodos para su uso.

Truyen *et al.*, *Veterinary Microbiology* 117 (2006) 9-13 se refiere a la evolución del parvovirus canino y la necesidad de nuevas vacunas.

El documento WO2008/032796 desvela una vacuna para infección por el virus del moquillo canino, infección por el tipo 2 de adenovirus canino o infección por el parvovirus canino, que se puede administrar por vía oral.

Debido a la capacidad del virus CPV para mutar y desarrollar nuevas variantes antigénicas, existe una necesidad en desarrollo de controlar la conformación genética de variantes de CPV y de desarrollar vacunas y ensayos de diagnóstico que reflejen las variantes de CPV actuales.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona vacunas actualizadas para prevenir la infección por CPV, y métodos de diagnóstico para detectar variantes de CPV nuevas y de reciente aparición. Las vacunas y métodos de diagnóstico se basan en el descubrimiento de variantes de CPV desconocidas y no apreciadas previamente, y tienen en cuenta a la aparición de formas mutantes del virus para las que las formulaciones de vacuna y diagnósticos anteriores no son adecuadas. Las vacunas de la presente invención proporcionan protección frente a formas de reciente aparición de CPV, y los diagnósticos proporcionan la capacidad para detectar las formas recién evolucionadas del virus, de las cuales ambas capacidades no estarán disponibles previamente. En particular, las nuevas variantes raras son útiles como variantes de "marcador" en vacunas. El uso de la variante de marcador hace posible las investigaciones forenses con respecto a si o no los síntomas de la enfermedad en un animal vacunado con la variante de marcador están causados por la vacuna, o por otra cepa de CPV.

Las nuevas formulaciones de vacuna incluyen CPV atenuado completo con ADN monocatenario que tiene las características que se definen en las reivindicaciones:

2bΔ494Δ572 es una variante 2b de CPV que contiene al menos los siguientes cambios: el codón que codifica la posición 494 de la proteína VP2 es TGC en lugar de TGT, y el codón que codifica la posición 572 de la proteína VP2 es GTC en lugar de GTA. Estos cambios no dan como resultado cambios de aminoácidos (tanto TGC como TGT codifican cisteína y tanto GTC como GTA codifican valina). Sin embargo, esta variante produce enfermedad en animales que ya se han vacunado previamente con vacunas convencionales, disponibles en la actualidad y se deberían incorporar en nuevas formulaciones de vacuna. Aunque previamente se describieron cambios en las posiciones 494 y 572, no se observaron. Además, este aislado americano puede contener otras mutaciones. La secuencia de 2b se presenta en la SEQ ID NO: 1.

2bΔ431Δ494Δ572 (también denominado "2bΔ431" en el presente documento) es una variante rara 2b de CPV recién descubierta (por ejemplo, una variante 2bΔ494Δ572) en la que la posición 431 que codifica el codón de la proteína VP2 es CTG en lugar de CTA. Aunque este cambio tampoco da como resultado un cambio de aminoácidos, esta variante sin embargo también produce enfermedad en animales vacunados y se puede incorporar en nuevas formulaciones de vacuna. De forma significativa, debido a su escasez, 2bΔ431 representa una secuencia de "marcador" de vacuna ideal. La secuencia de 2bΔ431 se presenta en la SEQ ID NO: 2.

2bΔ426Δ484Δ494Δ546Δ572 (también denominado "2bΔ426Δ484Δ546" en el presente documento) es una variante 2b de CPV recién descubierta (es decir una variante 2bΔ494Δ572) que contiene los mismos cambios que 2bΔ494Δ572 y, además, tiene cambios en las posiciones 426, 484 y 546. La posición 426 está codificada por GAC (en lugar de GAT), la posición 484 está codificada por GTG (en lugar de GTA) y la posición 546 está codificada por

AAC (en lugar de AAT). Estos cambios no dan como resultado cambios de aminoácidos (tanto GAC como GAT codifican asparagina, tanto GTG como GTA codifican valina, y tanto AAC como AAT codifican asparagina. Sin embargo, esta nueva variante, que se aisló de animales que previamente se habían vacunado con vacunas convencionales, disponibles en la actualidad, es muy citopática y se debería incorporar en nuevas formulaciones de vacuna, y se puede utilizar como una vacuna de marcador como se describe a continuación. La secuencia de 2bΔ426Δ484Δ546 se presenta en la SEQ ID NO: 6.

La variante 2c americana (o de Estados Unidos) es la primera variante 2c aislada en Estados Unidos y es la variante 2c predominante (81 %). Esta variante también se denomina "variante 2c principal" o "2c americana principal". La secuencia de esta variante se presenta en la SEQ ID NO: 3.

2cΔ440 (también mencionado en el presente documento es una variante 2c de CPV recién descubierta en la que la posición 440 que codifica el codón de la proteína VP2 es GCA, en lugar de ACA, lo que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos de treonina (ACA) por alanina (GCA) en esta posición. Esta variante produce enfermedad en animales vacunados y se debería incorporar en nuevas formulaciones de vacuna. En la actualidad esta variante es una variante secundaria (19 %) y en el presente documento también se denomina "variante 2c secundaria" o "2c Americana Secundaria". La secuencia de esta variante se presenta en la SEQ ID NO: 4.

2cΔ430Δ440, una variante adicional de 2cΔ440, que, además de contener GCA en el codón para la posición 440, también varía de las secuencias 2c conocidas por que tiene la leucina en la posición 430 codificada por TTA en lugar del TTG habitual. La secuencia de 2cΔ430Δ440 se presenta en la SEQ ID NO: 5.

Todas estas variantes de CPV se detectaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se aislaron en cultivo celular a partir de perros infectados con CPV y/o sus cachorros que ya se habían vacunado contra CPV usando vacunas comerciales convencionales. Por lo tanto, estas variantes de reciente aparición son capaces de escapar de la vigilancia inmunológica en perros vacunados de acuerdo con los protocolos actuales, tanto si la variación cambia (por ejemplo, 2cΔ440 di 2cΔ430Δ440 en parte) como si no cambia (por ejemplo, 2bΔ494Δ572, 2bΔ431, 2bΔ426Δ484Δ546) en la secuencia de aminoácidos de la proteína VP2 en las posiciones indicadas. Además, las técnicas de diagnóstico disponibles en la actualidad para uso en campo no detectan las nuevas variantes de CPV y reaccionan escasamente, lo que conduce a una disminución de la sensibilidad. La presente invención resolver estos problemas proporcionando vacunas y diagnósticos que tienen en cuenta las nuevas variantes.

En el presente documento también se enseña un método para propagar el canino parvovirus, en particular las variantes descritas en el presente documento, que no producen un efecto citopático (CPE) o que solamente producen un CPE leve, cuando se cultivan solo en células CRFK. El método comprende la etapa de cultivo del parvovirus canino en una mezcla de células de riñón felino de Crandall Reese (CRFK) y células Vero en un medio adecuado. La etapa de cultivo se realice en condiciones que permiten que el parvovirus canino se propague a titulaciones más elevadas que las alcanzadas cuando el CPV se cultiva solo en células CRFK.

La invención también proporciona una vacuna de parvovirus que comprende una o más variantes de CPV como se presenta en las reivindicaciones. El nivel de neutralización de la una o más variantes de CPV es al menos 4 veces menor que el nivel de neutralización de una o más variantes de CPV seleccionadas el grupo que consiste en CPV-2, CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c, como se determina usando suero de un animal vacunado con una vacuna que comprende una o más variantes de CPV, CPV-2, CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c. En algunas realizaciones, los niveles de neutralización se determinan mediante un ensayo de neutralización de suero y se expresan como título de neutralización.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Secuencia 2bΔ494Δ572 a modo de ejemplo (la secuencia de ácidos nucleicos presentada en la SEQ ID NO: 1) en la que el codón para la posición 494 es TGC y el codón para la posición 572 es GTC. Se muestra la secuencia de ácidos nucleicos que codifica los aminoácidos a 572 de la proteína VP2.

Figura 2. Una secuencia 2bΔ431 a modo de ejemplo (la secuencia de ácidos nucleicos presentada en la SEQ ID NO: 2) en la que el codón para la posición 431 es CTG. Se muestra la secuencia de ácidos nucleicos que codifica los aminoácidos 426 a 572 de la proteína VP2.

Figura 3. Se muestra la secuencia de ácidos nucleicos que codifica los aminoácidos 426 a 572 (la secuencia de ácidos nucleicos presentada en la SEQ ID NO: 3) de la proteína 2c VP2 americana principal.

Figura 4. Una secuencia 2cΔ440 (2c americana secundaria) a modo de ejemplo (la secuencia de ácidos nucleicos presentada en la SEQ ID NO: 4) en la que el codón para la posición 440 es GCA en lugar de ACA, que codifica alanina en lugar de treonina. Se muestra la secuencia de ácidos nucleicos que codifica los aminoácidos 426 a 572 de la proteína VP2.

Figura 5. Una secuencia 2cΔ430Δ440 a modo de ejemplo (la secuencia de ácidos nucleicos presentada en la SEQ ID NO: 5).

Figura 6. Supuesta estructura plegada asociada con la variante 2c (SEQ ID NO: 7).

Figura 7. Supuesta estructura plegada asociada con la variante 2bΔ431 (SEQ ID NO: 8).

Figura 8. Supuesta estructura plegada asociada con la variante 2cΔ430Δ440 (SEQ ID NO: 9).

Figura 9. Una secuencia 2bΔ426Δ484Δ494Δ546Δ572 (la secuencia de ácidos nucleicos presentada en la SEQ ID NO: 6).

5

Descripción detallada de las realizaciones

Preferentes de la invención

10 La presente invención proporciona vacunas y diagnósticos de CPV, cuyas composiciones incluyen variantes recién descubiertas que reflejan las tendencias evolutivas de CPV. Cada una de las variantes se aisló de un perro que ya se había vacunado para CPV, pero que sin embargo contrajo CPV puso enfermo. Por lo tanto, para detener o limitar la propagación de CPV, estas nuevas variantes se prevén incorporar en protocolos de vacunas. Además, como se describe con detalle a continuación, la identificación de estas variantes ha conducido al descubrimiento de una región hipervariable en el genoma del CPV.

15

El descubrimiento de las variantes que se describe en el presente documento ha conducido la identificación de una región hipervariable (HPV) fundamental del genoma del CPV. En el pasado, solamente se habían considerado importantes los nucleótidos en las posiciones 1276 a 1277. Sin embargo, los descubrimientos epidemiológicos que se describen en el presente documento han mostrado que la región de HPV crítica cae realmente casi en la parte media del genoma del CPV desde la posición 1275-1326 del gen de VP2 completo. Esta región de HPV incluye al menos dos codones hipervariables críticos, los codones 426 y 440 del gen VP2. Preferentemente, la región hipervariable comprende la región que comienza un nucleótido antes del codón 426 al codón 440. Sin quedar ligado por la teoría, es probable que la significancia biológica de esta región de HPV esté relacionada con la estabilidad termodinámica de las estructuras que son formadas por la secuencia, como se discute con más detalle a continuación.

20

25

Las seis variantes son las que siguen a continuación:

30 1) 2bΔ494Δ572 es una variante 2b de CPV en la que el codón para la posición 494 de la proteína VP2 es TGC en lugar de TGT y el codón para la posición 572 de la proteína VP2 es GTC en lugar de GTA. Ninguna de estas mutaciones producen un cambio en los aminoácidos codificados (Cys en la posición 494 y Val en la posición 572) y esta secuencia se han descrito anteriormente. Sin embargo, previamente no se observó que estos cambios permitieran que el virus evitara la eliminación inmunológica en los hospedadores vacunados con las vacunas disponibles en la actualidad, como se describe en el presente documento. Esta variante se representa en la Figura 1, en la que se muestra una parte de los aminoácidos 426 a 500 32 que codifican un gen 2b (es decir 426 = GAT) de VP2. Los dos codones mutantes (494 y 572) se muestran en letra negra y subrayada.

35

40 2) 2bΔ431 es una variante 2b de CPV rara que contiene un cambio de CTA a CTG en la posición 431 que codifica el codón. El aislado de 2bΔ431 original también incluía las mutaciones 2bΔ494Δ572 y por lo tanto es 2bΔ431Δ494Δ572. Sin embargo, la invención incluye cualquier secuencia de CPV (2a, 2b o 2c) que incluya CTG en la posición 431 codificante del codón de la proteína VP2. Esta mutación no da como resultado un cambio de aminoácidos (tanto CTA como CTG codifican Leu) pero, debido a su escasez, 2bΔ431 representa una secuencia de "marcador" de vacuna ideal para fines forenses. Este aspecto de la invención se discute con detalle a continuación. Esta variante se representa en la Figura 2, en la que se muestra una parte de los aminoácidos 426 a 572 que codifican el gen 2b (es decir 426 = GAT) de VP2. Tres codones mutantes (431, 494 y 572) se muestran en letra negra y subrayada.

45

3) 2c americano es la primera variante 2c aislada en Estados Unidos. La aparición significativa de esta variante no se observó previamente (véase la Figura 3).

50 4) 2cΔ440 es una variante 2c de CPV en la que el codón para la posición 440 de la proteína VP2 es GCA, en lugar de ACA. Esta mutación da como resultado un cambio de aminoácido de Thr por Ala en la posición 440. Además, este mutante también se aisló a partir de un perro vacunado previamente que sin embargo enfermó con CPV. Por lo tanto con esta secuencia variante se debería incorporar en nuevas preparaciones de vacuna y de diagnóstico de CPV. Esta variante se representa en la Figura 4, en la que se muestra una parte de los aminoácidos 426 a 572 que codifica el gen 2c de VP2 (es decir 426 = GAA). El codón mutante (440) se muestra en letra negra y subrayada. Los codones 494 y 572 están subrayados para referencia.

55

5) 2cΔ430Δ440, una variante adicional de 2cΔ440, que, además de contener GCA en el codón para la posición 440, también varía de las secuencias 2c conocidas por tener la leucina en la posición 430 codificada por TTA en lugar de el TTG habitual. Esta variante se representa en la Figura 5.

60 6) 2bΔ426Δ484Δ494Δ546Δ572 es una variante de 2bΔ494Δ572 que contiene cambios adicionales en las posiciones 426, 484 y 546. La posición 426 está codificada por GAC en lugar de GAT, la posición 484 está codificada por GTG (en lugar de GTA) y la posición 546 está codificada por AAC (en lugar de AAT). Aunque estos cambios no dan como resultado cambios de aminoácidos (en las variantes, la posición 426 es asparagina, la posición 484 es valina y la posición 546 es asparagina, esta nueva variante es extremadamente citopática y se debería incorporar en nuevas formulaciones de vacuna. Aunque este aislado tiene la misma secuencia de aminoácidos que CPV-2b, el codón GAC en la posición 426 es extremadamente raro, y esté aislado también se puede usar como una vacuna de marcador forense, como se describe a continuación.

65

La Tabla 1 proporciona un resumen de los cambios de la secuencia en estas variantes.

Tabla 1. Codones asociados con aminoácidos críticos de la proteína VP2 en variantes actuales de CPV en Estados Unidos

Variante y SEQ ID NO:	Posición del aminoácido y codón asociado							
	426	430	431	440	484	494	546	572
2bΔ494Δ572 SEQ ID NO: 1	GAT	TTG	CTA	ACA	GTA	TGC*	AAT	GTC*
2bΔ431Δ494Δ572 ("2bΔ431") SEQ ID NO: 2	GAT	TTG	CTG*	ACA	GTA	TGC*	AAT	GTC*
2bΔ426Δ484Δ494Δ546Δ572 ("2bΔ426Δ484Δ546") SEQ ID NO: 6	GAC *	TTG	CTA	ACA	GTG*	TGC*	AAC*	GTC*
2c Americano ("2c Americano Principal") SEQ ID NO: 3	GAA	TTG	CAT	ACA	GTA	TGT	AAT	GTA
2cΔ440 ("2c Americano Secundario") SEQ ID NO: 4	GAA	TTG	CAT	GCA*	GTA	TGT	AAT	GTA
2cΔ430Δ440 SEQ ID NO: 5	GAA	TTA*	CAT	GCA*	GTA	TGT	AAT	GTA
* indica un codón mutante								

5 Aunque los cambios en las posiciones 494 y 572 se describieron previamente, el predominio y las características de reciente aparición de esta variante no se observaron previamente. Todas las variantes que se describen en el presente documento se aislaron de perros (o sus descendientes) que ya habían sido vacunados contra el CPV pero que enfermaron y murieron por CPV. Aunque las variantes se identificaron por primera vez en el sur-centro de Estados Unidos, también se cree que son responsables de informes esporádicos de enfermedades por parvovirus resistentes a vacuna en perros en otras partes de Estados Unidos. En la actualidad, la variante 2c detectada previamente en todos los continentes excepto Australia y África, se ha detectado en 14 estados (Alabama, Arizona, Arkansas, California, Delaware, Florida, Illinois, Kansas, New Jersey, Missouri, Oregón, Oklahoma, Carolina del Sur y Texas). Dado el historial de rápida diseminación de variantes de CPV previamente conocidas, una o más de estas variantes se deberían incluir inmediatamente en vacunas en todo el mundo para detener la propagación de estas iteraciones más recientes del virus. Además, los ensayos y métodos de diagnóstico de CPV se deberían reformular para tener en cuenta estas variantes de reciente aparición.

20 Como se describe en la sección de Ejemplos, el inicio de los síntomas de enfermedad y muerte en los perros vacunados para los que se aislaron las variantes de CPV de la invención fue extremadamente rápido, lo que indica la presencia de mutantes de escape resistentes que no son disuadidos por una respuesta del sistema inmunológico a los tipos de CPV que están incluidos en las vacunas actuales. Esto era cierto no solo para 2cΔ440, que produce un cambio en la secuencia primaria de la proteína VP, sino también para 2cΔ431, 2bΔ494Δ572, que no contienen cambios de aminoácidos en las regiones estudiadas. La importancia de los cambios del codón 2bΔ494Δ572 no ha sido reconocida hasta el momento, y hasta donde saben los inventores, hasta ahora no ha habido ninguna propuesta para ajustar las composiciones de vacunas y diagnósticos de CPV para que incluyan o tengan en cuenta estas variantes de reciente aparición, como se describe en el presente documento. Además, 2cΔ440, 2bΔ431 y 2bΔ426Δ484Δ546 son nuevos mutantes que no se han descrito anteriormente.

30 Parece que estas variaciones proporcionan una ventaja de supervivencia para el virus. Sin quedar limitados por la teoría, es posible que las secuencias mutantes confieran una ventaja al virión o al propio ADN en algún estadio del ciclo de vida viral (por ejemplo, protección contra nucleasas del hospedador, transcripción y/o traducción más rápida o más eficaz, que podría, por ejemplo, dar como resultado diferentes patrones de plegamiento de proteínas; un empaquetado más rápido o más eficaz en la partícula del virión, etc.). Por ejemplo, las secuencias mutantes pueden conferir una ventaja en términos de la termodinámica del desplegamiento cuando la ADN polimerasa replica el ADN de CPV. Las Figuras 6-8 representan las estructuras plegadas de la región hipervariable de CPV2c, CPV2bΔ431, y CPV2cΔ430Δ440, respectivamente, que se describen con más detalle en el Ejemplo 3.

40 Una variante de CPV de reciente aparición, satisfactoria tal como CPV2cΔ430Δ440 se puede usar como virus de estimulación para verificar el valor de las preparaciones de vacunas comerciales en condiciones experimentales. La mayoría de las versiones anteriores de CPV2a y CPV2b no son altamente patógenas para los perros, y el nuevo CPV2c no se ha estudiado. Debido a la falta de un modelo de estimulación altamente virulento, hasta ahora no ha sido posible para las compañías de vacunas evaluar de forma adecuada la capacidad de las preparaciones de vacunas para conferir protección a los animales vacunados. . En el presente documento se enseña un método para

hacer lo mencionado exponiendo a los animales vacunados a la variante altamente virulenta CPV2cΔ430Δ440, y evaluando si la vacuna protege contra la enfermedad.

5 Para cada una de las variantes que se describen en el presente documento, la invención incluye preparaciones de vacunas y diagnósticos que incluyen una o más de las variantes, y métodos de uso de las mismas. Las preparaciones y diagnósticos de este tipo incluyen la nueva variante 2bΔ426Δ484Δ546. Las preparaciones y diagnósticos de este tipo pueden incluir además 2bΔ494Δ572 y/o 2c americano, y/o otras secuencias conocidas de CPV, tales como las que ya están incluidas en las vacunas actuales. Además, otros virus recientemente aislados con nuevas secuencias, en particular con nuevas secuencias de aminoácidos, pueden ser o no adecuados para su inclusión en una nueva vacuna. En general, la decisión de incluir un nuevo campo aislado se basa en la capacidad de las vacunas existentes para provocar respuestas neutralizantes al campo aislado en un animal vacunado, y en parte en la prevalencia de la variante. Si una nueva variante está extendida, se debería determinar su importancia antigénica. Una medida de esto es la distancia antigénica. La distancia antigénica total de un aislado de CPV en particular se puede determinar sometiendo a ensayo el aislado usando un ensayo funcional, tal como el título de neutralización del suero y/o un ensayo de hemaglutinación y/o un ensayo de anticuerpos de fluorescencia indirecta. Si, de acuerdo con uno o más ensayos, un aislado presenta una neutralización escasa en comparación con las variantes virales que ya están en la vacuna (es decir, si el nivel de neutralización del nuevo aislado heterólogo es más de 4 veces menor que el nivel de neutralización o de variantes que ya están en la vacuna), entonces se puede justificar el desarrollo de una nueva vacuna que incluya al nuevo aislado. Por ejemplo, cuando se aísla una nueva variante de CPV, la distancia antigénica total se puede calcular con un ensayo de neutralización en suero, y los resultados se expresan como un título de neutralización. El título de neutralización es el inverso de la dilución más alta del suero de un animal vacunado en el que la neutralización es completa evidenciado por la falta de efecto citopático (CPE) o presencia de virus. Si el suero de perros vacunados con una vacuna de CPV existente da, por ejemplo, un título de SN de 1:4000 con un virus homólogo y un título de 1:200 con un nuevo aislado de CPV heterólogo, entonces el nuevo aislado probablemente se debería incluir en una vacuna de CPV. En otras palabras, si la vacuna actual no protege contra una variante común y extendida que no está en la vacuna actual, entonces la variante se puede incluir con cuidado en una nueva preparación de vacuna. Si el aislado se localiza en un área geográfica pequeña, entonces una vacuna personalizada o autógena puede ser más adecuada que una vacuna comercial diseñada para uso generalizado. Los resultados también se deberían confirmar con experimentos de protección de estimulación. En experimentos de protección de estimulación, los animales se vacunan y a continuación se exponen a dosis moderadas (por ejemplo, 10.000 TCID₅₀, es decir una mediana de dosis infecciosa de cultivo tisular) de una variante que se usa como virus de estimulación. Si la vacuna proporciona protección contra la variante, entonces no es necesario incluir la variante en las composiciones de vacuna. Sin embargo, si un animal vacunado no está protegido de la variante, la variante se puede incluir en preparaciones de vacuna. Además, durante el proceso de vacunación, no es necesario incluir todas las cepas o variantes en la misma inyección. Puede ser preferente, por ejemplo, administrar al cachorro una dosis que contenga una variante a las 3 semanas de edad, una dosis que contenga una variante diferente a las 7 semanas, y una dosis que contenga otra variante más a las 10 semanas. Esto se produce en contraste con la práctica actual, en la que las mismas variantes se administran para las tres dosis para cachorros. Este procedimiento actual adolece del inconveniente de que la inmunidad existente desarrollada en respuesta a una vacunación anterior puede neutralizar los virus entrantes de CPV administrados en vacunaciones posteriores, lo que hace que las vacunas posteriores sean de poca o ninguna utilidad. Es de destacar que es bien sabido que algunos patógenos virales pueden infectar múltiples especies. En el caso del CPV, se sabe que los virus felinos y de visón también infectan a los perros. Aunque la inclusión de los virus de este tipo en una vacuna canina de CPV no es aconsejable, estos virus felinos y de visón se deberían incluir en experimentos de estimulación de animales vacunados.

En particular, la variante 2bΔ426Δ484Δ546 es útil en la preparación de vacunas adecuadas para rastreo y detección forense. Como se ha descrito anteriormente, las vacunas actuales cada vez más hallan en la protección de los animales vacunados contra el CPV de nueva aparición. Los propietarios de los animales que enferman después de la vacunación tienden a culpar a la propia vacuna por causar la enfermedad. Debido a que los métodos de diagnóstico actuales son inadecuados para diferenciar entre cepas de vacunas y cepas de reciente aparición, los fabricantes de vacunas no tienen una defensa práctica contra tales acusaciones y frecuentemente solucionan tales reclamaciones haciendo una compensación a los dueños de los animales. Este proceso es muy costoso para los fabricantes de vacunas. Además, la proximidad del codón 431 al codón 426 y su ubicación en la región hipervariable del genoma del CPV también permite que solo se realice una secuenciación limitada para verificar la fuente del agente causante del CPV en un perro enfermo. Esto se podría evitar incorporando las mutaciones 2bΔ426Δ484Δ546 en una o más de las cepas de vacuna que se usan para formular vacunas. 2bΔ426Δ484Δ546 es extremadamente raro, por ejemplo 2bΔ426Δ484Δ546 se ha detectado en una sola variante. Por lo tanto, cuando se somete a ensayo tejido de un animal enfermo que ha sido vacunado con una variante 2bΔ426Δ484Δ546 para CPV, si se detecta cualquier cepa de CPV distinta a 2bΔ426Δ484Δ54, puede concluir con seguridad que la vacuna no causó la enfermedad. Por el contrario, las otras cepas detectadas fueron las posibles culpables. Además, estas mutaciones se podrían detectar sin secuenciación extensa. Este tipo de investigación forense podría proporcionar importantes ahorros a las compañías de vacunas.

65 En el presente documento se enseñan preparaciones de vacuna que comprenden secuencias de ácidos nucleicos aisladas representadas por las SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 y/o proteínas, polipéptidos o péptidos codificados por

5 esas secuencias, y métodos de su uso. Además, también están incluidas las vacunas con ciertas variaciones de estas secuencias. Aunque las secuencias representan ADN monocatenario (ss), la invención también incluye el ADN correspondiente bicatenario (ds), ADN complementario y ARN de cualquier forma (por ejemplo, ARNm, híbridos de ARN/ADN, etc.) que se basa en, se obtiene a partir de o que complementa estas secuencias. Las secuencias de este tipo pueden ser secuencias sentido o antisentido. Además, las secuencias que presentan una identidad de al menos aproximadamente un 50 %, preferentemente una identidad de aproximadamente un 60 %, más preferentemente de aproximadamente un 70, 80, o 90 %, o una identidad de aproximadamente un 95, 96, 97, 98 o un 99 % o superior con las SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 también se contemplan para su uso en las vacunas. Las secuencias de este tipo pueden diferir, por ejemplo, al contener codones alternativos que codifican el mismo aminoácido en una o más posiciones. Además, también se contemplan porciones de estas secuencias que codifican regiones antigénicas de la proteína VP2 de CPV, al igual que las secuencias que presentan una identidad de un 70 %, o incluso más preferentemente de aproximadamente un 80, 90, o un 95 % o incluso superior (por ejemplo, una identidad de un 96, 97, 98 o un 99 %) con respecto a las secuencias de aminoácidos de este tipo. Las secuencias de este tipo pueden variar, por ejemplo, conteniendo sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o delecciones (delecciones amino o carboxi terminales), o diversas inserciones, etc., siempre y cuando la proteína/péptido resultante sea antigénica o antigénicos como se describe en el presente documento. Las regiones antigénicas de este tipo tienen una longitud de al menos aproximadamente 10 aminoácidos e incluyen una o más de las posiciones 426, 431, 440, 484, 494, 546, 555 y 572 de la proteína VP. Sin embargo, una región antigénica puede incluir un gen completo de VP2.

20 Además, las secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan con secuencias que se desvelan en el presente documento (o con porciones de esas secuencias) en condiciones rigurosas (especialmente condiciones de alta rigurosidad). Las condiciones rigurosas se refieren a las condiciones de hibridación que permiten que una secuencia de ácido nucleico se hibride con una secuencia en particular. En general, las condiciones altamente rigurosas se refieren a las condiciones de hibridación que permiten que una secuencia de ácidos nucleicos de al menos 50 nucleótidos y preferentemente aproximadamente 200 o más nucleótidos se hibride con una secuencia en particular a aproximadamente 65 °C en una solución que comprende aproximadamente 1 M de sal, preferentemente 6 x de SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable, y lavado a 65 °C en una solución que comprende aproximadamente 0,1 M de sal, o menos, 0,2 x de SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable. Estas condiciones permiten la detección de secuencias que tienen una identidad de aproximadamente un 90 % o superior. En general, las condiciones de rigurosidad más baja se refieren a las condiciones de hibridación que permiten que una secuencia de ácidos nucleicos de al menos 50 nucleótidos y preferentemente aproximadamente 200 o más nucleótidos se hibride con una secuencia en particular a aproximadamente 45 °C en una solución que comprende aproximadamente 1 M de sal, preferentemente 6 x de SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable, y lavar una temperatura ambiente en una solución que comprende aproximadamente 1 M de sal, preferentemente 6 x de SSC o cualquier otra solución que tenga una fuerza iónica comparable. Estas condiciones permiten la detección de secuencias que tienen una identidad de secuencias de hasta un 50 %. La persona experta en la materia será capaz de modificar estas condiciones de hibridación con el fin de identificar secuencias que tengan una identidad que varíe entre un 50 % y un 90 %.

40 En el presente documento se enseñan diversos tipos de vectores recombinantes y/o expresión que contienen y expresan las secuencias de ácidos nucleicos desveladas en el presente documento (o porciones de las mismas que codifican péptidos y/o polipéptidos antigénicos). Los ejemplos de vectores y sistemas de expresión de este tipo incluyen, pero no se limitan a: diversos vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, *Escherichia coli*) basados en probióticos (por ejemplo *Lactobacillus*); vectores adenovirales, baculovirus, *Pichia* y sistemas de expresión de levadura, etc. Los vectores recombinantes y sistemas de expresión de este tipo se pueden utilizar, por ejemplo, en preparaciones de vacuna, o, como alternativa, para otros fines, tales como la manipulación de las secuencias en el laboratorio, o para investigación o con fines de diagnóstico.

50 La invención proporciona composiciones inmunogénicas y/o vacunas contra el parvovirus canino. Las composiciones comprenden la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 6, o porciones de esta secuencia que codifican péptidos o polipéptidos antigénicos (regiones antigénicas), por ejemplo porciones de la secuencia que incluyen uno o más de los codones para las posiciones 426, 430, 431, 440, 484, 494, 546, 555, y 572.

55 Los expertos en la materia reconocerán que las composiciones de vacuna también pueden variar de acuerdo con el uso proyectado. En otras palabras, los componentes en particular (variantes) incluidos en la vacuna pueden variar de acuerdo con cualquiera de varios parámetros para crear una preparación de vacuna especialmente diseñada. Por ejemplo, las vacunas se pueden diseñar para incluir solo aquellas variantes que se han detectado en una ubicación geográfica en particular. Por ejemplo, la variante 2a ya no se detecta en Estados Unidos y, por lo tanto, los fabricantes de vacunas pueden optar por no incluir esta variante en las formulaciones de vacunas que se usarán en Estados Unidos. Las vacunas de Estados Unidos podrían contener, por ejemplo, solo las variantes 2c de CPV y 2b de CPV. Por el contrario, en la actualidad, 2a es la única variante de CPV en Australia. Por lo tanto, una composición de vacuna destinada a su uso en Australia podría incluir solo la variante 2a. Las vacunas recomendadas para Europa podrían incluir, por ejemplo, las variantes 2c y 2b, mientras que una composición de vacuna para Asia podría incluir 2a y 2b. Todas las vacunas de este tipo adaptadas geográficamente están incluidas en la presente invención, y pueden variar a lo largo del tiempo a medida que cambie el patrón de distribución de la variante. Una

consideración adicional con las vacunas de este tipo geográficamente específicas es que las vacunas de virus vivos modificados contienen altas cantidades de antígeno viral de la vacuna. Por lo tanto, si un perro vacunado con una variante se reubica en un área donde no existe esa variante, es preferente poner al animal en cuarentena durante al menos un mes antes de su liberación en el nuevo entorno. De otro modo, la variante se puede liberal en la nueva ubicación. Por ejemplo, los perros vacunados con una variante 2c se deberían poner en cuarentena antes de liberarse por ejemplo en Australia. Después del periodo de un mes, la propagación del virus debería cesar. Aunque la propagación del virus esté atenuada, su presencia puede confundir los intentos de supervisar la epidemiología viral, y podría permitir que los virus nativos se recombinen con el virus propagado, lo que daría como resultado la introducción de la mutación más virulenta en la población local.

Además, las composiciones de vacunas se pueden adaptar para su uso en un hospedador en particular. Por ejemplo, algunas razas de perros pueden ser más susceptibles a algunas variantes que a otras; o la etapa de la vida del animal (por ejemplo, cachorro con respecto a adulto) puede predisponer a un animal a la susceptibilidad a una o más variantes; o cuando se vayan a vacunar otros hospedadores además de los perros (por ejemplo, animales salvajes, animales en zoológicos o reservas de animales de caza, etc.), la composición de la vacuna se puede ajustar para tener en cuenta la susceptibilidad del animal hospedador en particular que va a recibir la vacuna. Por ejemplo, en el desarrollo de un modelo de estimulación, las razas Chihuahua y Labrador retriever tienden a ser más susceptibles al CPV. Por lo tanto, aproximadamente 4 logs de la variante de CPV-2c altamente virulenta deberían ser suficientes para inducir diarrea y vómitos en un ambiente controlado. Todas las vacunas de este tipo específicas de hospedador o selectivas de hospedador están incluidas en la presente invención.

En otras realizaciones, la composición de la vacuna se puede ajustar de acuerdo con el entorno local del receptor de la vacuna. Por ejemplo, en perreras comerciales que albergan más de 100 perros, en las que el riesgo de infección contagiosa es elevado, pueden ser preferentes las vacunas con preparaciones relativamente caras que contengan la variante 2b Δ 431 Δ 494 Δ 572 y/o la variante 2b Δ 484 Δ 494 Δ 546 Δ 572 en combinación con las variantes americanas 2c de CPV mayor y menor. Sin embargo, en perreras más pequeñas (por ejemplo, con menos de 25 perros) o en casas con uno o pocos perros, en las que el riesgo de exposición es menor, la vacunación con vacunas menos de menor coste que contengan las variantes 2b Δ 431 Δ 494 Δ 572 y/o 2b Δ 484 Δ 494 Δ 546 Δ 572 solo con la variante 2c americana mayor puede ser suficiente. Cuando se decide qué composiciones de vacuna usar, el riesgo de que los animales contraigan la enfermedad se debe sopesar con respecto al coste y la capacidad de supervisar y evaluar molecularmente la presencia de variantes de CPV en el futuro.

Además en otra faceta, la invención ofrece una estrategia de vacuna para evitar la interferencia de anticuerpos maternos y la inducción de inmunidad a la vacuna en cachorros. En lugar de usar una única preparación de vacuna para adultos y cachorros, los cachorros se pueden vacunar con una serie de vacunas que difieren antigénicamente. En otras palabras, la vacuna inicial para cachorros contendría variantes que podrían diferir de las que se habían administrado a la madre, y las inyecciones de refuerzo posteriores para cachorros incluirían otras iteraciones de la vacuna. De esta forma, se generaría un amplio espectro de anticuerpos de forma incremental. La vía de vacunación se puede modificar para superar algunas limitaciones de vacunación, tales como la propagación del virus después de la inmunización parenteral. Por ejemplo, mediante el uso de una vía de vacunación supra-lingual que emplea tecnología sin aguja, se puede inducir inmunidad, pero se puede prevenir la propagación en las heces.

En la técnica se conocen varios métodos para fabricar vacunas adecuadas para la vacunación contra el CPV. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 4.193.990 y 4.193.991 de Appel *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.303.645 de Carmichael *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.971.793 de Wood *et al.*; documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.882.652 de Valdes *et al.*, y en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.885.585 de Parrish *et al.*, cada uno de los cuales ofrece variaciones de estrategias de formulación de vacunas adecuadas. Los contenidos completos de cada una de estas patentes se incorporan en el presente documento por referencia. Generalmente, para fabricar una vacuna, se usará un vector viral que contiene las secuencias de ácido nucleico descritas (por ejemplo, ADNss que se produce naturalmente dentro de un virus, ADNss u otra forma equivalente genéticamente modificada en un vector viral no nativo (por ejemplo, ADNds, ss o ARNds, híbridos de ARN-ADN, etc.). Los ejemplos incluyen virus de CPV (u otros) que están "muertos", inactivados o de otra manera atenuados para no causar síntomas graves de enfermedad en el animal al que se le administra, junto con un vehículo fisiológico adecuado. Preferentemente, como resultado de la administración no se producirán síntomas de la enfermedad. Sin embargo, los expertos en la materia reconocerán que muchas composiciones de vacuna eficaces causan cierta incomodidad o malestar relativamente menor durante o después de la administración. Sin embargo, los beneficios de estar protegido contra la enfermedad en toda regla superan con creces esta posibilidad. Como alternativa, se puede usar un virus heterotípico que no infecte naturalmente o que no cause normalmente la enfermedad en el animal que se está vacunando.

El virus atenuado puede ser un CPV que contenga naturalmente la secuencia o secuencias de ácidos nucleicos, o el virus (CPV u otro virus) puede ser recombinante en el sentido de que la secuencia de ácidos nucleicos está insertada en el virus por ingeniería genética. En el caso de las vacunas recombinantes, las secuencias de ácidos nucleicos se pueden incorporar en virus distintos de CPV para formar vacunas recombinantes heterotípicas. Los ejemplos de los virus de este tipo incluyen, pero no se limitan a, FPV, diversos virus del herpes, "virus huérfanos" no

patógenos, virus entéricos tales como enterovirus, etc. En una realización preferente, el virus es un CPV vivo, atenuado (modificado) de título elevado, y el ácido nucleico es ADNss.

5 Preferentemente, una preparación de este tipo también contendrá secuencias de ácido nucleico que codifican regiones antigénicas de otras variantes de CPV, por ejemplo las variantes 2, 2a, 2b y/o 2c, y cualquier otra variante de CPV que se pueda identificar posteriormente y que se considere que es útil. Sin embargo, dada la amplia distribución de las composiciones de vacuna que contienen solo las variantes 2a y 2b, también puede ser beneficioso producir composiciones de vacuna que contengan solo una o más de las variantes que se desvelan en el presente documento, para usar en conjunto y para complementar los efectos de la vacunas 2a-2b conocidas. 10 Además, las vacunas de este tipo se pueden administrar con vacunas contra otras entidades causantes de enfermedad, ya sea como composiciones separadas, o juntas en una única composición.

La forma exacta de la vacuna puede variar. En una realización, la vacuna está compuesta por virus de CPV atenuados que contienen secuencias de ácidos nucleicos como se desvela en el presente documento. 15 Preferentemente la vacuna es polivalente y también incluye virus del tipo 2, 2a, 2b, y/o 2c de CPV atenuados. Como alternativa, un único virus se puede modificar genéticamente para que contenga ácidos nucleicos que codifican proteínas (por ejemplo, proteínas VP2, o porciones antigénicas de los mismos) de dos o más tipos variantes, es decir, se pueden construir CPV quiméricos recombinantes que tengan regiones genómicas de dos o más regiones de VP2 mediante tecnología recombinante intercambiando regiones de ADN de dos o más CPV, como es conocido por los expertos en la materia. 20

También se contemplan otras formas de la vacuna. Por ejemplo, también se contemplan vacunas de partículas de virión "vacías" (sin ácido nucleico), como lo son las vacunas que comprenden virión antigénico u otras proteínas de CPV que no se ensamblan en una cápside. En estos casos, las proteínas en la preparación de vacuna están codificadas por SEQ ID NO: 6, o como alternativa, las regiones antigénicas más cortas están codificadas por porciones de SEQ ID NO: 6. También se pueden incluir proteínas codificadas por SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3, y/o regiones antigénicas codificadas por porciones de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3. 25

Otros componentes de vacuna adecuados, por ejemplo, vehículos farmacológicamente aceptables, son bien conocidos por los expertos en la materia, como es la preparación de las composiciones de este tipo para usar como vacunas. Por lo general, las composiciones de este tipo se preparan como soluciones líquidas o suspensiones, sin embargo, también se contemplan formas sólidas tales como comprimidos, píldoras, polvos y similares. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquidos antes de su administración. La preparación también puede ser emulsionada. Los principios activos se pueden mezclar con excipientes que sean farmacéuticamente aceptables y compatibles con los principios activos. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y similares, o combinaciones de los mismos. Además, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, y similares. Si se desea administrar una forma oral de la composición, se pueden añadir diversos espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes y similares. La composición de la presente invención puede contener cualquiera de tales ingredientes adicionales para proporcionar la composición en una forma adecuada para su administración. La cantidad final del ácido nucleico traducible en las formulaciones puede variar. Sin embargo, en general, la cantidad será de aproximadamente un 1-99 %. Las composiciones pueden comprender además un adyuvante, cuyos ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, Seppic, Quil A, Alhidrogel, etc. 30 35 40 45

Las preparaciones inmunogénicas/vacunas de la presente invención se pueden administrar mediante cualquiera de muchos medios adecuados que son bien conocidos por los expertos en la materia, que incluyen pero no se limitan a, mediante inyección, por vía oral, por vía intranasal, por ingestión de un producto alimenticio que contiene el antígeno, etc. Sin embargo, en una realización preferente, el modo de administración es por inyección. Además, las composiciones se pueden administrar solas o en combinación con otros medicamentos o composiciones inmunogénicas, por ejemplo como parte de una vacuna de múltiples componentes. Además, la administración puede ser un suceso único, o se pueden administrar dosis de refuerzo múltiples en diversos intervalos de tiempo para aumentar la respuesta inmunológica. Además, la administración puede ser profiláctica, es decir antes de que se haya producido la exposición al virus, o se sospeche que se haya producido, o después del hecho, es decir, después de una exposición conocida o sospechada, o de forma terapéutica, por ejemplo después de la aparición de síntomas de la enfermedad asociados a la infección viral. 50 55

Después de la administración de la preparación, las secuencias de ácido nucleico de la invención se expresan dentro del animal hospedador al que se le ha administrado la vacuna, y el animal hospedador remonta una respuesta inmunológica a las proteínas antigénicas (o porciones de las mismas) codificadas por el ácido nucleico. Preferentemente, la respuesta inmunológica que se provoca es una respuesta inmunológica protectora. En algunas realizaciones, el virus atenuado retiene la capacidad de replicarse dentro del hospedador, aunque esto no es estrictamente necesario. 60

En el presente documento se enseñan métodos de prevención de los síntomas de la infección por CPV en un mamífero con necesidad de los mismos. Generalmente, las vacunas de CPV se administran para proporcionar 65

inmunidad activa en cachorros y/o perros adultos. El método implica administrar al mamífero una vacuna y/o composición inmunogénica que comprende un ácido nucleico que incluye la secuencia representada por al menos la SEQ ID NO: 6, o porciones de la misma que codifican regiones antigénicas de VP2. En una realización preferente, la preparación también incluye ácidos nucleicos que codifican otras variantes de CPV clínicamente relevantes, preferentemente las variantes 2a y 2b, y, opcionalmente, el CPV2 original. La administración de la composición da como resultado la obtención de una respuesta inmunológica por el receptor. Preferentemente, la respuesta inmunológica es protectora contra la exposición futura al CPV, y elimina los síntomas de la enfermedad por completo, o mejora los síntomas de la enfermedad a un nivel más leve de lo que se experimentaría sin la vacunación.

En una realización preferente de la invención, los animales que se vacunan usando las vacunas de la invención son perros domésticos, que incluyen perros adultos y cachorros. Sin embargo, también se contempla la vacunación de otros posibles hospedadores de CPV. Otros hospedadores potenciales incluyen otros cánidos tales como cánidos silvestres (por ejemplo, lobos, especies de perros salvajes, etc.), gatos (incluidos gatos y gatitos domésticos, y especies de gatos más grandes, ya sean domésticos o salvajes), visón, panda rojo, zorros, león y tigres, etc. Aunque las vacunas se usarán por supuesto en animales domésticos, los animales salvajes o parcialmente domesticados también se pueden beneficiar de dicha vacunación, por ejemplo animales en zoológicos o áreas protegidas, parques, en instalaciones de investigación, etc. Cualquier animal que pueda hospedar el CPV y variantes de CPV, tanto si el virus causa o no síntomas de enfermedad en el hospedador, se puede beneficiar al vacunarse con las preparaciones de vacuna proporcionadas en el presente documento. La vacunación de animales que son asintomáticos después de la infección con el virus (es decir vehículos silenciosos) sería beneficiosa para reducir la propagación del virus a poblaciones más susceptibles.

Los anticuerpos que se unen de forma específica o selectiva a determinantes antigénicos o regiones antigénicas de proteínas del tipo 2b Δ 494 Δ 572, 2b Δ 426 Δ 484 Δ 546, 2b Δ 431, 2c Δ 440 y/o los CPV de variante 2c americana también se enseñan en el presente documento. Los anticuerpos diferenciales de este tipo pueden ser policlonales o monoclonales, aunque generalmente se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se prepararán inyectando las variantes (en forma de proteína, o ácidos nucleicos que codifican las proteínas) en ratones. Después de 3 refuerzos, los bazos se recolectarán y se fusionarán con células de mieloma. Los anticuerpos monoclonales que producen clones se seleccionarán mediante ELISA, HA-HI y ensayo de anticuerpo con inmunofluorescencia indirecta. Los clones que reaccionan con 2b Δ 494 Δ 572, 2b Δ 426 Δ 484 Δ 546, 2b Δ 431, 2c Δ 440 y/o genotipos de 2c americano se guardarán para el desarrollo de ensayos de diagnóstico de CPV. Los anticuerpos policlonales se pueden preparar inyectando uno o más péptidos que abarcan los codones de aminoácidos que son dianas antigénicas preferentes de las variantes 2b Δ 494 Δ 572, 2b Δ 426 Δ 484 Δ 546, 2b Δ 431, 2c Δ 440 y/o 2c americana por ejemplo en conejos.

La invención también proporciona kits de diagnóstico para la detección de las variantes de CPV descritas en el presente documento y, opcionalmente, también de otras variantes de CPV (por ejemplo, CPV2, 2a y 2b). Los kits de este tipo incluyen cebadores de oligonucleótidos específicos para amplificar (por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa) las secuencias de ácidos nucleicos desveladas en el presente documento. Como alternativa, los kits de este tipo pueden incluir anticuerpos (por ejemplo, monoclonales o policlonales) que se unen de forma selectiva o específica a determinantes antigénicos únicos mostrados por las variantes y, opcionalmente, también otras variantes de CPV (por ejemplo, CPV2, 2a y 2b).

Se enseña un nuevo método para cultivar CPV *in vitro*. El método implica cultivar el virus en un cultivo celular mixto de 1) células que se sabe que son susceptibles de infección por CPV, y 2) células Vero, en un medio adecuado. En una realización preferente, las células que son susceptibles de infección por CPV son células CRFK. Sin embargo, también se pueden usar otros tipos de tales células, que incluyen, pero no se limitan a: células obtenidas a partir del fibroma canino A72; células obtenidas a partir de células CRFK tales como células de riñón felino Nordisk Laboratory (NLFK); células de lengua felina tales como células Fe3Tg; células de pulmón felino tales como células AK-D; líneas celulares de linfoma felino tales como 3201; líneas de linfocitos T caninos tales como CT 45-S; líneas de células epiteliales del timo canino tales como Cf2Th, etc. Además, una diversidad de líneas de células felinas y caninas, así como instrucciones para su cultivo, se pueden obtener en la Colección Americana de Cultivos Tipo en Manassas, Virginia.

Estas líneas celulares se pueden propagar, junto con células Vero, en una diversidad de medios que son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las células CT 45-S se pueden cultivar en medio RPMI 1640; Las células AK-D, Fe2lu y Cf2Ths se pueden cultivar en medio mínimo esencial de Dulbecco (MEM) con un suero bovino fetal al 10 % (FBS); para células Tg 3201, NLFK, CRFL, A72 y Fc3, se pueden usar 5A de McCoy y Leibowitz L15 con FCS al 5 %. Por lo general, las líneas celulares se incuban juntas durante 4-5 días a 37 °C.

Ejemplos

Introducción

5 La infección por parvovirus canino (CPV) es la enfermedad más grave y prevalente de los perros, y es la causa más común de diarrea en cachorros. Aunque las vacunas contra el CPV están disponibles y usan ampliamente, se han producido varios brotes recientes de CPV en perros vacunados. Por ejemplo, los dueños de perreras en el Sur Central de Estados Unidos han observado altas tasas de mortalidad de cachorros debido a la infección por CPV a pesar de la vacunación.

10 El CPV es un virus de ADN monocatenario que tiene una alta tasa de mutación y la capacidad de cambiar su rango de hospedador y tropismo. Las vacunas comerciales que están disponibles en la actualidad por lo general contienen solo las variantes CPV2, CPV2a y CPV2b. Durante el análisis de muestras de los inventores de perros vacunados con CPV con síntomas manifiestos de infección por parvovirus, los inventores observaron cambios funcionales en la
15 detección de CPV mediante ensayos de diagnóstico de CPV actuales y fallos en los kits actuales para detectar el virus de campo, lo que indica una posible evolución del CPV más allá de los subtipos 2a y 2b. Las investigaciones adicionales dieron como resultado la identificación de dos variantes de CPV, en particular 2b Δ 494 Δ 572 y 2c americano. Los aislados se asocian a un aumento de la virulencia y a un tropismo tisular más amplio que el observado hasta ahora con los aislados de CPV cultivados. Además, parece que los nuevos aislados de CPV
20 causan diarrea mucosa de color amarillo en lugar de diarrea hemorrágica causada por genotipos de CPV-2 en el pasado. De acuerdo con otros informes, la variante 2b Δ 494 Δ 572 tiene dos cambios de codones. La variante 2c Americana se detectó previamente en Italia, España y Vietnam, pero no se detectó previamente en Estados Unidos.

Materiales y métodos

25 Las muestras fecales fueron recibidas por el Oklahoma Animal Disease Diagnostic
Laboratorio por Federal Express en bolsas de hielo (aproximadamente 4-5 °C). Se recibieron un mínimo de 2-5

30 gramos de heces o 2-5 ml de heces de diarrea líquida. Las muestras fecales generalmente se someten a ensayo el mismo día mediante el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)(s) de CPV que están disponibles en el mercado. Los inventores recibieron bucles intestinales (aproximadamente 2-3 piezas) de diferentes regiones del
intestino para el ensayo de anticuerpos fluorescentes (FAT) o inmunohistoquímica (IHC). En ocasiones, los inventores recibían pedazos de la lengua para FAT o IHC o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el
35 examen de CPV. Estas muestras de ensayo se reciben frías en paquetes de hielo mediante FedEx. Muchos casos de CPV tienen un historial de ensayos negativos para CPV mediante kits de diagnóstico de campo (Assure, Synbiotics, CA; o IDEXX, Bar Harbor, Maine).

40 La histopatología se realizó en los intestinos de cachorros y perros adultos con una historia compatible con CPV. La historia incluyó diarrea sanguinolenta o mucosa y muerte. Se examinaron tejidos intestinales recién recogidos y fijados con formalina para lesiones compatibles con el CPV: dilatación y necrosis de las criptas y pérdida de
vellosidades intestinales.

45 El ensayo de anticuerpos fluorescentes (FAT) se usó para detectar los antígenos del CPV en los intestinos. Las secciones intestinales de 6-8 micrómetros de grosor se fijaron con acetona y se secaron al aire. El conjugado anti CPV etiquetado con FITC se añadió y las secciones se incubaron durante 30 min a 37 °C. Después de los lavados, las secciones se contratiñeron con azul de tripano. Las secciones se examinaron mediante microscopía de
fluorescencia: las células positivas para CPV se tiñeron de color verde manzana y las células negativas para CPV se
50 tiñeron de color rojo ladrillo con un ensayo de FAT.

Las secciones fijadas con formalina enviadas para histopatología se examinaron mediante inmunohistoquímica para
antígeno de CPV.

55 Se realizaron PCR seguida por secuenciación en muestras fecales y raspados de las muestras intestinales positivas o sospechosas de CPV, como lo describen en Desario *et al.*, 2005. Una porción del gen de la proteína viral se amplificó por PCR. El producto de PCR amplificado se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa y se eluyó del gel para secuenciación.

60 Las secuencias se sometieron a análisis con el programa BLAST que compara los resultados con una gran colección de secuencias que se han depositado en el GenBank. Todas las secuencias se identificaron como similares al parvovirus canino.

EJEMPLO 1. Fallo de los ensayos de diagnóstico de CPV actuales.

65 Las muestras fecales se analizaron como se ha descrito anteriormente, y todas las muestras fueron positivas usando los criterios convencionales de: lesiones características según lo determinado por histopatología, resultados de ensayo de anticuerpos fluorescentes y resultados de inmunohistoquímica. Sin embargo, después de someter a

ensayo las mismas muestras usando ensayos de diagnóstico comerciales, los resultados mostraron que los ensayos no eran confiables para el diagnóstico de campo de CPV de estas muestras, y fallaron en la detección de un 33-50 % de los casos positivos para CPV.

5 La mayoría de estos aislados de CPV se obtuvieron de perreras que en la actualidad usan vacunas comerciales de CPV de acuerdo con la etiqueta de la vacuna, pero que aún experimentan brotes de CPV y mortalidad. Esta falta de protección se debe probablemente a la variación antigénica en los nuevos aislados de CPV de reciente aparición. Esta observación de campo epidemiológica sobre muchos casos de CPV (n ~ 500) indica la necesidad de incorporar estas nuevas variantes de CPV en vacunas comerciales de CPV.

10 EJEMPLO 2. Secuenciación de aislados de CPV: identificación de la variante 2bΔ494Δ572 y del aislado CPV2c americano

15 Generalmente se considera que el fallo de las vacunas y los kits de diagnóstico es una evidencia epidemiológica de la evolución viral. Por lo tanto, se sospechó la presencia de nuevas variantes de CPV en las muestras estudiadas. Para confirmar esto, se realizó secuenciación de PCR de una porción de la proteína viral VP2 para detectar virus aislados de las muestras fecales, y los resultados se compararon con secuencias conocidas de VP2 usando programas informáticos de software y/o alineamiento manual.

20 Los resultados confirmaron la presencia de dos tipos de CPV de reciente aparición en las muestras: 1) una variante de 2b que se denominó 2bΔ494Δ572; y 2) 2c americano, que no había sido informado previamente en Estados Unidos. Las secuencias de ADN que codifican porciones de las proteínas VP2 de las dos variantes se presentan en la figura 1 (2bΔ494Δ572, SEQ ID NO: 1) y Figura 3 (2c americano, SEQ ID NO: 3). Una comparación de estas secuencias con una secuencia de referencia de CPV2 conocida desveló que, en 2bΔ494Δ572, se había producido un cambio en los codones 494 y 572. El codón CPV2 habitual en 494 es TGT, pero el codón 494 en 2bΔ494Δ572 es TGC. De forma análoga, el codón habitual en la posición 572 en los aislados de CPV2 es GTA pero en 2bΔ494Δ572 este codón es GTC. Estos cambios no dan lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína VP2. Sin embargo, es probable que los cambios confieran ventajas a la variante 2bΔ494Δ572 en una o más fases de su ciclo de vida, por ejemplo en la eficacia de replicación, transcripción o traducción. De forma significativa, la presencia de la variante 2c americana en las muestras es el primer informe de esta variante de CPV en Estados Unidos y es probablemente un presagio de su aparición como una variante dominante. Aproximadamente un 50 % de los casos de fallo de la vacuna se debieron a la presencia de CPV2bΔ494Δ572 y un 50 % se atribuyó a CPV2c o CPV2cΔ430Δ440.

35 Estos hallazgos demuestran la aparición de 2bΔ494Δ572 (SEQ ID NO: 1) y 2c americano (SEQ ID NO: 3) como variantes de CPV dominantes, y señalan la necesidad de incorporar estas variantes en preparaciones de vacuna de CPV.

40 Otras variantes se identificaron de una manera similar. En particular, la nueva variante 2bΔ426Δ484Δ546 (SEQ ID NO: 6), que es altamente citopática, también se ha identificado de esta manera.

EJEMPLO 3. Determinación de la estructura secundaria variante y energía asociada

45 Se sabe que la virulencia de los patógenos virales está asociada con elementos estructurales secundarios en el genoma viral (Pellerin *et al.*, 1994. *Virology* 203: 260-268). Los patrones de plegamiento de las regiones hipervariables de las variantes 2c, 2bΔ431 y 2cΔ430Δ440 se evaluaron usando el programa de plegamiento de ADN "mfold" en el sitio web ubicado en mfold.burnet.edu.au en la World Wide Web. Los resultados se muestran en las Figuras 6-8, que representan los patrones de plegamiento y los niveles de energía asociados para cada variante. Como se puede ver, la estructura secundaria de la región se mantiene y los niveles de energía para desplegamiento pueden cambiar.

EJEMPLO 4. Desarrollo y ensayo de una nueva vacuna polivalente contra CPV

55 Se desarrolla una nueva vacuna polivalente que protege contra variantes de CPV de reciente aparición. La vacuna incluye uno o más virus de CPV atenuados de los tipos CPV2b, 2bΔ494Δ572 (SEQ ID NO 1), 2bΔ431 (SEQ ID NO 2), 2bΔ426Δ484Δ546 (SEQ ID NO 6), 2c americano (SEQ ID NO 3), 2cΔ440 (SEQ ID NO 4) y, opcionalmente, CPV2. En otras palabras, en esta nueva vacuna, CPV2b se reemplaza por 2bΔ494Δ572 y/o 2bΔ426Δ484Δ546, variantes que se ha descubierto recientemente que están apareciendo como el genotipo dominante. La presencia de CPV2, que parece no ser más una amenaza, es opcional.

60 Los animales vacunados con la vacuna polivalente están protegidos contra el desarrollo de síntomas de infección por parvovirus mediante las variantes usadas para preparar la vacuna.

EJEMPLO 5. Nuevos métodos de cultivo celular mixto para propagación del CPV

El CPV por lo general crece en cultivos celulares que solo contienen un único tipo de célula tal como la línea celular de riñón felino Crandall (CRFK).

5 Se ha desarrollado un método mejorado de cultivo de CPV. De acuerdo con el nuevo método, CPV se cultiva en una mezcla igual de células CRFK y Vero en medio esencial mínimo (MEM). Ambas líneas celulares se sembraron en placas y las muestras se inocularon una hora después de la siembra. En esta etapa, las células se unieron, pero
 10 todavía en las primeras etapas de la división celular. El nuevo método de cultivo celular producía efectos citopáticos detectables más rápidamente que cuando el CPV se cultivaba solo con células CRFK. Además, se mantuvieron altos títulos de producción de CPV en el cultivo de células mixtas para 3 pasajes en serie

REFERENCIAS

15 Buonavoglia, Canio, V. Martella, A. Pratelli, M. Tempesta, A. Cavalli, D. Buonavoglia, G. Bozzo, G. Elia, N. Decaro y L. Carmichael, J. Gen. Virol. (2001) 82, 3021-3025.
 Decaro, Nicola, V. Martella, G. Elia, C. Desario, M. Campolo, E. Lorusso, M. L. Colaianni, A. Lorusso, y C. Buonavoglia, Vet. Micro. 121 (2007) 39-44.
 20 Desario, Constantina, N. Decaro, M. Campolo, A. Cavalli, F. Cirone, G. Elia, V. Martella, E. Lorusso, M. Camero y C. Buonavoglia. J. Virol. Methods 126 (2005) 179-185.
 Nakamura, Kazuya, M. Sakamoto, Y. Ikeda, E., Sato, K. Kawakami, T. Miyazawa, Y. Tohya, E. Takahashi, E. Mikami, T. Mikami y M. Mochizuki. Clin. Diag. Lab. Immuno. (2001) 663-668.
 Nakamura M., Tohya, Y., Miyazawa, T., Mochizuki, M., Phung, H. T., Nguyen, N. H., Huynh, L. M., Nguyen, L. T., P. N. Nguyen, P. N., Nguyen, P. V., Akashi, H. (2004) Arch. Virol. 149, 2261-2269.
 25 Parrish, Colin R. And y Yoshihiro Kawaoka, Annu. Rev. Microbiol. (2005) 59, 553-86.
 Truyen, Uwe. Veterinary Microbiology (2006) 117, 9-13.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Kapil, Sanjay
 Cooper, Emily
- <120> VACUNAS QUE CONTIENEN VARIANTES GENÉTICAS DE PARVOVIRUS CANINO
- 35 <130> 09-330 WO
- <150> US 12/211.174
 <151> 16-09-2008
- 40 <160>6
- <170> Patent In versión 3.4
- 45 <210> 1
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> *Canine parvovirus*
- 50 <400> 1
- | | |
|---|-----|
| gatgataatg tattgctacc aacagatcca attggaggta aaacaggaat taactatact | 60 |
| aatatattta atacttatgg tcctttaact gcattaaata atgtaccacc agtttatcca | 120 |
| aatgggtcaaa tttgggataa agaatttgat actgacttaa aaccaagact tcatgtaa | 180 |
| gcaccatttg tttgtcaaaa taattgccct ggtcaattat ttgtaaaagt tgogccta | 240 |
| ttaacaaatg aatatgatcc tgatgcatct gctaatatgt caagaattgt aacttactca | 300 |
| gatttttggg ggaaaggtaa attagtattt aaagctaaac taagagcctc tcatacttgg | 360 |
| aatccaattc acaaatgag tattaatgta gataaccaat ttaactatgt accaagtaat | 420 |
| attggaggta tgaaaattgt c | 441 |

ES 2 650 622 T3

<210> 2
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> *Canine parvovirus*
 5
 <400> 2
 gatgataatg tattgctgcc aacagatcca attggaggta aaacaggaat taactatact 60
 aatatattta atacttatgg tcctttaact gcattaaata atgtaccacc agtttatcca 120
 aatgggtcaaa tttgggataa agaatttgat actgacttaa aaccaagact tcatgtaaat 180
 gcaccatttg tttgtcaaaa taattgcctt ggtcaattat ttgtaaaagt tgcgcctaata 240
 ttaacaaatg aatatgatcc tgatgcatct gctaatatgt caagaattgt aacttactca 300
 gatttttggt ggaaaggtaa attagtatth aaagctaaac taagagcctc tcatacttgg 360
 aatccaattc aacaaatgag tattaatgta gataaccaat ttaactatgt accaagtaat 420
 attggaggta tgaaaattgt c 441
 10
 <210> 3
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> *Canine parvovirus*
 15
 <400> 3
 gaagataatg tattgctacc aacagatcca attggaggta aaacaggaat taactatact 60
 aatatattta atacttatgg tcctttaact gcattaaata atgtaccacc agtttatcca 120
 aatgggtcaaa tttgggataa agaatttgat actgacttaa aaccaagact tcatgtaaat 180
 gcaccatttg tttgtcaaaa taattgcctt ggtcaattat ttgtaaaagt tgcgcctaata 240
 ttaacaaatg aatatgatcc tgatgcatct gctaatatgt caagaattgt aacttactca 300
 gatttttggt ggaaaggtaa attagtatth aaagctaaac taagagcctc tcatacttgg 360
 aatccaattc aacaaatgag tattaatgta gataaccaat ttaactatgt accaagtaat 420
 attggaggta tgaaaattgt a 441
 20
 <210> 4
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> *Canine parvovirus*
 25
 <400> 4

ES 2 650 622 T3

```

gaagataatg tattgctacc aacagatcca attggaggta aagcaggaat taactatact      60
aatatattta atacttatgg tcctttaact gcattaaata atgtaccacc agtttatcca      120
aatgggtcaaa tttgggataa agaatttgat actgacttaa aaccaagact tcatgtaaat      180
gcaccatttg tttgtcaaaa taattgtcct ggtcaattat ttgtaaaagt tgcgcctaata      240
ttaacaaatg aatatgatcc tgatgcatct gctaatatgt caagaattgt aacttactca      300
gatttttggg ggaaaggtaa attagtattt aaagctaaac taagagcctc tcatacttgg      360
aatccaattc aacaaatgag tattaatgta gataaccaat ttaactatgt accaagtaat      420
attggaggta tgaaaattgt a                                                    441

```

5
<210> 5
<211> 441
<212> ADN
<213> *Canine parvovirus*

<400> 5

```

gaagataatg tattactacc aacagatcca attggaggta aagcaggaat taactatact      60
aatatattta atacttatgg tcctttaact gcattaaata atgtaccacc agtttatcca      120
aatgggtcaaa tttgggataa agaatttgat actgacttaa aaccaagact tcatgtaaat      180
gcaccatttg tttgtcaaaa taattgtcct ggtcaattat ttgtaaaagt tgcgcctaata      240
ttaacaaatg aatatgatcc tgatgcatct gctaatatgt caagaattgt aacttactca      300
gatttttggg ggaaaggtaa attagtattt aaagctaaac taagagcctc tcatacttgg      360
aatccaattc aacaaatgag tattaatgta gataaccaat ttaactatgt accaagtaat      420
attggaggta tgaaaattgt a                                                    441

```

10

15
<210> 6
<211> 441
<212> ADN
<213> *Canine parvovirus*

<400> 6

```

gacgataatg tattgctacc aacagatcca attggaggta aacaggaat taactatact      60
aatatattta atacttatgg tcctttaact gcattaaata atgtaccacc agtttatcca      120
aatgggtcaaa tttgggataa agaatttgat actgacttaa aaccaagact tcatgtgaat      180
gcaccatttg tttgtcaaaa taattgccct ggtcaattat ttgtaaaagt tgcgcctaata      240
ttaacaaatg aatatgatcc tgatgcatct gctaatatgt caagaattgt aacttactca      300
gatttttggg ggaaaggtaa attagtattt aaagctaaac taagagcctc tcatacttgg      360
aaccaattc aacaaatgag tattaatgta gataaccaat ttaactatgt accaagtaat      420
attggaggta tgaaaattgt c                                                    441

```

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6 o que tiene una identidad de al menos un 99 % con la SEQ ID NO: 6, en la que la posición 426 del aminoácido de la proteína VP2 está codificada por GAC, la posición 484 del aminoácido de la proteína VP2 está codificada por GTG y la posición 546 del aminoácido de la proteína VP2 está codificada por AAC.
- 10 2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1 o un ácido nucleico que tiene una identidad de al menos un 98 % con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o un ácido nucleico que tiene una identidad de al menos un 95 % con la SEQ ID NO: 3 y secuencias que codifican una proteína de tipo VP-2b.
- 15 3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico de SEQ ID NO: 6 o que tiene una identidad de al menos un 99 % con la SEQ ID NO: 6 en la que la posición 426 del aminoácido de la proteína VP2 está codificada por GAC, la posición 484 del aminoácido de la proteína VP2 está codificada por GTG y la posición 546 del aminoácido de la proteína VP2 está codificada por AAC está presente en un parvovirus atenuado.
- 20 4. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en la que la secuencia de ácidos nucleicos del grupo que consiste en; SEQ ID NO: 1 o un ácido nucleico que tiene una identidad de al menos un 98 % con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o un ácido nucleico que tiene una identidad de al menos un 95 % con la SEQ ID NO: 3 y secuencias que codifican una proteína de tipo VP-2b está presente en un parvovirus atenuado.
- 25 5. Un método para detectar la presencia de CPV en una muestra biológica, que comprende
- 30 - exponer dicha muestra a moléculas que se unen de forma específica o de forma selectiva a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6 o un ácido nucleico que tiene una identidad de al menos un 99 % con la SEQ ID NO: 6 en la que la posición 426 del aminoácido de la proteína VP2 está codificada por GAC, la posición 484 del aminoácido de la proteína VP2 está codificada por GTG y la posición 546 del aminoácido de la proteína VP2 está codificada por AAC;
- y
- detectar un suceso de unión entre dichas moléculas y dichas una o más secuencias de ácidos nucleicos.
- 35 6. El método de la reivindicación 5, en el que dichas moléculas son cebadores de oligonucleótidos.
- 40 7. Un kit de diagnóstico, que comprende moléculas específicas para detectar la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6 o un ácido nucleico que tiene una identidad de al menos un 99 % con la SEQ ID NO: 6 en la que la posición 426 del aminoácido de la proteína VP2 está codificada por GAC, la posición 484 del aminoácido de la proteína VP2 está codificada por GTG y la posición 546 del aminoácido de la proteína VP2 está codificada por AAC.
8. El kit de diagnóstico de la reivindicación 7, en el que dichas moléculas son ácidos nucleicos que se hibridan a la SEQ ID NO: 6 o un ácido nucleico que tiene una identidad de al menos un 99 % con la SEQ ID NO: 6 en condiciones rigurosas.

426
GATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTA
ACTA
TACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTT
TATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTT
CATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAAT⁴⁹⁴TGCCCTGGTCAATTATTTGTAAAA
GTTGCCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGA
ATTGTAACCTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAAACTA
AGAGCCTCTCATACTTGAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAATGTAGATAACCAA
TTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATT⁵⁷²GTCTATGAAAAATCTCAA
CTAGCACCTAGAAAATTATATTAACATACTTACTATGTTTTTATGTTTATTACATAT

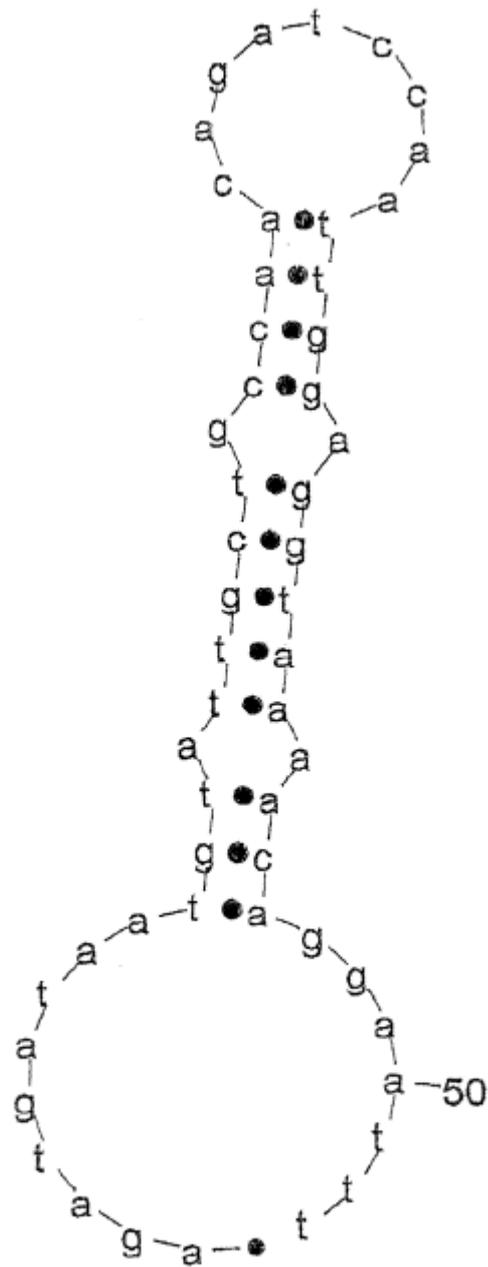
Figura 1

426
GAAGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTAACTA
TACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTT
TATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTT
CATGTAAATGCACCAATTTGTTTGTCAAAAATAAT⁴⁹⁴TGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAA
GTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGA
ATTGTAACCTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAAACTA
AGAGCCTCTCATACTTGAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAATGTAGATAACCAA
TTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATT⁵⁷²TGTA

Figura 3

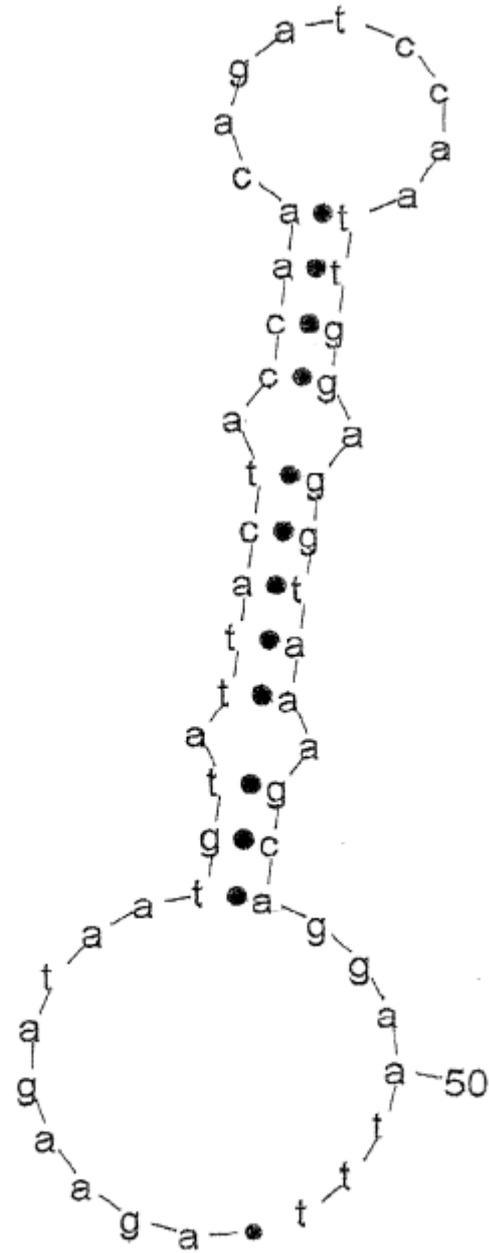
426 440
GAAGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAAAGCAGGAATTAACTA
TACTAAATATATTTAATACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACCACCAGTT
TATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTT
CATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAAATAATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAA
494
GTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGA
AATGTAACCTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAAACTA
AGAGCCTCTCATACTTGAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAATGTAGATAACCAA
TTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATGTA
572

Figura 4



ENERGÍA = -2,2

Figura 7



ENERGÍA = -2,9

Figura 8

ES 2 650 622 T3

426
GACGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGGAGGTAAAACAGGAATTA
ACTA
TACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACCACCAGTT
TATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTGATACTGACTTAAAACCAAGACTT
484 494
CATGTCAATGCACCATTTGTTTGTCAAATAATTGCCCCTGGTCAATTATTTGTAAAA
GTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAGA
ATTGTAACCTTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGCTAAACTA
546
AGAGCCTCTCATACTTGGAACCCAATTCAACAAATGAGTATTAATGTAGATAACCAA
572
TTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGTC

Figura 9