

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 386**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/86** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/205** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2013 PCT/IB2013/059207**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014 WO14060905**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2013 E 13799108 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2906704**

54 Título: **Novirabdovirus recombinante utilizable como vector de antígenos**

30 Prioridad:

**15.10.2012 FR 1259815**

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

**12.04.2018**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE (INRA) (100.0%)  
147, rue de l'Université  
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BREMONT, MICHEL y  
NZONZA, ANGELLA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 663 386 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

Novirabdovirus recombinante utilizable como vector de antígenos

5 La presente invención se refiere a novirabdovirus recombinantes utilizables como vectores de antígenos y, principalmente, de proteínas antigénicas no glicosiladas, para inducir una respuesta inmune frente a dichos antígenos.

Los novirabdovirus son virus con ARN de cadena negativa de la familia de los rabdovirus.

10 Los rabdovirus son virus con cubierta. El virión comprende una nucleocápside con simetría helicoidal, que resulta del ensamblaje de moléculas de proteína N alrededor de la hebra de ARN genómico, y a la que están asociadas moléculas de las proteínas L y P. La cubierta que recubre la nucleocápside está constituida por una doble capa lipídica de origen celular, cuya cara interna está tapizada con la proteína M, y en la que se insertan espículas formadas por trímeros de glicoproteína G, que intervienen en la unión del virus a la célula infectada y su fusión con la membrana celular. La glicoproteína G de los rabdovirus es, en su forma madura, un polipéptido de aproximadamente 500 aminoácidos, constituido por un ectodominio de aproximadamente 435 a aproximadamente 15 dominio intravirión (denominado igualmente dominio intracitoplásmico), de aproximadamente 25 a aproximadamente 45 aminoácidos. Se sintetiza en el citoplasma de las células infectadas en forma de un precursor de 505 a 525 aminoácidos, cuyo péptido señal se escinde a continuación en el retículo endoplásmico.

El género *Novirhabdovirus* comprende diferentes especies patógenas de los animales acuáticos, principalmente de los peces.

20 La especie tipo del género es el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI) que es el agente etiológico de una enfermedad grave en varias especies de salmónidos. Otras especies del género son el rabdovirus hirame (HIRRV), el virus de la septicemia hemorrágica viral (VSHV) y el rabdovirus del pez serpiente (SHRV por: snakehead rhabdovirus).

25 La estructura del genoma de los novirabdovirus es semejante a la de los rabdovirus de mamíferos, pero se diferencia de ésta por la presencia de un gen suplementario que codifica una proteína no estructural, denominada proteína NV (por « no virión »).

El genoma de los novirabdovirus comprende, por lo tanto, seis genes, cuya organización puede esquematizarse como sigue:

3'-N-P-M-G-NV-L-5'

30 N representa el gen que codifica la nucleoproteína asociada al ARN viral, P representa el gen que codifica la fosfoproteína asociada a la polimerasa viral, M representa el gen que codifica la proteína de la matriz, G representa el gen que codifica la glicoproteína de la cubierta G (denominada igualmente proteína de la espícula), NV representa el gen que codifica la proteína NV y L representa el gen que codifica la ARN polimerasa viral dependiente de ARN.

35 Estos genes están separados por regiones intergénicas: cada una de ellas comprende una señal de inicio de la transcripción del gen situado en posición 3' de ésta y una señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación, lo que permite la transcripción de los genes en ARNm individuales.

Se ha mostrado que los novirabdovirus podrían utilizarse como vectores de expresión de genes heterólogos y, principalmente, de antígenos vacunales.

40 Los sistemas de genética inversa, similares a los que existen para los rabdovirus de mamíferos, están en efecto disponibles para producir novirabdovirus recombinantes. Clásicamente, estos sistemas se basan en la cotransfección de una célula huésped que expresa una ARN polimerasa (generalmente la ARN polimerasa T7) con ADN complementario (ADNc) del genoma viral completo y con vectores de expresión que codifican las proteínas N, P, y L del complejo replicativo viral.

45 Con el fin de utilizar estos novirabdovirus recombinantes como vectores virales, se han utilizado diferentes estrategias para introducir en ellos genes extraños.

50 Una primera estrategia se basa en el reemplazo de un gen endógeno de novirabdovirus por un gen heterólogo. Por ejemplo, se ha mostrado así, en VNHI, VSHV y SHRV, que el gen de la glicoproteína G podría reemplazarse por el de otro novirabdovirus y que el gen NV podría delecionarse y reemplazarse por un gen extraño (BIACCHESSI et al., J Virol, 74, 11247-53, 2000; BIACCHESSI et al., J Virol, 76, 2881-9, 2002; BIACCHESSI et al., J Virol, 84, 10038-50, 2010; ALONSO et al., Journal of Virology, 78, 5875- 82, 2004 ; Solicitud PCT WO 2003/097090).

Una segunda estrategia consiste en insertar uno o varios genes en una o varias de las regiones intergénicas del genoma viral, en forma de una o varias unidades de transcripción suplementarias, comprendiendo cada unidad de transcripción una señal de inicio de la transcripción, seguida de la secuencia codificadora de la proteína de interés

que se va a expresar, estando esta secuencia codificadora seguida ella misma de una señal de terminación de la transcripción/poliadenilación.

Esta estrategia ha sido utilizada principalmente en VNHI y VSHV, para expresar *in vivo* diferentes genes informadores (HARMACHE et al., J Virol, 80, 3655-9, 2006; BIACCHESI et al., J Virol, 84, 10038-50, 2010). Igualmente, ha permitido expresar antígenos vacunales; la Solicitud PCT WO 2007/144773 describe la construcción de VNHI recombinantes que comprenden de 1 a 3 insertos intergénicos que expresan antígenos de diversos virus patógenos de salmónidos y muestra que estos VNHI recombinantes son capaces de multiplicarse normalmente en cultivo celular y pueden inducir una respuesta inmune protectora frente a los virus concernidos cuando se utilizan para inmunizar crías de trucha. Además, cuando uno de estos VNHI recombinantes que expresan un antígeno heterólogo se inyecta *in vivo* en ratones, es incapaz de replicarse, pero induce, sin embargo, una respuesta de anticuerpos dirigida principalmente frente al antígeno heterólogo.

Los novirabdoavirus presentan, por lo tanto, numerosas ventajas como vectores de expresión de antígenos heterólogos.

Para mejorar más la eficacia de la respuesta antigénica dirigida frente a los antígenos heterólogos expresados por novirabdoavirus, es deseable que estos antígenos estén expuestos en la superficie de las partículas virales. Sin embargo, los inventores han constatado que en el caso de los novirabdoavirus recombinantes descritos anteriormente, solo determinados antígenos, de naturaleza glicoproteica y capaces de insertarse naturalmente en las membranas celulares, estaban presentes en la superficie de las partículas virales.

En la búsqueda de remediar este inconveniente, los inventores han constatado que cuando se insertaba en el genoma de un novirabdoavirus un gen que codifica un polipéptido quimérico que contiene la secuencia de un antígeno de interés flanqueada en su extremo N-terminal por la secuencia del péptido señal de una proteína G de novirabdoavirus y en su extremo C-terminal por la secuencia del dominio transmembrana de una proteína G de novirabdoavirus, la expresión de este gen quimérico daba lugar a la incorporación de la forma madura de su producto de traducción en la cubierta viral, sin que esta incorporación interfiera con el ensamblaje del virión ni con su capacidad de infectar las células en cultivo y replicarse.

La presente invención tiene por objeto un novirabdoavirus recombinante que contiene en su genoma, además de los genes que codifican las proteínas N, P, M, G y L endógenas de dicho novirabdoavirus, un gen exógeno que codifica una proteína quimérica, caracterizándose dicha proteína quimérica porque comprende la secuencia de una proteína antigénica de interés, no siendo dicha proteína antigénica de interés una glicoproteína, fusionada en su extremo N terminal con el péptido señal de la proteína G de un rabdoavirus y en su extremo C-terminal con un fragmento de secuencia de una proteína G de rabdoavirus, comprendiendo dicho fragmento el dominio transmembrana de dicha proteína G de rabdoavirus o una parte de ésta que comprende al menos 15 aminoácidos C-terminales consecutivos de dicho dominio, caracterizado porque comprende además, a continuación del dominio transmembrana o de la parte de éste, el dominio intravirión de una proteína G de rabdoavirus, o una parte de dicho dominio intravirión, que comprende al menos 3 aminoácidos N-terminales consecutivos de dicho dominio.

La parte de dicho dominio transmembrana de dicha proteína G de rabdoavirus comprende, preferentemente, al menos 16 y, por orden de preferencia creciente, al menos 17, 18, 19, o 20 aminoácidos consecutivos de dicho dominio. Se define aquí como dominio transmembrana de la proteína G de un rabdoavirus, la región de la proteína G situada entre el ectodominio y el dominio intravirión de dicha proteína. El dominio transmembrana puede localizarse fácilmente por el experto en la técnica en la secuencia de una proteína G, por ejemplo, a partir de las anotaciones que figuran en las bases de datos o, llegado el caso, mediante un programa de predicción de dominios proteicos, tal como TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) o InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>).

A título de ejemplos no limitativos, según las indicaciones suministradas por la base de datos Uniprot/Swissprot, el dominio transmembrana de la proteína G corresponde en los novirabdoavirus, a los aminoácidos 462-482 de la secuencia del precursor de la proteína G en el caso del VHSV, del VNHI y del rabdoavirus hirame, y a los aminoácidos 464-486 en el caso del SHRV. En los rabdoavirus distintos de los novirabdoavirus, este dominio transmembrana corresponde a los aminoácidos 460-480 de la secuencia del precursor de la proteína G en el caso del virus de la rabia (Lyssavirus), a los aminoácidos 468-488 en el caso del virus de la estomatitis vesicular (Vesiculovirus), y a los aminoácidos 462-482 en el caso del virus de la viremia primaveral de la carpa (Vesiculovirus).

Ventajosamente, dicho dominio transmembrana se elige entre los de las proteínas G de lyssavirus, de vesiculovirus y de novirabdoavirus. De manera completamente preferida, se trata del dominio transmembrana de la proteína G de un novirabdoavirus.

Generalmente, por razones de comodidad de la construcción del gen quimérico, dicho dominio intravirión se obtendrá de la proteína G del mismo rabdoavirus que el dominio transmembrana; es sin embargo posible asociar un dominio transmembrana y un dominio intravirión (o sus partes) obtenidos de rabdoavirus diferentes. La parte del dominio intravirión comprende, ventajosamente, al menos 4, y por orden de preferencia creciente al menos 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos consecutivos de dicho dominio. Aunque se prefiere que el extremo C-terminal de la proteína antigénica de interés se fusione directamente con el extremo N-terminal del dominio transmembrana, es sin embargo

concebible, en determinados casos, que algunos aminoácidos C-terminales del ectodominio (generalmente menos de 20, preferentemente menos de 10, y ventajosamente menos de 5) estén presentes entre la proteína antigénica de interés y el dominio transmembrana.

5 El péptido señal de la proteína G de un rabdovirus puede ser cualquier péptido que permita el direccionamiento de la proteína quimérica en el retículo endoplásmico de la célula infectada por el novirabdovirus, seguido de escisión de dicho péptido señal. Un gran número de péptidos señal utilizables para este objetivo son conocidos en sí mismos por el experto en la técnica. Llegado el caso, se puede utilizar el péptido señal endógeno de la proteína antigénica de interés que se desea expresar, si ésta posee uno. Ventajosamente, se puede utilizar el péptido señal de la proteína G de un novirabdovirus; no es indispensable que este péptido señal se obtenga de la proteína G del mismo virus que el dominio transmembrana y/o que el dominio intravirión.

10 La proteína o el fragmento antigénico de interés puede ser de naturaleza no glicoproteica, es decir, que se trata de polipéptidos que no están glicosilados cuando se expresan en células animales.

15 Se puede tratar principalmente de un antígeno derivado de un patógeno viral, bacteriano, fúngico, de un parásito protozoario, o de un antígeno tumoral, o bien de una proteína recombinante que asocia diversos fragmentos antigénicos, obtenidos de un mismo antígeno o de antígenos diferentes.

El tamaño de esta proteína antigénica puede variar de algunos aminoácidos a algunas centenas de aminoácidos; preferentemente, tendrá de 100 a 600 aminoácidos y, de manera completamente preferida, de 300 a 600 aminoácidos.

20 A título de ejemplo no limitativo de proteína antigénica de naturaleza no glicoproteica, se citará el dominio III de la proteína E de los flavivirus. Aunque la proteína E entera sea una glicoproteína, su dominio III no contiene ningún sitio de glicosilación.

Un novirabdovirus recombinante según la invención puede obtenerse a partir de cualquier novirabdovirus, principalmente VNHI, VSHV, HIRRV, o SHRV. Los novirabdovirus preferidos son VNHI y VSHV.

25 Según un primer modo de realización de un novirabdovirus recombinante según la invención, el gen que codifica la proteína quimérica se inserta reemplazando el gen NV endógeno de dicho novirabdovirus. Los novirabdovirus recombinantes según este primer modo de realización pueden construirse como se describe, por ejemplo, por BIACCHESI et al., (2000, 2002, 2010, precitados), ALONSO et al., (2004 precitado) o en la Solicitud PCT WO 2003/097090.

30 Según un segundo modo de realización de un novirabdovirus recombinante según la invención, se conserva el gen NV endógeno y el gen que codifica la proteína quimérica se inserta en una unidad de transcripción adicional posicionada en una región intergénica del genoma viral. Los novirabdovirus recombinantes según este segundo modo de realización pueden construirse como se describe, por ejemplo, por BIACCHESI et al., (2010, precitado), HARMACHE et al., (2006, precitado) o en la Solicitud PCT WO 2007/144773.

35 Según este segundo modo de realización, dicho novirabdovirus puede contener varias unidades de transcripción adicionales, en la que cada una contiene un gen exógeno que codifica una proteína quimérica. Preferentemente, dicho novirabdovirus contiene dos unidades de transcripción adicionales y, de manera completamente preferida, tres unidades de transcripción adicionales. Ventajosamente, dichas proteínas quiméricas difieren entre sí al menos por la naturaleza del antígeno de interés y, opcionalmente, por la del péptido señal y/o del dominio transmembrana y/o del dominio intravirión.

40 La presente invención tiene igualmente por objeto construcciones de ADN recombinantes que permiten la obtención de un novirabdovirus según la invención.

En este marco, la presente invención engloba principalmente el ADNc del genoma de un novirabdovirus recombinante según la invención, así como cualquier vector recombinante que comprende dicho ADNc.

45 La presente invención tiene igualmente por objeto las utilidades de un novirabdovirus recombinante según la invención para inducir una respuesta inmune humoral y/o celular frente a la proteína antigénica de interés expresada por dicho novirabdovirus.

Principalmente, la presente invención tiene por objeto un novirabdovirus recombinante según la invención para la utilización como medicamento y, principalmente, como vacuna.

50 Las vacunas que contienen un novirabdovirus recombinante según la invención pueden utilizarse en los peces y, en particular, en los salmónidos, tales como las truchas y los salmones de piscifactorías, según los métodos descritos en la Solicitud PCT WO 2003/097090 o en la Solicitud PCT WO 2007/144773.

Los novirabdovirus recombinantes según la invención y, en particular, los que no se replican más que a baja temperatura como VNHI y VHSV son utilizables para la obtención de vacunas, no solamente en los peces, sino también en otros animales, incluyendo las aves y los mamíferos y, principalmente, los ovinos, los bovinos, los

porcinos, los equinos, los caninos, los felinos, y los primates, en particular el ser humano. En efecto, aunque los novirabdoavirus sean incapaces de replicarse en un animal homeotermo, son capaces de inducir una respuesta inmune fuerte frente a un antígeno heterólogo de interés presente en la superficie de la partícula viral.

5 En este marco, los novirabdoavirus según la invención pueden utilizarse como vacunas antivirales, antibacterianas, antifúngicas, o antitumorales, según la naturaleza del antígeno de interés elegido.

Estas vacunas pueden formularse para una utilización por vía parenteral, por ejemplo, por vía intradérmica, intramuscular, o subcutánea, por vía oral, o por vía mucosa, por ejemplo, intranasal. La cantidad de virus recombinantes por dosis vacunal se elige de manera que se permite un nivel de expresión de la proteína antigénica de interés suficiente para inducir una respuesta inmunitaria frente a esta proteína. Ésta la puede determinar el experto en la técnica principalmente en función de la naturaleza de dicha proteína antigénica, de la especie y de la edad del sujeto a vacunar, del tipo de respuesta inmunitaria (celular o humoral) que se desea favorecer.

15 La presente invención tiene igualmente por objeto un método no terapéutico para la producción de anticuerpos dirigidos frente a la proteína antigénica de interés, comprendiendo dicho método la inmunización de un animal no humano con un novirabdoavirus recombinante que comprende dicha proteína antigénica de interés y según la invención, y la recuperación de su suero (para la producción de anticuerpos policlonales), o de sus células linfocitarias (para la producción de anticuerpos monoclonales).

La presente invención se comprenderá mejor con la ayuda del complemento de la descripción que sigue, que se refiere a ejemplos no limitativos de construcción de un novirabdoavirus recombinante según la invención.

20 Ejemplo 1: construcción de un novirabdoavirus recombinante que contiene un gen que codifica una proteína quimérica que comprende el dominio III de la glicoproteína E del Virus del Nilo Occidental (VNO).

Las construcciones se han efectuado a partir del plásmido pVHSV, descrito por BIACCHESI et al. (2010, precitado). Este plásmido contiene el ADNc completo del genoma de un virus VHSV (cepa 23-75, GenBank FN665788), clonado en 3' del promotor de la ARN polimerasa del fago T7 y en 5' de una secuencia de ribozima del virus de la hepatitis  $\delta$  y del terminador de la transcripción de la ARN polimerasa del fago T7, en el vector pBlueScript SK (STRATAGENE).

El plásmido pVHSV contiene un sitio de restricción único *Pst*I situado en la región intergénica entre los genes N y P. Este sitio se ha utilizado para insertar una unidad de transcripción adicional, que contiene una secuencia que codifica una proteína de fusión constituida por la secuencia del dominio III de la glicoproteína E del Virus del Nilo Occidental (GenBank AF481864) precedida por el péptido señal de la proteína G de VHSV (cepa 23-75, GenBank CBJ23832.1.), y seguida por los que contienen un sitio *Spe*I (ACTAGT) y un sitio *Nhe*I (GCTAGC) y DIIIHVMTMR:

5'-GGCCCCTCCCACAACCCCATCCCAGATAACGCTCCTTTGAGGGTGGTTGTAAAGG-3' (SEQ ID NO: 2).

Una segunda amplificación por PCR se efectuó a partir del ADNc de VHSV, utilizando los cebadores siguientes: DIIITMSHFV:

5'-CCTTTACAACCACCCTCAAAGGAGCGTTATCTGGGATGGGGGTTGTGGGAGGGGCC-3' (SEQ ID NO: 3), y

35 SHVTMR:

5'-TACGTATCAGACCGTCTGACTTCTAGAGAACTGC-3' (SEQ ID NO: 4), que contiene un sitio *Sna*BI (TACGTA)

Los dos productos de la amplificación se mezclaron y se efectuó una tercera amplificación por PCR a partir de la mezcla, utilizando los cebadores:

SPSHVF:

40 5'-ACTAGTATGGACACCACGATCACCACTCCGC-3' (SEQ ID NO: 5), que contiene un sitio *Spe*I (ACTAGT) y SHVTMR (SEQ ID NO: 4).

El producto de esta tercera amplificación (SPg-DIII-TMg), que contiene la secuencia que codifica el péptido señal de la proteína G de VHSV, en fase de lectura con la que codifica el dominio III de la glicoproteína E del Virus del Nilo Occidental, y la que codifica los 42 aminoácidos C-terminales de la proteína G de VHSV se clonó en un vector pJet1.2 (FERMENTAS). El inserto SPg-DIII-TMg se escindió de este vector por digestión con *Spe*I/*Sna*BI y se clonó, en el lugar del gen tdTomato, en el plásmido pVSHV-dTomato (descrito por BIACCHESI et al., 2010, precitado) previamente digerido con *Spe*I/*Sna*BI, para obtener la construcción final pSHV-SPg-DIII-TMg.

Producción de los novirabdoavirus recombinantes:

50 Se construyeron tres plásmidos de expresión que contienen respectivamente los genes que codifican la nucleoproteína N, la fosfoproteína P y la ARN polimerasa dependiente de ARN L de VHSV, como se describe por

BIACCHESSI et al. (2010, publicación precitada). Estas construcciones se denominan respectivamente pT7-N, pT7-P y pT7-L.

5 El plásmido pVHSV o el plásmido pVHSV-SPg-DIII-TMg, a una dosis de 1 µg, y los 3 plásmidos, pT7-N, pT7-P, pT7-L, a dosis respectivas de 0,25 µg, 0,2 µg, 0,2 µg se introducen por transfección en presencia de Lipofectamina (GIBCO-BRL) en células EPC previamente infectadas con un virus de la vacuna recombinante que expresa la ARN polimerasa del fago T7 (vTF7-3, FUERST et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4477-4481, 1986).

10 Después de la transfección, las células se incuban durante 5 horas a 37 °C, después se lavan con medio de cultivo MEM (sin suero) y se incuban durante 7 días a 14 °C en medio de cultivo MEM que contiene 2 % de suero fetal de ternera. Las células y el sobrenadante se congelan/descongelan y se aclaran por centrifugación durante 10 minutos a 10.000 giros/min. El sobrenadante se utiliza a la dilución 1/10 para infectar un tapiz de células EPC (Epitelioma Papuloso de Carpa, derivadas de células epiteliales de carpa). Los virus se producen en el sobrenadante 3-4 días después de la infección.

Los virus obtenidos se denominan, respectivamente, rVHSV, en el caso del virus que posee el genoma del virus salvaje y rVHSV-SPg-DIII-TMg en el caso del virus que contiene el gen que codifica la proteína de fusión.

15 Se constituyeron preparaciones madre virales de cada uno de los virus producidos por subcultivos sucesivos en cultivo celular del sobrenadante recogido 7 días después de la transfección (sobrenadante PO) en las células EPC. Las células se infectan a una multiplicidad de infección (m.i) de 1. Después de 3 subcultivos, se recogieron los sobrenadantes a diferentes tiempos después de la infección y se titularon por dilución limitada para establecer una curva de crecimiento.

20 Las curvas de crecimiento establecidas para los virus rVHSV y rVHSV-SPg-DIII-TMg muestran que el virus rVHSV-SPg-DIII-TMg se multiplica en cultivo celular tan bien como el virus rVHSV.

La expresión del dominio III de la glicoproteína E del Virus del Nilo Occidental en las células infectadas por rVHSV-SPg-DIII-TMg se verificó a los 2 días después de la infección, por un ensayo de inmunofluorescencia indirecta mediante un anticuerpo monoclonal anti-DIII, en células infectadas vivas o fijadas con alcohol/acetona.

25 Ejemplo 2: expresión del dominio III de la glicoproteína E del Virus del Nilo Occidental en la superficie del novirabdovirus.

Las células EPC se infectaron como se describe en el Ejemplo 1 anterior, con el virus rVHSV o con el virus rVHSV-SPg-DIII-TMg.

30 Tres días después de la infección, se recuperó el sobrenadante del cultivo y los virus se purificaron sobre gradiente de sacarosa a partir de este sobrenadante.

Las proteínas virales se separaron por electroforesis SDS-PAGE y se visualizaron después de tinción con azul de Coomassie, o después de transferencia Western e incubación con un anticuerpo monoclonal dirigido frente al dominio III de la glicoproteína E de VNO.

Los resultados se ilustran por la Figura 1.

35 Leyenda de la Figura 1:

A: Panel de la izquierda: Gel de SDS PAGE teñido con azul de Coomassie de los virus rVHSV y rVHSV-SPg DIII TMg purificados sobre gradiente de sacarosa antes de transferencia para transferencia Western;

Panel de la derecha: transferencia Western con el anticuerpo monoclonal dirigido frente al dominio III de la glicoproteína E de VNO;

40 B: Geles de SDS PAGE de virus purificado teñidos con azul de Coomassie.

M: Marcador de peso molecular,

1: rVHSV

2: rVHSV-SPg-DIII-TMg.

45 Estos resultados muestran que el dominio III de la glicoproteína E de VNO está fuertemente expresado en las partículas del virus rVHSV-SPg-DIII-TMg.

Las partículas virales rVHSV-SPg-DIII-TMg purificadas se observaron igualmente al microscopio electrónico después de inmunomarcaje con oro coloidal utilizando bien un anticuerpo dirigido frente al dominio III de la glicoproteína E de VNO, bien un anticuerpo dirigido frente a la glicoproteína G de VSHV.

Los resultados se ilustran por la Figura 2. Los puntos negros en la superficie de las partículas virales indican la presencia del dominio III de la glicoproteína E de VNO (Figura 2A), así como de la glicoproteína G de VSHV (Figura 2B) en la superficie de los virus rVHSV-SPg-DIII-TMg.

5 Esto muestra que el antígeno de interés se expresa muy fuertemente y muy eficazmente en la superficie de las partículas virales.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE BREMONT, Michel NZONZA, Angella	
	<120> Novirabdovirus recombinante utilizable como vector de antígenos	
5	<130> MJP-11-F539-159WO	
	<150> 1259815	
	<151> 15-10-2012	
10	<160> 5	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 94	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador PCR	
	<400> 1	
	actagtatgg acaccacgat caccactccg ctcattctca ttctgatcac ctgctggagca	60
	gctagcggaa caacctatgg cgtctgttca aagg	94
25	<210> 2	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador PCR	
	<400> 2	
35	ggcccctccc acaaccccca tccagataa cgctccttg aggggtggtg taaagg	56
	<210> 3	
	<211> 56	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
45	<400> 3	
	cctttacaac caccctcaaa ggagcgttat ctgggatggg ggtgtggga ggggcc	56
	<210> 4	
	<211> 34	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
55	<400> 4	
	tacgtatcag accgtctgac ttctagagaa ctgc	34
	<210> 5	
60	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	



# ES 2 663 386 T3

<220>

<223> Cebador PCR

<400> 5

5 actagtatgg acaccacgat caccactccg c 31

**REIVINDICACIONES**

- 5 1) Novirabdovirus recombinante cuyo genoma contiene, además de los genes que codifican las proteínas N, P, M, G y L endógenas de dicho novirabdovirus, un gen exógeno que codifica una proteína quimérica, caracterizándose dicha proteína quimérica porque comprende la secuencia de una proteína antigénica de interés, no siendo dicha proteína antigénica de interés una glicoproteína, fusionada en su extremo N terminal con el péptido señal de la proteína G de un rabdovirus y en su extremo C-terminal con un fragmento de secuencia de una proteína G de rabdovirus, comprendiendo dicho fragmento el dominio transmembrana de dicha proteína G de rabdovirus o una parte de ésta que comprende al menos 15 aminoácidos C-terminales consecutivos de dicho dominio, caracterizado porque comprende además, a continuación del dominio transmembrana o de la parte de éste, el dominio intravirión de una proteína G de rabdovirus, o una parte de dicho dominio intravirión, que comprende al menos 3 aminoácidos N-terminales consecutivos de dicho dominio.
- 10 2) Novirabdovirus recombinante según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho dominio transmembrana y/o dicho dominio intravirión se elige(n) entre los de las proteínas G de lyssavirus, de vesiculovirus y de novirabdovirus.
- 15 3) Novirabdovirus recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque está desprovisto del gen NV endógeno y porque el gen que codifica la proteína quimérica se inserta reemplazando dicho gen NV.
- 20 4) Novirabdovirus recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque contiene el gen NV endógeno y porque el gen que codifica la proteína quimérica se inserta en una unidad de transcripción adicional posicionada en una región intergénica del genoma viral.
- 5) Novirabdovirus recombinante según la reivindicación 4 caracterizado porque contiene al menos dos unidades de transcripción adicionales en el que cada una contiene un gen exógeno que codifica una proteína quimérica tal como se define en una de las reivindicaciones 1 o 2.
- 6) Novirabdovirus recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se elige entre un virus de la necrosis hematopoyética infecciosa y un virus de la septicemia hemorrágica viral.
- 25 7) Molécula de ADNc del genoma de un novirabdovirus recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 8) Novirabdovirus recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la utilización como vacuna que induce una respuesta inmune dirigida frente al antígeno de interés expresado por dicho novirabdovirus.
- 30 9) Novirabdovirus recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la utilización como vacuna según la reivindicación 8, caracterizado porque dicha vacuna se elige entre una vacuna anti-viral, una vacuna antibacteriana, una vacuna antifúngica, una vacuna antiparasitaria o una vacuna antitumoral.
- 10) Método no terapéutico para la producción de anticuerpos dirigidos frente a una proteína antigénica de interés, comprendiendo dicho método la inmunización de un animal no humano con un novirabdovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende dicha proteína antigénica de interés.
- 35

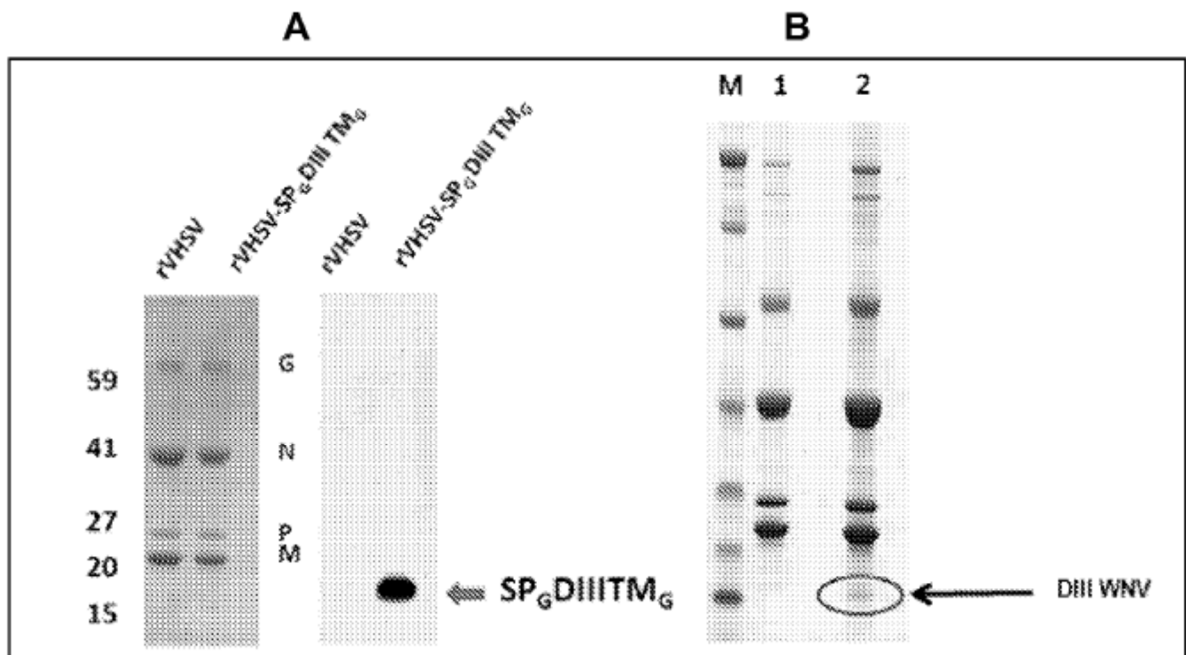


Figura 1

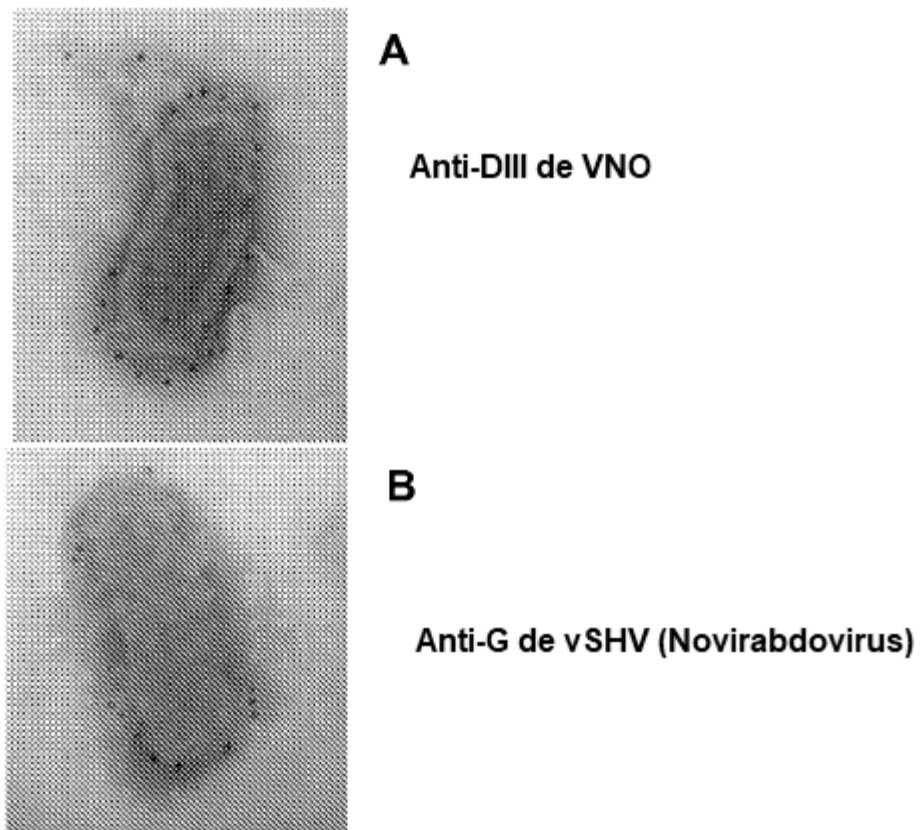


Figura 2