

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 069**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2013** **PCT/US2013/045667**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013** **WO13188673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2013** **E 13766730 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017** **EP 2861248**

54 Título: **Vacunas contra BTV y AHSV de genoma reordenado**

30 Prioridad:

13.06.2012 US 201261659198 P

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

18.04.2018

73 Titular/es:

MERIAL, INC. (50.0%)

3239 Satellite Blvd.

Duluth, GA 30096, US y

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF GLASGOW (50.0%)**

72 Inventor/es:

PALMARINI, MASSIMO;

HUDELET, PASCAL;

AUDONNET, JEAN-CHRISTOPHE y

NUNES, SANDRO, FILIPE

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 664 069 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 contra BTV y AHSV de genoma reordenado

5 **CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN**

[0001] La presente descripción se refiere a composiciones para combatir el Virus de la lengua azul (BTV) o infección por el virus la peste equina africana (VPE) en los animales. La presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vector recombinante de BTV o AHSV, los procedimientos de vacunación contra el BTV o AHSV, y kits para usar con tales procedimientos y composiciones.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

[0002] La lengua azul (BT) es una enfermedad viral infecciosa transmitida por artrópodos de los rumiantes. El ganado vacuno y las cabras pueden infectarse fácilmente con el BTV causante pero sin lesión vascular extensa y por lo tanto estas especies generalmente no muestran signos clínicos pronunciados. En cambio, la enfermedad en el ganado ovino se caracteriza por la inflamación catarral de las membranas mucosas de la boca, la nariz y preestómagos, y por la inflamación de las bandas coronarias y láminas de los cascos. Hay una excoriación del epitelio, y en última instancia la necrosis de la mucosa bucal; la lengua y la boca hinchada e inflamada pueden tomar un color azul a partir del cual se llama la enfermedad (Spreull 1905). La tasa de mortalidad en el ganado ovino se estima en el 1-30%.

[0003] BTV es el virus prototipo del género *Orbivirus* (familia *Reoviridae*) y se compone de al menos 24 serotipos diferentes (Wilson y Mecham 2000). Las diferentes cepas de BTV se han identificado en todo el mundo a lo largo de zonas tropicales y templadas. La infección por BTV ha aparecido tan lejos como 45°N en Europa, tan lejos como 50°N en Asia y América del Norte, y tan lejos en el sur hasta 35°. El BTV no es contagioso entre los rumiantes, por lo tanto la distribución de BTV es dependiente de la presencia de especies de vectores de artrópodos de *Culicoides* sp. (mosquitos mordedores), con diferentes especies de vectores que se producen en diferentes regiones del mundo. Los datos recientes sugieren que la deriva genética y el efecto fundador contribuyen a la diversificación de los segmentos génicos individuales de cepas de campo de BTV (Bonneau, Mullens et al. 2001). Se ha demostrado que los animales seropositivos en BTV son resistentes a la reinfección con el serotipo de BTV homólogo.

[0004] La infección con BTV de los rumiantes es transitoria, mientras que la infección del vector del insecto *Culicoides* es persistente. La duración de la viremia depende de la especie animal y de la cepa de BTV. Se ha descrito que la viremia puede ser muy transitoria en el ganado ovino y puede durar hasta 41 días en individuos infectados con BTV, hasta 42 días en las cabras, y hasta 100 días en el ganado vacuno. Dado que la infección con BTV del ganado vacuno a menudo da lugar a viremia prolongada, pero no persistente, el ganado vacuno sirve como un depósito desde el que el virus puede ser ingerido por el vector *Culicoides* y a continuación transmitido a otros rumiantes (Anderson, Stott et al 1985; MacLachlan 1994; MacLachlan y Pearson 2004). La ecología de muchas especies de vectores *Culicoides* es poco conocida y sus sitios de reproducción están en gran parte sin caracterizar, y sus tasas de dispersión son desconocidas. *Culicoides sonorensis* es el principal vector de BTV en América del Norte. Los insectos *Culicoides* hembra se infectan persistentemente con BTV y pueden transmitir el virus después de un período de incubación extrínseca de hasta 14 días (Mullens, Tabachnick et al. 1995). La invasión de BTV en las zonas templadas se puede producir a través de vectores de insecto infectados verticalmente, aunque los datos recientes indican que hay una reducción en la expresión de los genes de la cápside externa durante la infección persistente con BTV en estadios larvarios de los vectores de insectos (White, Wilson et al. 2005).

[0005] Los viriones de BTV tienen un diámetro de ~ 69 nm con una capa de doble envoltura (cápside) que a veces está rodeada de una "pseudo-envoltura" de lipoproteína derivada de las membranas celulares de las células infectadas. El genoma de BTV incluye 10 segmentos distintos de ARN de doble cadena que codifican colectivamente siete proteínas estructurales (VP1 a VP7) y cuatro proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3 y NS3a) (Roy 1996); 9 de los segmentos del genoma son monocistronicos, mientras que el segmento 10 codifica tanto NS3 como NS3A utilizando un segundo codón de iniciación en el marco. El ARN genómico está encapsidado en la partícula del virión icosaédrica por una cápside de proteína de doble capa (Verwoerd, Els et al. 1972). El núcleo icosaédrico consiste en dos proteínas principales (VP3 y VP7) y tres proteínas minoritarias (VP1, VP4, VP6) y está rodeado por la cápside externa que consiste en VP2 y VP5 que respectivamente están codificadas por los segmentos genómicos 2 y 5 (Roy 1996). VP2 es responsable de la unión y la entrada de BTV en las células, neutralización, especificidad de serotipo y hemaglutinación. Las formas multiméricas de VP2 (dímeros y trímeros) decoran gran parte de la superficie de un andamio de VP5 en la superficie exterior de las partículas virales (Hassan y Roy 1999). VP2 varía más entre los 24 serotipos de BTV, y los niveles de anticuerpo anti-VP2 se correlacionan con la neutralización del virus *in vitro* e *in vivo* (Huisman y Erasmus 1981). VP5 también varía notablemente entre diferentes serotipos y cepas de BTV (de Mattos, de Mattos et al 1994; DeMaula, Bonneau et al 2000) y aunque no se han identificado MAb neutralizantes específicos de VP5 hasta la fecha, los datos sugieren que esta proteína

tiene un papel en la neutralización y determinación del serotipo a través de su influencia conformacional en VP2 (Huismans y Erasmus 1981; Roy, Urakawa et al 1990; DeMaula et al, 2000). La VP2 purificada, inmunoabsorbida con suero anti-núcleo de BTV para eliminar cantidades traza de VP7, se inyectó en ovejas. Una dosis inicial de 50 microgramos de VP2 era suficiente para inducir anticuerpos precipitantes de VP2, así como anticuerpos neutralizantes e inhibidores de hemaglutinación. Estas ovejas fueron completamente protegidas contra la estimulación con una cepa virulenta del mismo serotipo de BTV. Las dosis más bajas de VP2 todavía proporcionaron un nivel significativo de protección a pesar de que no se detectaron anticuerpos neutralizantes antes de la estimulación (Huismans, van der Walt et al. 1987). Resultados recientes demuestran que VP2 y NS1 expresan epítomos reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTL) (Andrew, Whiteley et al. 1995), mientras que es poco probable que VP7 y VP5 tengan epítomos de CTL. Hasta el momento, VP3, VP4, VP6, NS2 y NS3 no han estimulado una respuesta de CTL en ovejas (Lobato, Coupar et al., 1997). La tabla 1 (modificado de Wilson y Mecham 2000) a continuación resume los genes de BTV y su función de la proteína.

Tabla 1 Genes del virus de la lengua azul y proteínas codificadas con la ubicación, propiedades y función de las proteínas

Segmento de genoma	Proteína	Ubicación	Propiedades y función
L1 (3954 pb) 150 kDa)	VP1	en el subnúcleo en el eje de orden 5	ARN polimerasa dependiente de ARN
L2 (2926 pb) 111 kDa)	VP2	cápside externa (trímero)	cápside externa, antígeno específico de serotipo, proteína de unión celular de mamífero, epítomos neutralizantes
L3 (2770 pb) 103 kDa)	VP3	capa de la cápside del subnúcleo (T = 2 simetría)	cubierta de la cápside de las proteínas más internas, capa de la cápside del subnúcleo, autoensambla, conserva la simetría icosaédrica, unión a ARN, interactúa con proteínas menores internas
M4 (2011 pb) 76 kDa)	VP4	en el subnúcleo en el eje de orden 5	enzima de bloqueo, guaniltransferasa
M5 (1638 pb) 59 kDa)	VP5	cápside externa (trímero)	proteína de la cápside externa interna, puede afectar a la características del serotipo del virus
M6 (1769 pb) 64 kDa)	NS1	citoplasma	Forma túbulos en el citoplasma celular
S7 (1156 pb) 38 kDa)	VP7	núcleo externo (T = 13 simetría, trímero)	proteína de superficie del núcleo externo, antígeno específico de serogrupo principal inmunodominante, proteína de unión para los anticuerpos "neutralizantes del núcleo"
S8 (1124 pb) 41 kDa)	NS2	Citoplasma, cuerpos de inclusión viral (VIB)	proteínas importantes de la matriz de cuerpos de inclusión viral, unión a ARNss, fosforilada, se puede asociar con cápside externa
S9 (1046 pb) 36 kDa)	VP6	en el subnúcleo en el eje de orden 5	unión a ARNss y ARNds, helicasa, NTPasa
S10 (822 pb) 24 kDa)	NS3, NS3a	Membranas celulares	glicoproteínas, proteínas de membrana, implicada en la salida celular

[0006] Los polipéptidos antigénicos de BTV de interés incluyen VP2 y VP5. El núcleo icosaédrico consiste en dos proteínas principales (VP3 y VP7) y tres proteínas minoritarias (VP1, VP4, VP6) y está rodeado por la cápside externa que consiste en VP2 y VP5 que respectivamente están codificadas por segmentos genómicos 2 y 5 (Roy 1996). VP2 es responsable de la unión y la entrada de BTV en las células, la neutralización, la especificidad de serotipo y hemaglutinación. Las formas multiméricas de VP2 (dímeros y trímeros) decoran gran parte de la superficie de una estructura de VP5 en la superficie exterior de las partículas virales (Hassan y Roy 1999). VP2 varía más entre los 24 serotipos de BTV, y los niveles de anticuerpo anti-VP2 se correlacionan con la neutralización del virus *in vitro* e *in vivo* (Huismans y Erasmus 1981). VP5 también varía notablemente entre diferentes serotipos y cepas de BTV (de Mattos, de Mattos et al 1994; DeMaula, Bonneau et al 2000) y aunque no se han identificado MAb neutralizantes específicos de VP5 hasta la fecha, los datos sugieren que esta proteína tiene un papel en la neutralización y determinación del serotipo a través de su influencia en la conformación de VP2 (Huismans y Erasmus 1981; Roy, Urakawa et al 1990;... DeMaula et al, 2000). La VP2 purificada, inmunoabsorbida con suero anti-núcleo de BTV para eliminar cantidades traza de VP7, se inyectó en ovejas. Una dosis inicial de 50 microgramos de VP2 era suficiente para inducir anticuerpos precipitantes de VP2, así como anticuerpos neutralizantes e inhibidores de hemaglutinación. Estas ovejas estaban completamente protegidas contra la estimulación con una cepa virulenta del mismo serotipo de BTV. Dosis más bajas de VP2 todavía proporcionaron un nivel significativo de protección aún cuando no se detectaron anticuerpos neutralizantes antes de la estimulación (Huismans, van der Walt et al.

1987). Resultados recientes demuestran que VP2 y NS1 expresan epítomos reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTL) (Andrew, Whiteley et al. 1995), mientras que es poco probable que VP7 y VP5 tengan epítomos de CTL. Hasta el momento, VP3, VP4, VP6, NS2 y NS3 no han estimulado una respuesta de CTL en ovejas (Lobato, Coupar et al. 1997), véase la Tabla 1.

[0007] La peste equina africana (PEA) es una enfermedad viral transmitida por artrópodos grave, a menudo mortal, de caballos y mulas (peste equina africana, The Merck Manual Veterinary). La tasa de mortalidad puede ser de hasta el 95% en algunas formas de esta enfermedad. Las infecciones asintomáticas o leves pueden aparecer en caballos, así como cebras y burros, especialmente caballos que fueron previamente infectados con un serotipo diferente del virus. Los animales o vectores infectados pueden llevar el virus en regiones libres de PEA. Algunos autores especulan que el cambio climático podría aumentar el riesgo de propagación de enfermedades transmitidas por artrópodos, tales como la peste equina africana, tal como ha ocurrido recientemente con el virus de la lengua azul relacionado (Wilson A et al, Parasitol Res 2008; 103: 69-77). *Culicoides imicola*, el principal vector de esta enfermedad, ha hecho incursiones en el norte de África y el sur de Europa. Los vectores de artrópodos potenciales también existen en prácticamente todas las regiones del mundo, incluida gran parte de los Estados Unidos y el resto de las Américas.

[0008] La peste equina africana resulta de la infección con el virus de la peste equina africana, un miembro del género Orbivirus en la familia Reoviridae. Hasta la fecha, se conocen 9 serotipos de virus de la peste equina africana. El serotipo 9 del virus de la peste equina africana está muy extendido en las regiones endémicas, mientras que los serotipos 1 a 8 se encuentran principalmente en áreas geográficas limitadas. El serotipo 9 ha sido responsable de la mayoría de los brotes de peste equina africana fuera de África. El serotipo 4 causó un brote en España y Portugal entre 1987 y 1990 (Lubroth J., Equine Pract 1988; 10: 26-33).

[0009] Las primeras investigaciones sobre el virus de la peste equina africana dio como resultado el desarrollo de una vacuna contra virus vivo modificado atenuado de cerebro de ratón para el virus de la peste equina africana en la década de 1930. Estas vacunas se refinaron y dieron lugar al desarrollo de una vacuna contra virus vivo modificado (MLV) atenuado de cultivo de tejidos en la década de 1960.

[0010] A pesar de la eficacia de esta vacuna, tiene algunas limitaciones inherentes, incluyendo reacciones de la vacuna (incluida la muerte) en animales individuales, respuesta inmunitaria variada en animales individuales, dificultad en la inmunización de animales jóvenes con inmunidad materna pasiva, posibilidad de reversión a virulencia del virus de la vacuna y la recombinación de cepas de la vacuna después de la vacunación con una posible reversión a virulencia (du Plessis M. et al.1998, Onderstepoort Journal of Veterinary Research 65: 321-329). También hay implicaciones socio-económicas con el uso de la vacuna de MLV. Sudáfrica tiene un protocolo que le permite exportar caballos a la Unión Europea y una serie de otros países. Este protocolo también hace posible que los caballos de otros países entren en Sudáfrica para competir en varios eventos o estar disponible como semental durante un período temporal. El protocolo se basa en asegurar que los caballos sean vacunados adecuadamente contra el virus de la peste equina africana. Las autoridades veterinarias son conscientes de los posibles peligros del uso de la vacuna de MLV. La mayoría de estos problemas se reducirían en gran medida mediante el desarrollo de vacunas alternativas de virus de peste equina africana.

[0011] El genoma del virus de la peste equina africana se compone de diez segmentos de ARN bicatenario (Oellermann, RA et al., 1970 Bremer, CW et al., 1976); que codifican al menos diez proteínas virales. Los segmentos del genoma se enumeran 1-10 en orden de su migración en PAGE. Siete de las proteínas virales son estructurales y forman la partícula de virus de doble envoltura. La cápside externa se compone de dos proteínas virales principales, VP2 y VP5, que determinan la variabilidad antigénica del virus de la peste equinaafricana, mientras que el cápside interior se compone de dos proteínas virales principales (VP3 y VP7) y tres minoritarias (VP1, VP4 y VP6) (Lewis SA y Grubman MJ, 1991; Martínez-Torrecuadrada JL et al, 1994); Bremer, CW, et al. 1990; Grubman, MJ & Lewis, SA, 1992). VP3 y VP7 están altamente conservadas entre los nueve serotipos (Oellermann et al, 1970; Bremer et al., 1990). Al menos tres proteínas no estructurales, NS1, NS2 y NS3, han sido identificadas (Huismans, H. & Els, HJ, 1979; van Staden, V. & Huismans, H., 1991; Mizukoshi, N. et al, 1992).

[0012] Los virus de la viruela del canario recombinantes derivados de virus atenuados se han desarrollado como vectores para la expresión de genes virales heterólogos. Un número de estas construcciones de la viruela del canario ya han sido autorizadas como vacunas en muchos países, incluyendo Sudáfrica, la Unión Europea y los Estados Unidos de América para su uso en caballos (Minke JM, et al, 2004a y b; Minke JM, et al., 2007; Siger L, et al.2006) y otras especies (Poulet H, et al, 2003).

[0013] El hecho de que estas vacunas sólo contienen genes del organismo de interés las hace inherentemente seguras (Minke JM, et al., 2004b). Además, la aparición de anticuerpos neutralizantes detectables es rápida, incluso después de una sola dosis de vacuna (Minke JM et al., 2004b). La seguridad inherente de tales vacunas y la naturaleza del desarrollo

de anticuerpos neutralizantes hacen que dichas vacunas sean particularmente atractivas para su uso en epizootias (Minke JM et al., 2004a).

[0014] Estudios anteriores han demostrado que los caballos desarrollan anticuerpos neutralizadores para AHS cuando se inoculan con VP2 expresada de forma exógena y un adyuvante apropiado (Scanlen M, et al., 2002). Los estudios en ovejas han demostrado que la respuesta de anticuerpos neutralizantes al virus de la lengua azul se ve reforzada por la inoculación de ovejas con partículas similares a virus en la que VP2 y VP5 son coexpresadas (Pearson LD, Roy P, 1993). Una vacuna contra el virus de viruela del canario recombinante que coexpresa los genes que codifican las proteínas de la cápside externa VP2 y VP5 del virus de la lengua azul se ha demostrado recientemente que induce altos niveles de protección en ovejas (Boone JD, et al., 2007).

[0015] No se ha demostrado que los caballos desarrollen anticuerpos neutralizantes para el virus de la peste equina africana cuando se inocula con un vector que contiene y coexpresa VP2 y VP5 de AHSV. Por tanto, puede entenderse que la presente descripción satisface una necesidad en la técnica proporcionando un poxvirus recombinante que incluye composiciones y productos de los mismos, en particular recombinantes basados en ALVAC y composiciones y productos de los mismos, especialmente dichos recombinantes que expresan VP 2 y 5 de AHSV o cualquier combinación de los mismos y composiciones y productos de los mismos.

[0016] Los estudios relativos a la modificación genética de BTV o AHSV han sido descritos por Piet A van Rijn et al. (Virology Journal, 2010, 7: 261), Polly Roy et al. (Journal of Virology, 2011, 85, 19; 10213 a 10221), Polly Roy et al. (Journal of Virology, 2008, pág. 8339-8348), Massimo Palmarini et al. (PLoS pathogens, 2011, 7 (12): e1002477) y, en WO2009/068870.

[0017] Por lo tanto, sería ventajoso proporcionar composiciones mejoradas inmunogénicas y de vacuna contra BTV y AHSV, y procedimientos para fabricar y usar tales composiciones, incluyendo dichas composiciones que proporcionan para procedimientos de diagnóstico diferenciales, ensayos y kits.

[0018] Teniendo en cuenta la susceptibilidad de los animales, incluyendo seres humanos, a BTV o AHSV, un procedimiento de prevención de la infección por BTV o AHSV y la protección de los animales es esencial. En consecuencia, existe una necesidad de una vacuna eficaz contra BTV o AHSV. Una vacuna de genoma reordenado de BTV basado en virus con una cadena principal de BTV-1 y proteínas VP2 y VP5 de BTV-8 heterólogas se conoce de J. Virology, 85, 2011, 10.213-10.221.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0019] La presente invención a la que la presente memoria descriptiva se refiere es tal como se establece en las reivindicaciones 1-7 adjuntas a esta descripción. Se proporcionan composiciones que comprenden uno o más vectores de BTV o AHSV de genoma reordenado recombinante que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican al menos uno de los antígenos de BTV o AHSV.

[0020] Los procedimientos de la descripción incluyen procedimientos para fabricar las composiciones o vectores de BTV o AHSV reordenados recombinantes. Los procedimientos también incluyen procedimientos de uso que incluyen administrar a un animal una cantidad eficaz de las composiciones o vectores para producir una respuesta inmunogénica protectora.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021] La siguiente descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplo, pero que no pretende limitar la descripción únicamente a las realizaciones específicas descritas, pueden entenderse mejor conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra el gráfico esquemático de BTV-1 y BTVA-8 de genoma reordenado y un diagrama de flujo de la generación de vectores de BTV de genoma reordenado recombinante.

La figura 2 representa los diámetros promedio de placa de los genomas reordenados de BTV.

La figura 3 representa los análisis de la curva de crecimiento de los virus de genomas reordenados. La mayoría de los genomas reordenados crecen de manera similar a los virus parentales de tipo natural.

La figura 4 representa los resultados de neutralización de BTV.

La figura 5 representa la generación de genomas reordenados de BTV.

La figura 6 representa el gráfico esquemático de la generación de genomas reordenados de BTV utilizando genética inversa.

La figura 7 muestra la tabla que contiene la asignación de SEQ ID NO y las secuencias de ADN y proteínas.

La figura 8 representa la evolución de la temperatura promedio rectal después de la estimulación.

La figura 9 representa las dispersiones de hipertermias máximas.

La figura 10 representa la evolución de las puntuaciones promedio clínicas diarias.

La figura 11 representa las dispersiones de las puntuaciones clínicas globales.

La figura 12 representa la evolución de títulos promedio de viremia.

5 La figura 13 representa las dispersiones de AUC.

La figura 14 representa la evolución de los títulos promedio de anticuerpos neutralizantes de BTV-8.

La figura 15 representa la morfología de la placa de sBTV que contiene la proteína VP2 y VP5 de cada serotipo.

La figura 16 representa los títulos virales de los virus sBTV en BHK-21.

La figura 17 representa el título infeccioso, ELISA, transferencia de puntos Vp2 para VP2 de BTV1 + BTV8 (RAS10).

10 La figura 18 representa el título infeccioso, ELISA, transferencia de puntos Vp2 para VP2/VP5 de BTV1 + BTV8 (RAS32).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 **[0022]** Se proporcionan composiciones que comprenden uno o más vectores de BTV o AHSV recombinantes que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican al menos uno de los antígenos de BTV o AHSV que provocan una respuesta inmunogénica en un animal. En una realización, el antígeno polipeptídico es un polipéptido de BTV VP2 o VP5 o fragmento activo o variante del mismo.

20 **[0023]** Se reconoce que los polipéptidos antigénicos de la descripción pueden ser polipéptidos de longitud completa o fragmentos activos o variantes de los mismos. Por "fragmentos activos" o "variantes activas" se pretende indicar que los fragmentos o variantes conservan la naturaleza antigénica del polipéptido. Por lo tanto, la presente descripción abarca cualquier polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de BTV o AHSV que provoque una respuesta inmunogénica en un animal. El polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de BTV o AHSV puede ser cualquier polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de BTV o AHSV, tal como, pero no limitado a, una proteína, péptido o fragmento o variante de los mismos, que provoque, induzca o estimule una respuesta en un animal, tal como un ovino, bovino, caprino o equino.

30 **[0024]** La presente descripción se refiere a vacunas o composiciones bovinas, ovinas, caprinas o equinas que pueden comprender una cantidad eficaz de un vector de BTV o AHSV recombinante y un portador, excipiente, adyuvante, o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

[0025] En algunas realizaciones, las vacunas comprenden además adyuvantes, tales como emulsiones de aceite-en-agua (O/W) descritas en la patente de Estados Unidos 7.371.395.

35 **[0026]** En aún otras realizaciones, los adyuvantes incluyen EMULSIGEN, hidróxido de aluminio y saponina, y CpG, o combinaciones de los mismos.

[0027] En algunas realizaciones, la respuesta en el animal es una respuesta inmunitaria protectora.

40 **[0028]** Por "animal" se pretende mamíferos, aves, y similares. Animal o huésped incluye mamíferos y humanos. El animal puede ser seleccionado del grupo que consiste en equino (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felino (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros gatos grandes, y otros felinos incluyendo guepardos y lince), ovino (por ejemplo, ovejas), bovino (por ejemplo, ganado vacuno), porcino (por ejemplo, cerdo), aves (por ejemplo, pollo, pato, ganso, pavo, codorniz, faisán, loro, pinzones, halcón, cuervo, avestruz, emu y casuario), primates (por ejemplo, prosimios, tarsero, mono, gibón, simio), hurones, focas, y pescado. El término "animal" también incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo recién nacido, embrionario y etapas fetales.

50 **[0029]** A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los términos singulares "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" pretende incluir "y" menos que el contexto indique claramente lo contrario.

55 **[0030]** Los términos "vector o vectores de BTV o AHSV recombinantes", "vector o vectores de BTV o AHSV de genoma reordenado recombinantes", "BTV o AHSV de genoma reordenado", "genomas reordenados de BTV o AHSV" se usan indistintamente en este documento para referirse a cualquier modificación, alteración o diseño de un virus de BTV o AHSV. La modificación, alteración o diseño de un virus de BTV o AHSV pueden incluir, pero no se limitan a, la delección de uno o más nucleótidos o aminoácidos, la delección de todo un gen, optimización de codones de un gen, la sustitución conservativa de aminoácidos, la inserción de uno o más polinucleótidos heterólogos, la mezcla de genes, transcripciones, segmentos de ARN, segmentos de ADN de diferentes serotipos o especies en nuevas combinaciones.

[0031] Los polipéptidos antigénicos de la descripción son capaces de proteger contra BTV y AHSV. Es decir, son capaces de estimular una respuesta inmunitaria en un animal. Por "antígeno" o "inmunógeno" se entiende una sustancia que induce una respuesta inmunitaria específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o parte de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una parte o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmunitaria tras la presentación a un animal huésped; un polipéptido, un epítipo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina.

[0032] El término "proteína, polipéptido, o péptido inmunogénico" como se usa en el presente documento incluye polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido de que una vez administrados al huésped, son capaces de evocar una respuesta inmunitaria de tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. Preferiblemente, el fragmento de proteína es tal que tiene sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína total. Por lo tanto, un fragmento de proteína según la presente invención comprende o consiste esencialmente en o consiste en al menos un epítipo o determinante antigénico. Una proteína o polipéptido "inmunogénico", tal como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína, análogos de la misma, o fragmentos inmunogénicos de la misma. Por "fragmento inmunogénico" se entiende un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y de este modo provoca la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Tales fragmentos pueden ser identificados usando cualquier cantidad de técnicas de mapeo de epítopos bien conocidas en el sector. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse mediante, por ejemplo, síntesis simultánea de grandes cantidades de péptidos sobre soportes sólidos, correspondencia de los péptidos a partes de la molécula de proteína, y reacción de los péptidos con anticuerpos, mientras los péptidos están todavía unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en el sector y se describen en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos. No. 4.708.871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. De manera similar, los epítopos conformacionales son fácilmente identificados mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos, tales como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, supra.

[0033] Tal como se ha descrito, la descripción abarca fragmentos activos y variantes del polipéptido antigénico. Por lo tanto, el término "proteína, polipéptido, o péptido inmunogénico" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica tal como se define en este documento. El término "variación conservativa" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de tal manera que el residuo de aminoácido codificado no cambie o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos - aspartato y glutamato; (2) básicos - lisina, arginina, histidina; (3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga - glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro residuo hidrófobo, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares; o una sustitución conservativa similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado que no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro de la definición del polipéptido de referencia. Todos los polipéptidos producidos por estas modificaciones se incluyen en el presente documento. El término "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido, siempre que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido.

[0034] El término "epítipo" se refiere al sitio en un antígeno o hapteno al cual responden células B y/o células T específicas. El término también se usa indistintamente con "determinante antigénico" o "sitio determinante antigénico". Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

[0035] Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos a una composición o vacuna de interés. Por lo general, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limita a uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares, y/o células T citotóxicas, dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en el composición o vacuna de interés. Preferentemente, el huésped mostrará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora de manera que la resistencia a la nueva infección se verá reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad

se verá reducida. Dicha protección se demostrará por una reducción o ausencia de síntomas normalmente mostrados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral disminuido en el huésped infectado.

[0036] Los antígenos sintéticos también se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, poliepítomos, epítomos flanqueantes, y otros antígenos recombinantes o derivados sintéticamente. Véase, por ejemplo, Bergmann et al., 1993; Bergmann et al., 1996; Suhrbier, 1997; Gardner et al., 1998. Los fragmentos inmunogénicos, para los propósitos de la presente invención, incluirán generalmente al menos aproximadamente 3 aminoácidos, al menos aproximadamente 5 aminoácidos, al menos aproximadamente 10-15 aminoácidos, o aproximadamente 15-25 aminoácidos o más aminoácidos, de la molécula. No hay límite superior crítico para la longitud del fragmento, que pueda comprender casi la longitud completa de la secuencia de la proteína, o incluso una proteína de fusión que comprende al menos un epítipo de la proteína.

[0037] Por consiguiente, una estructura mínima de un polinucleótido que expresa un epítipo es que comprende o consiste esencialmente en o consiste en nucleótidos que codifican un epítipo o determinante antigénico de un polipéptido de BTV o AHSV. Un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido de BTV o AHSV puede comprender o consistir esencialmente en o consistir en un mínimo de 15 nucleótidos, aproximadamente 30-45 nucleótidos, aproximadamente 45-75, o al menos 57, 87 o 150 nucleótidos consecutivos o contiguos de la secuencia que codifica el polipéptido. Los procedimientos de determinación de epítomos, tales como, la generación de bibliotecas de péptidos que se solapan, Pepscan (Geysen et al, 1984 (Hemmer et al., 1998); Geysen et al., 1985; Van der Zee. R. et al, 1989; Geysen., 1990; Multipin RTM Peptide Synthesis Kits de Chiron) y algoritmos (de Groot et al., 1999; PCT/US2004/022605) se pueden utilizar en la práctica de la invención.

[0038] El término "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refiere a ARN o ADN que es lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario, o un híbrido de los mismos. El término también abarca híbridos de ARN/ADN. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de unión, tales como fluororibosa y tiolato, y ramas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación, con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluidas en esta definición son los bloqueos terminales, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, y la introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes de marcaje, otros polinucleótidos o soporte sólido. Los polinucleótidos se pueden obtener mediante síntesis química o derivarse de un microorganismo.

[0039] El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier segmento de polinucleótido asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen intrones y exones como en la secuencia genómica, o sólo las secuencias codificantes como en ADNc y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Por ejemplo, el gen también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional, o codifica una proteína específica, y que incluye secuencias reguladoras.

[0040] Los términos "proteína", "péptido", "polipéptido" y "fragmento de polipéptido" se usan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de residuos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos, y puede estar interrumpido por restos químicos distintos de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo la formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje o componente bioactivo.

[0041] Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o proteína u orgánulo) se refiere a un componente que se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que se produce el componente de forma natural, por ejemplo, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y proteínas que han sido "aislados" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por tecnología recombinante, así como mediante síntesis química.

[0042] El término "purificado", tal como se usa en el presente documento, no requiere pureza absoluta; más bien, se entiende como un término relativo. De este modo, por ejemplo, una preparación de polipéptido purificado es aquel en el que el polipéptido está más enriquecido que el polipéptido en su medio natural. Es decir, el polipéptido se separa de los componentes celulares. Por "sustancialmente purificado" se entiende que el polipéptido representa varias realizaciones en las que al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98%, o más de los

componentes o materiales celulares se han eliminado. Del mismo modo, el polipéptido se puede purificar parcialmente. Por "parcialmente purificado" se entiende que se elimina menos del 60% de los componentes o material celular. Lo mismo se aplica a los polinucleótidos. Los polipéptidos descritos en este documento se pueden purificar por cualquiera de los medios conocidos en la técnica.

[0043] Como se señaló anteriormente, los polipéptidos antigénicos o fragmentos o variantes de los mismos son polipéptidos antigénicos de BTV o AHSV. Los fragmentos y variantes de los polinucleótidos descritos y polipéptidos codificados por los mismos también están abarcados por la presente descripción. Por "fragmento" se entiende una porción del polinucleótido o una porción de la secuencia de aminoácidos antigénica codificada por el mismo. Los fragmentos de un polinucleótido pueden codificar fragmentos de proteína que retienen la actividad biológica de la proteína nativa y por lo tanto tienen actividad inmunogénica, tal como se señala en otra parte en este documento. Los fragmentos de la secuencia de polipéptido conservan la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria protectora en un animal.

[0044] "Variantes" pretende significar secuencias sustancialmente similares. Para polinucleótidos, una variante comprende una delección y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios dentro del polinucleótido nativo y/o una sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en el polinucleótido nativo. Tal como se usa en el presente documento, un polinucleótido o polipéptido "nativo" comprende una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de origen natural, respectivamente. Las variantes de un polinucleótido particular de la descripción (es decir, el polinucleótido de referencia) también se pueden evaluar por comparación del porcentaje de identidad de secuencia entre el polipéptido codificado por un polinucleótido variante y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Proteína "variante" pretende significar una proteína derivada de la proteína nativa por delección o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína nativa y/o sustitución de uno o más aminoácidos nativa en uno o más sitios en la proteína nativa. Las proteínas variantes abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria.

[0045] En una realización, la presente descripción proporciona una composición o vacuna que comprende uno o más vectores de BTV o AHSV recombinantes que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican al menos un polipéptido de BTV o AHSV. Los polipéptidos pueden ser cualesquiera de polipéptidos de BTV o AHSV seleccionados del grupo que consiste en VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP5, VP7, NS1, NS2 y NS3/3A. En un aspecto, los vectores de BTV o AHSV recombinantes comprenden la estructura del vector derivado de los genomas de BTV o AHSV de serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, y 26. En otro aspecto, los polinucleótidos heterólogos codifican los antígenos de un serotipo de BTV o AHSV que es diferente del serotipo de BTV o AHSV utilizado como estructura del vector.

[0046] En otra realización, los vectores de BTV o AHSV recombinantes comprenden polinucleótidos heterólogos que codifican polipéptidos VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP7, NS1, NS2, VP6, y NS3/3A, en los que los polipéptidos pueden ser de diferentes serotipos de BTV o AHSV, tales como los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, y 26. Las diferentes combinaciones de polipéptidos de diferentes serotipos de BTV o AHSV pueden ser ilustrados en las siguientes tablas. La nomenclatura utilizada para los vectores de BTV (o AHSV) de genoma reordenado recombinantes en la presente descripción se define como: la sección en mayúscula del nombre se refiere a la estructura del virus, seguido por un subíndice que comprende la proteína o proteínas sustituidas, precedido por el origen de serotipo del segmento, por ejemplo BTV-1_{8VP1} se refiere a un virus con una estructura de BTV-1 que contiene el gen VP1 de BTV-8.

Tabla 1 Algunos ejemplos de BTV de genoma reordenado que comprende uno o dos polipéptidos de un serotipo de BTV y nueve u ocho polipéptidos de otro serotipo de BTV

	VP1	VP2	VP3	VP4	VP5	VP6	VP7	NS1	NS2	NS3/3A
BTV-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BTV-1 _{8VP1VP2}	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BTV-1 _{8VP2}	1	8	1	1	1	1	1	1	1	1
BTV-1 _{8VP3}	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1
BTV-1 _{8VP4}	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1
BTV-1 _{8VP5}	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1

BTv-1 _{8VP6}	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1
BTv-1 _{8VP7}	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1
BTv-1 _{8NS1}	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1
BTv-1 _{8NS2}	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1
BTv-1 _{8NS3/3A}	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
BTv-8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
BTv-8 _{1VP1}	1	8	8	8	8	8	8	8	8	8
BTv-8 _{1VP2}	8	1	8	8	8	8	8	8	8	8
BTv-8 _{1VP3}	8	8	1	8	8	8	8	8	8	8
BTv-8 _{1VP4}	8	8	8	1	8	8	8	8	8	8
BTv-8 _{1VP5}	8	8	8	8	1	8	8	8	8	8
BTv-8 _{1VP6}	8	8	8	8	8	1	8	8	8	8
BTv-8 _{1VP7}	8	8	8	8	8	8	1	8	8	8
BTv-8 _{1NS1}	8	8	8	8	8	8	8	1	8	8
BTv-8 _{1NS2}	8	8	8	8	8	8	8	8	1	8
BTv-8 _{1NS3/3A}	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1
BTv-1 _{8VP1,VP2}	8	8	1	1	1	1	1	1	1	1
BTv-1 _{8VP2,VP3}	1	8	8	1	1	1	1	1	1	1
BTv-1 _{8VP2,VP5}	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1
BTv-8 _{1VP1,VP2}	1	1	8	8	8	8	8	8	8	8
BTv-8 _{1VP2,VP3}	8	1	1	8	8	8	8	8	8	8
BTv-8 _{1VP2,VP5}	8	1	8	8	10076	8	8	8	8	8

[0047] La presente descripción abarca los vectores de BTV recombinantes que comprenden el BTV de genoma reordenado que tiene la fórmula BTV-ABVP_a, BTV-ABVP_{c,VPd}, BTV-ABNS_e, BTV-ABVP_{c,NSe}, en los que A y B = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, y 26 (para los serotipos de BTV o AHSV); c y d = 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7 (para VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6 o VP7); e = 1, 2, y 3/3A (para NS1, NS2 o NS3/3A).

[0048] En otro aspecto, la presente descripción proporciona un polipéptido de BTV que tiene una secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, o 190, y una variante o fragmento de las mismas.

[0049] Además, los homólogos de polipéptidos de BTV o AHSV de animales ovinos, bovinos, caprinos o equinos pretenden estar dentro del alcance de la presente descripción. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "homólogos" incluye ortólogos, análogos y parálogos. El término "análogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos que tienen la misma o similar función, pero que han evolucionado por separado en organismos no relacionados. El término "ortólogos"

se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos de diferentes especies, pero que han evolucionado a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los ortólogos codifican polipéptidos que tienen las mismas o similares funciones. El término "parálogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos que están relacionados por duplicación dentro de un genoma. Los parálogos usualmente tienen diferentes funciones, pero estas funciones pueden estar relacionadas. Los análogos, ortólogos y parálogos de un polipéptido de BTV o AHSV de tipo natural pueden diferir del polipéptido de BTV de tipo natural en modificaciones posteriores a la traducción, en diferencias en la secuencia de aminoácidos, o en ambos. En particular, los homólogos de la descripción mostrarán generalmente al menos 80-85%, 85-90%, 90-95%, o 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia, con la totalidad o parte de secuencias de polinucleótidos de BTV o AHSV de tipo natural, y exhibirán una función similar. Las variantes incluyen variantes alélicas. El término "variante alélica" se refiere a un polinucleótido o un polipéptido que contiene polimorfismos que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de una proteína y que existen dentro de una población natural (por ejemplo, una especie o variedad de virus). Tales variaciones alélicas naturales pueden dar lugar típicamente a 1- 5% de varianza en un polinucleótido o un polipéptido. Las variantes alélicas pueden identificarse por secuenciación de la secuencia de ácido nucleico de interés en un conjunto de diferentes especies, que puede llevarse a cabo fácilmente utilizando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético de genes en estas especies. Cualquiera y todas de tales variaciones de ácido nucleico y polimorfismos o variaciones de aminoácidos resultantes que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional de gen de interés, pretenden estar dentro del alcance de la descripción.

[0050] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "derivado" o "variante" se refiere a un polipéptido, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una o más variaciones conservativas de aminoácidos u otras modificaciones menores, tales que (1) el polipéptido correspondiente tiene una función sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido de tipo natural o (2) un anticuerpo generado contra el polipéptido es inmunorreactivo con el polipéptido de tipo natural. Estas variantes o derivados incluyen polipéptidos que tienen modificaciones menores de las secuencias de aminoácidos primaria del polipéptido de BTV o AHSV que pueden dar lugar a péptidos que tienen una actividad sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido homólogo sin modificar. Tales modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser espontáneas. El término "variante" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica tal como se define en este documento.

[0051] El término "variación conservativa" indica el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de tal manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, tal como se ha descrito anteriormente.

[0052] Los polinucleótidos de la descripción incluyen secuencias que son degeneradas como resultado del código genético, por ejemplo, el uso de codones optimizado para un huésped específico. Tal como se usa en el presente documento, "optimizado" se refiere a un polinucleótido que se modifica mediante genéticamente para incrementar su expresión en una especie determinada. Para proporcionar polinucleótidos optimizados que codifican polipéptidos de BTV o AHSV, la secuencia de ADN del gen de proteína de BTV o AHSV se puede modificar para 1) comprender codones preferidos por genes altamente expresados en una especie particular; 2) comprender un contenido de A + T o G + C en la composición de bases de nucleótidos con el que sustancialmente se encuentra en dicha especie; 3) formar una secuencia de iniciación de dicha especie; o 4) eliminar secuencias que causan la desestabilización, poliadenilación inapropiada, degradación y terminación de ARN, o que forman horquillas de estructura secundaria o sitios de empalme de ARN. El aumento de expresión de la proteína de BTV o AHSV en dicha especie se puede lograr mediante la utilización de la frecuencia de distribución de uso del codón en eucariotas y procariotas, o en una especie particular. El término "frecuencia de uso del codón preferido" se refiere a la preferencia exhibida por una célula huésped específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido determinado. Hay 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales son especificados por más de un codón. Por lo tanto, todas las secuencias de nucleótidos degeneradas están incluidas en la descripción, siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de BTV o AHSV codificado por la secuencia de nucleótidos esté funcionalmente inalterada.

[0053] La identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos puede establecerse por el "blas" por parejas del NCBI (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología) y la matriz BLOSUM62, utilizando los parámetros estándar (véase, por ejemplo, el algoritmo BLAST o BLASTX disponible en el servidor del "Centro Nacional de Información sobre Biotecnología" (NCBI, Bethesda, Md., EE.UU.), así como en Altschul et al.; y por lo tanto, este documento habla de utilizar el algoritmo o BLAST o BLASTX y la matriz BLOSUM62 por el término "blasts").

[0054] La "identidad" con respecto a secuencias puede referirse al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las dos secuencias en las que la alineación de las dos secuencias puede determinarse según el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur y Lipman), por ejemplo, usando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una penalización

por hueco de 4, y el análisis asistido por ordenador y la interpretación de los datos de secuencia que incluye la alineación se pueden realizar convenientemente utilizando programas disponibles comercialmente (por ejemplo, Intelligenetics® Suite, Intelligenetics Inc. CA). Cuando las secuencias de ARN se dice que son similares o tienen un grado de identidad u homología de secuencia con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN. Por lo tanto, las secuencias de ARN están dentro del alcance de la invención y pueden derivarse de secuencias de ADN, considerando la timidina (T) en la secuencia de ADN igual a uracilo (U) en las secuencias de ARN.

[0055] La identidad de secuencia o similitud de secuencia de dos secuencias de aminoácidos, o la identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar utilizando el paquete de software Vector NTI (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA).

[0056] Los siguientes documentos proporcionan algoritmos para comparar la identidad u homología relativa de secuencias, y adicionalmente o alternativamente con respecto a lo anterior, las enseñanzas de estas referencias pueden utilizarse para determinar el porcentaje de homología o identidad: Needleman SB y Wunsch CD; Smith TF y Waterman MS; Smith TF, Waterman MS y Sadler JR; Feng DF y Dolittle RF; Higgins DG y Sharp PM; Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ; y, Devereux J, Haeberle P y Smithies O. Y, sin demasiada experimentación, el experto puede consultar muchos otros programas o referencias para determinar el porcentaje de homología.

[0057] Las reacciones de hibridación se pueden realizar bajo condiciones de diferente "rigurosidad". Las condiciones que aumentan la rigurosidad de una reacción de hibridación son bien conocidos. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al, 1989).

[0058] La presente invención abarca además los polinucleótidos de BTV a los que pertenece la invención contenidos en una molécula vector o un vector de expresión y unido operativamente a un elemento promotor y opcionalmente a un potenciador.

[0059] Un "vector" se refiere a un ADN recombinante o plásmido de ARN o virus que comprende un polinucleótido heterólogo para liberarse a una célula diana, ya sea *in vitro* o *in vivo*. El polinucleótido heterólogo puede comprender una secuencia de interés para los fines de prevención o terapia, y opcionalmente puede estar en forma de un casete de expresión. Tal como se usa en este documento, un vector no necesita ser capaz de replicación en la última célula diana o sujeto. El término incluye vectores de clonación y vectores virales.

[0060] El término "recombinante" significa un polinucleótido de origen semisintético o sintético que, o bien no se produce en la naturaleza o está ligado a otro polinucleótido en una disposición no encontrada en la naturaleza.

[0061] "Heterólogo" significa derivado de una entidad genéticamente distinta del resto de la entidad a la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido puede colocarse mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una fuente diferente, y es un polinucleótido heterólogo. Un promotor eliminado de su secuencia codificante nativa y unido operativamente a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es un promotor heterólogo.

[0062] La presente invención se refiere a vacunas o composiciones farmacéuticas o inmunológicas ovinas, bovinas, caprinas y porcinas que pueden comprender una cantidad eficaz de un antígeno de BTV recombinante y un portador, excipiente, adyuvante, o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

[0063] La materia descrita en el presente documento se refiere, en parte, a composiciones y procedimientos relacionados con el antígeno de BTV preparado en un sistema de expresión de planta o alga que era altamente inmunogénico y animales protegidos contra la estimulación de cepas de BTV homólogas y heterólogas.

[0064] La presente descripción se refiere a una composición o vacuna que comprende uno o más vectores de BTV o AHSV recombinantes que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican al menos un polipéptido de BTV o AHSV y un portador, excipiente, adyuvante o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

[0065] En otra realización, el portador, excipiente, adyuvante o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una emulsión de agua-en-aceite. En aún otra realización, la emulsión de agua-en-aceite puede ser una emulsión triple de agua/aceite/agua (W/O/W).

[0066] La invención abarca además los polinucleótidos de BTV contenidos en una molécula vector o en un vector de expresión y unido operativamente a un elemento promotor y opcionalmente a un potenciador.

[0067] En otro aspecto, la presente descripción proporciona un polipéptido que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido antigénico de la descripción, en particular, con los polipéptidos que tienen una secuencia, tal como se establecen en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, o 190.

[0068] En otro aspecto adicional, la presente descripción proporciona fragmentos y variantes de los polipéptidos de BTV identificados anteriormente (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, o 190), que fácilmente se pueden preparar por un experto en la técnica usando técnicas de biología molecular bien conocidas.

[0069] Las variantes son polipéptidos homólogos que tienen una secuencia de aminoácidos al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos, tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, o 190.

[0070] En otro aspecto, la presente descripción proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de BTV, tal como un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia, tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, o 190. En otro aspecto adicional, la presente descripción proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 70%, al menos 75 %, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia, tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, o 190, o una variante conservativa, una variante alélica, un homólogo o un fragmento inmunogénico que comprende al menos ocho o al menos diez aminoácidos consecutivos de uno de estos polipéptidos, o una combinación de estos polipéptidos.

[0071] En otro aspecto, la presente descripción proporciona un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos, tal como se establece en las SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, o 132, o una variante de las mismas. En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una de un polinucleótido que tiene una secuencia, tal como se establece en las SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, o 132, o una variante de las mismas.

[0072] Los polinucleótidos de la invención pueden comprender secuencias adicionales, tales como secuencias adicionales codificante dentro de la misma unidad de transcripción, elementos de control, tales como promotores, sitios de unión a ribosomas, 5'UTR, 3'UTR, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, unidades de transcripción adicionales bajo el control del mismo promotor o diferente, secuencias que permiten la clonación, expresión, recombinación homóloga y transformación de una célula huésped, y cualquier constructo, tal como pueda ser deseable para proporcionar realizaciones de la presente invención.

[0073] Los elementos para la expresión de un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de BTV o AHSV están presentes ventajosamente en un vector de la invención. De una manera mínima, éste comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un codón de iniciación (ATG), un codón de terminación y un promotor, y opcionalmente también una secuencia de poliadenilación para ciertos vectores, tales como vectores plásmidos y ciertos vectores virales, por ejemplo, vectores virales distintos del virus de los poxvirus. Cuando el polinucleótido codifica un fragmento de polipéptido, por ejemplo, un péptido de BTV, ventajosamente, en el vector, un ATG se coloca en 5' del marco de lectura y un codón de parada se coloca en 3'. Pueden estar presentes otros elementos de control de la expresión, tales como secuencias potenciadoras, secuencias estabilizantes, tales como secuencias de intrones y secuencias señal que permiten la secreción de la proteína.

[0074] La presente descripción también se refiere a preparaciones que comprenden vectores, tales como vectores de expresión, por ejemplo, composiciones terapéuticas. Las preparaciones pueden comprender uno o más vectores, por ejemplo, vectores de expresión, tales como vectores de expresión *in vivo*, que comprenden y expresan uno o más polipéptidos, antígenos, epítipos o inmunógenos de BTV o AHSV. En una realización, el vector contiene y expresa un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polinucleótido que codifica (y ventajosamente expresa) un antígeno, epítipo o inmunógeno de BTV o AHSV, en un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. Por lo tanto, según una realización de la descripción, el otro vector o vectores en la preparación comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polinucleótido que codifica, y bajo circunstancias apropiadas, el vector expresa una o más proteínas de un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de BTV, o un fragmento de los mismos.

[0075] Según otra realización, el vector o vectores en la preparación comprende, o consiste esencialmente en, o consiste en un polinucleótido o polinucleótidos que codifican una o más proteínas o fragmento o fragmentos de un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de BTV o AHSV, expresando el vector o vectores el polinucleótido o polinucleótidos. En otra realización, la preparación comprende uno, dos, o más vectores que comprenden polinucleótidos que codifican y expresan, ventajosamente *in vivo*, un polipéptido de BTV o AHSV, antígeno, proteína de fusión o un epítipo del mismo. La invención también está dirigida a mezclas de vectores que comprenden polinucleótidos que codifican y expresan diferentes polipéptidos, antígenos, epítipos, proteína de fusión o inmunógenos de BTV o AHSV, por ejemplo, un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de BTV o AHSV de diferentes especies tales como, pero no limitado a, animales ovinos, bovinos, caprinos o porcinos.

[0076] Según una realización adicional de la invención, el vector de expresión es un vector plásmido o un vector plásmido de ADN, en particular un vector de expresión *in vivo*. En un ejemplo no limitativo específico, se puede utilizar el plásmido pVR1020 o 1012 (VICAL Inc.; Lucas et al, 1997; Hartikka et al, 1996, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.846.946 y 6.451.769) como un vector para la inserción de una secuencia de polinucleótido. El plásmido pVR1020 se deriva de pVR1012 y contiene la secuencia señal tPA humana. En una realización, la señal tPA humana comprende desde el aminoácido M(1) al aminoácido S(23) en el Genbank bajo el número de acceso HUMTPA14. En otro ejemplo no limitativo específico, el plásmido utilizado como un vector para la inserción de una secuencia de polinucleótidos puede contener la secuencia de péptido señal de IGF1 equino desde el aminoácido M(24) al aminoácido A(48) en el Genbank con número de acceso U28070. La información adicional sobre plásmidos de ADN que pueden consultarse o emplearse en la práctica se encuentran, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 6.852.705; 6.818.628; 6.586.412; 6.576.243; 6.558.674; 6.464.984; 6.451.770; 6.376.473 y 6.221.362.

[0077] El término plásmido cubre cualquier unidad de transcripción de ADN que comprende un polinucleótido según la invención y los elementos necesarios para su expresión *in vivo* en una célula o células del huésped o diana deseados; y, en este sentido, se observa que un plásmido circular superenrollado o no superenrollado, así como una forma lineal, se pretende que estén dentro del alcance de la invención.

[0078] Cada plásmido comprende o contiene o consiste esencialmente en, además del polinucleótido que codifica un antígeno, epítipo o inmunógeno de BTV o AHSV, opcionalmente fusionado con una secuencia de péptido heterólogo, variante, análogo o fragmento, unido operativamente a un promotor o bajo el control de un promotor o dependiente de un promotor. En general, es ventajoso emplear un promotor funcional fuerte en células eucariotas. El promotor fuerte puede ser, pero no limitado a, el promotor de citomegalovirus inmediato temprano (CMV-IE) de origen humano o murino, o que tiene opcionalmente otro origen, tal como la rata o cobaya, el Super promotor (Ni, M. et al., Plant J. 7, 661-676, 1995). El promotor CMV-IE puede comprender parte del promotor real, que puede o no estar asociado con la parte potenciadora. Se puede hacer referencia al documento EP-A-260 148, EP-A-323 597, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.168.062, 5.385.839, y 4.968.615, así como a la solicitud PCT No WO87/03905. El promotor CMV-IE es ventajosamente un CMV-IE humano (Boshart et al., 1985) o CMV-IE murino.

[0079] En términos más generales, el promotor tiene un origen viral, vegetal o un origen celular. Un promotor viral fuerte distinto del CMV-IE que puede emplearse de forma útil en la práctica de la invención es el promotor temprano/tardío del

virus SV40 o el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous. Un promotor celular fuerte que puede emplearse de forma útil en la práctica de la invención es el promotor de un gen del citoesqueleto, tal como por ejemplo el promotor de desmina (Kwissa et al., 2000), o el promotor de actina (Miyazaki et al., 1989).

[0080] Se puede utilizar cualquiera de los promotores constitutivos, regulables o dependientes de estímulo. Por ejemplo, los promotores constitutivos pueden incluir el promotor de manopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*. Alternativamente, puede ser ventajoso usar promotores de genes de choque térmico, promotores de genes inducibles por sequía, promotores de genes inducibles por patógenos, promotores de genes inducibles por heridas, y promotores de genes inducibles por luz/oscuridad. Puede ser útil el uso de promotores que son controlados por reguladores del crecimiento vegetal, tales como el ácido abscísico, auxinas, citoquininas y ácido giberélico. Los promotores también pueden ser elegidos de manera que dan expresión específica de tejido (por ejemplo, promotores específicos de raíz, hoja y flor).

[0081] Los plásmidos pueden comprender otros elementos de control de expresión. Es particularmente ventajoso incorporar una secuencia o secuencias estabilizantes, por ejemplo, secuencia o secuencias de intrón, por ejemplo, intrón de alcohol deshidrogenasa de maíz (Callis et al Genes & Dev.1 (10): 1183-1200, diciembre de 1987), el primer intrón del hCMV-IE (Solicitud PCT No. WO1989/01036), el intrón II del gen de β -globina de conejo (van Ooyen et al., 1979). En otra realización, los plásmidos pueden comprender 3' UTR. La 3' UTR puede ser, pero no limitado a, nopalina sintasa de agrobacterium (Nos) 3' UTR (Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. Depicker, A. et al J. Mol Appl Genet, 1982; Bevan, NAR, 1984, 12 (22): 8711-8721).

[0082] En cuanto a la señal de poliadenilación (poliA) para los plásmidos y vectores virales distintos de los poxvirus, puede hacerse más uso de la señal de poli(A) del gen de la hormona de crecimiento bovino (bGH) (véase el documento US 5.122.458), o la señal de poli(A) del gen de β -globina de conejo o la señal de poli(A) del virus SV40.

[0083] Una "célula huésped" o "célula" indica una célula procariota o eucariota que ha sido alterada genéticamente, o es capaz de ser alterada genéticamente mediante la administración de un polinucleótido exógeno, tal como un plásmido recombinante o vector o ARNs o ARNs. Cuando se hace referencia a células genéticamente modificadas, el término se refiere tanto a la célula originalmente alterada como a la progenie de la misma.

[0084] En una realización, la materia descrita en el presente documento se refiere a un procedimiento de producción de un vector de BTV o AHSV recombinante que comprende la transfección de una célula con a) ARN que codifican uno o más polipéptidos de un serotipo de BTV o AHSV; y b) ARN que comprenden las transcripciones de todo el genoma de un serotipo diferente de BTV o AHSV y comprende la supresión de las transcripciones que codifican los antígenos en a).

[0085] En otra realización, la materia descrita en el presente documento se refiere a un procedimiento de vacunación de un animal ovino, bovino, caprino, o porcino que comprende administrar al animal ovino, bovino, caprino o porcino una cantidad eficaz de una vacuna que puede comprender una cantidad eficaz de un vector de BTV recombinante y un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

[0086] En una realización, la materia descrita en el presente documento se refiere a un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria que comprende administrar al animal ovino, bovino, caprino o porcino una vacuna que comprende un vector de BTV o AHSV de animal ovino, bovino, caprino o porcino, en el que se provoca una respuesta inmunitaria.

[0087] La administración puede ser por vía subcutánea o intramuscular. La administración puede sin aguja (por ejemplo Pigjet o Bioject).

[0088] En una realización de la invención, se puede emplear un régimen de sensibilización-refuerzo que comprende al menos una administración primaria y al menos una administración de refuerzo con al menos un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno común. Típicamente, la composición inmunológica o vacuna utilizada en la administración primaria es de naturaleza diferente a la que se utiliza como refuerzo. Sin embargo, cabe indicar que la misma composición se puede utilizar como la administración primaria y el refuerzo. Este protocolo de administración se llama "sensibilización-refuerzo".

[0089] Una sensibilización-refuerzo de acuerdo con la presente descripción puede incluir un vector viral recombinante utilizado para expresar una secuencia codificante del BTV o fragmentos de la misma que codifica un polipéptido antigénico o fragmento o variante del mismo. Específicamente, el vector viral puede expresar un gen de BTV o AHSV o fragmento del mismo que codifica un polipéptido antigénico. Un vector viral contemplado en este documento incluye, pero no limitado a, virus de la viruela [por ejemplo, virus vaccinia o virus vaccinia atenuado, virus de la viruela aviar o virus de la viruela aviar atenuado (por ejemplo, la viruela del canario, viruela de ave de corral, viruela de la paloma (dovepox), viruela de la paloma (pigeonpox), viruela de la codorniz, ALVAC, TROVAC; véase, por ejemplo, US 5.505.941, US 5,494,807), virus del mapache, virus de la viruela porcina, etc.], adenovirus (por ejemplo, adenovirus humano, adenovirus canino), virus del

herpes (por ejemplo, virus del herpes canino, virus del herpes de pavo, virus de la enfermedad de Marek, virus de la laringotraqueitis infecciosa, virus del herpes felino, virus de laringotraqueitis (ILTV), virus del herpes bovino, virus del herpes porcino), baculovirus, retrovirus, etc. En otra realización, el vector de expresión de la viruela aviar puede ser un vector de viruela del canario, tal como, ALVAC. En aún otra realización, el vector de expresión de la viruela aviar puede ser un vector de la viruela aviar, tal como, TROVAC. El antígeno de BTV o de AHSV de la descripción que se expresa se inserta bajo el control de un promotor de virus de viruela aviar específico, por ejemplo, el promotor 42K *Amsacta moorei* de entomopoxvirus (Barcena, Lorenzo et al. 2000), el promotor vaccinia 7.5 kDa (Cochran et al., 1985), el promotor de vaccinia I3L (Riviere et al., 1992), el promotor de vaccinia HA (Shida, 1986), el promotor de la viruela vacuna ATI (Funahashi et al., 1988), el promotor de vaccinia H6 (Taylor et al., 1988b; Guo et al, 1989; Perkus et al, 1989), entre otros.

[0090] En otra realización, el vector de expresión de la viruela aviar puede ser un vector de viruela del canario, tal como, ALVAC. El polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno del BTV o AHSV puede ser una VP2 del BTV o AHSV o VP5 del BTV. El vector viral puede ser vCP2289, que codifica VP2 y VP5 sintéticos con codones optimizados del BTV (véase el documento US 2007/0280960).

[0091] En otro aspecto del protocolo de sensibilización-refuerzo de la invención, se administra una composición que comprende los vectores de BTV de la invención seguida de la administración de la vacuna o la composición que comprende el antígeno BTV o AHSV, o una vacuna viral inactivada, o una vacuna de ADN plásmido o composición que contiene o expresa el antígeno del BTV o AHSV. Del mismo modo, un protocolo de sensibilización-refuerzo puede comprender la administración de una vacuna o composición que comprende una vacuna viral inactivada o composición que comprende un antígeno del BTV o AHSV, o una vacuna de ADN de plásmido o composición que contiene o expresa un antígeno de BTV o AHSV, seguido de la administración de una composición que comprende los vectores de BTV o AHSV de la invención. Además, cabe indicar que tanto la administración primaria como secundaria pueden comprender la composición que comprende el antígeno del BTV de la presente invención.

[0092] Un protocolo de sensibilización-refuerzo comprende al menos una administración de sensibilización y al menos una administración de refuerzo usando al menos un polipéptido común y/o variantes o fragmentos del mismo. La vacuna utilizada en la administración de sensibilización puede ser de naturaleza diferente de la que se utiliza como vacuna de refuerzo posterior. La administración de sensibilización puede comprender una o más administraciones. Del mismo modo, la administración de refuerzo puede comprender una o más administraciones.

[0093] El volumen de dosis de composiciones para las especies diana que son mamíferos, por ejemplo, el volumen de dosis de las composiciones para animales ovinos, bovinos, caprinos o porcinos, basados en vectores virales, por ejemplo, las composiciones basadas en vectores virales no de virus de viruela, es generalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5,0 ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3,0 ml, y de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 2,5 ml.

[0094] La eficacia de las vacunas puede analizarse aproximadamente de 2 a 4 semanas después de la última inmunización mediante estimulación de los animales, tales como ovinos, bovinos, caprinos o porcinos, con una cepa virulenta del BTV, tal como las cepas BTV-1/2/3/4/8/9/16 o 17. Por ejemplo, la cepa del BTV puede ser el serotipo 17, que originalmente fue aislada de la sangre de las ovejas del condado de Tulare, CA (ver Bonneau, DeMaula et al 2002; DeMaula, Leutenegger et al., 2002). La cepa del BTV también puede ser del serotipo 8, una vacuna inactivada para la misma se encuentra actualmente disponible en Merial Limited.

[0095] Otras cepas pueden incluir BTV1 (aislado Australia), BTV1 (aislado Sudáfrica), BTV2 (aislado EE.UU.), BTV3 (aislado Sudáfrica), BTV4-9, BTV10 (aislado EE.UU.), BTV11 (aislado EE.UU.), BTV 12, BTV 13 (aislado EE.UU.), BTV 14-17, BTV 17 (aislado EE.UU.), BTV18, BTV 19, BTV20 (aislado Australia), BTV21-24, o BTV de Córcega.

[0096] Tanto las cepas homólogas como heterólogas se utilizan para la estimulación para probar la eficacia de la vacuna. El animal puede estimularse por vía intradérmica, subcutánea, aerosol, por vía intranasal, intraocular, intratraqueal, y/o por vía oral.

[0097] Para el BTV, se evalúan animales bovinos y caprinos para determinar la lesión vascular extendida. También para el BTV, se evalúan animales ovinos para la inflamación catarral de las membranas de las mucosas de la boca, nariz y panza, la inflamación de las bandas coronarias y láminas de los cascos, excoiación del epitelio, necrosis de la mucosa bucal, y lengua y boca hinchada/inflamada/azul. Pueden recogerse hisopos de todos los animales después de la estimulación para aislar el virus. La presencia o ausencia de antígenos virales en los tejidos indicados anteriormente se puede evaluar por reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa en tiempo real de forma cuantitativa (qRRT-PCR). Las muestras de sangre pueden recogerse antes y después de la estimulación y pueden ser analizadas para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra el BTV.

[0098] Las administraciones de sensibilización-refuerzo pueden llevarse a cabo ventajosamente con 2 a 6 semanas de diferencia, por ejemplo, alrededor de 3 semanas de diferencia. De acuerdo con una realización, un refuerzo semianual o un refuerzo anual, de forma ventajosa usando la vacuna basada en vector viral, también se contempla. Los animales tienen ventajosamente al menos 6 a 8 semanas de vida en el momento de la primera administración.

[0099] Las composiciones que comprenden los polipéptidos antigénicos recombinantes de la invención utilizadas en los protocolos de sensibilización-refuerzo están contenidas en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable. Los protocolos de la descripción protegen al animal del BTV o AHSV ovino, bovino, caprino o porcino y/o previenen la progresión de la enfermedad en un animal infectado.

[0100] Las diversas administraciones se realizan preferiblemente con 1 a 6 semanas de diferencia, y más particularmente con aproximadamente 3 semanas de diferencia. Según un modo preferido, también se contempla un refuerzo anual, preferiblemente usando la composición inmunológica de vacuna basada en vector viral. Los animales tienen preferiblemente al menos de un día de vida en el momento de la primera administración.

[0101] Debe entenderse por un experto en la técnica que la presente descripción se proporciona a modo de ejemplo y la presente invención no está limitada a la misma. A partir de la descripción de este documento y el conocimiento en la técnica, el experto en la materia puede determinar el número de administraciones, la vía de administración, y las dosis a utilizar para cada protocolo de inyección, sin ninguna experimentación excesiva.

[0102] La presente invención contempla al menos una administración a un animal de una cantidad eficaz de la composición terapéutica fabricada de acuerdo con la invención. El animal puede ser macho, hembra, hembra embarazada y recién nacido. Esta administración puede ser a través de diversas rutas incluyendo, pero no limitado a, intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC) o mediante administración intranasal o por vía oral. La composición terapéutica de acuerdo con la invención también se puede administrar mediante un aparato sin aguja (como, por ejemplo, con un Pigjet, Dermojet, Biojector, Avijet (Meril, GA, EE.UU.), o aparato Vetjet o Vitajet (Bioject, Oregon, EE.UU.). Otra estrategia para la administración de composiciones de plásmido es usar electroporación (véase, por ejemplo Tollefsen et al, 2002; Tollefsen et al., 2003; Babiuk et al, 2002; solicitud PCT No. WO99/01158). En otra realización, la composición terapéutica se libera al animal mediante pistola de genes o bombardeo de partículas de oro.

[0103] En una realización, la descripción proporciona la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación para la liberación y expresión de un antígeno o epítipo del BTV o AHSV en una célula diana. La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz es experimentación rutinaria para un experto en la técnica. En una realización, la formulación comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que expresa un antígeno o epítipo del BTV o AHSV y un portador, vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable. En otra realización, el portador, vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable facilita la transfección u otros medios de transferencia de polinucleótidos a un animal huésped y/o mejora la conservación del vector o proteína en un huésped.

[0104] En una realización, la materia descrita en este documento proporciona un procedimiento de detección para la diferenciación entre animales infectados y vacunados (DIVA).

[0105] En la actualidad, existen varias vacunas del BTV disponibles. Meril e Intervet ofrecen vacunas de BTV8 inactivadas. Se ha descrito recientemente (Anderson, J et al, J. Virol Methods, 1993; Silvia C. Barros et al, Veterinary Microbiology, 2009) un procedimiento para distinguir entre animales vacunados con BTV y animales infectados con BTV.

[0106] Se describe en el presente documento que el uso de la vacuna o composición de la presente descripción permite la detección de la infección por BTV o AHSV en un animal. Se describe en el presente documento que el uso de la vacuna o composición de la presente invención permite la detección de la infección en animales mediante la diferenciación entre animales infectados y vacunados (DIVA). En el presente documento se describe un procedimiento para el diagnóstico de la infección de BTV en un animal utilizando un procedimiento de detección inmunogénica basada en BTV-NS3, tal como ELISA específico de NS3.

Artículo de fabricación

[0107] En una realización, la materia descrita en el presente documento se refiere a un kit para llevar a cabo un procedimiento para producir o inducir una respuesta inmunitaria que puede comprender una cualquiera de las composiciones o vacunas inmunológicas del BTV o AHSV recombinante, o composiciones o vacunas inmunológicas del BTV o AHSV inactivado, composiciones o vacunas virales de BTV o HASV recombinante, y las instrucciones para realizar el procedimiento.

[0108] Otra realización de la descripción es un kit para llevar a cabo un procedimiento para inducir una respuesta

inmunológica o protectora contra BTV o AHSV en un animal que comprende una composición o vacuna que comprende un antígeno del BTV de la invención y una composición o vacuna inmunológica viral de BTV o AHSV recombinante, e instrucciones para realizar el procedimiento de liberación en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el animal.

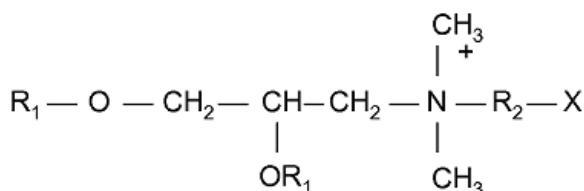
[0109] Otra realización de la descripción es un kit para llevar a cabo un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica o protectora contra BTV o AHSV en un animal que comprende una composición o vacuna que comprende un antígeno del BTV o AHSV de la descripción y una composición o vacuna inmunológica del BTV inactivado, e instrucciones para realizar el procedimiento de liberación en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el animal.

[0110] Todavía otro aspecto de la presente descripción se refiere a un kit para la vacunación de sensibilización-refuerzo de acuerdo con la presente invención tal como se ha descrito anteriormente. El kit puede comprender al menos dos viales: un primer vial que contiene una vacuna o composición para la vacunación de sensibilización de acuerdo con la presente invención, y un segundo vial que contiene una vacuna o composición para la vacunación de refuerzo de acuerdo con la presente invención. El kit puede contener ventajosamente un primer y segundo viales adicionales para vacunaciones de sensibilización adicionales o vacunaciones de refuerzo adicionales.

[0111] Las siguientes realizaciones están abarcadas por la descripción. En una realización, se describe una composición que comprende un vector de BTV o AHSV recombinante y un portador, excipiente, adyuvante o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. En una realización, las composiciones anteriores en las que el portador, excipiente, adyuvante o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable es una emulsión de agua en aceite o una emulsión de aceite en agua. En otra realización, se describe un procedimiento de vacunación de un animal susceptible a BTV o AHSV ovino, bovino, caprino o porcino que comprende administrar las composiciones anteriores al animal. En una realización, se describe un procedimiento de vacunación de un animal susceptible a BTV o AHSV ovino, bovino, caprino o porcino que comprende un régimen de sensibilización-refuerzo. En una realización, se describe un procedimiento para diagnosticar la infección por gripe en un animal. En aún otra realización, se describe un kit para la vacunación de sensibilización-refuerzo que comprende al menos dos viales, un primer vial que contiene la composición de la presente invención, y un segundo vial que contiene una composición para la vacunación de refuerzo que comprende una composición que comprende un vector viral recombinante, o una composición que comprende una composición viral inactivada, o una composición de ADN plasmídico que contiene o expresa el antígeno de BTV o AHSV.

[0112] Los portadores o vehículos o adyuvantes o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o un tampón fosfato. Otros portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables que se pueden utilizar para los procedimientos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, poli-(L-glutamato) o polivinilpirrolidona. Los portadores o vehículos o excipientes farmacéuticos o veterinariamente aceptables pueden ser cualquier compuesto o combinación de compuestos que faciliten la administración del vector (o proteína expresada a partir de un vector de la invención *in vitro*); ventajosamente, el portador, vehículo o excipiente puede facilitar la transfección y/o mejorar la conservación del vector (o proteína). Las dosis y volúmenes de dosis se describen en el presente documento en la descripción general y también se pueden determinar por el experto en la materia a partir de esta descripción en relación con el conocimiento en la técnica, sin gran experimentación.

[0113] Los lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario que son ventajosamente, pero no exclusivamente, adecuados para plásmidos, son ventajosamente aquellos que tienen la siguiente fórmula:



en la que R1 es un radical alifático de cadena lineal saturado o insaturado que tiene de 12 a 18 átomos de carbono, R2 es otro radical alifático que contiene 2 o 3 átomos de carbono y X es un grupo amina o hidroxilo, por ejemplo, DMRIE. En otra realización, el lípido catiónico puede estar asociado con un lípido neutro, por ejemplo DOPE.

[0114] Entre estos lípidos catiónicos, se da preferencia a DMRIE (N-(2-hidroxiethyl)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propano amonio; WO96/34109), ventajosamente asociado con un lípido neutro, ventajosamente DOPE (dioleoil-fosfatidil-etanolamina; Behr, 1994), para formar DMRIE-DOPE.

[0115] Ventajosamente, la mezcla de plásmido con el adyuvante se forma de manera extemporánea y ventajosamente simultáneamente con la administración de la preparación o poco antes de la administración de la preparación; por ejemplo, poco antes o previa a la administración, se forma la mezcla de plásmido-adyuvante, de manera ventajosa a fin de dar tiempo suficiente antes de la administración para que la mezcla forme un complejo, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 minutos antes de la administración, tal como aproximadamente 30 minutos antes de la administración.

[0116] Cuando DOPE está presente, la relación molar de DMRIE:DOPE es ventajosamente aproximadamente 95:aproximadamente 5 a aproximadamente 5:aproximadamente 95, más ventajosamente aproximadamente 1:aproximadamente 1, por ejemplo, 1:1.

[0117] La relación en peso de adyuvante DMRIE o DMRIE-DOPE:plásmido puede ser de entre aproximadamente 50:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 10, tal como aproximadamente 10:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 5, y aproximadamente 1:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 2, por ejemplo, 1:1 y 1:2.

[0118] En otra realización, el portador, excipiente, vehículo o adyuvante farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una emulsión de agua-en-aceite. Ejemplos de emulsiones de agua-en-aceite adecuados incluyen emulsiones de agua-en-aceite vacunales de base aceite que son estables y fluidas a 4°C que contienen: de 6 a 50% v/v de una fase acuosa que contiene el antígeno, preferiblemente de 12 a 25% v/v, de 50 a 94% v/v de una fase aceite que contiene en total o en parte un aceite no metabolizable (por ejemplo, aceite mineral, tal como aceite de parafina) y/o aceite metabolizable (por ejemplo, aceite vegetal, o ácido graso, un poliol o ésteres de alcohol), de 0,2 a 20% p/v de tensioactivos, preferiblemente de 3 a 8% p/v, estando el último en total o en parte, o en una mezcla, ya sea de ésteres de poliglicerol ésteres, siendo dichos ésteres de poliglicerol preferiblemente (poli)ricinoleatos de poliglicerol, o aceites de ricino polioxietilenados u otros aceites de ricino polioxietilenados hidrogenados. Ejemplos de tensioactivos que pueden usarse en una emulsión de agua-en-aceite incluyen ésteres de sorbitán etoxilados (por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) (TWEEN 80®), disponible de AppliChem, Inc., Cheshire, CT) y ésteres de sorbitán (por ejemplo, monooleato de sorbitán (SPAN 80®, disponible de Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Además, con respecto a una emulsión de agua-en-aceite, véase también el documento US 6.919.084, por ejemplo, el ejemplo 8 de la misma. En algunas realizaciones, la fase acuosa que contiene antígeno comprende una solución salina que comprende uno o más agentes tamponantes. Un ejemplo de una solución tampón adecuada es solución salina tamponada con fosfato. En una realización ventajosa, la emulsión de agua-en-aceite puede ser una emulsión triple agua/aceite/agua (W/O/W) (US 6.358.500). Ejemplos de otras emulsiones adecuadas se describen en US 7.371.395.

[0119] Las composiciones y vacunas inmunológicas según la invención puede comprender o consistir esencialmente en uno o más portadores, excipientes, vehículos o adyuvantes farmacéutica o veterinariamente aceptables. Los portadores o adyuvantes adecuados para uso en la práctica de la presente invención son (1) polímeros de ácido acrílico o metacrílico, anhídrido maleico y polímeros derivados con alqueno, (2) secuencias inmunoestimulantes (ISS), tales como secuencias de oligodesoxirribonucleótidos que tienen una o más unidades CpG no metiladas (Klinman et al, 1996; WO98/16247), (3) una emulsión de aceite en agua, tal como la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach", publicado por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de la misma obra, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, por ejemplo, DDA (5) citoquinas, (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, (7) saponina u (8) otros adyuvantes tratados en cualquier documento citado e incorporado por referencia en la presente solicitud, o (9) cualquier combinación o mezclas de los mismos.

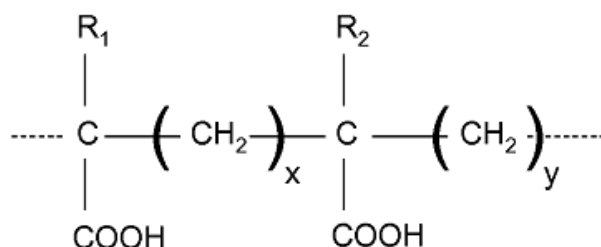
[0120] La emulsión de aceite en agua (3), que es especialmente apropiada para vectores virales, puede basarse en: aceite de parafina líquido ligero (tipo farmacopea europea), aceite de isoprenoide, tal como escualano, escualeno, aceite resultante de la oligomerización de alquenos, por ejemplo, isobuteno o deceno, ésteres de ácidos o alcoholes que tienen un grupo alquilo de cadena lineal, tales como aceites vegetales, oleato de etilo, propilenglicol, di(caprilato/caprato), tri(caprilato/caprato) de glicerol y dioleato de propilenglicol, o ésteres de alcoholes grasos o ácidos ramificados, especialmente ésteres de ácido isoesteárico.

[0121] El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar una emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como: ésteres de, por una parte, sorbitán, manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), glicerol, poliglicerol o propilenglicol y, por otra parte, ácidos oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxiesteárico, estando dichos ésteres opcionalmente etoxilados, o bloques de copolímero de polioxipropileno-polioxietileno, tal como Pluronic, por ejemplo, L121.

[0122] Entre los polímeros adyuvantes de tipo (1), se da preferencia a polímeros de ácido acrílico o metacrílico reticulado, especialmente reticulado por polialquénil éteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos bajo el nombre de carbómero (Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, junio de 1996). Un experto en la técnica también puede hacer referencia a US 2909462, que proporciona tales polímeros acrílicos reticulados por un compuesto polihidroxílico que tiene al menos tres grupos hidroxilo, preferiblemente no más de ocho de tales grupos, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres grupos hidroxilo sustituidos por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos dos átomos de carbono. Los radicales preferidos son aquellos que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados también pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son especialmente adecuados. Se reticulan por alil sacarosa o por alilpentaeritritol. Entre ellos, se hace referencia a Carbopol 974P, 934P y 971P.

[0123] En cuanto a los copolímeros derivados de anhídrido maleico-alquénilo, se da preferencia a EMA (Monsanto), que son copolímeros de etileno-anhídrido maleico de cadena lineal o reticulados y están, por ejemplo, reticulados por divinil éter. También se hace referencia a J. Fields et al., 1960.

[0124] Con respecto a la estructura, los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y EMA están formados preferentemente por unidades básicas que tienen la siguiente fórmula:



en la que:

- R1 y R2, que pueden ser iguales o diferentes, representan H o CH3
- x = 0 o 1, preferiblemente x = 1
- y = 1 o 2, con x + y = 2.

[0125] Para EMA, x = 0 e y = 2 y para carbómeros x = y = 1.

[0126] Estos polímeros son solubles en agua o solución salina fisiológica (20 g/1 NaCl) y el pH se puede ajustar a de 7,3 a 7,4, por ejemplo, mediante sosa (NaOH), para proporcionar la solución adyuvante en la que se puede incorporar el vector o vectores de expresión. La concentración de polímero en la composición inmunológica o de vacuna final puede oscilar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1,5% p/v, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1% p/v, y de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,4% p/v.

[0127] La citoquina o citoquinas (5) pueden estar en forma de proteína en la composición inmunológica o de vacuna, o pueden coexpresarse en el huésped con el inmunógeno o inmunógenos o epítipo o epítipos de los mismos. Se da preferencia a la coexpresión de la citoquina o citoquinas, ya sea por el mismo vector que expresa el inmunógeno o inmunógenos o epítipo epítipos del mismo, o por un vector separado de la misma.

[0128] La invención comprende la preparación de tales composiciones de combinación; por ejemplo mezclando los componentes activos, de forma ventajosa entre sí y con un adyuvante, portador, citoquina, y/o diluyente.

[0129] Las citoquinas que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), interferón α (IFN α), interferón β (IFN- β), interferón γ (IFN- γ), interleuquina-1 α (IL-1 α), interleuquina-1 β (IL-1 β), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-5 (IL-5), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-7 (IL-7), interleuquina-8 (IL-8), interleuquina-9 (IL-9), interleuquina-10 (IL-10), interleuquina-11 (IL-11), interleuquina-12 (IL-12), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor de necrosis tumoral β (TNF- β), y factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Se entiende que las citoquinas se pueden coadministrar y/o administrar secuencialmente con la composición inmunológica o de vacuna de la presente invención. Así, por ejemplo, la vacuna de la presente invención puede también

contener una molécula de ácido nucleico exógena que expresa *in vivo* una citoquina adecuada, por ejemplo, una citoquina emparejada a este huésped a vacunar o en el que debe provocarse una respuesta inmunológica (por ejemplo, una citoquina bovina para las preparaciones a administrar a animales bovinos).

[0130] Ventajosamente, la composición inmunológica y/o vacuna según la descripción comprenden o consisten esencialmente en o consisten en una cantidad eficaz para provocar una respuesta terapéutica de uno o más polipéptidos tal como se describe en el presente documento; y, una cantidad eficaz se puede determinar a partir de esta descripción y el conocimiento en la técnica, sin gran experimentación.

[0131] En el caso de una composición inmunológica y/o vacuna basada en los polipéptidos expresados, una dosis puede incluir, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2000 µg, ventajosamente de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 1000 µg y más ventajosamente de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 500 µg de antígeno, epítipo o inmunógeno de BTV o FMDV. Los volúmenes de dosis pueden ser entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml, ventajosamente entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 5 ml.

[0132] Se proporcionan los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

[0133] La construcción de insertos de ADN, plásmidos y vectores virales o vegetales recombinantes se llevó a cabo utilizando las técnicas estándar de biología molecular descritas por J. Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

Ejemplo 1 Generación de BTV de genoma reordenado

Células y virus

[0134] Las células BSR son un clon de células BHK-21 y se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con 5% de suero bovino fetal (FBS) y 25 µg/ml de penicilina/estreptomicina (p/s, Gibco). Las células Vero se mantuvieron en DMEM suplementado con FBS al 5% y p/s. Las células de CPT-Tert son una línea inmortalizada de células del plexo coroideo de oveja (59) y se mantuvieron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, Gibco) suplementado con 10% de FBS y p/s. Todas las células de mamíferos se incubaron a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂.

[0135] BTV-1 es la cepa de referencia del serotipo 1 de Sudáfrica y se ha utilizado como la base para el primer sistema de genética inversa de BTV. La cepa BTV-8 europea (BTV-8NET2008/06 (colección IAH Orbivirus)) se aisló de una vaca clínicamente afectada en los Países Bajos, y tiene una historia de pases de un solo pase en células KC seguido de un pase adicional en células BHK 21.

Plásmidos

[0136] Los plásmidos utilizados para el rescate de BTV-1 y BTV-8 fueron descritos anteriormente (Ratinier et al, 2011). Cada plásmido contiene una sola copia de ADNc de BTV de un segmento genómico flanqueado por un promotor T7 5' y un sitio de restricción 3'. El promotor T7 y el sitio de restricción se dispusieron de manera que los plásmidos linealizados con la enzima de restricción apropiada permitieron la transcripción *in vitro* de transcritos de ARN bloqueados con extremos de BTV auténticos. Se sintetizaron comercialmente plásmidos adicionales que contienen Seg-2 de aislados de campo virulentos de BTV-2, BTV-4 y BTV-9 (13) en el mismo contexto que los otros plásmidos de rescate (GenScript).

Genética inversa

[0137] Los plásmidos que contienen los segmentos genómicos de BTV-1 o BTV-8 o mutantes resultantes se linealizaron con las enzimas de restricción apropiadas y a continuación se purificaron por extracción con fenol/cloroformo. Los plásmidos digeridos fueron utilizados como plantilla para la transcripción *in vitro* usando el kit mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit (Ambion), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se purificaron secuencialmente ARNss mediante extracción con fenol/cloroformo y a través de columnas Illustra Microspin G25 (GE Healthcare Life Sciences), siguiendo el protocolo del fabricante.

[0138] Las combinaciones de los ARN individuales se ensamblaron de acuerdo con los genomas reordenados deseados (véase la Tabla 1 y la figura 1).

[0139] Se emplacaron 2×10^5 células BSR en placas de 12 pocillos en medio de crecimiento sin antibióticos, 24 h antes de la transfección. Las células se transfectaron dos veces con ARN usando Lipofectamine 2000. Para la primera transfección, se mezclaron 1×10^{11} copias de ARN bloqueado de tipo BTV transcrito *in vitro* que codifica VP1, 3, 4, 6, NS1 y NS2 con OptiMEM (Gibco) que contenía RNAsin Plus (0,5 U/μl, Promega) en un volumen final de 10 μl. Se mezclaron 2 μl de Lipofectamine 2000 10 μl de OptiMEM (con RNAsin Plus) y se incubaron durante 5 min antes de la combinación con el ARN. Se dejaron formar complejos de transfección durante 20 min antes de añadir gota a gota la mezcla de transfección a las células. Aproximadamente 18 h después de la primera transfección, el medio se reemplazó, y las células se transfectaron una segunda vez como la primera transfección, pero con todos los 10 segmentos y 3 μl de Lipofectamine. 4h después de la segunda transfección, el medio se reemplazó con una capa de agar.

[0140] Se adopta una nomenclatura estándar en este informe: la sección en mayúscula del nombre se refiere a la estructura del virus, seguido por un subíndice que comprende la proteína sustituida, precedido por el origen de serotipo del segmento, por ejemplo BTV-1_{BVP1} se refiere a un virus con una estructura de BTV-1 que contiene el gen de VP1 de BTV-8.

[0141] El gráfico esquemático que representa la generación de BTV de genoma reordenado se muestra en la figura 6.

Curvas de crecimiento

[0142] Para el análisis de crecimiento del virus *in vitro*, se emplacaron 2×10^5 células CPT-terc/pocillo o 3×10^6 células KC/pocillo en placas de 12 pocillos en 1 ml de medio de crecimiento el día antes de la infección. Se incubaron las células en el medio que contenía el virus correspondiente durante 2 horas a 37°C. A continuación, el medio se desechó y las células se lavaron una vez con DMEM y después se incubó con 1 ml de medio de crecimiento fresco apropiado. Se extrajeron muestras de 100 μl de sobrenadante a las 0, 8, 24, 48 y 72 horas después de la infección (p.i.), y se reemplazaron con 100 μl medio de crecimiento fresco. Las muestras de 100 μl se aclararon por centrifugación durante 5 minutos a 500 xg y después se almacenaron a 4°C. Las muestras a continuación se titularon mediante ensayos de dilución limitante (60) en células BSR y los títulos de virus se expresaron como TCID₅₀/ml.

Ensayos en placa

[0143] Las células CPT-terc se sembraron a una densidad de 4×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos 24 h antes de la infección con BTV. Las células se infectaron durante 2 horas a 37°C. A continuación, se desechó el medio que contenía el virus y las células se lavaron con DMEM y se incubaron durante 72 h en 3 ml de una capa semisólida (1,2% Avicel en DMEM suplementado con 4% de FBS y p/s). A continuación, la capa se desechó y las células se lavaron con PBS y a continuación se tiñeron durante > 1 h con violeta cristal en formaldehído.

Ensayos de neutralización

[0144] Se prepararon diluciones en serie de tres veces de antisuero específico de BTV-1 o BTV-8 por cuadruplicado en placas de 96 pocillos utilizando 50 μl de cada suero de ensayo diluido en DMEM que contenía 3% de FBS. A continuación, se añadieron 100 TCID₅₀ de BTV-1, BTV-8 y genomas reordenados seleccionados a los pocillos correspondientes y las placas y se incubaron a 37°C durante 1 h. Finalmente, se añadieron $2,5 \times 10^4$ células Vero a cada pocillo y la placa se incubó a 37°C durante 5 días en un incubador humidificado con 5% de CO₂, después de lo cual se evaluó visualmente el CPE viral. La dosis protectora 50 (PD₅₀) para cada muestra de suero, definida como la dilución de suero que inhibe la infección por BTV en el 50% de cultivos de células Vero, se determinó a continuación usando el procedimiento de Reed-Muench (60). Las células BHK-21 en suspensión se ampliaron para la producción a gran escala de BTV de genoma reordenado. El BTV de genoma reordenado recogido estaba inactivado. Los adyuvantes adecuados se añadieron al BTV de genoma reordenado para la preparación de vacunas.

RESULTADOS

[0145] Se utilizó genética inversa para determinar si era posible reordenar cualquier segmento individual de BTV-1 o BTV-8 en una estructura alternativa. Todas las combinaciones de virus con un único segmento de BTV-8 en la estructura de BTV-1 se rescataron con éxito, y viceversa (Figura 1). El genotipo de cada virus de genoma reordenado se comprobó mediante amplificación por RT-PCR y secuenciación de un fragmento de cada segmento (Figura 1). Los resultados mostraron que cualquier segmento de BTV puede reordenarse entre BTV-1 y VLA-8.

[0146] Las características de crecimiento *in vitro* de todos los virus de genoma reordenado se evaluaron utilizando el ensayo en placa y mediante la realización de curvas de crecimiento de virus. Se determinaron los diámetros promedio de placa a partir de dos rondas independientes del ensayo en placa. En la mayoría de los casos, el diámetro de la placa en gran parte no estaba afectado y difería poco de la estructura parental en el que se insertó el segmento individual alternativo

(Figura 2A-B). Sin embargo, algunos virus revelaron consistentemente un fenotipo en placa más pequeña o más grande con relación a la estructura parental. La sustitución del BTV-8 Seg-8 (que codifica NS2) en la estructura de BTV-1 (BTV-1_{8NS2}) dio lugar a placas que fueron aproximadamente 33% más pequeñas que BTV-1 de tipo natural (Figura 2A). Las placas del genoma reordenado contrario, es decir BTV-8_{1NS2}, también se redujeron, aunque en menor medida (Figura 2B). Otros monogenomas reordenados que produjeron consistentemente placas con un diámetro más pequeño en comparación con los virus parentales fueron aquellos con segmentos reordenados que codifican VP1, VP4, y NS1.

[0147] Los análisis de la curva de crecimiento se realizaron con el fin de evaluar la cinética de crecimiento de cada genoma reordenado. La mayoría de los genomas reordenados demostraron una dinámica de crecimiento similar a los correspondientes virus de tipo natural (Figura 3).

[0148] Varios estudios han sugerido que el VP2 está ligado inextricablemente al serotipo de BTV. Sin embargo, también se ha sugerido que VP5 contribuye a la definición de un serotipo para cepas particulares. Para investigar las contribuciones relativas de VP2 y VP5 a la determinación del serotipo, se realizaron ensayos de neutralización en suero usando genomas reordenados BTV-1, BTV-8 y genomas reordenados con la estructura de BTV-1 o BTV-8 y la VP2 heteróloga sola o VP2 y VP5 (BTV-1_{8VP2}, BTV-1_{8VP2, VP5}, BTV-8_{1VP2} y BTV-8_{1VP2, VP5}). Los antisueros neutralizantes de BTV-1 y BTV-8 se derivaron de animales vacunados contra BTV-1 o BTV-8 y se estimularon con la cepa homóloga.

[0149] Los resultados mostraron que los antisueros de BTV-8 neutralizaron completamente BTV-8 de tipo natural, a la vez que no muestra capacidad de neutralización contra BTV-1 (Figura 4A). Del mismo modo, BTV-1 se neutralizó mediante antisueros de BTV-1, pero no por antisueros de BTV-8 (Figura 4A).

[0150] Los experimentos con genomas reordenados que contienen VP2 solo o VP2 y VP5 del virus heterólogo reveló que el virus sólo se neutraliza cuando los sueros se emparejan con la proteína VP2, confirmando estudios que relacionan el serotipo únicamente con VP2.

[0151] Los resultados que indican que VP2 solo puede dictar el serotipo impulsaron a generar más genomas reordenados de BTV-1 que incorporan Seg-2 entre una selección de serotipos. Los virus de genoma reordenado de BTV-1 que contienen la VP2 de BTV-2, BTV-4 y BTV-9, que dan lugar a BTV-1_{2VP2}, BTV-1_{4VP2} y BTV-1_{9VP2}, respectivamente, fueron rescatados con éxito. En todos los casos fueron rescatados los virus que crecían de forma igual al virus de tipo natural (Figura 5).

Ejemplo 2 Estudio clínico y de serología de los animales vacunados

[0152] Se utilizaron dos constructos utilizando una estructura de BTV-1 y sustituyendo (VP2BTV1) o (VP2BTV1 + VP5BTV1) por (VP2BTV8) o (VP2BTV8 + VP5BTV8), respectivamente, en el estudio de estimulación. Las características de los antígenos producidos para formular las vacunas probadas se resumen en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2 Características de los antígenos

antígeno	estructura	sustitución de proteína o proteínas (y serotipo)
VP2	BTV-1	VP2 (BTV-8)
VP2 + VP5	BTV-1	VP2 (BTV-8) + VP5 (BTV-8)

[0153] Los virus de genomas reordenados se cultivaron, inactivaron y procesaron para producir dos lotes de antígenos. Estos antígenos se formularon en vacunas mediante la mezcla con gel de aluminio (2,7 mg de hidróxido de aluminio) y saponina (30HU de saponina por 1 ml de dosis de vacuna) como adyuvantes. Las vacunas probadas se indican en la Tabla 3.

Tabla 3 Características de las vacunas

antígeno	contenido de antígeno de VP2 por 1 ml de dosis de vacuna (log ₁₀ pixel*)	contenido volumétrico de antígeno por 1 ml de dosis de vacuna (ml**)
VP2 dosis alta	3,2	6,39
VP2 dosis baja	2,12	0,53
VP2 + VP5	3,2	6,49

*: Contenido de VP2_{BTV8} medido mediante transferencia de puntos cuantitativa en el PI (principio activo)

**: ml equivalentes de PI no concentrado

[0154] Las vacunas se administraron en 1 o 2 inyecciones a ovejas BTV sero-negativas convencionales. La protección se evaluó a través de una estimulación de BTV-8 virulento llevada a cabo 21 días después de la finalización de la vacunación y el seguimiento clínico y virológico posterior. El estudio de estimulación en las ovejas se llevó a cabo de acuerdo con la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Grupo	Tratamiento	Vacunación		Eficacia	Estimulación con BTV-8 en D42
		D0	D21		
G1	VP2 dosis alta	x	x	5	sí
G2	VP2 dosis alta	-	x	5	sí
G3	VP2 dosis alta	-	x	5	sí
G4	VP2 + VP5	x	x	5	sí
G5	VP2 + VP5	-	x	5	sí
G6	Vacuna BTV-8 comercial (Merial) – control positivo	-	x		sí
G7	control negativo	-	-	6	sí

[0155] Antes de las sesiones de vacunación, se controló en todos los animales por su estado de salud y la temperatura rectal. En D0 y/o D21, cada animal de los grupos G1 a G6 recibió una dosis de 1 ml de la vacuna apropiada, tal como se describe en la Tabla 4. Las inyecciones se realizaron por vía subcutánea en la cara lateral izquierda (D0) o derecha (D21) del tórax, junto al codo, después de la desinfección local del punto de inyección. Los animales del grupo G7 permanecieron sin tratar y sirvieron como control.

[0156] Para todos los animales, la temperatura rectal se registró en D42 (antes de la estimulación) y a continuación todos los días de D47 a D56. Desde D47 a D56, se registraron el comportamiento general y la condición corporal de los animales. Para la condición general: Bien se le asigna una puntuación de 0; apático se le asigna una puntuación de 1; deprimido se le asigna una puntuación de 2; postrado se le asigna una puntuación de 3. Para la condición corporal: normal se le asigna una puntuación de 0; delgado se le asigna una puntuación de 1; caquéctico se le asigna una puntuación de 2.

[0157] De D47 a D56, se registraron los signos clínicos observados con frecuencia durante la infección de la lengua azul, incluyendo:

- congestión y/o edema, especialmente en la cabeza: ojos, nariz, orejas, labios, chaflán, espacio intermandibular
- hipersalivación
- descarga/costras nasales
- balido quejumbroso
- petequias
- problemas de locomoción (cojera)
- problemas respiratorios (tos/disnea)
- problemas digestivos (diarrea)
- eritema

[0158] Se registró otro signo clínico cuando estaba presente. En los días en que no se realizó un seguimiento clínico de los individuos, se comprobó diariamente el estado general de salud de la manada como parte de la atención y el mantenimiento diario.

[0159] En D0 (antes de la vacunación), D21 (antes de la vacunación), D42 (antes de la estimulación) y D56, se tomaron muestras de sangre de todas las ovejas por punción yugular con tubos lisos. Todas las muestras fueron tratadas para recoger el suero. Los sueros se dividieron en alícuotas y se inactivaron por calor (56°C, 30 min) antes de su transferencia al laboratorio de análisis clínicos. Los títulos de anticuerpos específicos de BTV-8 se determinaron en sueros individuales en todas las fechas de muestreo mediante pruebas de seroneutralización.

[0160] Se realizaron pruebas de sero-neutralización según la técnica (Nº002488) actualmente utilizadas por el Laboratorio de análisis clínicos. Brevemente, los sueros se ensayaron en diluciones de tres veces (0,48 Log10), a partir de 1/3, en placas de microtitulación. Cien microlitros de suero diluido se incubaron 1 hora a 37°C con 50 microlitros de una suspensión viral de un serotipo de BTV determinado (serotipo 8). A continuación, se añadieron a la mezcla cincuenta microlitros de una suspensión de células VERO que contenían 500.000 células por ml y se incubaron las placas a 37°C. La lectura de

las placas se basó en el efecto citopático, después de una incubación de 7 días. Los títulos de suero, expresados en Log10 (PD50%) se calcularon mediante regresión después de transformación angular.

[0161] En D42 (antes de la estimulación), D47, D49, D51, D54 y D56, se tomaron muestras de sangre de todas las ovejas mediante punción yugular con tubos de EDTA.

[0162] Con el fin de detectar y cuantificar el ARN del virus de la lengua azul en la sangre, se realizó un análisis mediante la prueba de qRT-PCR en estas muestras. Estos ensayos se realizaron de acuerdo con la técnica No. 200336 actualmente utilizada por el Laboratorio de Análisis Clínicos (procedimiento automatizado).

[0163] En resumen, después de la extracción utilizando un kit comercial (Nucleospin multi 96), el ARN se desnaturalizó primero por tratamiento térmico. A continuación, se incubó una parte alícuota con sonda MGB, cebadores específicos y el reactivo del kit de Invitrogen Super Script III Platinum One step, para permitir la amplificación en el termociclador. Esta etapa se realizó por duplicado. La señal fluorescente es proporcional a la cantidad de ADN sintetizado. La amplificación se refiere a cualquiera de los 24 serotipos de BTV. La cuantificación de ácidos nucleicos de BTV en las muestras se hizo por comparación con muestras de ARN estandarizadas. La cantidad de ARN se expresó en número Log10 de copias de ARN por ml de sangre teniendo en cuenta los resultados obtenidos en cada duplicado cuando ambos eran positivos y sólo un positivo cuando uno de los duplicados se encontró que era negativo. El punto de corte positivo del 95% de la técnica (que se define como el número mínimo de secuencias diana por volumen de muestra que pueden detectarse en el 95% de las pruebas realizadas) o se determinó el umbral de respuesta positiva del 95% (PRT95) a 3,68 log10 copias de ARN/ml. Los resultados de las muestras de titulación por debajo de 3,68 log10 copias de ARN/ml se expresaron como < PRT95 y se consideraron negativos. Los resultados de las muestras de titulación $\geq$ PRT95 se proporcionaron tal cual y fueron considerados positivos.

[0164] Para el propósito de la descripción de resultados (cálculo del promedio, desviación estándar y área bajo la curva) y el análisis, se atribuyó un título de 3,68 log 10 copias de ARN/ml a las muestras negativas.

Resultados de hipertermia

[0165] Las evoluciones de temperaturas promedio después de la estimulación se muestran en la figura 8. Las dispersiones de hipertermias máximas se muestran en la figura 9.

[0166] Se observó claramente un aumento de la temperatura rectal en el grupo de control, a partir de D48 (es decir, 6 días después de la estimulación) y alcanzando un máximo en D49 (41,3°C de promedio), reduciendo luego progresivamente hasta D56.

[0167] En todos los grupos vacunados, la temperatura promedio fue bastante constante durante todo el período de seguimiento. Cuando se comparó con el grupo de control (G7), las hiperterminas máximas se redujeron de forma estadísticamente significativa ($p \leq 0,01$) en los grupos vacunados G1, G3 y G4. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas para G2 y G6.

Signos clínicos y puntuaciones clínicas

[0168] La evolución de las puntuaciones clínicas diarias promedio se muestra en la figura 10. La dispersión de GCS por grupo se representa en la figura 11.

[0169] Después de la estimulación, los signos clínicos observados con mayor frecuencia fueron congestión y edema en la cabeza. Entre otros también se observaron ocasionalmente eritema, apatía, delgadez, descarga y costras nasales, problemas respiratorios y de locomoción.

[0170] La frecuencia y la duración de la observación de estos signos fueron marcadamente más elevadas en los controles que en los grupos vacunados.

[0171] En el grupo de control (G7), la puntuación clínica diaria promedio alcanzó su punto máximo en D50 (es decir, 8 días después de la estimulación) con un valor de 8,8 y era constantemente mayor que en cualquier grupo vacunado. La GCS promedio de G7 fue 50. En los grupos vacunados, la puntuación clínica promedio diaria fue muy baja durante todo el período de seguimiento. Cuando se comparó con el grupo de control (G7), la GCS se redujo de manera estadísticamente significativa ($p \leq 0,01$) en todos los grupos vacunados excepto G2. Para G2, la diferencia estaba cerca de la significación estadística.

Resultados de viremia

[0172] La evolución de títulos de viremia promedio se resumen en la figura 12. Las frecuencias de muestras positivas de PCR y AUC se muestran en la Tabla 5. La Fig. La figura 13 muestra dispersiones de AUC.

- 5 **[0173]** Todas las ovejas fueron confirmadas como RT-PCR negativas antes de la estimulación. En el grupo de control, todas las ovejas fueron positivas en D47 (es decir, 5 días después de la estimulación) y todos permanecieron positivos, a títulos bastante altos, hasta el final del período de seguimiento.
- 10 **[0174]** En los grupos vacunados G3 y G4, se detectó una oveja poco positiva en la fecha de muestreo inmediatamente después de la inoculación. A continuación, ambas ovejas se hallaron siempre negativas. Estos resultados, poco positivos, transitorios fueron muy probablemente debidos a la detección de un resto del inóculo de estimulación y claramente no eran atribuibles a una multiplicación viral.
- 15 **[0175]** Cuando se compararon con el grupo control (G7), las áreas bajo la curva se redujeron de manera estadísticamente significativa ($p \leq 0,01$) en todos los grupos vacunados excepto G2. Para G2, la diferencia era próxima a la significación estadística. Se consideró que la prevención completa de la viremia se logró en G1, G3, G4 y G5.

Tabla 5 Frecuencias de muestras positivas de PCR y AUC

Grupo	Frecuencia de PCR positiva en los días					Número total de muestras positivas en PCR	Área bajo la curva (AUC)	
	D47	D49	D51	D54	D56		promedio	de
G1 (VP2 dosis alta, D0/D21)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25	0,00	0,00
G1 2 (VP2 dosis alta, D21)	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	5/25	1,82	4,06
G3 (VP2 dosis baja, D21)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25	0,87	1,95
G4 (VP2 + VP5, D0/D21)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25	0,99	2,20
G5 (VP2 + VP5, D21)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25	0,00	0,00
G6 (vacuna comercial BR8)*	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	5/25	1,33	2,98
G7 (no vacunado)	6/6	6/6	6/6	5/5**	5/5	28/28	8,85	0,73
*: vacuna comercial BR8: vacuna de BTV-8 comercial (Merial)								
**: una oveja murió en el D53								

20

Resultados serológicos

25

[0176] La evolución de títulos promedio de anticuerpos neutralizantes de BTV-8 se resume en la Figura 14. Todas las ovejas fueron confirmadas como sero-negativas antes de la vacunación y los controles permanecieron seronegativos hasta la estimulación.

[0177] En los grupos vacunados 2 veces (G1 y G4), se observaron algunas sero-conversiones en D21. En D42, todas las ovejas se habían sero-convertido en ambos grupos y los títulos promedio fueron casi idénticos.

30

[0178] En los grupos vacunados una vez (G2, G3, G5 y G6), se observaron algunas sero-conversiones 21 días después de la vacunación (es decir, D42). Aunque se observó una diferencia obvia en los títulos serológicos (D42) entre los grupos

vacunados una vez y dos veces (G1 vs G2 y G4 vs G5), las diferencias en los títulos serológicos de acuerdo con la carga útil de antígeno (G2 vs G3) eran menos evidentes.

[0179] Todas las ovejas se sero-convirtieron fuertemente después de la estimulación (D56) y hubo claramente un efecto de refuerzo en todos los grupos vacunados.

Conclusión

[0180] Los resultados mostraron que las construcciones proporcionaban una reducción significativa de la hipertermia, una reducción significativa de los signos clínicos, y la prevención completa y significativa de la viremia.

Ejemplo 3 Producción de BTV sintético de múltiples serotipos

[0181] Usando el sistema de genética inversa tal como se describe en el Ejemplo 1, se generaron genomas reordenados de BTV "sintéticos" (sBTV) que cubrían 24 de los 26 serotipos diferentes, en los que cada VP2 se acopló con la proteína VP5 homóloga en una estructura de BTV-1 (proteínas VP1, VP3, VP4, NS1, VP7, NS2, VP6 y NS3) como se muestra en la Tabla 6 a continuación. El término "sintético" se utiliza para describir la plataforma porque segmentos de genoma se pueden sintetizar *in vitro* a partir de una secuencia conocida, en lugar de mediante la amplificación del genoma de un aislado de virus.

[0182] Es interesante y sorprendentemente, a pesar de que BTV-25 (Toggenburg Orbivirus) no creció en cultivo celular, mediante la introducción de las regiones no traducidas de BTV-1 en la secuencia codificante de las proteínas VP2 y VP5, los inventores fueron capaces de rescatar un sBTV del serotipo de BTV-25. De este modo, la plataforma de vacuna puede ser extremadamente útil para aquellas cepas de virus que no pueden aislarse fácilmente en cultivo de tejidos.

Tabla 6 Virus sBTV disponibles sintetizados mediante el sistema genético inverso

Código de virus	Serotipo	Proteína VP2	Proteína VP5	Estructura	Nombre alternativo+
RAS8	BTV-01	BTV-01	BTV-01	BTV-01	S1BTV-1VP2/VP5
RAS41	BTV-02	BTV-02	BTV-01	BTV-01	-/-
RAS51	BTV-02	BTV-02	BTV-02	BTV-01	S1BTV-2VP2/VP5
RFN70	BTV-02	BTV-02	BTV-02	BTV-01	-/-
RFN30	BTV-03	BTV-03	BTV-06	BTV-01	-/-
RFN52	BTV-03	BTV-03	BTV-03	BTV-01	S1BTV-3VP2/VP5
RAS40	BTV-04	BTV-04	BTV-01	BTV-01	-/-
RFN53	BTV-04	BTV-04	BTV-04	BTV-01	S1BTV-4VP2/VP5
RFN71	BTV-04	BTV-04	BTV-04	BTV-01	-/-
RFN78	BTV-05	BTV-05	BTV-5	BTV-01	-/-
RFN32	BTV-06	BTV-06	BTV-06	BTV-01	S1BTV-6VP2/VP5
RFN73	BTV-07	BTV-07	BTV-01	BTV-01	-/-
RAS32	BTV-08	BTV-08	BTV-08	BTV-01	S1BTV-8VP2/VP5
RFN56	BTV-09	BTV-09	BTV-09	BTV-01	S1BTV-9VP2/VP5
RAS39	BTV-09it	BTV-09	BTV-01	BTV-01	-/-
RFN74	BTV-10	BTV-10	BTV-01	BTV-01	-/-
RFN35	BTV-11	BTV-11	BTV-01	BTV-01	-/-
RFN58	BTV-11	BTV-11	BTV-11	BTV-01	S1BTV-11VP2/VP5
RFN75	BTV-12	BTV-12	BTV-01	BTV-01	-/-
RFN37	BTV-13	BTV-13	BTV-13	BTV-01	S1BTV-13VP2/VP5
RFN38	BTV-14	BTV-14	BTV-06	BTV-01	S1BTV-14VP2
RFN76	BTV-16	BTV-16	BTV-01	BTV-01	-/-
RFN79	BTV-16	BTV-16	BTV-10	BTV-01	-/-
RFN80	BTV-16	BTV-16	BTV-11	BTV-01	-/-
RFN81	BTV-16	BTV-16	BTV-16	BTV-01	-/-
RFN82	BTV-16	BTV-16	BTV-21	BTV-01	-/-
RFN83	BTV-16	BTV-16	BTV-22	BTV-01	-/-
RFN84	BTV-16	BTV-16	BTV-23	BTV-01	-/-
RFN85	BTV-16	BTV-16	BTV-26	BTV-01	-/-
RFN41	BTV-17	BTV-17	BTV-01	BTV-01	-/-

RFN63	BTV-17	BTV-17	BTV-17	BTV-01	S1BTV-17 _{VP2/VP5}
RFN77	BTV-18	BTV-18	BTV-01	BTV-01	-/-
RFN44	BTV-20	BTV-20	BTV-10	BTV-01	-/-
RFN66	BTV-20	BTV-20	BTV-20	BTV-01	S1BTV-20 _{VP2/VP5}
RFN45	BTV-21	BTV-21	BTV-16	BTV-01	-/-
RFN67	BTV-21	BTV-21	BTV-21	BTV-01	S1BTV-21 _{VP2/VP5}
RFN46	BTV-22	BTV-22	BTV-22	BTV-01	S1BTV-22 _{VP2/VP5}
RFN47	BTV-23	BTV-23	BTV-01	BTV-01	-/-
RFN68	BTV-23	BTV-23	BTV-23	BTV-01	S1BTV-23 _{VP2/VP5}
RFN48	BTV-24	BTV-24	BTV-04	BTV-01	S1BTV-24 _{VP2}
RFN49	BTV-25	BTV-25 (1UTRs) [#]	BTV-25 (1UTRs) [#]	BTV-01	S1BTV-25 _{VP2/VP5}
RFN50	BTV-26	BTV-26	BTV-26	BTV-01	S1BTV-26 _{VP2/VP5}
#Región que codifica la proteína flanqueada por las regiones no traducidas de BTV-1					

Caracterización y replicación *in vitro* de sBTV

[0183] Las reservas virales de cada uno de los virus sBTV se cultivaron y se titularon en células BSR. El fenotipo de placa se evaluó mediante ensayo de placas en células de oveja a las 72 horas después de la infección (Figura 15). Tal como se mencionó anteriormente, todos los serotipos rescatados tienen la combinación VP2/VP5 homóloga.

[0184] La replicación de sBTV se determinó en células BHK-21 (infectadas con una MOI de 0,001). Los sobrenadantes celulares se recogieron a las 72 h después de la infección (Figura 16). Las muestras por triplicado se titularon posteriormente mediante TCID₅₀ en células BHK-21 (usando el procedimiento de Reed-Muench) y se representaron gráficamente como log₁₀ TCID₅₀/ml.

Ejemplo 4 Producción de virus de genoma reordenado inactivado

[0185] Se amplificaron dos cepas de construcción como BTV de genoma reordenado, una correspondiente a VP2 de BTV8 en estructura de BTV-1 y la segunda con VP2/VP5 de BTV8 en la estructura de BTV-1, en células BHK21.

Producción de células

[0186] Se inoculó un biorreactor de 7L (pase 48) con 5 litros de medio GMEM con 7% de suero de ternera y 2x 10⁹ células (6BHK2M12-pase 47). El cultivo se reguló utilizando como parámetros: pH: 7,1 ± 0,1, temperatura: 37,0 ± 1,5°C, DO2: 7,1 ± 10% y agitación: 300 rpm ± 10%. Después de 2 días de cultivo, se realizó una numeración. El volumen total de la suspensión se transfirió en un biorreactor B4 previamente esterilizado y que contenía 35 litros de medio GMEM + 7% CS. El cultivo se regula utilizando como parámetros: pH: 7,1 ± 0,1, temperatura: 7,1 ± 1,5°C, DO2: 7,1 ± 10% y agitación: 150 rpm ± 10%. Después de 3 días de cultivo, la agitación del biorreactor se detuvo por decantación de las células durante aproximadamente 24 horas a +5°C. Después de la decantación, el medio se eliminó, (volumen restante = 5 litros). Se añadió medio VMM (30 litros). Después de mezclar, se llevó a cabo un recuento de células y se añadió el inóculo: inóculo BTV1 + BTV8 VP2 (RAS10) para el primer principio activo y el inóculo BTV1 + BTV8 VP2/VP5 (RAS32) para el segundo. El volumen final en el biorreactor fue de 35 litros, se calcularon los volúmenes de inóculo para obtener una MOI igual a 5 10⁻⁴ CCID₅₀/célula. Los parámetros del cultivo fueron: pH: 7,1 ± 0,1, temperatura: 37,0 ± 1,5°C, DO2: 7,1 ± 10%, agitación: 100 rpm ± 10% y presión: 0,1 bares ± 10%. El cultivo se detuvo después de aproximadamente 46 horas por enfriamiento bajo agitación.

Tratamiento antes de la inactivación

[0187] La regulación de oxígeno se detuvo y se añadió cloroformo para obtener una concentración final de 0,05%. La mezcla se dejó en agitación a aproximadamente 8°C durante una hora con una regulación del pH a 7,4 ± 0,1. La regulación del pH se detuvo y el producto se almacenó a aproximadamente +8°C sin agitación hasta el tratamiento. Se trataron aproximadamente 24 litros del cultivo con Ultra-Turrax T50: 8 muestras de 3000 ml a 1000 vatios durante 3 minutos a la temperatura del laboratorio. Las muestras se combinaron después del tratamiento.

[0188] El producto a continuación se aclaró por centrifugación (20 minutos a 3500 rpm, 20°C). El sobrenadante se filtró y se almacenó a +5°C antes de la inactivación.

Inactivación

[0189] El filtrado sobrenadante se calentó a 37°C y el pH se ajustó a $7,4 \pm 0,1$. Se añadió solución de formaldehído hasta obtener una concentración final de 0,5 mg/ml. Veinte minutos después se añadió una dosis de EI para obtener una concentración final de 1,5 mM. 18 horas después, se añadió una segunda dosis de EI (la misma concentración). La etapa de inactivación se llevó a cabo a 37°C durante 24 horas (T0 = tiempo de la primera adición de EI). Durante esta etapa de inactivación, las muestras se llevaron a cabo y se trataron mediante una solución de L-cisteína.

Filtración y concentración

[0190] El producto inactivado se filtró (CUNO 30S). Se midió el nuevo volumen. El filtrado se concentró a temperatura de laboratorio, se calculó el factor de concentración.

Purificación y tratamiento con formaldehído

[0191] El concentrado se purificó usando la columna XK 25/100 con S6FF. Se realizaron dos rondas. Las condiciones de purificación fueron: volumen de la muestra: 15% de la columna (aproximadamente 60 ml); tampón para elución: tampón fosfato de pH 7,4; velocidad de elución: 2,5 ml/min. El pico de exclusión (principio activo), la fracción de seguridad, y el pico de proteína se recogieron por separado. La solución de formaldehído se añadió al principio activo para obtener una concentración final de 1 mg/ml almacenado a +5°C.

[0192] Los resultados de título infeccioso, ELISA, transferencia de puntos Vp2 para BTV1 + BTV8 VP2 (RAS10) y BTV1 + BTV8 VP2/VP5 (RAS32) se muestran en las figuras 17 y 18. La producción de los dos genomas reordenados de BTV inactivado purificados se realizó con éxito. Estos dos genomas reordenados se utilizaron para formular vacunas.

[0193] Habiendo por tanto descrito en detalle las realizaciones preferida de la presente invención, debe entenderse que la invención a la que esta memoria se refiere no está limitada a los detalles particulares expuestos en la descripción anterior, ya que muchas variaciones evidentes de la misma son posibles sin apartarse del alcance de la presente invención.

REFERENCIAS

[0194]

- Anderson, G. A., J. L. Stott, et al. (1985). "Subclinical and clinical bluetongue disease in cattle: clinical, pathological and pathogenic considerations." *Prog Clin Biol Res* 178: 103-7.
- Andreansky, S. S., B. He, et al. (1996). "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11313-8.
- Andrew, M., P. Whiteley, et al. (1995). "Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus." *Vet Immunol Immunopathol* 47(3-4): 311-22.
- Antoine, G., F. Scheiflinger, et al. (1998). "The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses." *Virology* 244(2): 365-96.
- Ballay, A., M. Leverro, et al. (1985). "In vitro and in vivo synthesis of the hepatitis B virus surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses." *Embo J* 4(13B): 3861-5.
- Barcena, J., M. M. Lorenzo, et al. (2000). "Sequence and analysis of a swinepox virus homologue of the vaccinia virus major envelope protein P37 (F13L)." *J Gen Virol* 81(Pt 4): 1073-85.
- Bernard, K. A., B. A. Israel, et al. (1997). "Sequence and cognitive analyses of two virulence-associated markers of bluetongue virus serotype 17." *Intervirology* 40(4): 226-31.
- Bonneau, K. R., C. D. DeMaula, et al. (2002). "Duration of viremia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep." *Vet Microbiol* 88(2): 115-25.
- Bonneau, K. R., B. A. Mullens, et al. (2001). "Occurrence of genetic drift and founder effect during quasispecies evolution of the VP2 and NS3/NS3A genes of bluetongue virus upon passage between sheep, cattle, and *Culicoides sonorensis*." *J Virol* 75(17): 8298-305.
- Bonneau, K. R., N. Zhang, et al. (1999). "Sequence comparison of the L2 and S10 genes of bluetongue viruses from the United States and the People's Republic of China." *Virus Res* 61(2): 153-60.
- Boshart, M., F. Weber, et al. (1985). "A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus." *Cell* 41(2): 521-30.
- Bradel-Tretheway, B. G., Z. Zhen, et al. (2003). "Effects of codon-optimization on protein expression by the human herpesvirus 6 and 7 U51 open reading frame." *J Virol Methods* 111(2): 145-56.
- Carroll, M. W., W. W. Overwijk, et al. (1997). "Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a murine tumor model." *Vaccine* 15(4): 387-94.
- Cochran, M. A., C. Puckett, et al. (1985). "In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals." *J Virol* 54(1): 30-7.
- Cowley, J. A. and B. M. Gorman (1989). "Cross-neutralization of genetic reassortants of bluetongue virus serotypes 20 and 21." *Vet Microbiol* 19(1): 37-51.

- De Groot, A. S. and F. G. Rothman (1999). "In silico predictions; in vivo veritas." *Nat Biotechnol* 17(6): 533-4.
- de Mattos, C. A., C. C. de Mattos, et al. (1994). "Heterogeneity of the L2 gene of field isolates of bluetongue virus serotype 17 from the San Joaquin Valley of California." *Virus Res* 31(1): 67-87.
- DeMaula, C. D., K. R. Bonneau, et al. (2000). "Changes in the outer capsid proteins of bluetongue virus serotype ten that abrogate neutralization by monoclonal antibodies." *Virus Res* 67(1): 59-66.
- DeMaula, C. D., H. W. Heidner, et al. (1993). "Neutralization determinants of United States bluetongue virus serotype ten." *Virology* 195(1): 292-6.
- DeMaula, C. D., C. M. Leutenegger, et al. (2002). "The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue." *Virology* 296(2): 330-7.
- Disbrow, G. L., I. Sunitha, et al. (2003). "Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression." *Virology* 311(1): 105-14.
- Felgner, J. H., R. Kumar, et al. (1994). "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations." *J Biol Chem* 269(4): 2550-61.
- Frolov, I., T. A. Hoffman, et al. (1996). "Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11371-7.
- Funahashi, S., T. Sato, et al. (1988). "Cloning and characterization of the gene encoding the major protein of the A-type inclusion body of cowpox virus." *J Gen Virol* 69 (Pt 1): 35-47.
- Geysen, H. M. (1990). "Molecular technology: peptide epitope mapping and the pin technology." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 21(4): 523-33.
- Geysen, H. M., S. J. Barteling, et al. (1985). "Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(1): 178-82.
- Geysen, H. M., R. H. Meloen, et al. (1984). "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(13): 3998-4002.
- Ghiasi, H., A. Fukusho, et al. (1987). "Identification and characterization of conserved and variable regions in the neutralization VP2 gene of bluetongue virus." *Virology* 160(1): 100-9.
- Graham, F. L. (1990). "Adenoviruses as expression vectors and recombinant vaccines." *Trends Biotechnol* 8(4): 85-7.
- Guo, P. X., S. Goebel, et al. (1989). "Expression in recombinant vaccinia virus of the equine herpesvirus 1 gene encoding glycoprotein gpl3 and protection of immunized animals." *J Virol* 63(10): 4189-98.
- Hartikka, J., M. Sawdey, et al. (1996). "An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle." *Hum Gene Ther* 7(10): 1205-17.
- Hassan, S. S. and P. Roy (1999). "Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry." *J Virol* 73(12): 9832-42.
- Heidner, H. W., P. V. Rossitto, et al. (1990). "Identification of four distinct neutralizing epitopes on bluetongue virus serotype 10 using neutralizing monoclonal antibodies and neutralization-escape variants." *Virology* 176(2): 658-61.
- Hemmer, B., C. Pinilla, et al. (1998). "The use of soluble synthetic peptide combinatorial libraries to determine antigen recognition of T cells." *J Pept Res* 52(5): 338-45.
- Huang, I. J., G. Y. Hwang, et al. (1995). "Sequence analyses and antigenic epitope mapping of the putative RNA directed RNA polymerase of five U.S. bluetongue viruses." *Virology* 214(1): 280-8.
- Huisman, H. and B. J. Erasmus (1981). "Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus." *Onderstepoort J Vet Res* 48(2): 51-8.
- Huisman, H., N. T. van der Walt, et al. (1987). "Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep." *Virology* 157(1): 172-9.
- Jewell, J. E. and J. O. Mecham (1994). "Identification of an amino acid on VP2 that affects neutralization of bluetongue virus serotype 10." *Virus Res* 33(2): 139-44.
- Ju, Q., D. Edelstein, et al. (1998). "Transduction of non-dividing adult human pancreatic beta cells by an integrating lentiviral vector." *Diabetologia* 41(6): 736-9.
- Kim, C. H., Y. Oh, et al. (1997). "Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells." *Gene* 199(1-2): 293-301.
- Kitson, J. D., K. L. Burke, et al. (1991). "Chimeric polioviruses that include sequences derived from two independent antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies against FMDV in guinea pigs." *J Virol* 65(6): 3068-75.
- Klinman, D. M., A. K. Yi, et al. (1996). "CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7): 2879-83.
- Kwissa, M., K. van Kampen, et al. (2000). "Efficient vaccination by intradermal or intramuscular inoculation of plasmid DNA expressing hepatitis B surface antigen under desmin promoter/enhancer control." *Vaccine* 18(22): 2337-44.
- Laval, F., R. Paillot, et al. (2002). "Quantitative analysis of the antigen-specific IFNgamma+ T cell-mediated immune response in conventional outbred pigs: kinetics and duration of the DNA-induced IFNgamma+ CD8+ T cell response." *Vet Immunol Immunopathol* 90(3-4): 191-201.
- Lobato, Z. I., B. E. Coupar, et al. (1997). "Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens." *Vet Immunol Immunopathol* 59(3-4): 293-309.

- Luckow, V. A. and M. D. Summers (1988). "Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors." *Virology* 167(1): 56-71.
- MacLachlan, N. J. (1994). "The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 17(3-4): 197-206.
- 5 MacLachlan, N. J. and J. E. Pearson (2004). *Bluetongue: Proceedings of the Third International Symposium*. Bluetongue: Proceedings of the Third International Symposium. N. J. MacLachlan and J. E. Pearson, *Vet Italiana*. 40: 1-730.
- Marshall, E., L. B. Woolford, et al. (1997). "Continuous infusion of macrophage inflammatory protein MIP-1 α enhances leucocyte recovery and haemopoietic progenitor cell mobilization after cyclophosphamide." *Br J Cancer* 75(12): 1715-20.
- 10 Martinez-Torrecuadrada, J. L., J. P. Langeveld, et al. (1999). "Antigenic profile of African horse sickness virus serotype 4 VP5 and identification of a neutralizing epitope shared with bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus." *Virology* 257(2): 449-59.
- McClements, W. L., M. E. Armstrong, et al. (1996). "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11414-20.
- 15 Mecham, J. O., V. C. Dean, et al. (1986). "Correlation of serotype specificity and protein structure of the five U.S. serotypes of bluetongue virus." *J Gen Virol* 67 (Pt 12): 2617-24.
- Mecham, J. O. and D. J. Johnson (2005). "Persistence of bluetongue virus serotype 2 (BTV-2) in the southeast United States." *Virus Res* 113(2): 116-22.
- 20 Miyazaki, J., S. Takaki, et al. (1989). "Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5." *Gene* 79(2): 269-77.
- Moss, B. (1996). "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11341-8.
- Mullens, B. A., W. J. Tabachnick, et al. (1995). "Effects of temperature on virogenesis of bluetongue virus serotype 11 in *Culicoides variipennis sonorensis*." *Med Vet Entomol* 9(1): 71-6.
- 25 Paoletti, E. (1996). "Applications of pox virus vectors to vaccination: an update." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11349-53.
- Pearson, W. R. and D. J. Lipman (1988). "Improved tools for biological sequence comparison." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(8): 2444-8.
- Pennock, G. D., C. Shoemaker, et al. (1984). "Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector." *Mol Cell Biol* 4(3): 399-406.
- 30 Perkus, M. E., K. Limbach, et al. (1989). "Cloning and expression of foreign genes in vaccinia virus, using a host range selection system." *J Virol* 63(9): 3829-36.
- Powell, M. F. and M. J. Newman (1995). *Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach. A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients*. F. Vogel and M. Powell. New York, Plenum Press. 6: 147, 183.
- 35 Prevec, L., M. Schneider, et al. (1989). "Use of human adenovirus-based vectors for antigen expression in animals." *J Gen Virol* 70 (Pt 2): 429-34.
- Pritchard, L. I. and A. R. Gould (1995). "Phylogenetic comparison of the serotype-specific VP2 protein of bluetongue and related orbiviruses." *Virus Res* 39(2-3): 207-20.
- 40 Regelson, W., S. Kuhar, et al. (1960). "Synthetic polyelectrolytes as tumour inhibitors." *Nature* 186: 778-80.
- Riviere, M., J. Tartaglia, et al. (1992). "Protection of mice and swine from pseudorabies virus conferred by vaccinia virus-based recombinants." *J Virol* 66(6): 3424-34.
- Robertson, E. S., T. Ooka, et al. (1996). "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11334-40.
- 45 Robinson, H. L. and C. A. Torres (1997). "DNA vaccines." *Semin Immunol* 9(5): 271-83.
- Roizman, B. (1996). "The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11307-12.
- Rossitto, P. V. and N. J. MacLachlan (1992). "Neutralizing epitopes of the serotypes of bluetongue virus present in the United States." *J Gen Virol* 73 (Pt 8): 1947-52.
- 50 Roy, P. (1992). "Bluetongue virus proteins." *J Gen Virol* 73 (Pt 12): 3051-64.
- Roy, P. (1996). "Orbivirus structure and assembly." *Virology* 216(1): 1-11.
- Roy, P. (1996). *Orbiviruses and their replication*. Fields Virology. B. N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley. Philadelphia, PA, Lippincott-Raven: 1709-1734.
- Roy, P., T. Urakawa, et al. (1990). "Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep." *J Virol* 64(5): 1998-2003.
- 55 Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual* / Joseph Sambrook, David W. Russell. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider, K., F. Puehler, et al. (2000). "cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18." *J Interferon Cytokine Res* 20(10): 879-83.
- Shida, H. (1986). "Nucleotide sequence of the vaccinia virus hemagglutinin gene." *Virology* 150(2): 451-62.
- 60 Smith, G. E., M. D. Summers, et al. (1983). "Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector." *Mol Cell Biol* 3(12): 2156-65.

- Snedecor, G. W. & COCHRAN, W. G. (1971) Transformation de proportions en Arcsinus. In Méthodes Statistiques. 6th edn. Eds H. Boelle, E. Camhaji. Association de Coordination Technique Agricole. pág. 366-367
- Spreull, J. (1905). "Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa." J. Comp. Path.. Ther. 18: 321-337.
- Stickl, H. and V. Hochstein-Mintzel (1971). "[Intracutaneous smallpox vaccination with a weak pathogenic vaccinia virus ("MVA virus").]" Munch Med Wochenschr 113(35): 1149-53.
- 5 Stittelaar, K. J., L. S. Wyatt, et al. (2000). "Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus Ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies." J Virol 74(9): 4236-43.
- Sutter, G. and B. Moss (1992). "Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes." Proc Natl Acad Sci U S A 89(22): 10847-51.
- 10 Sutter, G., L. S. Wyatt, et al. (1994). "A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to BTV or FMDV virus." Vaccine 12(11): 1032-40.
- Tang, D. C., M. DeVit, et al. (1992). "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response." Nature 356(6365): 152-4.
- Taylor, J., R. Weinberg, et al. (1988). "Protective immunity against avian BTV or FMDV induced by a fowlpox virus recombinant." Vaccine 6(6): 504-8.
- 15 Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res 22(22): 4673-80.
- Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, et al. (1993). "Heterologous protection against BTV or FMDV by injection of DNA encoding a viral protein." Science 259(5102): 1745-9.
- 20 Van der Zee, R., W. Van Eden, et al. (1989). "Efficient mapping and characterization of a T cell epitope by the simultaneous synthesis of multiple peptides." Eur J Immunol 19(1): 43-7.
- van Ooyen, A., J. van den Berg, et al. (1979). "Comparison of total sequence of a cloned rabbit beta-globin gene and its flanking regions with a homologous mouse sequence." Science 206(4416): 337-44.
- 25 Verwoerd, D. W., H. J. Els, et al. (1972). "Structure of the bluetongue virus capsid." J Virol 10(4): 783-94.
- Vialard, J., M. Lalumiere, et al. (1990). "Synthesis of the membrane fusion and hemagglutinin proteins of measles virus, using a novel baculovirus vector containing the beta-galactosidase gene." J Virol 64(1): 37-50.
- Wang, L. F., D. H. Du Plessis, et al. (1995). "Use of a gene-targeted phage display random epitope library to map an antigenic determinant on the bluetongue virus outer capsid protein VP5." J Immunol Methods 178(1): 1-12.
- 30 White, D. M., W. C. Wilson, et al. (2005). "Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects." J Gen Virol 86(Pt 2): 453-62.
- Wilson, W. C. and J. O. Mecham (2000). "Molecular Evolution of Orbiviruses." Proc USAHA 104: 169-180.
- Xin, K. Q., K. Hamajima, et al. (1999). "IL-15 expression plasmid enhances cell-mediated immunity induced by an HIV-1 DNA vaccine." Vaccine 17(7-8): 858-66.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición o vacuna que comprende uno o más vectores del virus de la lengua azul (BTV) recombinantes que consisten en un polinucleótido heterólogo que codifica el polipéptido VP2 de BTV-8 y una estructura de vector derivada del genoma de BTV-1.
2. Vector de BTV recombinante que consiste en un polinucleótido heterólogo que codifica el polipéptido VP2 de BTV-8 y una estructura de vector derivada del genoma de BTV-1.
- 10 3. Procedimiento de producción de un vector de BTV recombinante que comprende transfectar una célula con:
a) ARNs que codifican VP2 de BTV-8, y
b) ARNs que comprenden los transcritos que codifican VP1, VP3, VP4, VP5, VP7, NS1, NS2, VP6NS4, y NS3/3A de BTV-1, y en el que en términos de secuencias codificantes de BTV, éstas son las únicas moléculas de ARN con las que se transfecta la célula.
- 15 4. Composición o vector, según la reivindicación 1 o 2, para usar en la vacunación de un animal, en la que dicha composición o vector se administra a dicho animal al menos una vez.
- 20 5. Composición o vector para usar, según la reivindicación 4, en la que además la composición o vector se administra de acuerdo con un régimen de administración de sensibilización-refuerzo.
6. Composición o vector, según la reivindicación 1 o 2, para usar en la inducción de una respuesta inmunogénica o protectora en un animal contra uno o más patógenos, en la que dicha composición o vector se administra a dicho animal al menos una vez.
- 25 7. Composición o vector para usar, según la reivindicación 6, en la que el animal es un animal bovino, ovino, caprino o equino.

Figura 1

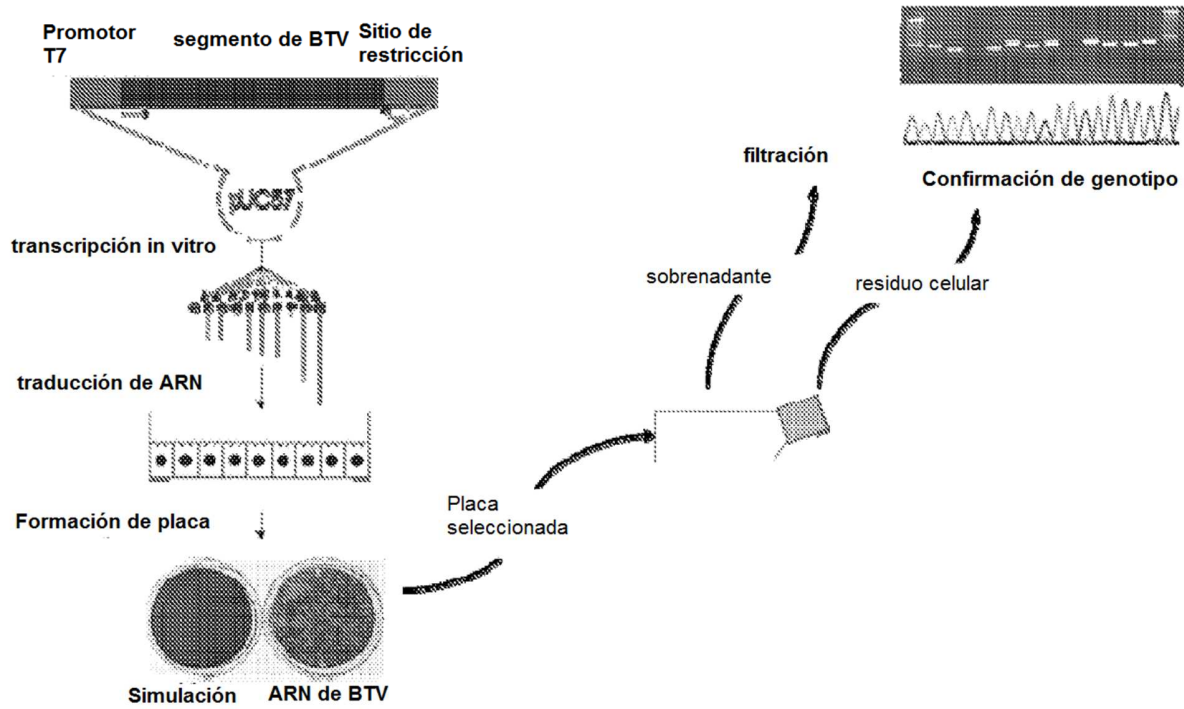
Figura A

	VP1	VP2	VP3	VP4	NS1	VP5	VP7	NS2	VP6/NS4	NS3/3A
BTV-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BTV-1 _{VP1}	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BTV-1 _{VP2}	1	8	1	1	1	1	1	1	1	1
BTV-1 _{VP3}	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1
BTV-1 _{VP4}	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1
BTV-1 _{NS1}	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1
BTV-1 _{VP5}	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1
BTV-1 _{VP7}	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1
BTV-1 _{NS2}	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1
BTV-1 _{VP6/NS4}	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1
BTV-1 _{NS3/3A}	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
BTV-8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
BTV-8 _{VP1}	1	8	8	8	8	8	8	8	8	8
BTV-8 _{VP2}	8	1	8	8	8	8	8	8	8	8
BTV-8 _{VP3}	8	8	1	8	8	8	8	8	8	8
BTV-8 _{VP4}	8	8	8	1	8	8	8	8	8	8
BTV-8 _{NS1}	8	8	8	8	1	8	8	8	8	8
BTV-8 _{VP5}	8	8	8	8	8	1	8	8	8	8
BTV-8 _{VP7}	8	8	8	8	8	8	1	8	8	8
BTV-8 _{NS2}	8	8	8	8	8	8	8	1	8	8
BTV-8 _{VP6/NS4}	8	8	8	8	8	8	8	8	1	8
BTV-8 _{NS3/3A}	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1

- A) Cada combinación de genoma monoreordenado. Además, se rescataron los núcleos de BTV-1 u 8 con las proteínas de la cápside externa VP2 y VP5 del virus heterólogo

Figura 1
(continuación)

Figura B



B) Visión general del proceso de rescate. El ARN se sintetiza a partir de un plásmido linealizado y se transfecta en células BSR. Los virus rescatados se recogen y se amplifican en un cultivo celular antes de confirmar el genotipo mediante Rt-PCR y secuenciación

Figura 2

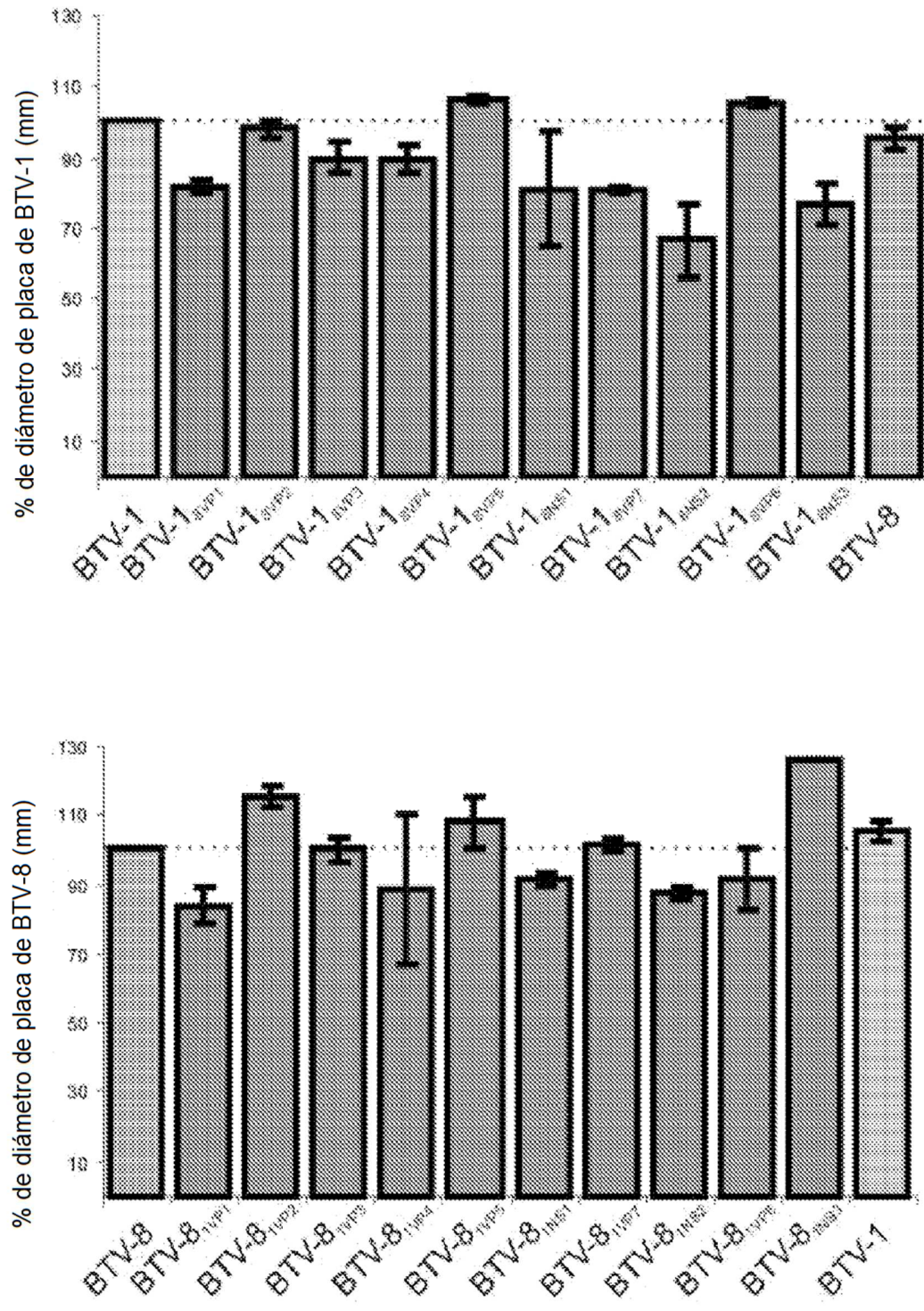
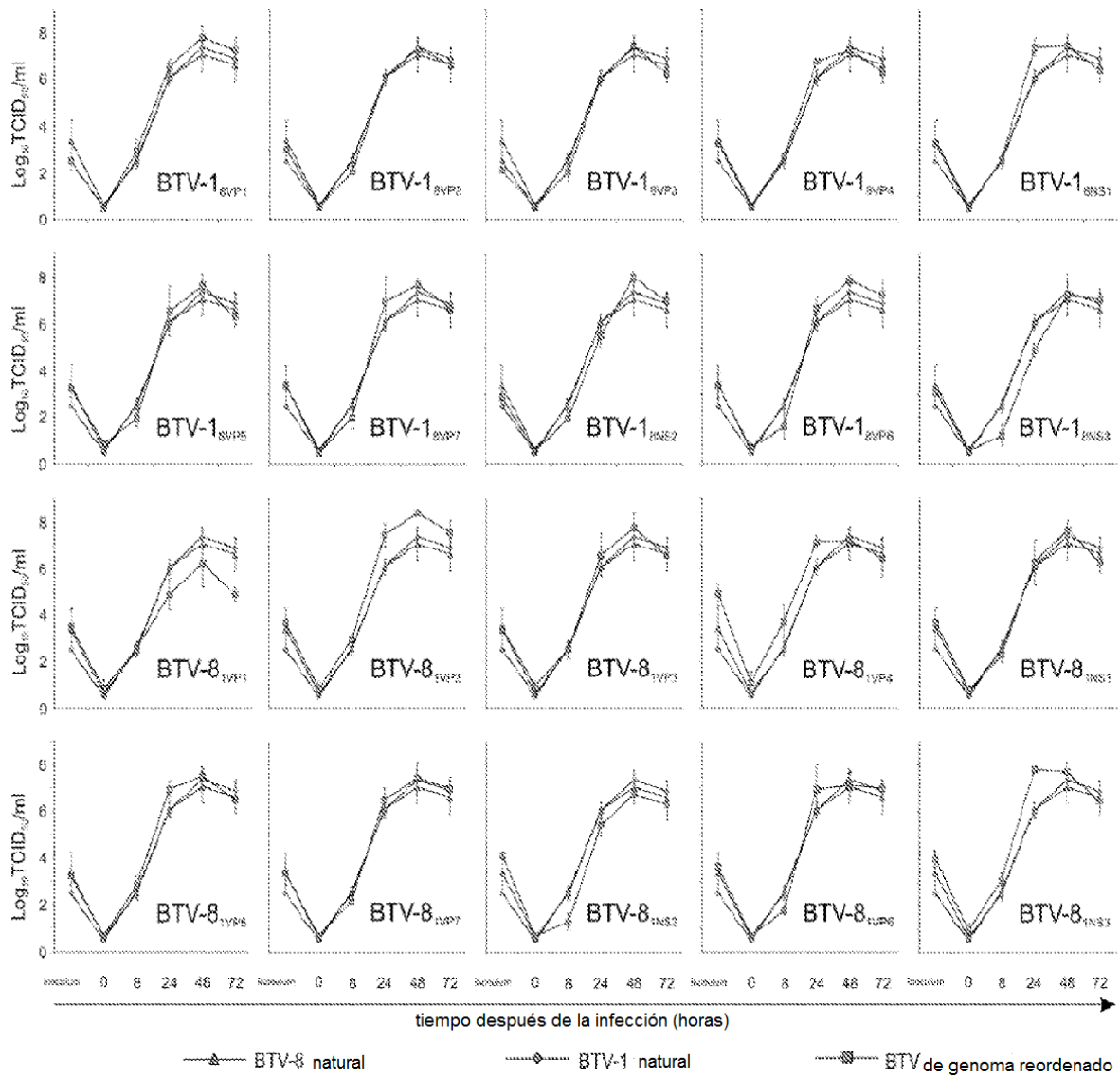
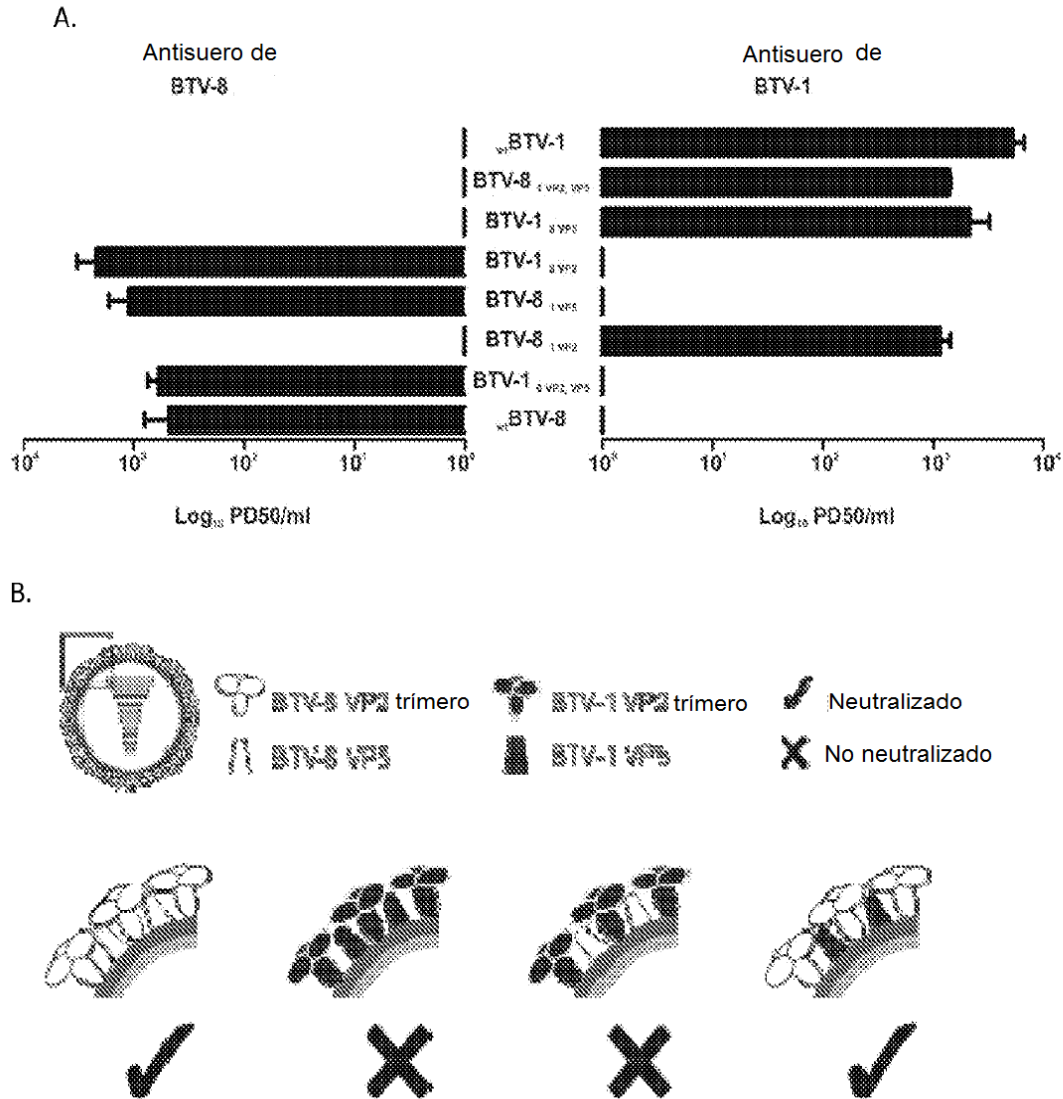


Figura 3



Análisis de la curva de crecimiento de virus de genoma reordenado. La mayoría de virus de genoma reordenado crecen de manera similar a los virus parentales de tipo natural

Figura 4

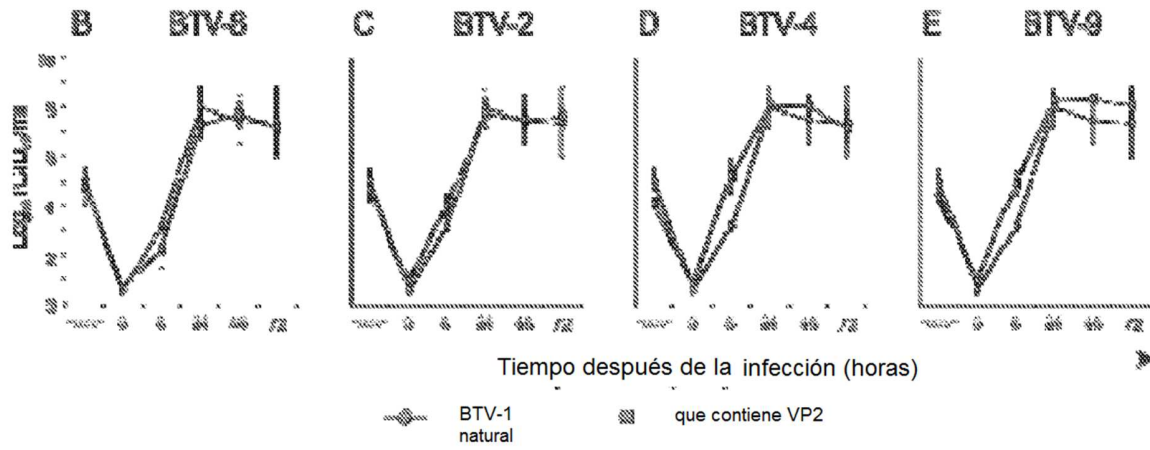


VP2 es responsable para la neutralización de virus

A) BTV-1, BTV-1_{8VP5} y BTV-8_{8VP5} y BTV-8_{1VP2, VP5} se neutralizaron todos por antisuero de BTV-1, pero no por anticuerpo de BTV-8, mientras que BTV-8, BTV-8_{1VP5}, BTV-1_{8VP2} y BTV-1_{8VP2, VP5} se neutralizaron todos por antisuero de BTV-8, pero no por antisuero de BTV-1

B) Resumen de los dibujos: la neutralización de BTV se correlaciona con VP2, independientemente de VP5 (para genomas reordenados de BTV-1:BTV-8)

Figura 5



Los genomas reordenados de BTV se rescataron con 9 segmentos de BTV-1 de tipo natural y que contenían la VP2 de BTV-8 (B), BTV-2 (C), BTV-4 (D) o BTV-9 (E)

Figura 6

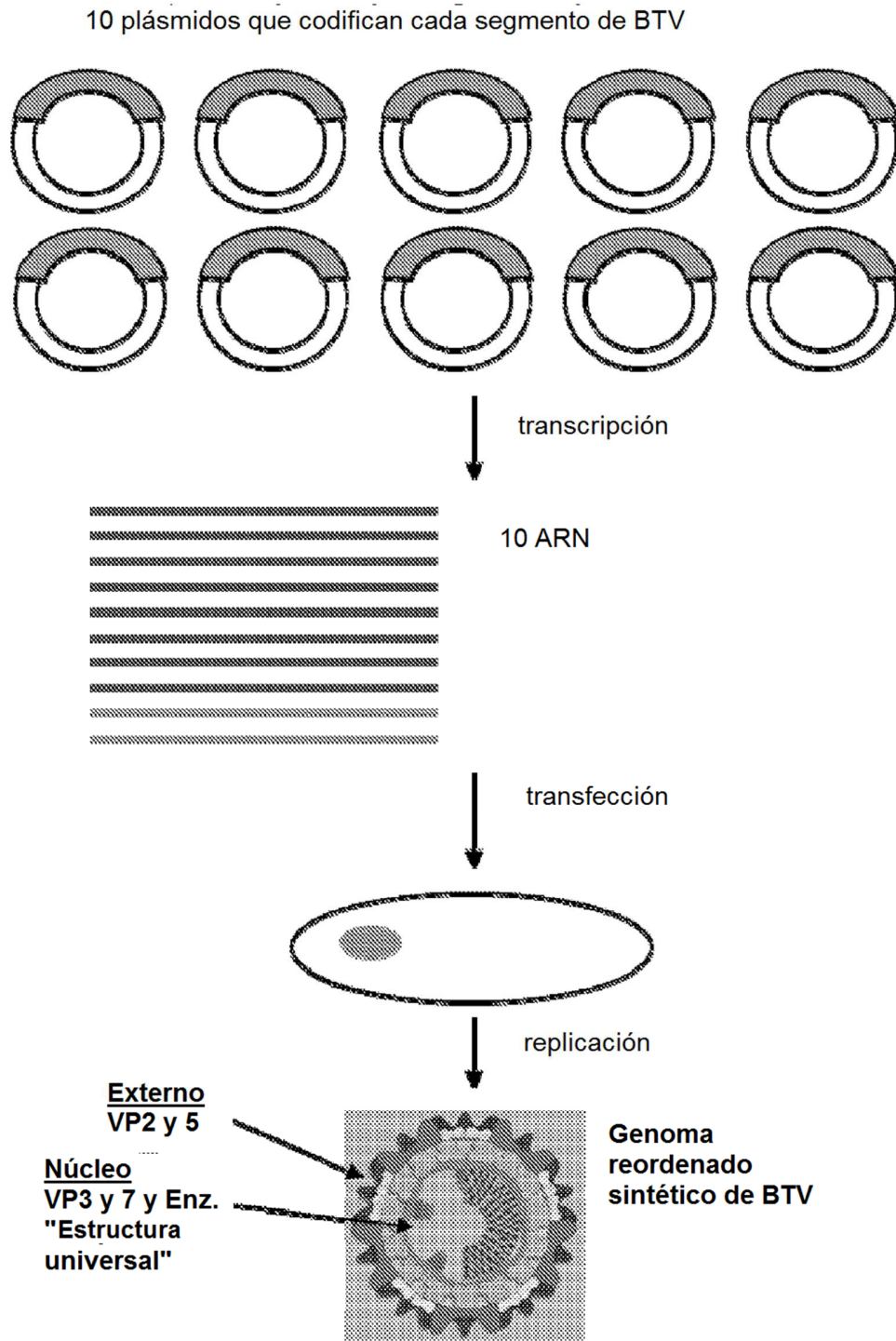


Figura 7

SEQ ID NO	tipo	Serotipo	Nombre del gen	No. acceso GenBank	cepa
1	PRO	1	VP1	ACR58458 (codificado por FJ969719)	serotipo 1 de virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
2	PRO	1	VP2	ACR58459 (codificado por FJ969720)	serotipo 1 de virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
3	PRO	1	VP3	ACR58460 (codificado por FJ969721)	serotipo 1 de virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
4	PRO	1	VP4	ACR58461 (codificado por FJ969722)	serotipo 1 de virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
5	PRO	1	VP5	ACR58462 (codificado por FJ969723)	serotipo 1 de virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
6	PRO	1	NS1	ACR58463 (codificado por FJ969724)	serotipo 1 de virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
7	PRO	1	VP7	ACR58464 (codificado por FJ969725)	serotipo 1 de virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
8	PRO	1	NS2	ACR58465 (codificado por FJ969726)	serotipo 1 de virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
9	PRO	1	VP6/NS4	AEU03964 (codificado por JN848767)	serotipo 1 de virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica Secuencia idéntica a la cepa SZ97/1 del virus 1 de la lengua azul
10	PRO	1	Ns3/3A	ACR58467 (codificado por FJ969728)	serotipo 1 de virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
11	PRO	8	VP2	Ninguno	BTV-8NT (NET2006/04)
12	PRO	8	VP5	CAM57247 (codificado por FJ969719)	BTV-8NT (NET2006/04)
13	PRO	2 (Italia)	VP2	AEO19855 (codificado por JN255863)	segmento 2 de cepa BTV-2IT(L) de virus de lengua azul 2

Figura 7 (continuación)

SEQ ID NO	tipo	Serotipo	Nombre del gen	No. acceso GenBank	cepa
14	PRO	2 (Italia)	VP5	AEO19851 (codificado por JN255867)	cepa BTV-2IT(L) segmento 6 de virus de lengua azul 2
15	PRO	2(Sudáfrica)	VP5	CAE53012 (codificado por AJ586696)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 2, ARN genómico, aislado RSArrrr/02
16	PRO	3	VP2	CAE51090 (codificado por AJ585124)	gen VP2 de virus de la lengua azul 3, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
17	PRO	3	VP5	CAE53013 (codificado por AJ586697)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 3, ARN genómico, aislado RSArrrr/03
18	PRO	4	VP2	ABB71699 (codificado por DQ191280)	Segmento S2 de aislado 10353 de virus de lengua azul 4, secuencia completa
19	PRO	4	VP5	CAE53015 (codificado por AJ586699)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 4, ARN genómico, aislado RSArrrr/034
20	PRO	5	VP2	CAE51092 (codificado por AJ585126)	gen VP2 de virus de la lengua azul 5, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
21	PRO	5	VP5	CAE53016 (codificado por AJ586700)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 5, ARN genómico, aislado RSArrrr/05
22	PRO	6	VP2	CAE51093 (codificado por AJ585127)	gen VP2 de virus de la lengua azul 6, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
23	PRO	6	VP5	CAE53019 (codificado por AJ586703)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 6, ARN genómico, aislado RSArrrr/06
24	PRO	7	VP2	CAE51094 (codificado por AJ585128)	gen VP2 de virus de la lengua azul 7, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
25	PRO	7	VP5	CAE53020 (codificado por AJ586704)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 7, ARN genómico, aislado RSArrrr/07
26	PRO	9 (Sudáfrica)	VP2	AEO19747(codificado por JN255953)	Segmento 2 de cepa BTV-9RSA(WT) de virus de lengua azul 9, secuencia completa

Figura 7 (continuación)

SEQ ID NO	tipo	Serotipo	Nombre del gen	No. acceso GenBank	cepa
27	PRO	9 (Sudáfrica)	VP5	CAE53024 (codificado por AJ586708)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 9, ARN genómico, aislado RSArrrr/09
28	PRO	9 (Italia)	VP2	AEO19795 (codificado por JN255913)	Segmento 2 de cepa BTV-9IT(H) de virus de lengua azul 9
29	PRO	10	VP2	CAE51097 (codificado por AJ585131)	gen VP2 de virus de la lengua azul 10, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
30	PRO	10	VP5	CAE53025 (codificado por AJ586709)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 10, ARN genómico, aislado RSArrrr/10
31	PRO	11	VP2	CAE51098 (codificado por AJ585132)	gen VP2 de virus de la lengua azul 11, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
32	PRO	11	VP5	CAE53026 (codificado por AJ586710)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 11, ARN genómico, aislado RSArrrr/11
33	PRO	12	VP2	CAE51099 (codificado por AJ585133)	gen VP2 de virus de la lengua azul 12, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
34	PRO	12	VP5	CAE53027 (codificado por AJ586711)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 12, ARN genómico, aislado RSArrrr/12
35	PRO	13	VP2	CAE51100 (codificado por AJ585134)	gen VP2 de virus de la lengua azul 13, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
36	PRO	13	VP5	CAE53029 (codificado por AJ586713)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 13, ARN genómico, aislado RSArrrr/13
37	PRO	14	VP2	CAE51101 (codificado por AJ585135)	gen VP2 de virus de la lengua azul 14, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
38	PRO	14	VP5	CAE53030 (codificado por AJ586714)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 14, ARN genómico, aislado RSArrrr/14
39	PRO	15	VP2	CAE51102 (codificado por AJ585136)	gen VP2 de virus de la lengua azul 15, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
40	PRO	15	VP5	CAE53032 (codificado por AJ586716)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 15, ARN genómico, aislado RSArrrr/15

Figura 7 (continuación)

SEQ ID NO	tipo	Serotipo	Nombre del gen	No. acceso GenBank	cepa
41	PRO	16	VP2	CAE51103 (codificado por AJ585137)	gen VP2 de virus de la lengua azul 16, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
42	PRO	16	VP5	CAE53035 (codificado por AJ586719)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 16, ARN genómico, aislado RSArrrr/16
43	PRO	17	VP2	CAE51104 (codificado por AJ585138)	gen VP2 de virus de la lengua azul 17, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
44	PRO	17	VP5	CAE53036 (codificado por AJ586720)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 17, ARN genómico, aislado RSArrrr/17
45	PRO	18	VP2	CAE51105 (codificado por AJ585139)	gen VP2 de virus de la lengua azul 18, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
46	PRO	18	VP5	CAE53037 (codificado por AJ586721)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 18, ARN genómico, aislado RSArrrr/18
47	PRO	19	VP2	CAE51106 (codificado por AJ585140)	gen VP2 de virus de la lengua azul 19, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
48	PRO	19	VP5	CAE53038 (codificado por AJ586722)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 19, ARN genómico, aislado RSArrrr/19
49	PRO	20	VP2	CAE51107 (codificado por AJ585141)	gen VP2 de virus de la lengua azul 20, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
50	PRO	20	VP5	CAE53039 (codificado por AJ586723)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 20, ARN genómico, aislado RSArrrr/20
51	PRO	21	VP2	CAE51108 (codificado por AJ585142)	gen VP2 de virus de la lengua azul 21, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
52	PRO	21	VP5	CAE53040 (codificado por AJ586724)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 21, ARN genómico, aislado RSArrrr/21
53	PRO	22	VP2	CAE51109 (codificado por AJ585143)	gen VP2 de virus de la lengua azul 22, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico

Figura 7 (continuación)

SEQ ID NO	tipo	Serotipo	Nombre del gen	No. acceso GenBank	cepa
54	PRO	22	VP5	CAE53041 (codificado por AJ586725)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 22, ARN genómico, aislado RSArrrr/22
55	PRO	23	VP2	CAE51110 (codificado por AJ585144)	gen VP2 de virus de la lengua azul 23, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
56	PRO	23	VP5	CAE53043 (codificado por AJ586727)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 23, ARN genómico, aislado RSArrrr/23
57	PRO	24	VP2	CAE51111 (codificado por AJ585145)	gen VP2 de virus de la lengua azul 24, aislado de Sudáfrica de ref., ARN genómico
58	PRO	24	VP5	CAE53046 (codificado por AJ586730)	gen vp5 para la proteína de cápside externa VP5 del virus de lengua azul 24, ARN genómico, aislado RSArrrr/24
59	PRO	25	VP2	ACJ06702 (codificado por EU839840)	Gen de VP2 de segmento 2 de aislado TOV del virus de lengua azul, cds completa
60	PRO	25	VP5	ACJ06704 (codificado por EU839842)	Gen de VP5 de segmento 6 de aislado TOV del virus de lengua azul, cds completa
61	PRO	26	VP2	AED99447 (codificado por HM590642)	gen VP2 para la proteína de cápside externa del segmento 2 del aislado KUW2010/02 del virus de lengua azul, cds completa
62	ADN	26	VP5	AER60536 (codificado por JN255159)	segmento 6 del aislado KUW2010/02 del virus de lengua azul, secuencia completa
63	ADN	1	VP1	FJ969719	serotipo 1 del virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
64	ADN	1	VP2	FJ969720	serotipo 1 del virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
65	ADN	1	VP3	FJ969721	serotipo 1 del virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
66	ADN	1	VP4	FJ969722	serotipo 1 del virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
67	ADN	1	VP5	FJ969723	serotipo 1 del virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
68	ADN	1	NS1	FJ969724	serotipo 1 del virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica

Figura 7 (continuación)

SEQ ID NO	tipo	Serotipo	Nombre del gen	No. acceso GenBank	cepa
69	ADN	1	VP7	FJ969725	serotipo 1 del virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
70	ADN	1	NS2	FJ969726	serotipo 1 del virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
71	ADN	1	VP6/NS4	JN848767	serotipo 1 del virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica, secuencia idéntica a la cepa SZ97/1 del virus de lengua azul 1
72	ADN	1	NS3/3A	FJ969728	serotipo 1 del virus de lengua azul, aislado de Sudáfrica
73	ADN	8	VP2	Ninguno	BTV-8NT (NET2006/04)
74	ADN	8	VP5	AM498056	BTV-8NT (NET2006/04)
75	ADN	1	VP2	FJ969720	BTV1-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica ACR58459.1
76	ADN	1	VP5	FJ969723	BTV1-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica ACR58462.1
77	ADN	2	VP2	JN255863	BTV2-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AEO19855.1
78	ADN	2	VP5	JN255867	BTV2-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AEO19851.1
79	ADN	2	VP2	AJ585123	BTV2-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51089.1
80	ADN	2	VP5	JN255867	BTV2-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AEO19851.1
81	ADN	3	VP2	AJ585124	BTV3-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51090.1
82	ADN	3	VP5	AJ586697	BTV3-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53013.1
83	ADN	4	VP2	DQ191280	BTV4-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica ABB71699.1
84	ADN	4	VP5	AJ586699	BTV4-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53015.1
85	ADN	4	VP2	AJ585125	BTV4-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51091.1
86	ADN	4	VP5	AJ586699	BTV4-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53015.1
87	ADN	5	VP2	AJ585126	BTV5-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51092.1
88	ADN	5	VP5	AJ586700	BTV5-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53016.1

Figura 7 (continuación)

SEQ ID NO	tipo	Serotipo	Nombre del gen	No. acceso GenBank	cepa
89	ADN	6	VP2	AJ585127	BTv6-VP2 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE51093.1
90	ADN	6	VP5	AJ586703	BTv6-VP5 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE53019.1
91	ADN	7	VP2	AJ585128	BTv7-VP2 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE51094.1
92	ADN	7	VP5	AJ586704	BTv7-VP5 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE53020.1
93	ADN	8	VP2	AM498052	BTv8-VP2 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAM57243.2
94	ADN	8	VP5	AM498056	BTv8-VP5 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAM57247.2
95	ADN	9	VP2	JN255903	BTv9-VP2 utilizado en la producción de sBTv, que codifica AEO19807.1
96	ADN	9	VP5	AJ586708	BTv9-VP5 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE53024.1
97	ADN	9	VP2	AJ585130	BTv9-VP2 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE51096.1
98	ADN	9	VP5	AJ586708	BTv9-VP5 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE53024.1
99	ADN	10	VP2	AJ585131	BTv10-VP2 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE51097.1
100	ADN	10	VP5	AJ586709	BTv10-VP5 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE53025.1
101	ADN	11	VP2	AJ585132	BTv11-VP2 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE51098.1
102	ADN	11	VP5	AJ586710	BTv11-VP5 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE53026.1
103	ADN	12	VP2	AJ585133	BTv12-VP2 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE51099.1
104	ADN	12	VP5	AJ586711	BTv12-VP5 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE53027.1
105	ADN	13	VP2	AJ585134	BTv13-VP2 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE51100.1
106	ADN	13	VP5	AJ586713	BTv13-VP5 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE53029.1
107	ADN	14	VP2	AJ585135	BTv14-VP2 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE51101.1
108	ADN	14	VP5	AJ586714	BTv14-VP5 utilizado en la producción de sBTv, que codifica CAE53030.1

Figura 7 (continuación)

SEQ ID NO	tipo	Serotipo	Nombre del gen	No. acceso GenBank	cepa
109	ADN	15	VP2	AJ585136	BTV15-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51102.1
110	ADN	15	VP5	AJ586716	BTV15-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53032.1
111	ADN	16	VP2	AJ585137	BTV16-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51103.1
112	ADN	16	VP5	AJ586719	BTV16-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53035.1
113	ADN	17	VP2	AJ585138	BTV17-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51104.1
114	ADN	17	VP5	AJ586720	BTV17-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53036.1
115	ADN	18	VP2	AJ585139	BTV18-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51105.1
116	ADN	18	VP5	AJ586721	BTV18-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53037.1
117	ADN	19	VP2	AJ585140	BTV19-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51106.1
118	ADN	19	VP5	AJ586722	BTV19-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53038.1
119	ADN	20	VP2	AJ585141	BTV20-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51107.1
120	ADN	20	VP5	AJ586723	BTV20-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53039.1
121	ADN	21	VP2	AJ585142	BTV21-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51108.1
122	ADN	21	VP5	AJ586724	BTV21-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53040.1
123	ADN	22	VP2	AJ585143	BTV22-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51109.1
124	ADN	22	VP5	AJ586725	BTV22-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53041.1
125	ADN	23	VP2	AJ585144	BTV23-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51110.1
126	ADN	23	VP5	AJ586727	BTV23-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53043.1
127	ADN	24	VP2	AJ585145	BTV24-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE51111.1
128	ADN	24	VP5	AJ586730	BTV24-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica CAE53046.1

Figura 7 (continuación)

SEQ ID NO	tipo	Serotipo	Nombre del gen	No. acceso GenBank	cepa
129	ADN	25	VP2	EU839840	BTV25-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica ACJ06702.1
130	ADN	25	VP5	EU839842	BTV25-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica ACJ06704.1
131	ADN	26	VP2	HM590642	BTV26-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AED99447.1
132	ADN	26	VP5	JN255159	BTV26-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AER60536.1
133	PRO	1	VP2	ACR58459.1	BTV1-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica FJ969720
134	PRO	1	VP5	ACR58462.1	BTV1-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica FJ969723
135	PRO	2	VP2	AEO19855.1	BTV2-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica JN255863
136	PRO	2	VP5	AEO19851.1	BTV2-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica JN255867
137	PRO	2	VP2	CAE51089.1	BTV2-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585123
138	PRO	2	VP5	AEO19851.1	BTV2-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica JN255867
139	PRO	3	VP2	CAE51090.1	BTV3-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585124
140	PRO	3	VP5	CAE53013.1	BTV3-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586697
141	PRO	4	VP2	ABB71699.1	BTV4-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica DQ191280
142	PRO	4	VP5	CAE53015.1	BTV4-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586699
143	PRO	4	VP2	CAE51091.1	BTV4-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585125
144	PRO	4	VP5	CAE53015.1	BTV4-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586699
145	PRO	5	VP2	CAE51092.1	BTV2-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585126
146	PRO	5	VP5	CAE53016.1	BTV5-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586700
147	PRO	6	VP2	CAE51093.1	BTV6-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585127

Figura 7 (continuación)

SEQ ID NO	tipo	Serotipo	Nombre del gen	No. acceso GenBank	cepa
148	PRO	6	VP5	CAE53019.1	BTV6-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586703
149	PRO	7	VP2	CAE51094.1	BTV7-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585128
150	PRO	7	VP5	CAE53020.1	BTV7-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586704
151	PRO	8	VP2	CAM57243.2	BTV8-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AM498052
152	PRO	8	VP5	CAM57247.2	BTV8-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AM498056
153	PRO	9	VP2	AEO19807.1	BTV9-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica JN255903
154	PRO	9	VP5	CAE53024.1	BTV9-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586708
155	PRO	9	VP2	CAE51096.1	BTV9-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585130
156	PRO	9	VP5	CAE53024.1	BTV9-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586708
157	PRO	10	VP2	CAE51097.1	BTV10-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585131
158	PRO	10	VP5	CAE53025.1	BTV10-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586709
159	PRO	11	VP2	CAE51098.1	BTV11-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585132
160	PRO	11	VP5	CAE53026.1	BTV11-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586710
161	PRO	12	VP2	CAE51099.1	BTV12-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585133
162	PRO	12	VP5	CAE53027.1	BTV12-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586711
163	PRO	13	VP2	CAE51100.1	BTV13-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585134
164	PRO	13	VP5	CAE53029.1	BTV13-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586713
165	PRO	14	VP2	CAE51101.1	BTV14-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585135

Figura 7 (continuación)

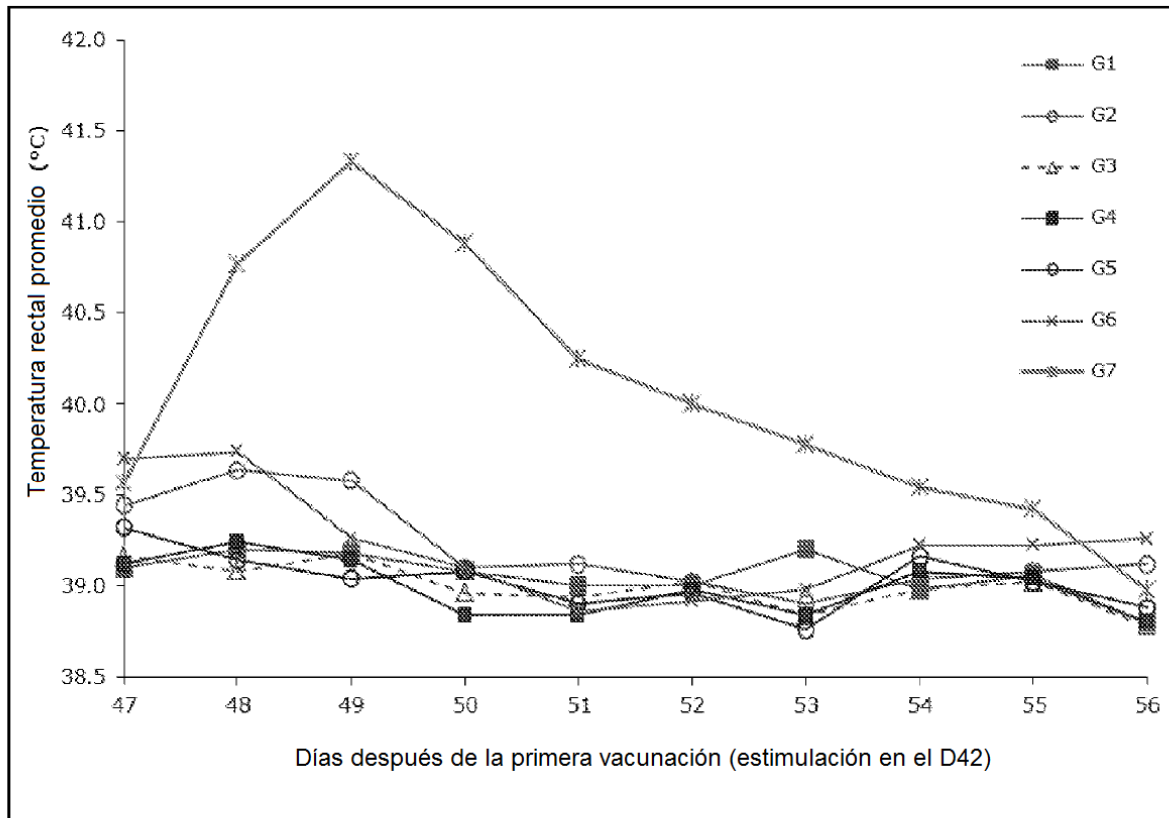
SEQ ID NO	tipo	Serotipo	Nombre del gen	No. acceso GenBank	cepa
166	PRO	14	VP5	CAE53030.1	BTV14-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586714
167	PRO	15	VP2	CAE51102.1	BTV15-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585136
168	PRO	15	VP5	CAE53030.1	BTV15-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586716
169	PRO	16	VP2	CAE51102.1	BTV16-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585137
170	PRO	16	VP5	CAE53030.1	BTV16-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586719
171	PRO	17	VP2	CAE51102.1	BTV17-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585138
172	PRO	17	VP5	CAE53030.1	BTV17-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586720
173	PRO	18	VP2	CAE51102.1	BTV18-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585139
174	PRO	18	VP5	CAE53030.1	BTV18-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586721
175	PRO	19	VP2	CAE51102.1	BTV19-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585140
176	PRO	19	VP5	CAE53030.1	BTV19-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586722
177	PRO	20	VP2	CAE51102.1	BTV20-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585141
178	PRO	20	VP5	CAE53030.1	BTV20-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586723
179	PRO	21	VP2	CAE51102.1	BTV21-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585142
180	PRO	21	VP5	CAE53030.1	BTV21-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586724
181	PRO	22	VP2	CAE51102.1	BTV22-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585143
182	PRO	22	VP5	CAE53030.1	BTV22-VP5 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ586725
183	PRO	23	VP2	CAE51102.1	BTV23-VP2 utilizado en la producción de sBTV, que codifica AJ585144

Figura 7 (continuación)

SEQ ID NO	tipo	Serotipo	Nombre del gen	No. acceso GenBank	cepa
184	PRO	23	VP5	CAE53043.1	BT23-VP5 utilizado en la producción de sBT23, que codifica AJ586727
185	PRO	24	VP2	CAE51111.1	BT24-VP2 utilizado en la producción de sBT24, que codifica AJ585145
186	PRO	24	VP5	CAE53046.1	BT24-VP5 utilizado en la producción de sBT24, que codifica AJ586730
187	PRO	25	VP2	ACJ06702.1	BT25-VP2 utilizado en la producción de sBT25, que codifica EU839840
188	PRO	25	VP5	ACJ06704.1	BT25-VP5 utilizado en la producción de sBT25, que codifica EU839842
189	PRO	26	VP2	AED99447.1	BT26-VP2 utilizado en la producción de sBT26, que codifica HM590642
190	PRO	26	VP5	AER60536.10	BT26-VP5 utilizado en la producción de sBT26, que codifica JN255159
191	ADN	1	VP2		VP2 5'UTR GTTAAAATAGTAGCGCG
192	ADN	1	VP2		VP2 3'UTR TCTGCTTGACCGCAGATCCG CGCACTATTAGACTTAC
193	ADN	1	VP5		VP5 5' UTR GTTAAAAAGTGCGCCCTTAG CGAAG
194	ADN	1	VP5		VP5 3'UTR ACGCAGCGACGGGAAGCAC TTACACTTAC

Figura 8

Evolución de la temperatura rectal promedio después de la estimulación

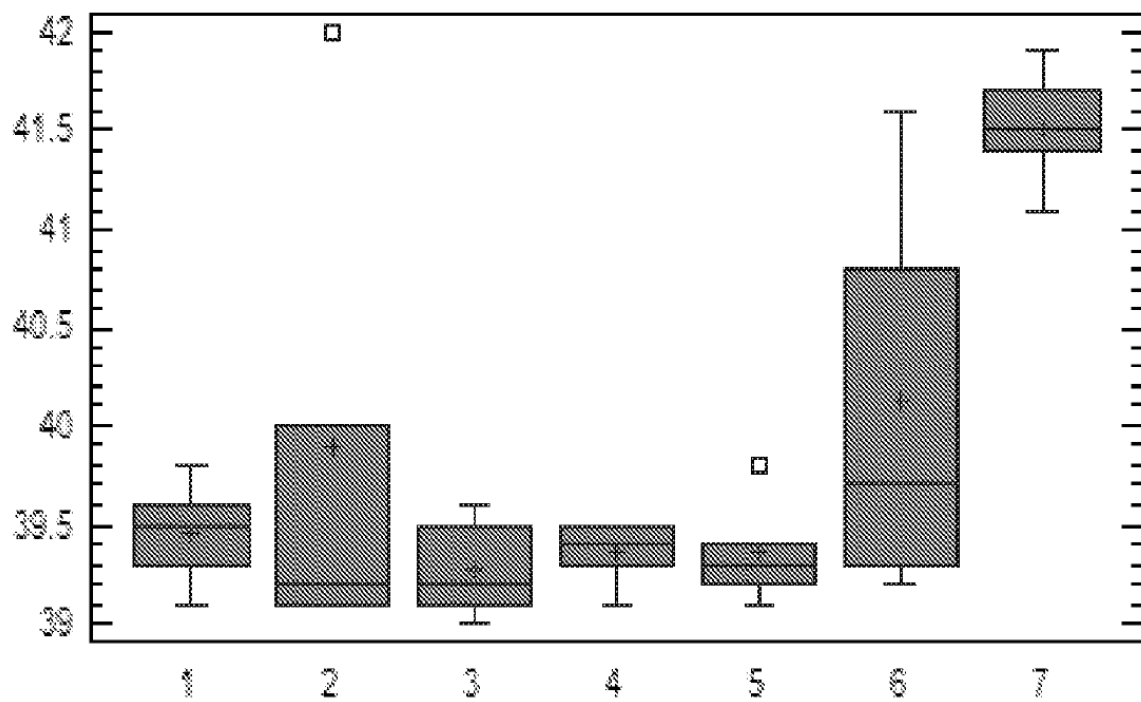


G1: VP2 dosis alta (D0+D21)
 G2: VP2 dosis alta (D21)
 G3: VP2 dosis baja (D21)
 G4: Vp2+Vp5 (D0+D21);
 G5: Vp2+Vp5 (D21);
 G6: BR8 comercial
 G7: Controles

Figura 9

Dispersiones de hipertermias máximas

Representación Box-and-Whisker



G1: VP2 dosis alta (D0+D21)

G2: VP2 dosis alta (D21)

G3: VP2 dosis baja (D21)

G4: Vp2+Vp5 (D0+D21);

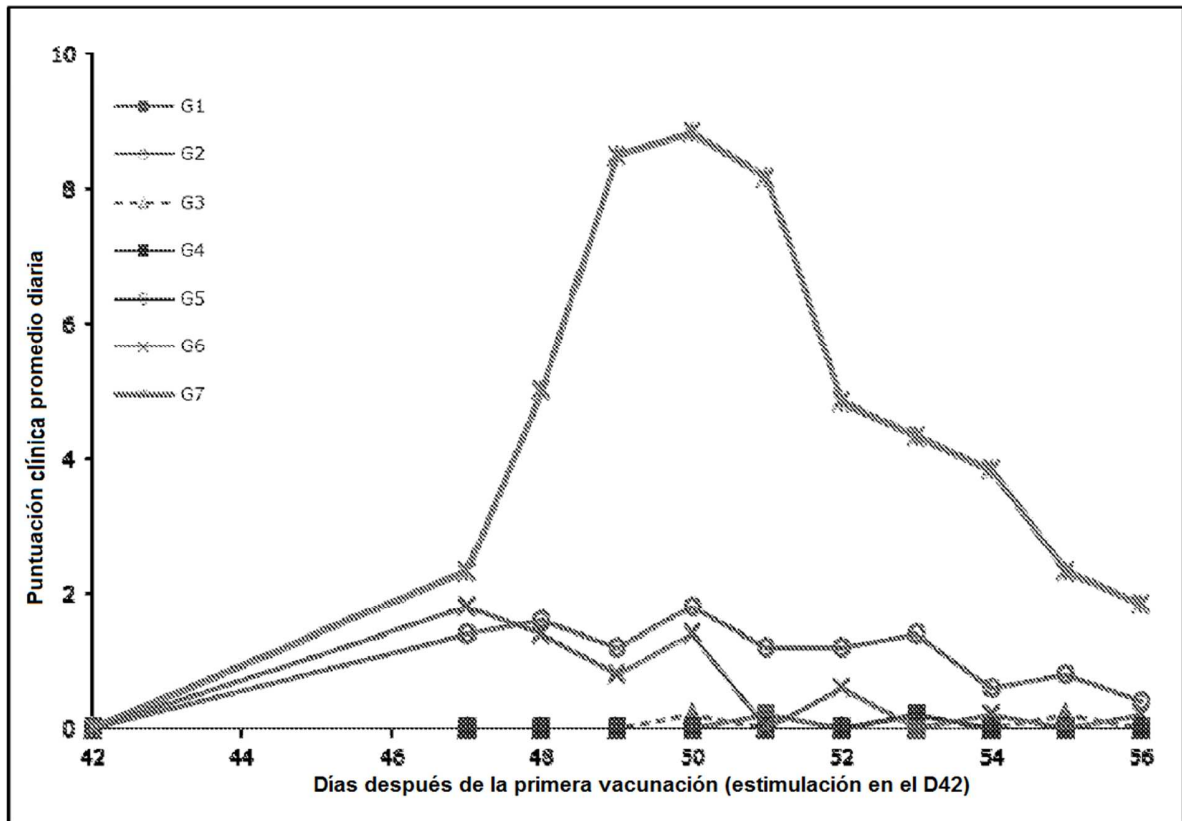
G5: Vp2+Vp5 (D21);

G6: BR8 comercial

G7: Controlés

Figura 10

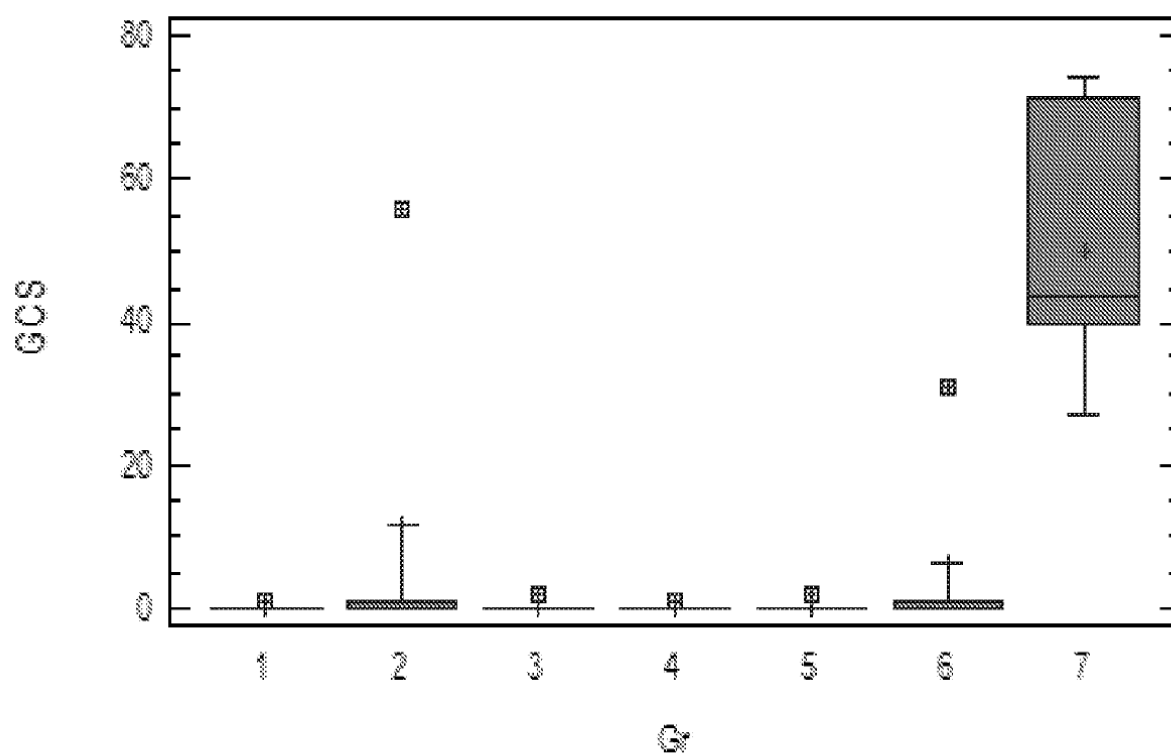
Evolución de las puntuaciones clínicas promedio diarias



G1: vP2 dosis alta (D0+D21)
 G2: vP2 dosis alta (D21)
 G3: vP2 dosis baja (D21)
 G4: Vp2+Vp5 (D0+D21)
 G5: Vp2+Vp5 (D21)
 G6: BR8 comercial
 G7: Controles

Figura 11

Dispersiones de puntuaciones clínicas globales



G1: vP2 dosis alta (D0+D21)

G2: vP2 dosis alta (D21)

G3: vP2 dosis baja (D21)

G4: Vp2+Vp5 (D0+D21)

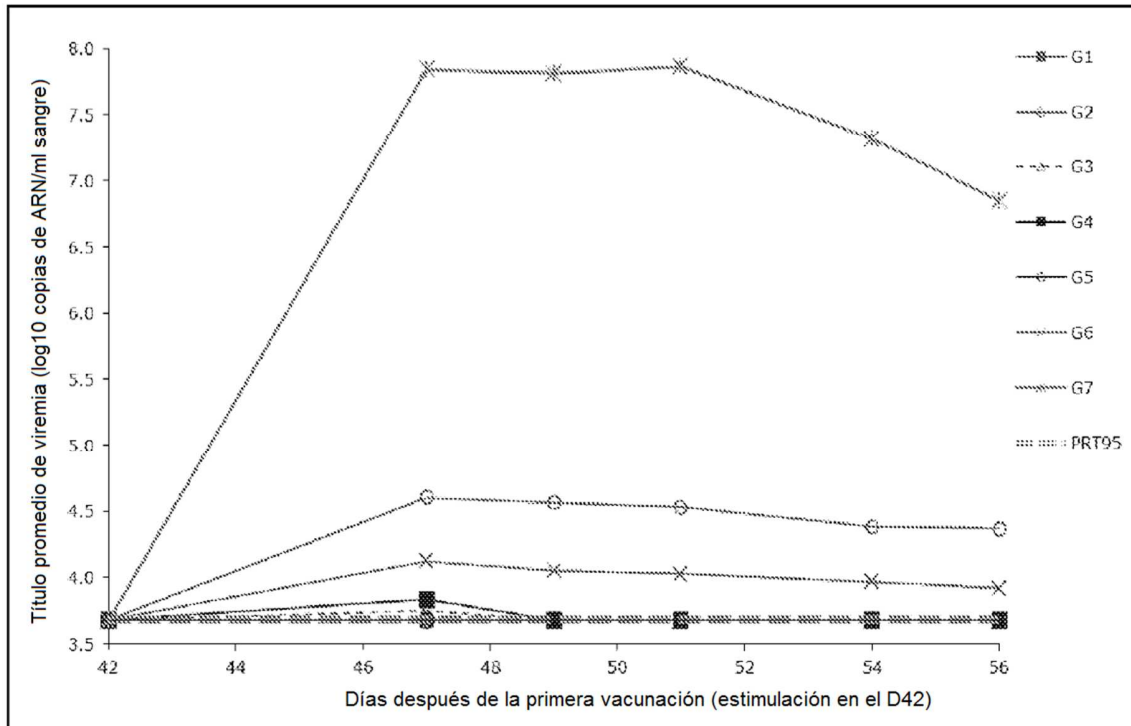
G5: Vp2+Vp5 (D21)

G6: BR8 comercial

G7: Controles

Figura 12

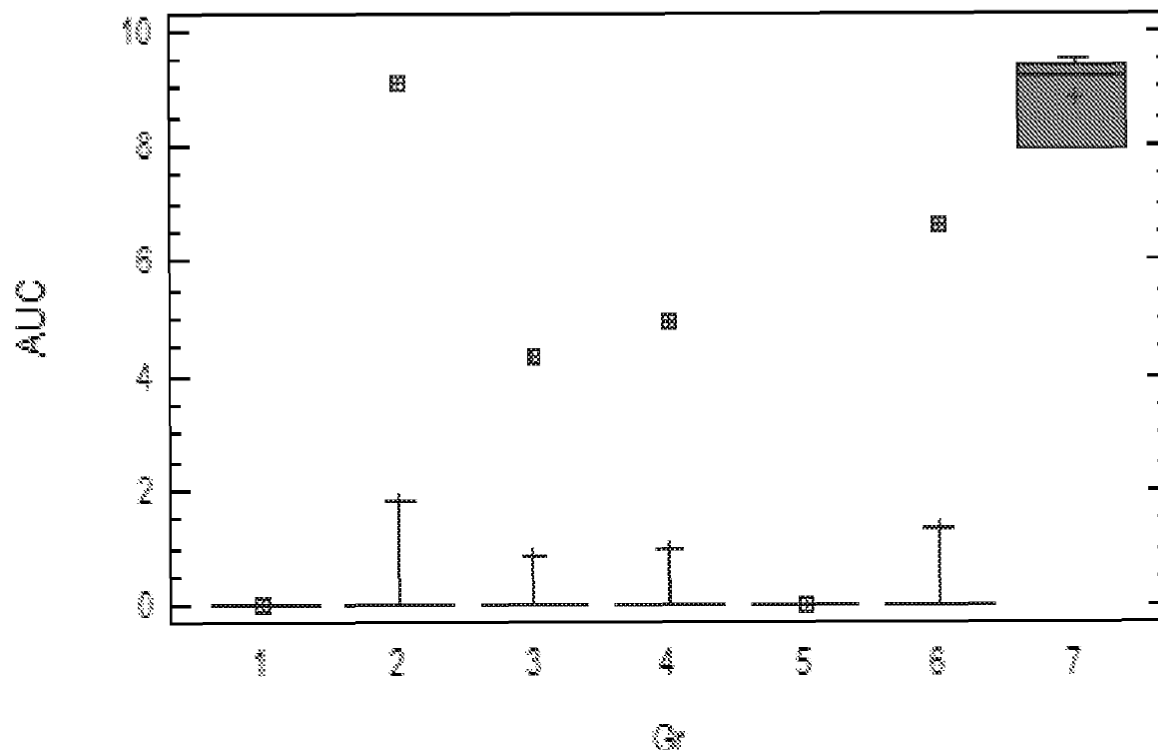
Evolución de los títulos promedio de viremia



- G1: vP2 dosis alta (D0+D21)
- G2: vP2 dosis alta (D21)
- G3: vP2 dosis baja (D21)
- G4: Vp2+Vp5 (D0+D21)
- G5: Vp2+Vp5 (D21)
- G6: BR8 comercial
- G7: Controles

Figura 13

Dispersiones de AUC



G1: vP2 dosis alta (D0+D21)

G2: vP2 dosis alta (D21)

G3: vP2 dosis baja (D21)

G4: Vp2+Vp5 (D0+D21)

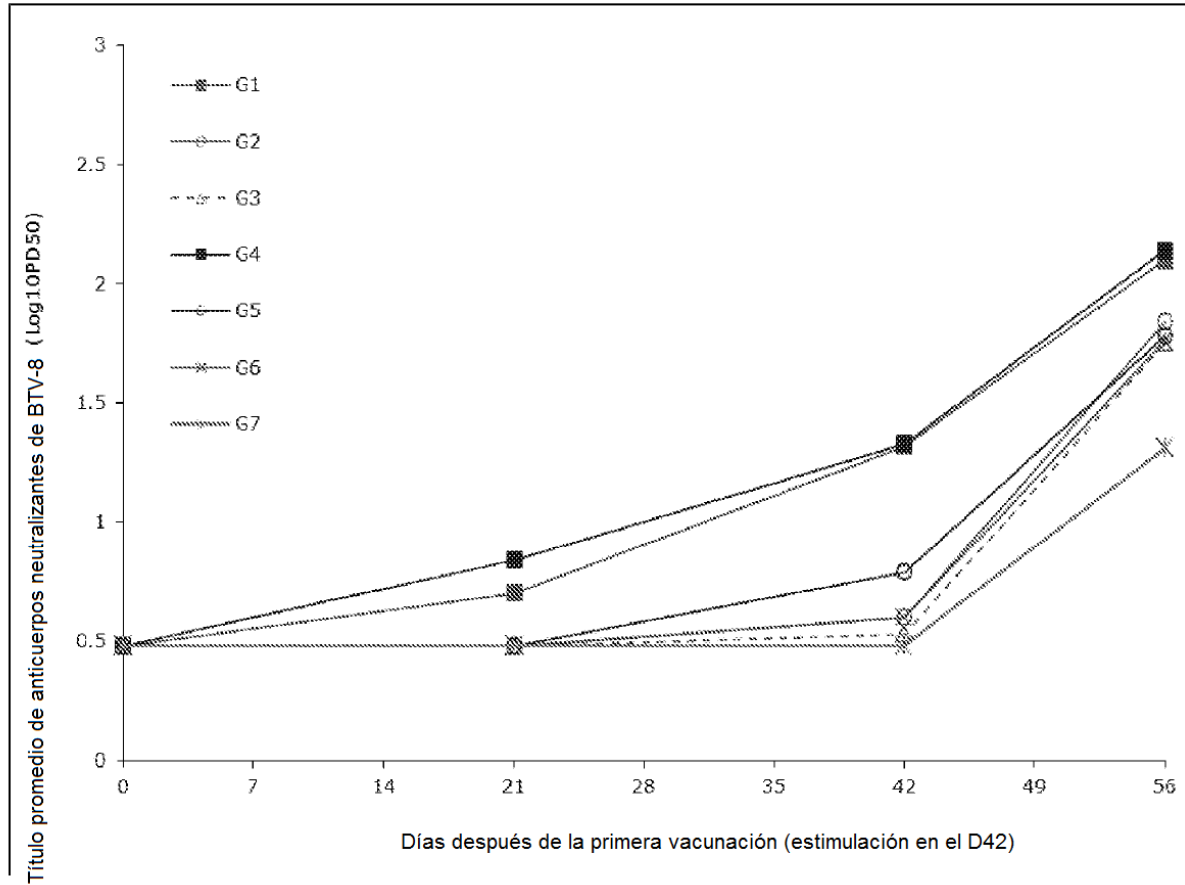
G5: Vp2+Vp5 (D21)

G6: BR8 comercial

G7: Controles

Figura 14

Evolución de los títulos promedio de anticuerpos neutralizantes de
BTV-8



- G1: vP2 dosis alta (D0+D21)
- G2: vP2 dosis alta (D21)
- G3: vP2 dosis baja (D21)
- G4: Vp2+Vp5 (D0+D21)
- G5: Vp2+Vp5 (D21)
- G6: BR8 comercial
- G7: Controles

Figura 15

Morfología de placa de sBTV que contiene la proteína VP2 y VP5 de cada serotipo

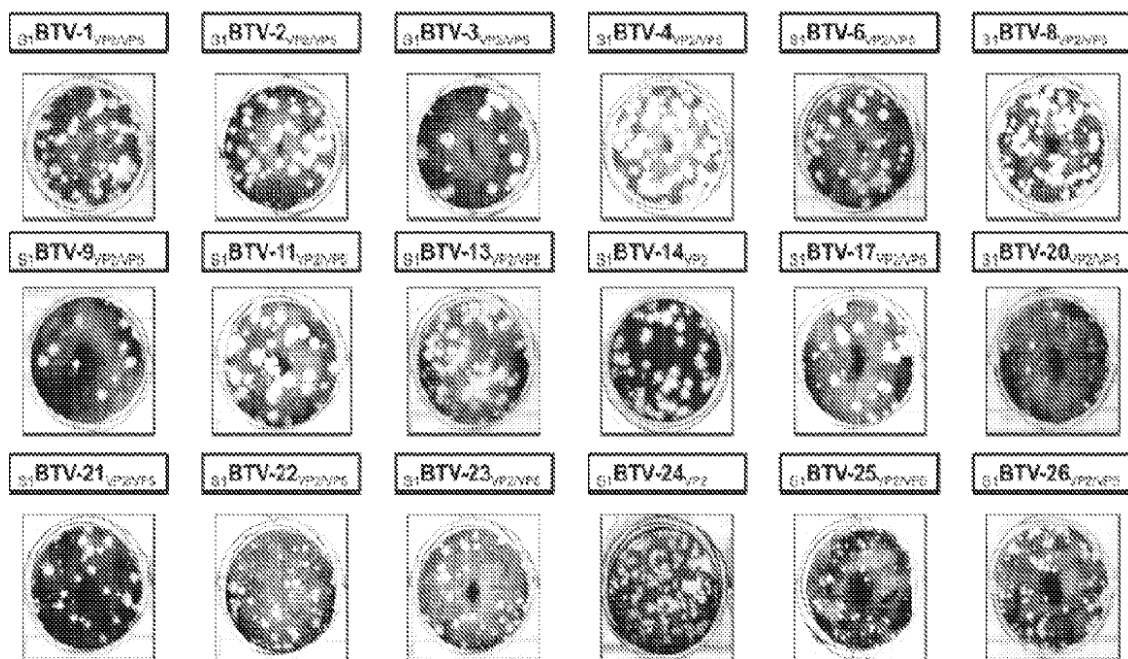


Figura 16

Títulos virales de virus sBTV en BHK-21
(72 horas después de la infección, MOI
0,001)

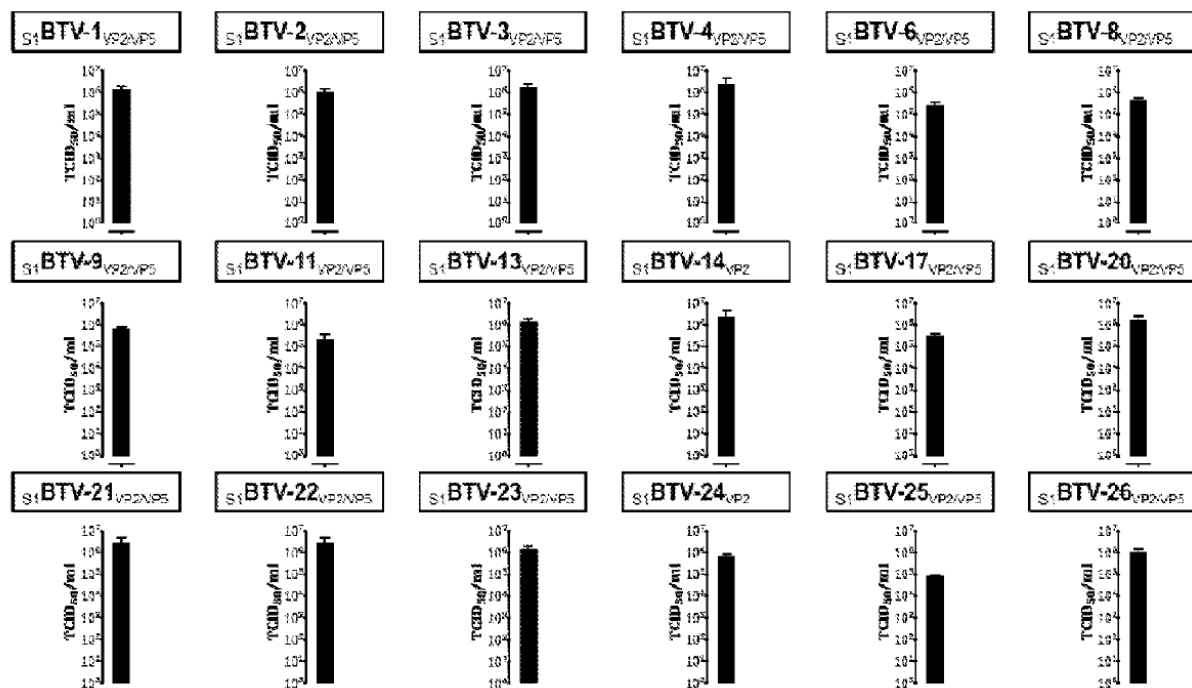


Figura 17

Título infeccioso, ELISA transferencia de puntos Vp2 para VP2 de BTV-1 y BTV-8 (RAS10)

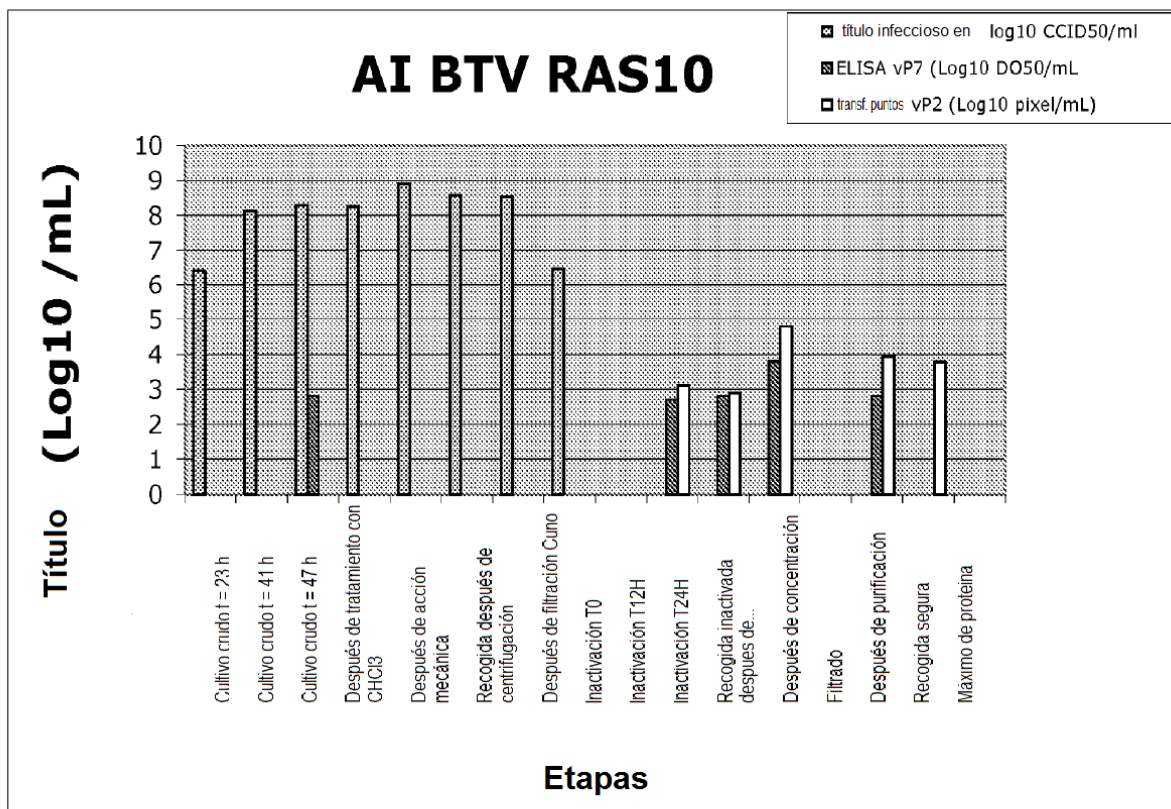


Figura 18

Título infeccioso, ELISA, transferencia de puntos Vp2 para VP2/VP5 de BTV-1 + BTV-8 (RAS32)

