



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 429**

51 Int. Cl.:
C12N 7/00 (2006.01)
C07K 14/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07114143 .6**
96 Fecha de presentación : **24.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1908822**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **Mutante del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa y vacunas.**

30 Prioridad: **24.03.2003 EP 03075842**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.03.2011

73 Titular/es: **INTERVET INTERNATIONAL B.V.**
Wim de Körverstraat 31
5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es: **Mundt, Egbert;**
Letzel, Tobias;
Paul, Guntram y
Van Loon, Adriaan Antonius Wilhelmus Maria

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 353 429 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

La presente invención tiene que ver con un mutante del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) clásico y con una vacuna que contiene tal mutante del IBDV clásico.

El virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) es un miembro de la familia Birnaviridae. Los virus de esta familia tienen una organización genómica muy similar y un ciclo de replicación similar. Los genomas de estos virus constan de dos segmentos (A y B) de ARN bicatenario (ds). El segmento mayor A codifica una poliproteína que es cortada mediante autoproteólisis para formar las proteínas víricas maduras VP2, VP3 y VP4. VP2 y VP3 son las proteínas estructurales principales del virión. VP2 es el inmunógeno principal protector del huésped de los birnavirus y contiene las regiones inmunogénicas responsables de la inducción de anticuerpos neutralizantes del virus.

Existen dos serotipos para el IBDV, serotipos 1 y 2. Los dos serotipos pueden ser diferenciados mediante ensayos de neutralización del virus (VN). Se ha demostrado que los virus de serotipo 1 son patógenos para los pollos, mientras que los IBDV de serotipo 2 causan únicamente una enfermedad subaguda en los pavos. La enfermedad infecciosa de la bursa (IBD), denominada también enfermedad de Gumboro, es una infección vírica aguda de los pollos, muy contagiosa, que tiene como diana primaria el tejido linfoide con un tropismo selectivo para las células de la bursa de Fabricius. La tasa de morbilidad en las bandadas susceptibles es elevada, con una rápida pérdida de peso y tasas de mortalidad de moderadas a altas. Los pollos que se recuperan de la enfermedad pueden tener deficiencias inmunes debido a la destrucción de la bursa de Fabricius, que es esencial para el mecanismo de defensa de los pollos. El virus de la IBD causa una inmu-

nosupresión grave en los pollos menores de 3 semanas de edad e induce lesiones de la bursa en los pollos de hasta 3 meses de edad.

5 Durante muchos años, la enfermedad pudo ser prevenida mediante la inducción de niveles elevados de anticuerpos en las bandadas reproductoras por la aplicación de una vacuna inactivada a los pollos que habían sido estimulados con una vacuna de IBDV vivos atenuados. Esto ha mantenido al mínimo las pérdidas económicas causadas por la IBD. Los anticuerpos maternos de los pollos derivados de los reproductores vacunados impiden la infección temprana con IBDV y disminuyen los problemas asociados con la inmunosupresión. Además, se han utilizado también con éxito vacunas vivas atenuadas en bandadas de pollos comerciales después de que los anticuerpos maternos hubieran declinado.

10 Históricamente, los virus de la IBD constaban solamente de un tipo que es conocido como virus de la IBD "clásico". Sin embargo, a mitad de los años 80 se observó una enfermedad aguda en bandadas vacunadas con vacunas basadas en el IBDV clásico, en particular en EE.UU. Se encontró que esta enfermedad estaba causada por virus de la IBD que tenían un carácter inmunogénico diferente. Estos nuevos virus emergieron probablemente como resultado de la deriva genética. La aparición de estas cepas de IBDV denominadas "variantes" requirió el diseño de nuevos programas de vacunación contra la IBD, ya que las cepas vacuna del IBDV clásico no eran capaces de inducir una protección cruzada adecuada. Los subtipos variantes más importantes de los IBDVs de serotipo 1 identificados en el pasado fueron las variantes Delaware-E, GLS, RS/593 y DS326. Las cepas variantes pueden ser identificadas y distinguidas de las cepas clásicas mediante un ensayo de neutralización del virus, un panel de anticuerpos monoclonales o RT-PCR.

15
20
25
30
35

La variante Delaware-E fue descrita por Rosenberger y col. (Proc. 20th. Natl. Meet. On Poultry Health and Condemnations; Ocean City, MD, EE.UU., 94-101, 1985) y por Snyder y col. (Avian Diseases 32, 535-539, 1985). El virus GLS fue aislado en EE.UU. en 1987 y DS326 (similar a GLS) fue aislado en EE.UU. en 1988 (Snyder y col., Arch. Virol. 127, 89-101, 1992 y van Loon y col., Proceedings of the International symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia, Rauschholzhausen, Alemania, 179-187, 1994). La cepa RS/593 (similar a la variante E) fue aislada también en EE.UU. en 1993 (Snyder y col., Proceedings of the International symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia, Rauschholzhausen, Alemania, 65-70, 1994).

En la técnica se utiliza comúnmente un panel de anticuerpos monoclonales (moab) neutralizantes del virus en un inmunoensayo enzimático de captura del antígeno (AC-ELISA) para identificar los diferentes tipos de IBDV. El patrón de reactividad de estos moabs con las cepas de IBDV existentes está resumido en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Las diferentes cepas variantes del IBDV determinadas mediante el patrón de reacción del panel de moabs

Cepa↓Moab→	8	B69	R63	10	BK9	67	57	44A1	179
Clásica	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Variante Delaware (-E)	+	-	+	-	+	+	-	+	+
RS/593	+	-	-	-	-	+	-	-	+
GLS	+	-	-	+	-	-	+	+	+
DS326	+	-	-	+	-	-	+	+	-

Los moabs VN R63 y B69 neutralizan las cepas clásicas del IBDV con títulos elevados y el moab B69 se une específicamente a las cepas clásicas. El moab BK9 se

une únicamente a las cepas variantes Delaware-E. Puede utilizarse una reacción positiva con el moab 57 para separar las cepas GLS y DS326 de la cepa clásica y de la variante Delaware. Estos y otros moabs son utilizados generalmente en el campo para distinguir entre cepas (variantes) del IBDV determinando el patrón de reacción del panel de moabs disponibles. Los hibridomas que secretan los moabs están también disponible en la ATCC (Rockville, EE.UU.) bajo los números de acceso siguientes: R63 (HB-9490), 8 (HB-10174), B29 (HB-9746), BK-9 (HB-10157), 67 (HB-11122), 57 (HB-10156), B69 (HB-9437) y 179 (HB-10158). Las cepas variantes del IBDV y los hibridomas están también disponible en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes del Institute Pasteur, Paris, Francia, bajo los siguientes n^{os} de acceso: DS 326 (I-910), GLS (I-792 e I-793) y moab 10 (I-2812).

Aunque se ha propuesto la importancia de algunas regiones y de aminoácidos definidos dentro de la proteína VP2 del IBDV para la variación antigénica entre las cepas del IBDV (Vakharia y col., *Virus Research* 31, 265-273, 1994 y Snyder y col., *Avian Diseases* 38, 701-707, 1994), no se ha determinado todavía la presencia obligatoria de todos los aminoácidos para la formación de epítomos neutralizantes del IBDV. En *Virus Research* 49, 131-137, 1997, Vakharia y col. informaron que el aminoácido prolina estaba presente en la variante E del IBDV. En la solicitud de patente internacional WO 95/26196, Vakharia y col. sugirieron la implicación de los aminoácidos 286 (Ile), 318 (Asp) y 323 (Glu) en el contexto de la unión de la proteína VP2 de una variante E con el moab 67. Además, se describen múltiples diferencias entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP2 del IBDV clásico y VP2 de las variantes. Las posiciones de aminoácidos 222 (Pro), 249 (Gln) y 254 (Gly) fueron consideradas relevantes para la formación del epítomo B69 en la

proteína VP2 de GLS.

EP 1170302 (Akzo Nobel N.V.) describe la preparación de un mutante de una variante E de IBDV con una inmunogenidad mejorada frente a las cepas clásicas de IBDV. Este mutante de IBDV fue obtenido mediante la introducción de mutaciones en la región codificadora de VP2 de la variante E en los codones para los aminoácidos 253 (Gln a His), 284 (Ala a Thr), 254 (Ser a Gly) y 270 (Ala a Thr). Ninguno de estos mutante de la variante E del IBDV expresa una proteína VP2 que se una al moab B69.

Sin embargo, en la misma no se revela ninguna información que permita la generación de un mutante del IBDV clásico que exprese también un epítipo neutralizante de la variante E del virus. Tal mutante sería muy útil en vacunas para inducir protección contra la enfermedad causada por las cepas clásicas y variantes del IBDV en el campo.

En la presente invención, se ha construido un nuevo mutante del IBDV basado en un IBDV clásico mediante la introducción de mutaciones en la región codificadora de VP2, de tal manera que la proteína VP2 expresada por el virus contiene el epítipo neutralizante del virus 67 que es típico de los IBDVs variantes. Los inventores encontraron que en el contexto de la proteína VP2 clásica, la reactividad con el moab 67 está influenciada por secuencias de aminoácidos separadas por 100 aminoácidos aproximadamente. Además, la suposición realizada por Vakharia y col. de que 286 (Ile), 318 (Asp) y 323 (Glu) influyen sobre la presencia del epítipo 67 no es correcta. De hecho, los inventores han encontrado que la aparición del epítipo del 67 en el contexto de la proteína VP2 del IBDV clásico depende del cambio de la prolina en posición 222 a serina o treonina y de la presencia de ciertas secuencias de aminoácidos en las posiciones 318-322. El cambio de prolina a serina o treonina en la posición 222

en presencia de las secuencias de aminoácidos presentes de forma natural en la proteína VP2 de un IBDV clásico en las posiciones 318-323 (Gly-Gly-Gln-Ala-Gly-Asp) da lugar a la aparición del epítipo del 67 en la proteína VP2 del
5 IBDV clásico.

Por tanto, la presente invención proporciona un mutante del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa clásico que expresa una proteína VP2 que se une al anticuerpo monoclonal (moab) B69, **que se caracteriza por-**
10 **que** la proteína VP2 se une también al moab 67 secretado por las líneas celulares de hibridomas HB-9437 y HB-11122, depositadas en la ATCC, Rockville, EE.UU., respectivamente.

La proteína VP2 del IBDV consta de 512
15 aminoácidos y está situada en la poliproteína en las posiciones de aminoácidos 1-512. Las secuencias de nucleótidos de (el segmento A completo que contiene) la región codificadora de VP2 y las secuencias de aminoácidos correspondientes de la proteína VP2 de muchas cepas clásicas del IBDV han sido determinadas (US 5.871.744, EP
20 887.412 para D78; NCBI GeneBank).

Todos los moabs conocidos que muestran propiedades neutralizantes del virus, incluyendo el moab B69 que es específico para las cepas clásicas del IBDV,
25 son producidos exclusivamente contra la proteína VP2 y reconocen epítipos dependientes de la conformación. La comparación de muchas secuencias de aminoácidos de VP2 de cepas clásicas y variantes, en particular de la variante E y de GLS, está descrita en Vakharia y col. (1994, *su-*
30 *pra*) y Heine y col. (J. Gen. Virol. 72, 1835-1843, 1991). Aunque existe una variación biológica entre las cepas del virus, dentro de las cepas del IBDV de tipo clásico la secuencia de aminoácidos de la proteína VP2 está muy conservada. La homología de aminoácidos entre las secuencias
35 de aminoácidos de la VP2 de cepas clásicas varía entre un

98%-99,4% a lo largo de la longitud total de la proteína (sobre la base de una comparación con la secuencia de aminoácidos de VP2 de la cepa D78 del IBDV). Se identificó una región central dentro de la proteína VP2 que
5 contenía la parte más variable de VP2. Esta región está situada en las posiciones de aminoácidos 206 a 350 (Bayliss y col., J. Gen. Virol. 71, 1303-1312, 1987) y la homología de aminoácidos entre las secuencias de aminoácidos de VP2 de cepas clásicas dentro de esta región
10 varía entre el 95,9%-97,9% (sobre la base de una comparación con la secuencia de aminoácidos de VP2 de la cepa D78 del IBDV). Dentro de esta región central se han identificado dos regiones hipervariables en las posiciones 212-224 y 314-326, en las cuales tienen lugar la mayor
15 parte de los cambios de aminoácidos entre los diferentes tipos de cepas del IBDV (Vakharia y col., 1994, *supra*). A pesar de esto, la mayoría de las cepas clásicas del IBDV contienen una secuencia de aminoácidos en la región 200-230 que es idéntica a la de VP2 de la cepa D78 del IBDV:
20 Ser-Asp-Arg-Pro-Arg-Val-Tyr-Thr-Ile-Thr-Ala-Ala-Asp-Asp-Tyr-Gln-Phe-Ser-Ser-Gln-Tyr-Gln-Pro-Gly-Gly-Val-Thr-Ile-Thr-Leu-Phe (SEC ID N°: 19). Las secuencias son analizadas en la presente con el programa de ordenador Wisconsin Package, versión 8 (Genetics Computer Group, Madison,
25 Wis.).

Por tanto, en la presente se define un IBDV clásico como un IBDV aislado que contiene una región codificadora de VP2 que expresa una proteína VP2 que es capaz de unirse al moab B69.

30 Más en particular, se define un IBDV clásico como un IBDV aislado que contiene una secuencia de aminoácidos de VP2 en las posiciones 200-230 que es la misma que la de la cepa D78 (SEC ID N°: 19).

La reacción de un moab con un IBDV puede ser
35 determinada por medio de un AC-ELISA que es utilizado

comúnmente en la técnica para este fin, tal como está descrito por Snyder y col. (1992, *supra*) y van der Marel y col. (Dtsch. Tierartzl. Wschr. 97, 81-83, 1990).

Alternativamente, la reacción de un IBDV con un moab puede ser determinada también por medio de un ensayo de inmunofluorescencia según está descrito en el Ejemplo 1.

Un mutante del IBDV clásico preferido de acuerdo con la invención expresa una proteína VP2 que además de unirse al moab B69 y al moab 67 se une al moab R63 secretado por la línea celular de hibridomas HB-9490, depositada en la ATCC, Rockville, EE.UU. El moab R63 es capaz de neutralizar cepas clásicas y cepas variantes E del IBDV.

La presente invención identifica por vez primera qué residuos de aminoácidos, en el contexto de una proteína VP2 de una cepa clásica, son requeridos y suficientes para (i) la formación de un epítipo neutralizante que se une al moab R63 (clásica y variante E), (ii) la formación adicional de un epítipo neutralizante que se une al moab 67 (variante E) y (iii) para la formación adicional de un epítipo neutralizante que se une al moab 57 (GLS).

Los inventores prepararon varios mutantes del IBDV según se definió anteriormente mediante la introducción de mutaciones en la región codificadora de VP2 de una cepa clásica del IBDV (Ejemplo 1). Los resultados obtenidos demuestran que epítopos idénticos pueden ser plegados por secuencias de aminoácidos diferentes, mientras que otras secuencias de aminoácidos son incapaces de generar los epítopos variantes. Por tanto, existe una capacidad de codificación específica para un epítipo específico. En la Tabla 2 se presenta un resumen de las secuencias de aminoácidos relevantes que son requeridas para el plegamiento apropiado de los epítopos 67, 57 y R63 (SEC

ID N^{os} 1-5, 6-9 y 10-18, respectivamente). La información proporcionada en la Tabla 2 permite a las personas con experiencia generar mutantes del IBDV clásico capaces de expresar una proteína VP2 que comprenda también, además del epítipo neutralizante del virus B69, el epítipo neutralizante de virus 67 que es específico para las cepas variantes E del IBDV.

Tabla 2: Resumen de los aminoácidos esenciales para el plegamiento del epítipo

Epítipo	aa 222	aa 318	aa 319	aa 320	aa 321	aa 322	aa 323	aa 330	SEC ID N° (318-323)
67	S o T	G	G	Q	A	G	D	R o S	1
67	S o T	G	G	Q	A	G	E	R o S	2
67	S o T	D	G	Q	A	G	D	R o S	3
67	S o T	D	G	Q	A	G	E	R o S	4
67	S o T	N	G	Q	A	G	E	R o S	5
57	P, S o T	G	G	Q	E	G	D	R o S	6
57	P, S o T	D	G	Q	E	G	D	R	7
57	P, S o T	N	G	Q	E	G	D	R	8
57	P, S o T	N	G	Q	E	G	E	R	9
R63	P, S o T	G	G	Q	A	G	D	R o S	10
R63	P, S o T	G	G	Q	A	G	E	R o S	11
R63	P, S o T	D	G	Q	A	G	D	R o S	12
R63	P, S o T	D	G	Q	A	G	E	R o S	13
R63	P, S o T	D	G	Q	E	G	D	S	14
R63	P, S o T	N	G	Q	A	G	D	R o S	15
R63	P, S o T	N	G	Q	A	G	E	R o S	16
R63	P, S o T	N	G	Q	E	G	D	S	17
R63	P, S o T	N	G	Q	E	G	E	S	18

10

Por tanto, un mutante del IBDV clásico de la invención es un mutante que se une al moab B69 y al moab 67 y que contiene una o más mutaciones en la región codi-

ficadora de la VP2 clásica, de tal manera que la región codificadora contiene,

(i) un codón para el aminoácido en posición 222 que codifica serina o treonina, y

5 (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC ID N^{os} 2-5 en las posiciones 318-323.

Se encontró que la secuencia de aminoácidos en las posiciones 318-323 según se muestra en la Tabla 2, 10 tenía como resultado un plegamiento correcto del epítipo 67 solamente en el caso de que el aminoácido en posición 222 (prolina) hubiera sido cambiado a serina o treonina, lo cual implica que el plegamiento correcto del epítipo está influenciado por aminoácidos separados por 100 posi- 15 ciones.

Aunque el aminoácido en posición 330 no es crítico, un mutante ventajoso del IBDV contiene además un codón que codifica el aminoácido arginina o serina en esta posición.

20 Una propiedad ventajosa adicional de un mutante del IBDV clásico según se definió anteriormente, es que tal mutante exprese también una proteína VP2 que tenga la secuencia de aminoácidos requerida para el plegamiento correcto del epítipo neutralizante del virus R63. En la Tabla 2 y en el Ejemplo 1 se demuestra que un 25 IBDV que exprese una proteína VP2 con una secuencia de aminoácidos en las posiciones 318-323 como las mostradas en cualquiera de las SEC ID N^{os} 14-15 y 17-18 (además de una serina o una treonina en posición 222) presenta el epítipo R63 pero es incapaz de presentar el epítipo 67. 30

Una observación sorprendente adicional realizada por los inventores, es que el cambio de un aminoácido de la región codificadora de VP2 en las posiciones 318-323 de una cepa clásica del IBDV, tiene como resul- 35 tado una disminución de las propiedades de crecimiento de

tales mutantes. Tales mutantes muestran un fenotipo atenuado para los pollos y pueden ser utilizados de manera ventajosa como candidatos para una vacuna con propiedades de seguridad mejoradas, en particular en vacunas que son administradas por vía *in ovo*. Por tanto, la presente invención proporciona también un mutante del IBDV clásico que contiene una o más mutaciones en la región codificadora de la VP2 clásica, de tal manera que la región codificadora contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos en las posiciones 318-323 que es diferente de la secuencia de aminoácidos natural Gly-Gly-Gln-Ala-Gly-Asp (SEC ID N° 1). Preferiblemente, estos mutantes del IBDV clásico contienen una secuencia de aminoácidos en estas posiciones como la mostrada en cualquiera de las SEC ID N°s 2-5, opcionalmente con un aminoácido en la posición 222 y en la posición 330 como el definido anteriormente.

Un mutante del IBDV clásico de acuerdo con la invención puede ser preparado introduciendo las mutaciones requeridas en la región codificadora de VP2 derivada de cualquier cepa clásica del IBDV aislable en el campo o utilizada en vacunas. Las cepas adecuadas de IBDV incluyen las cepas bien conocidas del IBDV presentes en las vacunas disponibles comercialmente tales como D78, PBG98, 228E y 89-03 (Intervet International B.V.). La cepa D78 del IBDV (patente de EE.UU. N° 4.530.831) está también disponible en la ATCC bajo el n° de acceso VR-2041. La secuencia de nucleótidos del segmento A completo de la cepa D78, que incluye la región codificadora de VP2, y la secuencia de aminoácidos de la (poli)proteína correspondiente están descritas en la patente de EE.UU. n° 5.871.744 y en la solicitud de EP 887.412.

En particular, se proporciona un mutante del IBDV clásico que contiene una o más mutaciones en la región codificadora de VP2 de la cepa D78 del IBDV.

Un mutante del IBDV clásico preferido adicional de acuerdo con la presente invención, contiene el esqueleto genético completo del segmento A de una cepa clásica del IBDV, incluyendo la región codificadora de VP2 clásica mutada según se describió anteriormente. Más en particular, un mutante del IBDV clásico, según se definió anteriormente, deriva de la cepa D78 del IBDV.

Sin embargo, un mutante del IBDV clásico de acuerdo con la invención puede estar basado también en el esqueleto genético de una cepa variante del IBDV, tal como la cepa variante E o GLS. En tal mutante del IBDV clásico "quimérico", las secuencias codificadoras de VP2 en el esqueleto genético del segmento A de una cepa variante del IBDV están sustituidas por las secuencias codificadoras de la VP2 clásica relevantes correspondientes, que contienen adicionalmente las mutaciones deseadas que son responsables de los epítomos de la nueva variante en el mutante del IBDV clásico.

La generación de un mutante del IBDV clásico de acuerdo con la invención puede ser conseguida por medio del sistema recientemente establecido del ARNc infeccioso para IBDV (Mundt y Vakharia, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11131-11136, 1996). Este sistema de genética inversa proporciona la posibilidad de introducir mutaciones en el genoma de ARN del IBDV. La etapa más importante de este sistema de genética inversa es proporcionar clones de ADNc de longitud completa de los segmentos A y B del IBDV, incluyendo los nucleótidos de los extremos 5' y 3' de estos dos segmentos. Después de los procedimientos de clonaje, las secuencias de longitud completa del segmento A y del segmento B son unidas operativamente a un promotor que es capaz de unirse a una ARN polimerasa dependiente de ADN, tal como la polimerasa T7, SP6 o T3, prefiriéndose el promotor de T7. La polimerasa dependiente de ADN es capaz de transcribir ARNc vírico a partir de

los clones de ADNc de longitud completa de los segmentos A y B, respectivamente. Este ARNc es capaz de inducir la replicación del virus y el aislamiento de virus viables. Este procedimiento puede ser llevado a cabo con todos los
5 IBDV existentes en la naturaleza.

Los sistemas de genética inversa han sido descritos para varias cepas de IBDV tales como D78 (Yao y col., J. Virol. 72, 2647-2657, 1998), cepa HK46 (Lim y col., J. Virol. 73, 2854-2862, 1999), CEF 94 (Boot y col., Virology 265, 330-341, 1999) y UK661 (van Loon y col., J. Gen. Virol. 83, 121-129, 2002).
10

Las mutaciones deseadas pueden ser introducidas en el genoma del IBDV mediante métodos generalmente conocidos en la técnica para este fin. En particular,
15 la(s) mutación(es) es(son) introducida(s) por medio de mutagénesis dirigida a un sitio. En la presente se describen métodos para introducir una mutación en el genoma del IBDV, pero los mismos son también utilizados de manera general en la técnica (Mundt y Vakharia, 1996, *supra*;
20 Yao y col., J. Virol. 72, 2647-2654, 1998; Mundt y col., 1999, *supra*; solicitud de patente EP n° 1170302; Current Protocols in Molecular Biology, eds.: F.M. Ausubel y col., Wiley N.Y., edición de 1995, páginas 8.5.1.-8.5.9. y Kunkel y col., en Methods in Enzymology vol.
25 154, 376-382, 1987).

Los números utilizados en la presente para indicar las posiciones de los aminoácidos se refieren a la numeración de los aminoácidos en la poliproteína del IBDV según se utilizan comúnmente en la técnica. Los
30 números que indican las posiciones de los nucleótidos están basados en la secuencia de nucleótidos completa del segmento A del genoma del IBDV según está descrito por Mundt y Müller (J. Gen. Virol. 77, 437-443, 1995; n° de acceso del NCBI X 84034).

35 El segmento B de un mutante del IBDV clásico

de acuerdo con la invención puede derivar de cualquier cepa de IBDV, preferiblemente de una cepa clásica del IBDV, muy preferiblemente de la cepa D78 o P2 (patente de EE.UU. 5.871.744 y solicitud de patente EP nº 887412).

5 Según se demuestra en los Ejemplos, el mutante del IBDV clásico de acuerdo con la invención presenta un carácter inmunogénico que no se había observado antes en las cepas clásicas del IBDV. El nuevo mutante del IBDV clásico puede constituir la base de un nuevo
10 tipo de vacuna de IBDV que puede proteger eficazmente a las aves de corral frente a condiciones de enfermedad resultantes de la infección por cepas clásicas y variantes del IBDV. Por tanto, otro aspecto de esta invención es una vacuna para ser utilizada en la protección de las
15 aves de corral frente a enfermedades causadas por la infección con IBDV, **que se caracteriza porque** la vacuna contiene un mutante del IBDV clásico según se definió anteriormente, junto con un vehículo o diluyente farmacéutico aceptable.

20 El mutante del IBDV clásico puede ser incorporado a la vacuna como un virus vivo atenuado o inactivado.

 Una vacuna de acuerdo con la invención puede ser preparada por métodos convencionales tales como, por
25 ejemplo, los utilizados comúnmente para las vacunas de IBDV vivos e inactivados disponibles comercialmente. Brevemente, un sustrato susceptible es inoculado con un mutante del IBDV clásico de acuerdo con la invención y propagado hasta que el virus se haya replicado con un título
30 infeccioso deseado, después de lo cual el material que contiene el IBDV es recogido, opcionalmente inactivado, y mezclado con un vehículo o diluyente farmacéutico aceptable.

 Cualquier sustrato que sea capaz de soportar
35 la replicación de IBDVs puede ser utilizado para preparar

una vacuna de acuerdo con la presente invención, incluyendo cultivos celulares primarios (de aves), tales como fibroblastos de embrión de pollo (CEF) o células hepáticas de embrión de pollo (CEL), líneas celulares de mamífero tales como la línea de células VERO o la línea celular BGM-70, o líneas celulares aviares tales como QT-35, QM-7 o LMH. Normalmente, después de la inoculación de las células, el virus es propagado durante 3-14 días, después de lo cual el sobrenadante del cultivo celular es recogido y, si se desea, filtrado o centrifugado con el fin de eliminar los desechos celulares.

El mutante del IBDV clásico puede ser también propagado en huevos de pollo embrionados.

Si se desea, la atenuación del IBDV clásico puede ser obtenida mediante el pase seriado estándar del virus en cultivos celulares, por ejemplo en los cultivos celulares primarios o en las líneas celulares establecidas anteriormente mencionadas (Bayyari y col., Avian Diseases 40, 516-532, 1996; Tsai y col., Avian Diseases 36, 415-422, 1992).

Alternativamente, el IBDV clásico puede ser propagado *in vivo* en pollos infectados, seguido por el aislamiento de la bursa de Fabricius de estos animales infectados, mezclando la misma con un diluyente y homogeneizando la mezcla. El IBDV propagado de esta manera constituye comúnmente la base de una vacuna inactivada.

La vacuna de acuerdo con la invención que contiene el virus vivo, puede ser preparada y comercializada en forma de suspensión o en forma liofilizada y contiene adicionalmente un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable utilizado habitualmente para tales composiciones. Los vehículos incluyen estabilizantes, conservantes y tampones. Son estabilizantes adecuados, por ejemplo, SPGA, carbohidratos (tales como sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrano, glutamato o glucosa),

proteínas (tales como suero de leche deshidratado, albúmina o caseína), o productos o degradación de los mismos. Tampones adecuados son por ejemplo fosfatos de metales alcalinos. Son conservantes adecuados timerosal, mertiolato y gentamicina. Los diluyentes incluyen agua, tampones acuosos (tales como solución salina tamponada), alcoholes y polioles (tales como glicerol).

Si se desea, las vacunas vivas de acuerdo con la invención pueden contener un adyuvante. Ejemplos de compuestos y composiciones adecuadas con actividad adyuvante son los mismos que se mencionan posteriormente.

Aunque es posible la administración por inyección, por ejemplo intramuscularmente, subcutáneamente o *in ovo*, de la vacuna viva de acuerdo con la presente invención, la vacuna es administrada preferiblemente mediante una vía de aplicación en masa más barata utilizada comúnmente para la vacunación contra el IBDV. Para la vacunación contra el IBDV, esta vía incluye el agua de bebida, así como vacunación por pulverización y aerosólica.

Alternativamente, la presente invención proporciona una vacuna que contiene el IBDV variante en forma inactivada (destruido). Una ventaja de la vacuna con IBDV inactivado es el nivel elevado de anticuerpos protectores de larga duración que puede ser obtenido.

El objetivo de la inactivación de los virus recogidos después de la etapa de propagación es eliminar la reproducción de los virus. En general, esto puede ser conseguido mediante medios químicos o físicos bien conocidos en la técnica.

Una vacuna conteniendo la variante de IBDV inactivada puede contener, por ejemplo, uno o más de los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables anteriormente mencionados adecuados para este fin.

Preferiblemente, una vacuna inactivada de

acuerdo con la invención contiene uno o más compuestos con actividad adyuvante. Compuestos o composiciones adecuados para este fin incluyen hidróxido, fosfato u óxido de aluminio, una emulsión aceite-en-agua o agua-en-aceite
5 basada en, por ejemplo, un aceite mineral, tal como Bayol F[®] o Marcol 52[®] o un aceite vegetal tal como acetato de vitamina E, y saponinas.

La vacuna de acuerdo con la invención contiene una dosis eficaz del mutante de IBDV clásico como
10 componente activo, esto es una cantidad de material IBDV inmunizante que inducirá inmunidad en las aves vacunadas frente al desafío por un virus virulento. En la presente se define inmunidad como la inducción de un nivel de protección en una población de aves después de la vacunación
15 significativamente más elevado en comparación con un grupo no vacunado.

Típicamente, la vacuna viva de acuerdo con la invención puede ser administrada en una dosis de 10^0 - 10^9 TCID₅₀ por animal, preferiblemente en una dosis que varía
20 de 10^3 - 10^6 TCID₅₀ por animal. Las vacunas inactivadas pueden contener el equivalente antigénico de 10^6 - 10^{10} TCID₅₀ por animal.

Las vacunas inactivadas son administradas normalmente por vía parenteral, por ejemplo intramuscularmente o subcutáneamente.
25

Aunque la vacuna de IBDV de acuerdo con la presente invención puede ser utilizada eficazmente en los pollos, otras aves de corral tales como pavos, gallinas de Guinea y perdices pueden ser también vacunadas con éxito con la vacuna. Los pollos incluyen pollos de engorde, pollas, reproductores y ponedoras.
30

La edad de los animales que reciben una vacuna viva o inactivada de acuerdo con la invención es la misma que la de los animales que reciben las vacunas de IBDV vivas o inactivadas convencionales. Por ejemplo, los
35

pollos de engorde (libres de anticuerpos derivados de la madre-MDA) pueden ser vacunados cuando tienen un día de edad o *in ovo*, mientras que los pollos de engorde con niveles elevados de MDA son vacunados preferiblemente a las 5 2-3 semanas de edad. Las aves ponedoras o las aves reproductoras con bajos niveles de MDA pueden ser vacunadas a los 1-10 días de edad, seguido por vacunaciones de refuerzo con la vacuna inactivada a las 6-12 y a las 16-20 semanas de edad.

10 La invención incluye también vacunas combinadas que comprenden, además del mutante del IBDV clásico anteriormente descrito, uno o más componentes vacuna de otros patógenos infecciosos para las aves de corral.

Preferiblemente, la vacuna combinada contiene 15 adicionalmente una o más cepas vacuna del virus de la enfermedad de Marek (MDV), del virus de la bronquitis infecciosa (IBV), del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), del virus del síndrome de la caída de la puesta (EDS), del virus de la rinotraqueitis del pavo (TRTV) o 20 de reovirus.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de mutantes del IBDV clásico y determinación de la reactividad de anticuerpos monoclonales

25 Material y Métodos

Generación de un segmento A mutado

Para los experimentos de mutagénesis dirigida a un sitio, se utilizó pD78A (Mundt y Vakharia, *supra*, 1996; solicitud de EP 887412). Con este fin, pD78A fue 30 cortado con EcoRI/KpnI y el fragmento que contenía el segmento A fue ligado en pBluescript KS+ cortado apropiadamente para obtener pSK+-D78A. Después de la preparación de ADN monocatenario, se llevaron a cabo los experimentos de mutagénesis dirigida a un sitio de acuerdo con Kunkel 35 y col. (*supra*, 1987) utilizando los oligonucleótidos es-

pecificados en la Tabla 3. Se utilizaron los oligonucleótidos Mut1, Mut2, Mut3, Mut4, Mut5, Mut6, Mut7, Mut8, Mut9, Mut10, Mut11 para generar los plásmidos mutados pMut1, pMut2, pMut3, pMut4, pMut5, pMut6, pMut7, pMut8, pMut9, pMut10 y pMut11, respectivamente. Utilizando estos once plásmidos mutados se preparó ADN monocatenario y se utilizó junto con el ADN monocatenario de pSK+-D78A en los experimentos de mutagénesis dirigida a un sitio. Estos experimentos se llevaron a cabo con uno (P222S o R339S) o dos oligonucleótidos (P222S y R339S) en un experimento para obtener uno o dos cambios de tripletes de bases. Los plásmidos mutagenizados obtenidos (mostrados en la Tabla 4) fueron secuenciados y utilizados para experimentos posteriores.

15 **Transfección de ARNc, ensayos de inmunofluorescencia y pase del virus generado**

Para la transcripción *in vitro*, los plásmidos que contenían pD78A y los plásmidos mutageneizados fueron linealizados mediante el corte con *BsrG1*. El pP2B (Munt y Vakharia, *supra*, 1996; solicitud de EP 887412) fue linealizado utilizando *PstI*. El tratamiento posterior del ADN linealizado, la transcripción y la transfección del ARN a células BHK21 se llevaron a cabo según está descrito por Mundt (J. Gen. Virol. 80, 2067-2076, 1999). Para el ensayo de inmunofluorescencia, células BHK21 cultivadas en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos fueron transfectadas y 24 horas después de la transfección fueron fijadas con acetona/metanol (50%/50%) durante 5 minutos y secadas. Las células fijadas fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales 67, B69, 57, R63 y con suero de conejo anti-IBDV (Mundt y col., J. Gen. Virol. 76, 437-443, 1995), respectivamente, diluidos en solución salina tamponada con fosfato (PBS), durante 30 minutos y lavadas tres veces con PBS. Las células fueron luego incubadas durante 30 minutos con anti-IgG de conejo producido en

cabra conjugado a DTAF o con anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado a DTAF (Dianova, Hamburg, Alemania) diluidos en PBS seguido por tres lavados utilizando PBS y un lavado con agua destilada. Después de secar al aire
5 las células fueron montadas en PBS que contenía un 2,5% de 1,4-Diazobiciclo(2.2.2)-octano (DABCO, Sigma, Deisenhofen, Alemania) con un 90% de glicerol. La fluorescencia fue visualizada utilizando un microscopio de fluorescencia de inmersión.

10 Para el pase del virus generado, células BHK21 cultivadas en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos fueron transfectadas en paralelo a los experimentos de transfección en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos e incubadas durante 24 horas-48 horas. Después
15 de congelar/descongelar a -70°C durante al menos una hora, el sobrenadante obtenido fue centrifugado $6400 \times g$ durante 10 minutos y pasado sobre células QM cultivadas en un frasco de cultivo de tejidos de 25 cm^2 hasta que el CPE fue visible. El sobrenadante fue obtenido según se
20 describió anteriormente, alicuotado y almacenado a -70°C . Para el análisis de la viabilidad y para detectar la presencia de reactividad con los moabs, células QM cultivadas en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos fueron infectadas con una alícuota e incubadas durante 24 horas.
25 El ensayo de inmunofluorescencia se llevó a cabo según se describió anteriormente.

Análisis del crecimiento de los virus generados en cultivo celular

30 Para monitorizar el crecimiento, CEC cultivadas en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos fueron infectadas con el IBVD seleccionado a una MOI de 1 durante 1 hora a 37°C . Posteriormente, se retiró el inóculo, se lavaron las células con medio y se añadió 1 ml de medio. Los sobrenadantes fueron recogidos separada-
35 mente inmediatamente después (0 horas) y tras 8, 12, 16,

24 y 36 horas de incubación a 37°C y fueron almacenados a -70°C. Los títulos del virus fueron obtenidos mediante la determinación de la TCID₅₀ utilizando células QM (células musculares de codorniz) cultivadas en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Para este fin, los sobrenadantes fueron descongelados y titulados en etapas de log 10. Se pipetearon 100 µl de cada una de las diluciones apropiadas en cuatro pocillos de una placa de cultivo de tejidos seguido por la adición de 100 µl de una suspensión de células QM (10⁶ células/ml). Las placas fueron incubadas a 37°C. Después de cinco días, los pocillos con CPE fueron contados como positivos y se determinó la TCDI₅₀ de acuerdo con Spaerman (Brit. J. Psychol., 2, 227-242, 1908) y Karber (Arch. Exp. Path. Pharmac., 162, 480-487, 1931). Se calcularon los valores medios y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

Resultados

Influencia del cambio de aminoácidos en la región variable de VP2 sobre la reactividad de los anticuerpos monoclonales

Los aminoácidos situados en la secuencia de la cepa D78 en posición 222 (prolina), 318 (glicina), 321 (alanina) y 323 (aspartato) fueron cambiados por los aminoácidos serina, treonina (P222S, P222T), aspartato, asparragina (G318D, G318N), glutamato (A321E) y glutamato (D323E), respectivamente, en diferentes combinaciones (ver la Tabla 4). El cambio de la prolina en posición 222 por serina tuvo como resultado una reactividad adicional del moab 67 si la secuencia de aa desde la posición 318 a la posición 323 estaba formada por las combinaciones siguientes: GGQAGD, DGQAGD, DGQAGE, GGQAGE, NGQAGE. Las combinaciones restantes de la secuencia de aa desde la posición 318 hasta la posición 323 (DGQEGD, DGQEGE, GGQEGD, GGQEGE, NGQAGD, NGQEGD, NGQEGE) parecen impedir el plegamiento del epítipo caracterizado por el moab 67

incluso si la prolina en posición 222 era cambiada por serina. Se detectó la unión del moab 57 después de cambiar el aa 321 de alanina a glutamato, independientemente de si el aminoácido 222 (prolina), 318 (glicina) y 323 (aspartato) habían sido cambiados. Sin embargo, el cambio de arginina por serina en la posición 330 influía sobre la presencia del epítipo 57. En este caso, si el cambio realizado (R330S) se llevaba a cabo en presencia de las combinaciones DGQEGD, NGQEGD y NGQEGE, respectivamente, no se detectaba reactividad con el moab 57 después de los experimentos de cotransfección. En contraste, el cambio R330S no mostró influencia sobre la reactividad con el moab 57 en presencia de la combinación GGQEGD. La presencia de reactividad de los moabs 57 y R63 era excluyente entre sí en los experimentos realizados, ya que si estaba presente el epítipo 57 el epítipo R63 estaba ausente. Además, se registró reactividad con el moab 63 después de los experimentos de cotransfección tras la utilización de los plásmidos que codificaban las combinaciones GGQAGD, DGQAGD, DGQAGE, GGQAGE, NGQAGD y NGQAGE desde el aa 318 hasta el aa 323 situadas en la región de VP2, independientemente de si se habían cambiado el aa 222 (prolina) o el aa 330 (arginina). La proteína traducida del ARNc de los plásmidos que codificaban la secuencia de aminoácidos DGQEGE o GGQEGE desde la posición 318 hasta la posición 323 del gen de la poliproteína, reaccionaba solamente con el moab 69. Aquí el cambio del aa 222 y/o 330 tampoco parece tener influencia sobre la reactividad. Después de todos los experimentos de transfección, las células fueron congeladas/descongeladas y se pasó el sobrenadante obtenido. En cada caso se generó virus viable, indicando que los aminoácidos mutagenizados realizados no tenían influencia sobre la viabilidad ni la infectividad del cultivo celular del virus.

Análisis del crecimiento en cultivo celular

Con el fin de analizar si el cambio de aminoácidos influenciaba el crecimiento del virus mutado, se analizaron varios IBDV mutados (D78, Mut1, Mut2, PS-D78, PS-Mut1, PS-Mut2, Mut10, Mut11). Para este fin, se seleccionaron IBDV generados que contenían el mismo patrón de reactividad con el panel de moabs utilizado. Según se muestra en la figura, el crecimiento del virus se vio afectado por el cambio de aminoácidos en ciertas regiones. El cambio del aminoácido 222 de prolina a serina no mostró influencia sobre el crecimiento en cultivo celular. En contraste, el cambio en la región desde el aminoácido 318 hasta el 323 influyó sobre el crecimiento de los mutantes investigados. Estos mutantes crecieron con títulos más bajos en todos los puntos de tiempo investigados, indicando que la región que va desde el aa 318 al aa 323 es importante para el crecimiento en cultivo celular.

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida a un sitio

Secuencia	Orientación	Posición	Cambio de aminoácidos	Nombre	SEC ID N°
GACCATGACATCTGATCCCC TGCCTGACC gt CACTTTTGGAG GGTC	antisentido	1069-1113	G318D	Mut1	20
GACCATGACATCTG tT CCCCCT GCCTGACC gt CACTTTTGGAG GTC	antisentido	1069-1113	G318D D323E	Mut2	21
GACCATGACATCTGATCCCC Tt CCTGACC gt CACTTTTGGAG GTC	antisentido	1069-1113	G318D A321E	Mut3	22
GACCATGACATCTG tT CCCC T t CCTGACC gt CACTTTTGGAG GTC	antisentido	1069-1113	G318D A321E D323E	Mut4	23

GACCATGACATCTG tTCC CCCT GCCTGACCACCACTTTTGGGA GGTC	antisentido	1069-1113	D323E	Mut5	24
GACCATGACATCTGATCCCC TtC CTGACCACCACTTTTGGGA GGTC	antisentido	1069-1113	A321E	Mut6	25
GACCATGACATCTG tTCC CC T tC CTGACCACCACTTTTGGAG GTC	antisentido	1069-1113	A321E D323E	Mut7	26
GACCATGACATCTGATCCCC TGCCTGACC gtt ACTTTTGGAG GTC	antisentido	1069-1113	G318N	Mut8	27
GACCATGACATCTG tTCC CCCT GCCTGACC gtt ACTTTTGGAG GTC	antisentido	1069-1113	G318N D323E	Mut9	28
GACCATGACATCTGATCCCC TtC CTGACC gtt ACTTTTGGAG GTC	antisentido	1069-1113	G318N A321E	Mut10	29
GACCATGACATCTG tTCC CC T tC CTGACC gtt ACTTTTGGAGG TC	antisentido	1069-1113	G318N A321E D323E	Mut11	30
ATTGTTACCCACCGGTT tGg TACTGTGATGAGAATTGG	antisentido	772-810	P222T	P222T	31
GATTGTTACCCACCG ct TTG GTACTGTGA	antisentido	782-811	P222S	P222S	32
GTCACTGCTAGGCTCC ag aT GCCGACCATGACATC	antisentido	1102-1137	R330S	R330S	33

Tabla 4: Resultados de la mutagénesis dirigida a un sitio, de los experimentos de transfección y del ensayo de inmunofluorescencia

Oligo-nucleótidos ^a	Plásmidos ^b	Secuencia de aa ^c	57	R63	67	B69	Viable	SEC ID N°
	pD78A	GGQAGD	-	+	-	+	+	1
P222S	pD78A-P222S	GGQAGD	-	+	+	+	+	1
P222T	pD78A-222T	GGQAGD						1
R330S	pD78A-R330S	GGQAGD	-	+	-	+	+	1
P222S, R330S	pD78A-P222S-R330S	GGQAGD	-	+	+	+	+	1
Mut1	pMut1	DGQAGD	-	+	-	+	+	3
Mut1, P222S	pMut1-P222S	DGQAGD	-	+	+	+	+	3
Mut1, R330S	pMut1-R330S	DGQAGD	-	+	-	+	+	3
Mut1, P222S, R330S	pMut1-P222S-R330S	DGQAGD	-	+	+	+	+	3
Mut2	pMut2	DGQAGE	-	+	-	+	+	4
Mut2, P222S	pMut2-P222S	DGQAGE	-	+	+	+	+	4
Mut2, P222T	pMut2-P222T	DGQAGE						4
Mut2, R330S	pMut2-R330S	DGQAGE	-	+	-	+	+	4
Mut2, P222S, R330S	pMut2-P222S-R330S	DGQAGE	-	+	+	+	+	4
Mut3	pMut3	DGQEGD	+	-	-	+	+	7
Mut3, P222S	pMut3-P222S	DGQEGD	+	-	-	+	+	7
Mut3, R330S	pMut3-R330S	DGQEGD	-	+	-	+	+	7
Mut4	pMut4	DGQEGE	-	-	-	+	+	34
Mut4, P222S	pMut4-P222S	DGQEGE	-	-	-	+	+	34
Mut4, R330S	pMut4-R330S	DGQEGE	-	-	-	+	+	34
Mut5	pMut5	GGQAGE	-	+	-	+	+	2
Mut5, P222S	pMut5-P222S	GGQAGE	-	+	+	+	+	2
Mut5, P222T	pMut5-P222T	GGQAGE						2
Mut5, R330S	pMut5-R330S	GGQAGE	-	+	-	+	+	2
Mut6	pMut6	GGQEGD	+	-	-	+	+	6
Mut6, P222S	pMut6-P222S	GGQEGD	+	-	-	+	+	6
Mut6, R330S	pMut6-R330S	GGQEGD	+	-	-	+	+	6

Oligo-nucleótidos ^a	Plásmidos ^b	Secuencia de aa ^c	57	R63	67	B69	Viable	SEC ID N°
Mut7	pMut7	GGQEGE	-	-	-	+	+	35
Mut7, P222S	pMut7-P222S	GGQEGE	-	+	-	+	+	35
Mut7, R330S	pMut7-R330S	GGQEGE	-	-	-	+	+	35
Mut8	pMut8	NGQAGD	-	+	-	+	+	15
Mut8, P222S	pMut8-P222S	NGQAGD	-	+	-	+	+	15
Mut8, R330S	pMut8-R330S	NGQAGD	-	+	-	+	+	15
Mut9	pMut9	NGQAGE	-	+	-	+	+	16
Mut9, P222S	pMut9-P222S	NGQAGE	-	+	+	+	+	16
Mut9, P222T	pMut9-P222T	NGQAGE						16
Mut9, R330S	pMut9-R330S	NGQAGE	-	+	-	+	+	16
Mut10	pMut10	NGQEGD	+	-	-	+	+	8
Mut10, P222S	pMut10-222S	NGQEGD	+	-	-	+	+	8
Mut10, R330S	pMut10-330S	NGQEGD	-	+	-	+	+	8
Mut11	pMut11	NGQEGE	+	-	-	+	+	9
Mut11, P222S	pMut11-222S	NGQEGE	+	-	-	+	+	9
Mut11, R330S	pMut11-330S	NGQEGE	-	+	-	+	+	9

^a Oligonucleótidos utilizados para los experimentos de mutagénesis dirigida a un sitio

^b Plásmidos mutagenizados obtenidos utilizados para los experimentos de transfección

^c La secuencia de aminoácidos situada en las posiciones de aminoácidos 318-323 está mostrada con el código de una letra y los aminoácidos cambiados en comparación con la secuencia de D78 están en negrita

Ejemplo 2

Propiedades antigénicas de los mutantes del IBDV clásico

Material y Métodos

5 **Caracterización del virus mutante mediante un ensayo de neutralización**

Con el fin de analizar si el virus generado era neutralizado por anticuerpos monoclonales, se llevó a cabo un ensayo de neutralización esencialmente según está descrito (Schröder y col., J. Gen. Virol., 81, 533-540, 2000). Brevemente, se pipetearon 100 µl de una solución

de virus que contenía 750 TCID₅₀/100 µl en cada uno de los pocillos de una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos, con la excepción del primer pocillo de cada fila. Posteriormente, se pipetearon 100 µl de cada uno de los diferentes moabs (67, B69, 57, R63) o de un suero policlonal anti-IBDV de conejo en el primer pocillo vacío de cada fila. A los pocillos que contenían los anticuerpos, se añadieron luego 100 µl de una suspensión de virus que contenía 1500 TCID₅₀/100 µl. Después de mezclar el virus y el suero, se realizaron diluciones seriadas transfiriendo de manera seriada 100 µl/pocillo. Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron a cada pocillo 100 µl de células QM (10⁶ células/ml) y se incubaron a 37°C. Seis días después se valoraron los pocillos para determinar la presencia de CPE. Se determinó que el punto final del ensayo de VN para una muestra de suero era el recíproco de la dilución más elevada, expresada en log₂, en la cual no era visible el CPE.

Resultados

20 **Propiedades antigénicas en el ensayo de neutralización**

Con el fin de analizar si los mutantes generados podían ser neutralizados por los anticuerpos monoclonales apropiados, se llevaron a cabo ensayos de neutralización. Para este ensayo se seleccionaron pares de virus que mostraban un patrón de mAb diferente basado en un cambio de aminoácidos (D78, PS-D78; Mut1, PS-Mut1; Mut2, PS-Mut2) o el mismo patrón pero secuencias de aminoácidos diferentes (D78, Mut1, Mut2; PS-D78, PS-Mut1, PS-Mut2; Mut10, Mut11). Los resultados mostraron (Tabla 5) que la neutralización tenía lugar en la mayoría de los casos (D78, Mut1, Mut2, PS-D78, PS-Mut1, PS-Mut2, Mut11) con el mismo patrón que en el ensayo de fluorescencia. Una excepción fue Mut11, que no fue neutralizado por el mAb57, aunque era positivo en el ensayo de fluorescencia, indicando que el epítipo estaba presente pero había per-

dido su propiedad neutralizante.

Tabla 5: Ensayo de neutralización de los mutantes de IBDV utilizando un suero policlonal y anticuerpos monoclonales

Virus ^a	Patrón del panel en IIFA ^b				Anticuerpos utilizados en el ensayo de neutralización ^c				
	57	R63	67	B69	57	R63	67	B69	Anti-IBDV
rD78	-	+	-	+	<2 ^d	>2 ¹²	<2	2 ¹²	2 ¹²
PS-D78	-	+	+	+	<2	>2 ¹²	2 ¹⁰	2 ¹¹	2 ¹²
Mut1	-	+	-	+	<2	>2 ¹²	<2	2 ¹⁰	2 ⁸
PS-Mut1	-	+	+	+	<2	>2 ¹²	2 ¹¹	2 ¹⁰	2 ¹⁰
Mut2	-	+	-	+	<2	>2 ¹²	<2	2 ¹¹	2 ⁹
PS-Mut2	-	+	+	+	<2	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹⁰	2 ⁷
Mut10	+	-	-	+	2 ¹¹	<2	<2	2 ¹⁰	2 ⁹
Mut11	+	-	-	+	<2	<2	<2	2 ¹²	2 ⁸

^a IBDV recombinante utilizado en el ensayo de neutralización.

^b Resultados del patrón del panel en el ensayo de inmunofluorescencia indirecta utilizando los moabs (57, R63, 67, B69) según se muestra en la Tabla 4.

^c En el ensayo de neutralización cuatro moabs (57, R63, 67, B69) y un suero policlonal anti-IBDV de conejo.

^d Título de neutralización en log₂ del suero diluido.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AKZO Nobel NV

<120> Un mutante del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) que expresa epítomos neutralizantes del
 5 virus específicos para cepas clásicas y variantes del IBDV

<130> 2003-002-FF

<160> 35

<170> PatentIn versión 3.2

10

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Mutante del IBDV clásico

<400> 1

Gly Gly Gln Ala Gly Asp

1 5

20

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Mutante del IBDV clásico

<400> 2

Gly Gly Gln Ala Gly Glu

1 5

30

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Mutante del IBDV clásico

<400> 3

Asp Gly Gln Ala Gly Asp

1 5

5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Mutante del IBDV clásico

<400> 4

Asp Gly Gln Ala Gly Glu

1 5

15

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Mutante del IBDV clásico

<400> 5

Asn Gly Gln Ala Gly Glu

1 5

25

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Mutante del IBDV clásico

<400> 6

Gly Gly Gln Glu Gly Asp

1 5

35

<210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Mutante del IBDV clásico
 <400> 7

 Asp Gly Gln Glu Gly Asp
 1 5
 10
 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Mutante del IBDV clásico
 <400> 8

 Asn Gly Gln Glu Gly Asp
 1 5
 20
 <210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Mutante del IBDV clásico
 <400> 9

 Asp Gly Gln Glu Gly Glu
 1 5
 30
 <210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>

<223> Mutante del IBDV clásico

<400> 10

Gly Gly Gln Ala Gly Asp

1 5

5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Mutante del IBDV clásico

<400> 11

Gly Gly Gln Ala Gly Glu

1 5

15

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Mutante del IBDV clásico

<400> 12

Asp Gly Gln Ala Gly Asp

1 5

25

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Mutante de pD78A

<400> 13

Asp Gly Gln Ala Gly Glu

1 5

35

<210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Mutante del IBDV clásico
 <400> 14

 Asp Gly Gln Glu Gly Asp
 1 5
 10
 <210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Mutante del IBDV clásico
 <400> 15

 Asn Gly Gln Ala Gly Asp
 1 5
 20
 <210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Mutante del IBDV clásico
 <400> 16

 Asn Gly Gln Ala Gly Glu
 1 5
 30
 <210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>

<223> Mutante del IBDV clásico

<400> 17

Asn Gly Gln Glu Gly Asp

1 5

5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Mutante del IBDV clásico

<400> 18

Asn Gly Gln Glu Gly Asp

1 5

15

<210> 19

<211> 31

<212> PRT

<213> Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa

20 <400> 19

Ser Asp Arp Pro Arg Val Tyr Thr Ile Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln

1 5 10 15

Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly Val Thr Ile Thr Leu Phe

20 25 30

25

<210> 20

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio

<400> 20

gaccatgaca tctgatcccc tgccctgaccg tcacttttgg aggtc 45

35

<210> 21
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
5 <220>
<223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
<400> 21
gaccatgaca tctggttcccc tgctgaccg tcacttttgg aggtc 45
10
<210> 22
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
<400> 22
gaccatgaca tctgatcccc ttctgaccg tcacttttgg aggtc 45
20
<210> 23
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
25 <220>
<223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
<400> 23
gaccatgaca tctggttcccc ttctgaccg tcacttttgg aggtc 45
30
<210> 24
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
35 <220>

<223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
<400> 24
gaccatgaca tctggtcccc tgccctgacca ccacttttgg aggtc 45
5
<210> 25
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
10 <220>
<223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
<400> 25
gaccatgaca tctgatcccc ttccctgacca ccacttttgg aggtc 45
15
<210> 26
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
20 <220>
<223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
<400> 26
gaccatgaca tctggtcccc ttccctgacca ccacttttgg aggtc 45
25
<210> 27
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
30 <220>
<223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
<400> 27
gaccatgaca tctgatcccc tgccctgaccg ttacttttgg aggtc 45
35

<210> 28
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
5 <220>
<223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
<400> 28
gaccatgaca tctggttcccc tgctgaccg ttacttttgg aggtc 45
10
<210> 29
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
<400> 29
gaccatgaca tctgatcccc ttctgaccg ttacttttgg aggtc 45
20
<210> 30
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
25 <220>
<223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
<400> 30
gaccatgaca tctggttcccc ttctgaccg ttacttttgg aggtc 45
30
<210> 31
<211> 39
<212> ADN
<213> Artificial
35 <220>

<223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
 <400> 31
 attgttaccc caccggtttg gtactgtgat gagaattgg 39
 5
 <210> 32
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
 <400> 32
 gattgttacc ccaccgcttt ggtactgtga 30
 15
 <210> 33
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> oligonucleótido para mutagénesis dirigida a un sitio
 <400> 33
 gtcactgcta ggctcccaga tgccgaccat gacatc 36
 25
 <210> 34
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Mutante del IBDV clásico
 <400> 34

Asp Gly Gln Glu Gly Glu

1

5

35

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Mutante del IBDV clásico

<400> 35

Gly Gly Gln Glu Gly Glu

1

5

10

REIVINDICACIONES

1.- Un método para la preparación de un mutante del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) clásico que expresa una proteína VP2 que se une al anticuerpo monoclonal (moab) B69 y al moab 67, secretados por las líneas celulares de hibridomas HB-9437 y HB-11122, respectivamente, depositadas en la ATCC, Rockville, EE.UU., **que se caracteriza porque** una o más mutaciones son introducidas en la región codificadora de VP2 de una cepa clásica de IBDV, de tal manera que

(i) un codón para el aminoácido en posición 222 codifica serina o treonina, y
(ii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos para las posiciones 318-323 codifica una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC ID N^{os} 1-5.

2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **que se caracteriza porque** la mutación es introducida en el codón para el aminoácido en posición 222 en la región codificadora de VP2 de una cepa clásica del IBDV que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N^o 1.

3.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **que se caracteriza porque** la proteína VP2 se une también al moab R63 secretado por la línea celular de hibridomas HB-9490, depositada en la ATCC, Rockville, EE.UU.

4.- Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **que se caracteriza porque** la región que codifica VP2 contiene un codón para el aminoácido en posición 330 que codifica arginina o serina.

5.- Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, **que se caracteriza porque** una o más mutaciones son introducidas en la región codificadora de VP2 de la cepa D78 del IBDV.

6.- Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, **que se caracteriza porque** una o más mutaciones son introducidas en un segmento A genómico de un IBDV clásico, preferiblemente de la cepa D78 del IBDV.

5 7.- Un mutante del IBDV clásico obtenible mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **que se caracteriza porque** una o más mutaciones son introducidas en la región codificadora de VP2 de una cepa clásica del IBDV, de tal manera que

10 (i) un codón para el aminoácido en posición 222 codifica treonina, y

(ii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos para las posiciones 318-323 codifica una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC ID N^{os} 1-5.

15 8.- Un mutante del IBDV clásico obtenible mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **que se caracteriza porque** una o más mutaciones son introducidas en la región codificadora de VP2 de una cepa clásica del IBDV, de tal manera que

20 (i) un codón para el aminoácido en posición 222 codifica serina o treonina, y

(ii) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos para las posiciones 318-323 codifica una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC ID N^{os} 2-5.

25 9.- Un mutante del IBDV clásico de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, **que se caracteriza porque** la proteína VP2 se une también al moab R63, secretado por la línea celular de hibridomas HB-9490, depositada en la ATCC, Rockville, EE.UU.

30 10.- Un mutante del IBDV clásico de acuerdo con las reivindicaciones 7 - 9, **que se caracteriza porque** la región codificadora contiene un codón para el aminoácido en posición 330 que codifica arginina o serina.

35

11.- Un mutante del IBDV clásico de acuerdo con las reivindicaciones 7 - 10, **que se caracteriza por-
que** el mutante contiene una o más mutaciones en la región codificadora de VP2 de la cepa D78 del IBDV.

5 12.- Un mutante del IBDV clásico de acuerdo con las reivindicaciones 7 - 11, **que se caracteriza por-
que** el mutante contiene un segmento A genómico de un IBDV clásico, preferiblemente de la cepa D78 del IBDV.

10 13.- Una vacuna para ser utilizada en la protección de las aves de corral contra la enfermedad causada por la infección con IBDV, **que se caracteriza porque** la vacuna comprende un mutante del IBDV clásico de acuerdo con las reivindicaciones 7 - 12, junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

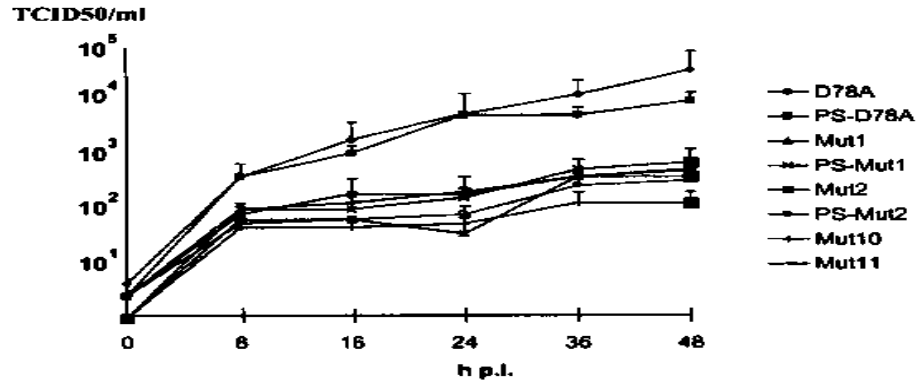
15 14.- Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 13, **que se caracteriza porque** el mutante del IBDV clásico está en forma viva.

20 15.- Una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 13 ó 14, **que se caracteriza porque** la vacuna contiene además uno o más componentes vacuna de otros patógenos infecciosos para las aves de corral.

16.- Una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 13 - 15, **que se caracteriza porque** la vacuna contiene un adyuvante.

25 17.- Un método para la preparación de una vacuna para ser utilizada en la protección de las aves de corral contra la enfermedad causada por la infección con IBDV, **que se caracteriza porque** un mutante del IBDV clásico de acuerdo con las reivindicaciones 7 - 12 es
30 mezclado con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Cinética de Crecimiento en Cultivo Celular



Grupo 1: **D78A ; Mut1 ; Mut2:** 63+, 69+, 57-, 67-
 Grupo 2: **PS-D78A ; PS-Mut1 ; PS-Mut2:** 63+, 69+, 57-, 67+
 Grupo 3: **Mut10 ; Mut11:** 63-, 69+, 57+, 67-