

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 666**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/23** (2006.01)  
**A61K 39/135** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61P 31/20** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2016** **PCT/US2016/051736**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017** **WO17058521**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2016** **E 16771050 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2023** **EP 3355915**

54 Título: **Vacunas de partículas similares a virus (VLP) del parvovirus canino (CPV) y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**29.09.2015 US 201562234196 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.07.2024**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA INC. (100.0%)**  
**3239 Satellite Boulevard, Bldg. 500**  
**Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**DAVID, FREDERIC;**  
**HANNAS-DJEBBARA, ZAHIA;**  
**POULET, HERVE y**  
**MINKE, JULES, MAARTEN**

74 Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

### Observaciones:

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

ES 2 974 666 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 de partículas similares a virus (VLP) del parvovirus canino (CPV) y usos de las mismas

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] La presente invención hace referencia al campo de vacunología, y más particularmente, al desafío de superar anticuerpos derivados de la madre (MDA, *maternally-derived antibodies*). Más particularmente, la presente invención se refiere a la superación de MDA mediante la administración a animales, incluyendo perros, de una combinación de partículas similares a virus y virus vivos modificados (MLV, *modified live virus*), en combinación simultánea, administración posterior o a través de un régimen de administración de vacunación principal seguida de un refuerzo. Incluso más particularmente, la presente invención se refiere a composiciones para obtener inmunidad protectora frente a parvovirus (CPV) en perros y cachorros, tanto si MDA de CPV están presentes o no en los perros y cachorros.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

[0002] El parvovirus canino (CPV) es principalmente un patógeno entérico que infecta a perros, especialmente a perros jóvenes. La infección por parvovirus se caracteriza por diarrea aguda, fiebre y leucopenia en perros y cachorros que tienen más de 4 o 5 semanas de edad, y en casos raros, enfermedad miocárdica en cachorros más jóvenes. La tasa de mortalidad de la enfermedad en perros no vacunados es muy alta. Y aunque existen varias vacunas contra CPV, la presencia de anticuerpos derivados de la madre (MDA) tiende a bloquear la capacidad de vacunas de otro modo eficaces de proporcionar inmunidad protectora.

[0003] Los cachorros recién nacidos adquieren inmunidad pasiva frente a las enfermedades, tal como infección por CPV, cuando se amamantan de su madre, especialmente durante los dos primeros días de su vida. Un cachorro que es lactante recibe el calostro de la leche que se produce primero y (MDA) en el calostro pasa al cachorro. Para perros, y muchos otros mamíferos, el nivel de inmunidad pasiva proporcionado por el calostro disminuye gradualmente cuando se catabolizan los MDA. Por tanto, la edad a la que un cachorro ya no está protegido por MDA varía ampliamente, dependiendo de la ingesta de calostro por el cachorro, la cantidad de anticuerpos contenidos en el mismo y varios otros factores.

[0004] Un desafío particular cuando se vacuna a los cachorros es la administración de vacunas de acuerdo con un periodo de tiempo que proporcione protección que se solapa con la protección proporcionada por los anticuerpos maternos y que empieza cuando los anticuerpos maternos disminuyen. Actualmente, los regímenes de vacunación de cachorros empiezan habitualmente a las aproximadamente 6 semanas de edad y las vacunas de refuerzo se administran aproximadamente cada 3 semanas a partir de entonces, por ejemplo, a las 9, 12 y a veces 15 semanas. Sin embargo, para que este régimen proporcione protección completa, la primera dosis de vacuna debería provocar una respuesta inmunitaria protectora de inmediato. Esta expectativa es completamente irreal debido, en parte, a la inmadurez del sistema inmunitario de los cachorros y el periodo de tiempo que se necesita para incrementar una respuesta inmunitaria. Además, la situación se complica adicionalmente debido a que los MDA residuales, que pueden durar hasta aproximadamente seis semanas de edad, neutralizan vacunas de MLV. Actualmente, todas las vacunas contra CPV comercialmente disponibles son vacunas de MLV.

[0005] De manera importante, aunque un cachorro con MDA de CPV puede no responder a ninguna vacuna de MLV contra CPV, todavía puede infectarse con una cepa de campo virulenta de CPV y desarrollar parvovirus canina. Debido a la interferencia de MDA, la protección completa normalmente no se desarrolla hasta que se administre el ciclo completo de vacunación. Como consecuencia, la mortalidad basada en la edad debido a la infección con CPV alcanza el máximo antes de completar los protocolos de vacunación. Por consiguiente, desarrollar una vacuna que inmuniza de manera activa a los cachorros después de la primera inyección, y en presencia de MDA, es una de las necesidades no cumplidas más importantes en medicina canina.

[0006] Otro desafío en veterinaria canina es el tratamiento de cáncer, por ejemplo, en perros. Existen muchas limitaciones entre las herramientas existentes de terapia del cáncer, especialmente para perros geriátricos. La administración de parvovirus oncolíticos para la eliminación de células cancerígenas es muy prometedora como un tratamiento de cáncer eficaz (Rommelaere et al, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21:185-195, 2010; y la Patente de Estados Unidos N°. 7.179.456 de Rommelaere et al.) y podría aplicarse a los caninos. Sin embargo, la existencia de anticuerpos preexistentes contra parvovirus (por ejemplo, como un resultado de vacunación) haría que este procedimiento fuera ineficaz, debido a que los parvovirus se neutralizarían por los anticuerpos existentes. Adicionalmente, la terapia genética rara vez se realiza en la actualidad, pero sería un procedimiento prometedor de tratamiento de varios trastornos, si se identifican vectores de ácido nucleico adecuados. Por consiguiente, los procedimientos para superar los anticuerpos existentes serían útiles en las aplicaciones más allá de la vacunación.

[0007] En vista de lo anterior, existe una necesidad de vacunas con una seguridad mejorada y buena eficacia, que incluyen la capacidad de superar vacunas que incluyen MDA que proporcionan protección contra cepas de CPV heterólogas.

[0008] T. V. Nguyen et al: «High Titers of Circulating Maternal Antibodies Suppress Effector and Memory B-Cell Responses Induced by an Attenuated Rotavirus Priming and Rotavirus-Like Particle-Immunostimulating Complex Boosting Vaccine Regimen», *Clinical and Vaccine Immunology*, volumen 13, número 4, 1 de abril de 2006, describe los efectos de anticuerpos derivados de la madre tras la respuesta inmunitaria a vacunas de rotavirus.

[0009] M. P. Azevedo et al: «Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease», *Expert Review of Vaccines*, volumen 12, número 2, 9 de febrero de 2013 (2013-02-09), páginas 169-181, evalúa la eficacia de vacunas con partículas similares al virus de (VLP) en un modelo de cerdo gnotobiótico.

[0010] Xu Jin et al: «Self-assembly of virus-like particles of canine parvovirus capsid protein expressed from *Escherichia coli* and application as virus-like particle vaccine», *Applied Microbiology and Biotechnology*, volumen 98, Número 8, 12 de enero de 2014, describe la producción de VLPs de parvovirus canino a partir de VP2 de CPV producida en *E. coli*, que son capaces de inducir anticuerpos anti-CPV en ratones después de vacunación subcutánea.

[0011] H. Feng et al: «Canine Parvovirus VP2 Protein Expressed in Silkworm Pupae Self-Assembles into Virus-Like Particles with High Immunogenicity», *PLoS ONE*, volumen 9, número 1, 17 de enero de 2014, página e79575, describe la expresión de VP2 de CPV que forma VLP en un sistema de baculovirus, el autoensamblaje de VLP en células y pupas de insectos y la inducción de una respuesta inmunitaria en ratones y perros.

[0012] Gilbert L. et al: «Truncated forms of viral VP2 proteins fused to EGFP assemble into fluorescent parvovirus-like particles», *Revista de Nanobiotecnología*, volumen 4, Número 1, 8 de diciembre de 2006, describe VP2 de CPV recombinante y mutantes por eliminación del extremo N-terminal de la misma, fusionada con el extremo C-terminal de proteína fluorescente verde potenciada y su capacidad para formar VLPs.

[0013] Hurtado A. et al: «Identification of domains in canine parvovirus VP2 essential for the assembly of virus-like particles», *Revista de Virología*, volumen 70, Número 8, 1996, describe mutantes por eliminación del extremo N-terminal y bucle de superficie de VP2 de CPV y su capacidad de formar VLPs.

## **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

[0014] En un aspecto, la presente invención da a conocer una vacuna combinada que comprende una partícula similar al virus (VLP) de parvovirus canino (CPV) y un virus vivo modificado (MLV) de CPV, en la que tanto la VLP como el MLV provocan una respuesta inmunitaria frente a CPV, y en la que la vacuna combinada supera los anticuerpos derivados de la madre (MDA).

[0015] En otro aspecto la presente invención da a conocer una vacuna combinada para ser utilizada en un procedimiento que provoca una respuesta inmunitaria en un animal frente a CPV que comprende la administración de dicha vacuna combinada al animal.

[0016] En el presente documento se describen composiciones farmacéuticas que comprenden antígenos de partículas similares al virus (VLP) de CPV, vacunas de virus vivo modificado (MLV) de CPV, procedimientos de vacunación contra CPV y kits para ser utilizados con tales procedimientos y composiciones.

[0017] Se dan a conocer composiciones o vacunas que comprenden un polipéptido de CPV antigénico y fragmentos y variantes del mismo. Los antígenos de CPV y los fragmentos y las variantes de los mismos poseen propiedades inmunogénicas y protectoras. Los antígenos de CPV pueden generarse producirse por un vector de expresión de baculovirus en células de insectos y ensamblarse en cápsides vacías de CPV o VLPs (partículas similares a virus) de CPV.

[0018] Los polipéptidos antigénicos y fragmentos y variantes de los mismos se pueden formular en vacunas con o sin virus vivos modificados de CPV y/o composiciones farmacéuticas. Tales vacunas o composiciones se pueden utilizar para vacunar un animal y proporcionar protección frente a cepas de CPV homólogas y heterólogas.

[0019] De manera importante, los inventores han descubierto de manera sorprendente e inesperada que la administración de composiciones que comprenden tanto un MLV como una VLP (cada uno un antígeno que corresponde al mismo patógeno, pero no necesariamente que codifica o proporciona la misma parte o gen o subunidad del mismo), es capaz de superar los MDA para provocar inmunidad protectora frente a una estimulación virulenta posterior por dicho patógeno. Por consiguiente, en una realización particular, la presente invención da a conocer vacunas de combinación que comprenden tanto MLV de CPV como VLP de CPV, que provocan inmunidad protectora en cachorros tanto si los cachorros tienen o no MDA circulante contra CPV.

[0020] La divulgación da a conocer vacunas de combinación que comprenden tanto MLV como VLP que corresponden a otros patógenos, donde la interferencia de MDA es un problema. Por ejemplo, los animales bovinos, porcinos, felinos, caprinos, ovinos, equinos y otros animales jóvenes tienen MDA circulante contra varios patógenos. En cada caso, la presencia de estos MDA pueden interferir con la eficacia de las vacunas.

[0021] Ahora que se ha realizado esta divulgación, los inventores contemplan que la administración de una combinación de MLV + VLP superará MDA independientemente del patógeno. Los patógenos pueden incluir, pero sin limitarse a los mismos: virus de la enfermedad de pies y boca (FMDV), virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), virus de moquillo canino (CDV), panleucopenia felina (FPL) y virus de gripe equina (EIV). El experto entenderá este enfoque, siempre y cuando MLV + VLP se puedan aplicar en cualquier caso donde la interferencia de MDA es un desafío.

[0022] También se dan a conocer kits que comprenden al menos un polipéptido antigénico o fragmento o variante del mismo y las instrucciones del uso.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0023] La siguiente descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplo, pero que no pretende limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse en combinación con los dibujos que la acompañan, en los que:

La Figura 1 describe una tabla que resume las secuencias de ADN y proteína;

La Figura 2 describe el mapa de plásmido de pMEB072;

La Figura 3 describe el mapa de plásmido de pMEB073;

La Figura 4 es una micrografía de electrones de VLPs de CPV, que muestra la forma y morfología correctos de viriones similares a parvovirus;

La Figura 5 es una transferencia Western que muestra los niveles de VLPs de CPV y los datos adjuntos;

La Figura 6 es una transferencia Western que muestra los niveles de VLPs de CPV y los datos adjuntos;

La Figura 7 es un gráfico que muestra los títulos de CPV determinados por ELISA después de la vacunación;

La Figura 8 es un gráfico que muestra los títulos de CPV determinados por ELISA después de la vacunación con cepas Souriou & Bari (dosis baja, sin adyuvantes) o VLP de CPV producida por pMEB072. El comienzo es más rápido en el grupo que recibe VLP;

La Figura 9 es un gráfico que muestra los títulos de CPV determinados por ELISA después de la vacunación con cepas Souriou & Bari (dosis intermedia, con adyuvantes) o VLP de CPV producidas por pMEB073 (con Al(OH)<sub>3</sub>+saponina). El comienzo es todavía más rápido en el grupo que recibe VLP;

La Figura 10 es un gráfico que muestra los títulos de CPV determinados por ELISA después de la vacunación con cepas Souriou & Bari (dosis alta) o VLP de CPV producidas por pMEB073 (con Al(OH)<sub>3</sub>+saponina). El comienzo es rápido en los tres grupos;

La Figura 11 es una alineación de ClustalW de las SEQ ID NOs: 1, 3, 4 y 6;

La Figura 12 es un gráfico que muestra títulos de anticuerpo anti-CPV de individuo (IHA) de acuerdo con el tratamiento (MLV o MLV + VLP el día 0) y el día. Cada línea corresponde a un individuo y el tamaño de los puntos corresponde al número de valores a la combinación indicada de día y título. Únicamente se muestran los datos de perros que tienen un título de IHA del día 0  $\geq$  40;

La Figura 13 es un gráfico que muestra títulos de anticuerpo anti-CPV promedio (IHA) de acuerdo con el tratamiento (MLV o MLV + VLP el día 0) y el día. Los cuadros representan la mediana, los percentiles 25º y 75º, y los extremos de los bigotes representan valores en 1,5 veces el intervalo intercuartílico; cada símbolo representa un valor;

La Figura 14 es un gráfico que muestra los títulos de anticuerpo anti-CPV promedio (determinados por ELISA log10 DO50) de acuerdo con el día después de la vacunación y el grupo (Gr A: VLP SC 500 µl; Gr D VLP oral; Gr E Ad5 CPV 8,64 log10; Gr G Ad5 CDV). Los perros se vacunaron el día 0 y el día 28. Las medias se representan +/- un error estándar de la media; cada punto representa un valor;

La Figura 15 es un gráfico que muestra el porcentaje de respondedores del estudio divulgado en el Ejemplo 7;

La Figura 16 es un gráfico que muestra los títulos de HAI;

La Figura 17 es un gráfico que muestra la media geométrica de títulos de anticuerpos neutralizantes de CPV.

La Figura 18 es un gráfico que muestra el porcentaje de respondedores por grupo y día;

La Figura 19 es un gráfico que muestra la media geométrica de títulos de anticuerpos contra CPV por grupo y día.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

[0024] Cualquier referencia en la descripción a los procedimientos de tratamiento hace referencia a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para el uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

[0025] Se dan a conocer composiciones que comprenden un polipéptido de CPV, antígeno y fragmentos y variantes de los mismos que provocan una respuesta inmunitaria. Los polipéptidos antigénicos o fragmentos o variantes de los mismos se producen por un vector de expresión de baculovirus en células de insectos. Los polipéptidos antigénicos o fragmentos o variantes de los mismos se pueden formular en vacunas con o sin virus vivos modificados de CPV o composiciones farmacéuticas y se pueden utilizar para provocar o estimular una respuesta protectora en un animal. En una realización, el antígeno polipéptido es un polipéptido de cápside de CPV o un fragmento activo o variante del mismo. Los antígenos de CPV pueden ensamblarse en cápsides vacías de CPV o VLPs (partículas similares a virus) de CPV.

**[0026]** Se reconoce que los polipéptidos antigénicos de la presente invención pueden ser polipéptidos de longitud completa o fragmentos o variantes activos de los mismos. Mediante «fragmentos activos» o «variantes activas» se pretende que los fragmentos o las variantes retengan la naturaleza antigénica del polipéptido. Por tanto, la divulgación abarca cualquier polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de CPV que provoca una respuesta inmunogénica en un animal. El polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de CPV puede ser cualquier polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de CPV, tal como, pero sin limitarse a los mismos, una proteína, un péptido o un fragmento o variante del mismo, que provoca, induce o estimula una respuesta en un animal, tal como un animal ovino, un bovino, un caprino o un porcino.

**[0027]** En el presente documento se describen vacunas o composiciones para caninos que pueden comprender una cantidad eficaz de un antígeno de CPV recombinante. En algunas realizaciones, las vacunas o las composiciones son sin adyuvantes y pueden comprender un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

**[0028]** En algunas realizaciones, la respuesta en el animal es una respuesta inmunitaria protectora.

**[0029]** Por «animal» se entiende mamíferos, pájaros y similares. Animal o huésped incluye a mamíferos y seres humanos. El animal puede seleccionarse entre el grupo que consiste en equinos (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felinos (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros gatos grandes y otros felinos que incluyen guepardos y lince), ovinos (por ejemplo, ovejas), bovinos (por ejemplo, ganado), porcinos (por ejemplo, cerdos), caprinos (por ejemplo, cabras), aviar (por ejemplo, gallinas, patos, gansos, pavos, codornices, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos, avestruces, emús y casuarios), primates (por ejemplo, prosimios, tarseros, monos, gibones, simios) y peces. El término «animal» incluye también a un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo las etapas embrionaria y fetal.

**[0030]** A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por un experto en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Los términos en singular «un», «una» y «el/la» incluyen referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra «o» pretende incluir «y» a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

**[0031]** Cabe indicar que en esta divulgación y particularmente en las reivindicaciones y/o los párrafos, los términos tales como «comprende», «comprendido», «que comprende» y similares pueden tener el significado atribuido a ellos en la Legislación de patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar «incluye», «incluido», «que incluye» y similares; y aquellos términos tales como «que consiste esencialmente en» y «consiste esencialmente en» tienen el significado atribuido a ellos en la Legislación de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, se contemplan elementos no recitados explícitamente, pero se excluyen los elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan una característica básica o novedosa de la presente invención.

**[0032]** Los polipéptidos antigénicos de la presente invención son capaces de proteger contra CPV. Es decir, son capaces de estimular una respuesta inmunitaria en un animal. El término «antígeno» o «inmunógeno» significa 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 al presentarse a un animal huésped; un polipéptido, un epítipo, un hapteno o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o el antígeno pueden comprender una toxina o una antitoxina.

**[0033]** El término «proteína, polipéptido o péptido inmunogénico», tal como se utiliza en el presente documento, incluye los polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido de que cuando se administran al huésped, son capaces de provocar una respuesta inmunitaria de tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. De manera preferente, el fragmento de proteína es tal que tiene sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína total. Por tanto, un fragmento de proteína, según la presente invención, comprende o consiste esencialmente en o consiste en al menos un epítipo o un determinante antigénico. Una proteína o un polipéptido «inmunogénico», tal como se utiliza 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 epítipos y, por tanto, provoca la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Dichos fragmentos pueden identificarse usando cualquier conjunto de técnicas de mapeo de epítipos bien conocidas en el sector. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Volumen 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Por ejemplo, los epítipos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando simultáneamente grandes cantidades de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a las partes de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con los anticuerpos mientras los péptidos todavía estén unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en el sector y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N°. 4.708.871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. De manera similar, los epítipos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos, tal como, por ejemplo, mediante la cristalografía de los rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, supra. Los procedimientos especialmente aplicables a las proteínas de *T. parva* se describen completamente en PCT/US2004/022605.

**[0034]** Tal como se describe, la presente invención abarca fragmentos y variantes activos del polipéptido antigénico. De este modo, el término «proteína, polipéptido o péptido inmunogénico» contempla adicionalmente eliminaciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre y cuando el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica tal como se define en el presente documento. El término «variación conservadora» indica la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo similar biológicamente o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de nucleótidos, de tal modo que el residuo de aminoácido codificado no cambie o es otro residuo similar biológicamente. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservadora, 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 no cargados: glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Fenilalanina, triptófano y tirosina a veces se clasifican como aminoácidos aromáticos. Los ejemplos de variaciones conservadoras 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 conservadora similar de un aminoácido por un aminoácido relacionado estructuralmente que no tendrá un efecto mayor 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 se encuentran, por 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 conservadora» también incluye el uso de un aminoácido sustituido en el lugar de un aminoácido original no sustituido a condición de que los anticuerpos desarrollados contra el polipéptido sustituido también presenten inmunoreacción con el polipéptido no sustituido.

**[0035]** El término «epítipo» se refiere al sitio en un antígeno o un hapteno al que responden las células B y/o las células T. El término también se usa indistintamente con «determinante antigénico» o «sitio determinante antigénico». Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

**[0036]** Una «respuesta inmunológica» a una composición o una vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por los anticuerpos a una composición o una vacuna de interés. Normalmente, 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, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o la vacuna de interés. De manera preferente, el huésped mostrará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora de tal manera que se potenciará la resistencia frente a una nueva infección y/o se reducirá la gravedad clínica de la enfermedad. Dicha protección se demostrará mediante una reducción o una falta de síntomas que normalmente presenta un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral reducido en el huésped infectado.

**[0037]** Los antígenos sintéticos también se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, poliepitopos, epitopos flanqueantes y otros antígenos recombinantes o derivados sintéticamente. Véanse, por ejemplo, Bergmann et al., 1993; Bergmann et al., 1996; Suhrbier, 1997; Gardner et al., 1998. Los fragmentos inmunogénicos, para los fines de la presente invención, incluirán normalmente 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 existe un límite superior crítico para la longitud del fragmento, que podría comprender casi la longitud completa de la secuencia de la proteína, o incluso una proteína de fusión que comprenda al menos un epítipo de la proteína.

**[0038]** Por consiguiente, una estructura mínima de un polinucleótido que expresa un epítipo es aquella que comprende o consiste esencialmente en o consiste en los nucleótidos que codifican un epítipo o un determinante antigénico de un polipéptido de CPV. Un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido de CPV puede comprender o consistir esencialmente 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. Se pueden utilizar en la práctica de la presente invención los procedimientos de determinación de epitopos, tal como la generación de bibliotecas de péptidos superpuestos (Hemmer et al., 1998), Pepscan (Geysen et al., 1984; 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).

**[0039]** El término «ácido nucleico» y «polipéptido» hace referencia a ARN o ADN que es lineal o ramificado, de cadena única o doble o un híbrido de las mismas. El término abarca también los híbridos de ARN/ADN. Los siguientes son ejemplos no limitativos de los polinucleótidos: un gen o un 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 y cebadores de ácido nucleico. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de enlace, tales como fluororribosa y tiolato, y ramificaciones de nucleótidos. Se puede modificar adicionalmente la secuencia de nucleótidos después de la polimerización, tal como mediante conjugación, con un

componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluidas en esta definición son los "caps", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural por un análogo y la introducción de los medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes del marcado, otros polinucleótidos o el soporte sólido. Los polinucleótidos pueden obtenerse mediante la síntesis química o derivarse de un microorganismo.

**[0040]** El término «gen» se utiliza en un sentido amplio para hacer referencia a cualquier segmento de polinucleótido asociado a una función biológica. Por consiguiente, los genes incluyen intrones y exones como en una secuencia genómica o solamente las secuencias de codificación como en ADNc y/o las secuencias reguladoras necesarias para su expresión. Por ejemplo, el gen también hace referencia a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional o codifica una proteína específica y que incluye secuencias reguladoras.

**[0041]** La divulgación comprende adicionalmente una cadena complementaria para un polinucleótido que codifica un antígeno, un epítipo o un inmunógeno de CPV. La cadena complementaria puede ser polimérica y de cualquier longitud y puede contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y análogos en cualquier combinación.

**[0042]** Los términos «proteína», «péptido», «polipéptido» y «fragmento del 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 abarcan también un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de forma natural o mediante la intervención; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje o bioactivo.

**[0043]** Un componente biológico «aislado» (tal como un ácido nucleico o proteína u orgánulo) hace referencia a un componente que ha sido sustancialmente separado o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente es de origen natural, por ejemplo, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y las proteínas que han sido «aislados» incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos estándares de purificación. El término abarca también ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante tecnología recombinante, así como síntesis química.

**[0044]** El término «purificado», tal como se utiliza en el presente documento, no requiere pureza absoluta, más bien, pretende ser un término relativo. Por consiguiente, por ejemplo, una preparación de polipéptidos purificados es aquella en la que el polipéptido está más enriquecido que el polipéptido en su entorno natural. Es decir, el polipéptido está separado de componentes celulares. Por «sustancialmente purificado» se entiende que dicho polipéptido representa diferentes realizaciones, en las que al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 %, o más de los componentes celulares o materiales celulares han sido eliminados. Del mismo modo, el polipéptido puede estar parcialmente purificado. Por «parcialmente purificado» se entiende que se elimina menos del 60 % de los componentes celulares o material celular. Lo mismo se aplica a los polinucleótidos. Los polipéptidos divulgados en el presente documento pueden purificarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica.

**[0045]** Tal como se indica anteriormente, los polipéptidos antigénicos o fragmentos o variantes de los mismos son polipéptidos antigénicos de CPV que se producen por un vector de expresión de baculovirus en células de insectos. Los fragmentos o variantes de los polinucleótidos divulgados y polipéptidos codificados por los mismos están abarcados también por la presente invención. Por «fragmento» se entiende una parte del polinucleótido o una parte de la secuencia de aminoácidos antigénica codificada por el mismo. Los fragmentos de un polinucleótidos pueden codificar fragmentos de proteínas que retienen la actividad biológica de la proteína nativa y, por lo tanto, poseen actividad inmunogénica, tal como se señala en otra parte del presente documento. Los fragmentos de la secuencia de polipéptidos conservan la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria protectora en un animal.

**[0046]** «Variantes» pretende significar secuencias sustancialmente similares. En lo que se refiere a los polinucleótidos, una variante comprende una eliminación y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en el polinucleótido nativo y/o una sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en el polinucleótido nativo. Tal como se utiliza en el presente documento, un polinucleótido o polipéptido «nativo» comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos de origen natural, respectivamente. Las variantes de un polinucleótido particular de la presente invención (es decir, el polinucleótido de referencia) se pueden evaluar también mediante la comparación del porcentaje de identidad de secuencia entre el polinucleótido codificado por una variante de polinucleótido y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. La «variante» de proteína pretende significar una proteína derivada de la proteína nativa mediante eliminación o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la proteína nativa y/o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la proteína nativa. Las variantes de proteínas abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, tienen la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria.

**[0047]** En un aspecto, la presente divulgación proporciona polipéptidos de CPV a partir de aislados de CPV. En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido que tiene una secuencia tal como se establece en las SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 6, 8-10 y una variante o un fragmento del mismo.

**[0048]** En otro aspecto, la divulgación se refiere a cápsides vacías de CPV o VLPs (partículas similares a virus) de CPV. Las cápsides pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en polipéptidos VP2 de CPV o variantes que incluyen versiones truncadas de los mismos.

**[0049]** Además, los homólogos de polipéptidos de CPV pretenden formar parte del alcance de la presente invención. Tal como se utiliza en el presente documento, el término «homólogos» incluye ortólogos, análogos y parálogos. El término «análogos» hace referencia a dos polinucleótidos o polipéptidos que tienen la misma función o similar, pero que han evolucionado por separado en organismos no relacionados. El término «ortólogos» hace referencia a dos polinucleótidos o polipéptidos de especies diferentes, pero que han evolucionado a partir de un gen ancestral común mediante especiación. Normalmente, los ortólogos codifican los polipéptidos que tienen las mismas funciones o similares. El término «parálogos» hace referencia a dos polinucleótidos o polipéptidos que están relacionados mediante duplicación dentro de un genoma. Normalmente los parálogos tienen funciones diferentes, pero estas funciones pueden estar relacionadas. Los análogos, los ortólogos y los parálogos de un polipéptido de CPV de tipo salvaje pueden diferenciarse del polipéptido de CPV de tipo salvaje mediante modificaciones postraduccionales, mediante diferencias en las secuencias de aminoácidos o mediante ambas. En particular, los homólogos de la divulgación mostrarán de manera general al menos el 80-85 %, 85-90 %, 90-95 % o 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con todas o una parte de secuencias de polinucleótido de CPV de tipo salvaje y mostrarán una función similar. Las variantes incluyen las variantes alélicas. El término «variante alélica» hace referencia 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 típicamente pueden dar lugar a una variación del 1-5 % en un polinucleótido o un polipéptido. Las variantes alélicas pueden identificarse mediante la secuenciación de la secuencia de ácido nucleico de interés en un conjunto de especies diferentes, que se puede llevar a cabo fácilmente utilizando sondas de hibridación para identificar el locus genético del mismo gen en esas especies. Cualquiera y todas de tales variaciones de ácido nucleico y los polimorfismos o variaciones de ácido nucleico resultante que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional del gen de interés, pretenden formar parte del alcance de la divulgación.

**[0050]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término «derivado» o «variante» hace referencia a un polipéptido o a un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una o más variaciones de aminoácido conservativas u otras modificaciones menores de tal modo que (1) el polipéptido correspondiente posee una función sustancialmente equivalente, cuando se compara con el polipéptido de tipo salvaje o (2) un anticuerpo desarrollado contra el polipéptido es inmunoreactivo con el polipéptido de tipo salvaje. Estos variantes o derivados incluyen polipéptidos que tienen modificaciones menores de las secuencias de aminoácidos primarias de polipéptido de CPV que pueden dar lugar a péptidos que poseen una actividad sustancialmente equivalente cuando se comparan con el polipéptido equivalente no modificado. Tales modificaciones pueden ser deliberadas, tal como mediante mutagénesis dirigida de sitio, o pueden ser espontáneas. El término «variante» contempla adicionalmente eliminaciones, adiciones y sustituciones de la secuencia, siempre y cuando el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica tal como se define en el presente documento.

**[0051]** El término «variación conservativa» significa la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo similar biológicamente o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de nucleótidos de tal modo que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán de manera general de naturaleza conservativa, tal como se describe anteriormente.

**[0052]** Los polinucleótidos de la divulgación incluyen secuencias que se degeneran como resultado del código genético, por ejemplo, uso de codones optimizados para un huésped específico. Tal como se utiliza en el presente documento, «optimizado» hace referencia a un polinucleótido que se modifica genéticamente para aumentar su expresión en una especie determinada. Para proporcionar polinucleótidos optimizados que codifican polipéptidos de CPV, se puede modificar la secuencia de ADN del gen de proteína CPV 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 a aquella que se encuentra de manera sustancial en dicha especie; 3) formar una secuencia de iniciación de dicha especie; o 4) eliminar las secuencias que causan desestabilización, poliadenilación inadecuada, degradación y terminación de ARN o aquellas que forman horquillas como estructura secundaria o sitios de empalme de ARN. Se puede lograr una expresión aumentada de proteína de CPV en dichas especies utilizando la frecuencia de distribución del uso de codones en eucariotas y procariotas, o en una especie particular. El término «frecuencia del uso de codones preferido» hace referencia a la preferencia mostrada por una célula huésped específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido determinado. Existen 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales son especificados por más de un codón. Por consiguiente, todas las secuencias de nucleótidos degeneradas se incluyen en la divulgación siempre y cuando la secuencia de aminoácidos del polipéptido de CPV codificado por la secuencia de nucleótidos no se altere de manera funcional.

**[0053]** Se puede establecer la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos mediante blast por pares de NCBI (National Center for Biotechnology Information) y la matriz blosum62, utilizando los parámetros estándar (véanse, por ejemplo, el algoritmo BLAST o BLASTX disponibles en el servidor de «National Center for Biotechnology

Information» (NCBI, Bethesda, Md., Estados Unidos), así como también en Altschul *et al.*; y, por consiguiente, este documento habla de utilizar el algoritmo o la matriz BLAST o BLASTX y BLOSUM62 mediante el término «blasts»).

[0054] El término «identidad» con respecto a las secuencias puede hacer referencia al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la secuencia más corta de las dos, en donde la alineación de las dos secuencias se puede determinar según el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur y Lipman), por ejemplo, utilizando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos y una penalización por hueco de 4 y se puede llevar a cabo de manera conveniente un análisis asistido por ordenador e interpretación de los datos de secuencia que incluye una alineación utilizando programas disponibles comercialmente (por ejemplo, Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc. CA). Cuando se dice que las secuencias de ARN son similares, o tienen un grado de identidad de secuencia u homología con las secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN es considerada igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN. Por consiguiente, las secuencias de ARN se encuentran en el alcance de la presente invención y pueden derivarse de las secuencias de ADN, considerando que la timidina (T) en la secuencia de ADN es igual al uracilo (U) en las secuencias de ARN.

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

[0056] Los siguientes documentos proporcionan algoritmos para la comparación de identidad u homología relativa de secuencias y de manera adicional o alternativamente con respecto a los anteriores, las enseñanzas en estas referencias se pueden utilizar para la determinación del 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, Haeblerle P y Smithies O. Y sin gran experimentación, el experto en la técnica puede consultar otros muchos programas o referencia para la determinación del porcentaje de homología.

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

[0058] La divulgación abarca adicionalmente los polinucleótidos de CVP contenidos en una molécula del vector o un vector de expresión y operativamente unidos a un elemento promotor y opcionalmente a un potenciador.

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

[0060] El término «recombinante» significa un polinucleótido semisintético, o de origen sintético que no tiene origen natural o está unido a otro polinucleótido en una disposición que no se encuentra 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 un 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 para animales ovinos, bovinos, caprinos y porcinos que pueden comprender una cantidad eficaz de un antígeno de CPV recombinante y un portador, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

[0063] La materia descrita en el presente documento está dirigida, en parte, a composiciones y procedimientos relacionados con el antígeno de CPV preparado en un sistema de expresión de baculovirus/células de insectos que era altamente inmunogénico y protegía a animales contra las estimulaciones con las cepas de CPV homólogas y heterólogas.

Composiciones

[0064] La presente invención se refiere a una vacuna o composición contra CPV que puede comprender una cantidad eficaz de un antígeno de CPV recombinante y un portador, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. En una realización, el antígeno de CPV recombinante se expresa mediante un vector de expresión de baculovirus en células de insectos.

[0065] En el presente documento se describe una vacuna o una composición que comprende cápsides vacías de

CPV o VLP (partículas similares a virus) de CPV. Las cápsides vacías de CPV o VLP (partículas similares a virus) de CPV se obtienen mediante la expresión de la proteína de la cápside de CPV.

**[0066]** La presente divulgación se refiere también a los procesos de preparación de estas vacunas, el uso de antígenos para la producción de estas vacunas y los procedimientos de vacunación que las utilizan.

**[0067]** En el presente documento se describen las secuencias de nucleótidos, en particular, ADNc, y secuencias de aminoácidos, modificadas en comparación con las secuencias naturales del virus. La divulgación se refiere también a los productos de expresión de las secuencias de nucleótidos modificadas y a los antígenos de CPV y virus que incorporan estas modificaciones.

**[0068]** La presente divulgación se refiere a cualquier polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de CPV que provoca una respuesta inmunogénica en un animal, tal como un animal ovino, bovino, caprino o porcino. El polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de CPV puede ser cualquier polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de CPV, tal como, pero no se limita a, una proteína, un péptido o fragmento de los mismos, que provoca, induce o estimula una respuesta en un animal, tal como un animal canino.

**[0069]** En una realización, en la que la composición inmunológica o vacuna de CPV es una composición inmunológica o vacuna recombinante, la composición o la vacuna que comprende un vector recombinante es sin adyuvante y puede comprender de manera opcional un excipiente, portador o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable; el vector recombinante es un vector de expresión de baculovirus que puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de CPV. El polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de CPV puede ser una proteína de cápside o cualquier fragmento de la misma.

**[0070]** Tal como se describe en el presente documento, la molécula de ácido nucleico que codifica uno o más antígenos de CPV es un ADNc que codifica una proteína de cápside de CPV. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, la molécula de ácido nucleico que codifica uno o más antígenos de CPV es un ADNc que codifica un fragmento de la proteína de cápside de CPV.

**[0071]** Tal como se describe en el presente documento, el antígeno de CPV puede derivar de la cepa 100869-1 de CPV.

**[0072]** La presente invención se refiere a una composición o una vacuna de CPV que puede comprender una cantidad eficaz de un antígeno de CPV recombinante. La composición o la vacuna de CPV no contiene un adyuvante. La composición o la vacuna de CPV puede contener de manera opcional un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

**[0073]** En el presente documento se describen polinucleótidos de CPV contenidos en una molécula del vector o un vector de expresión y operativamente unidos a un elemento promotor y opcionalmente a un potenciador.

**[0074]** En otro aspecto, la presente invención da a conocer polipéptidos de CPV que tienen una secuencia tal como se establece en SEQ ID Nos: 1, 3, 4, 6 o 8-10 y variantes o fragmentos de los mismos.

**[0075]** En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido que tiene al menos un 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 presente invención, particularmente con los polipéptidos que tienen una secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6 o 8-10.

**[0076]** En otro aspecto adicional, la divulgación proporciona fragmentos y variantes de los polipéptidos de CPV identificados anteriormente (SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6 o 8-10) que se pueden preparar fácilmente por un experto en la técnica utilizando técnicas de biología molecular bien conocidas.

**[0077]** Las variantes son polipéptidos homólogos que tienen una secuencia de aminoácidos de al menos un 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, 3, 4, 6 o 8-10.

**[0078]** Un fragmento inmunogénico de un polipéptido de CPV incluye al menos 8, 10, 15 o 20 aminoácidos consecutivos, al menos, 21 aminoácidos, al menos, 23 aminoácidos, al menos, 25 aminoácidos o, al menos, 30 aminoácidos de un polipéptido de CPV que tiene una secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6 o 8-10 o variantes de las mismas. Tal como se describe en el presente documento, un fragmento de un polipéptido de CPV incluye un epítipo antigénico específico que se encuentra en un polipéptido de CPV de longitud completa. Sin embargo, el experto entenderá que debe estar presente una parte suficiente del polipéptido de CPV para permitir la formación de VLP de CPV.

**[0079]** En otro aspecto, la presente invención da a conocer un polinucleótido que codifica un polipéptido de CPV, tal como un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO:

1, 3, 4, 6 o 8-10. En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 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, 3, 4, 6 o 8-10, o una variante conservadora, una variante alélica, un fragmento homólogo o inmunogénico que comprende al menos ocho o al menos diez aminoácidos consecutivos de uno de estos polipéptidos o una combinación de estos polipéptidos.

**[0080]** En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos tal como se establece en las SEQ ID NO: 2, 5, 7, 11 o 12 o una variante del mismo. En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un polinucleótido que tiene al menos un 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 polinucleótido que tiene una secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 2, 5, 7, 11 o 12 o una variante del mismo.

**[0081]** Los polinucleótidos de la presente invención pueden comprender secuencias adicionales, tales como secuencias codificantes adicionales dentro de la misma unidad de transcripción, elementos de control, tales como promotores, sitios de unión a ribosomas, UTR 5', UTR 3', terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, unidades adicionales de transcripción bajo control del mismo promotor o diferente, secuencias que permiten la clonación, expresión, recombinación homóloga y transformación de una célula huésped y cualquiera de tales construcciones según se pueda desear para proporcionar las realizaciones de la presente invención.

**[0082]** Los elementos para la expresión de un polipéptido, un antígeno, un epítipo o un inmunógeno de CPV están presentes de manera ventajosa en un vector de la presente invención. De manera mínima, esto 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 plásmidos y ciertos vectores virales, por ejemplo, vectores virales distintos a los virus de la viruela. Cuando el polinucleótido codifica un fragmento de la poliproteína, por ejemplo, un péptido de CPV, de manera ventajosa se coloca en el vector un ATG en 5' del marco de la lectura y un codón de terminación en 3'. Pueden estar presentes otros elementos de control de la expresión, tales como las secuencias potenciadoras, secuencias estabilizadoras, tales como las secuencias de intrones y señales que permiten la secreción de la proteína.

**[0083]** La divulgación 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 CPV. Tal como se describe en el presente documento, el vector contiene y expresa un polinucleótido que incluye, consiste esencialmente en, o consiste en un polinucleótido que codifica (y expresa ventajosamente) un antígeno, un epítipo o un inmunógeno de CPV, en un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. Por consiguiente, de acuerdo con la divulgación, el otro vector o vectores en la preparación comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polinucleótido que codifica, y en circunstancias apropiadas, el vector expresa una o más proteínas distintas de un polipéptido, un antígeno, un epítipo o un inmunógeno de CPV o un fragmento de los mismos.

**[0084]** Tal como se describe en el presente documento, el vector o los vectores en la preparación comprenden, o consisten esencialmente en, o consisten en un polinucleótido o polinucleótidos que codifican una o más proteínas o fragmento o fragmentos de las mismas de un polipéptido, un antígeno, un epítipo o un inmunógeno de CPV, expresando el vector o los vectores que polinucleótido o polinucleótidos. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, la preparación comprende uno, dos o más vectores que comprenden polinucleótidos que codifican y expresan, de manera ventajosa *in vivo*, un polipéptido, un antígeno de CPV, una proteína de fusión o un epítipo de los mismos.

**[0085]** Tal como se describe en el presente documento, el vector de expresión es un vector de plásmido o un vector de plásmido de ADN, en particular un vector de expresión *in vivo*. En un ejemplo específico, no limitativo, el plásmido pVR1020 o 1012 (VICAL Inc.; Luke et al., 1997; Hartikka et al., 1996, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.846.946 y 6.451.769) se puede utilizar como un vector para la inserción de una secuencia de polinucleótidos. El plásmido pVR1020 deriva de pVR1012 y contiene la secuencia de la señal tPA humana. En una realización, la señal tPA humana comprende desde el aminoácido M(1) hasta el aminoácido S(23) en Genbank con el número de acceso HUMTPA14. En otro ejemplo específico, no limitativo, el plásmido utilizado como un vector para la inserción de una secuencia de polinucleótidos puede contener la secuencia del péptido señal de IGF1 equino desde el aminoácido M(24) hasta el aminoácido A(48) en Genbank con el número de acceso U28070. La información adicional sobre los plásmidos de ADN que se puede consultar o utilizar en la práctica se encuentra, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 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.

**[0086]** El término plásmido cubre cualquier unidad de transcripción de ADN que comprende un polinucleótido de acuerdo con la presente invención y los elementos necesarios para su expresión *in vivo* en una célula o células del huésped o diana deseados; y, a este respecto, cabe indicar que un plásmido circular superenrollado o no

superenrollado, así como una forma lineal, pretende formar parte del alcance de la presente invención.

[0087] Cada plásmido comprende o contiene o consiste esencialmente en, además del polinucleótido que codifica un antígeno, un epítipo o un inmunógeno de CPV, opcionalmente fusionado con una secuencia de péptidos heteróloga, una variante, un análogo o un fragmento, unido operativamente a un promotor o bajo el control de un promotor o dependiente de un promotor. De manera general, es ventajoso emplear un promotor fuerte funcional en las células eucariotas. El promotor fuerte puede ser, pero no está limitado a, el promotor de citomegalovirus inmediatamente temprano (CMV-IE) de origen humano o murino, u opcionalmente que tiene otro origen, tal como de rata o cobaya, el promotor Super (Ni, M. et al., Plant J. 7, 661-676, 1995). El promotor CMV-IE puede comprender la parte promotora real, que puede estar asociada o no a la parte potenciadora. Se puede hacer referencia a los documentos 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 publicación número WO87/03905. El promotor de CMV-IE es ventajosamente un CMV-IE humano (Boshart et al., 1985) o CMV-IE murino.

[0088] En términos más generales, el promotor tiene un origen viral, vegetal o celular. Un promotor viral fuerte distinto del CVM-IE que puede emplearse de manera habitual en la práctica de la presente 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 manera útil en la práctica de la presente invención es el promotor de un gen del citoesqueleto, tal como, por ejemplo, el promotor de desmina (Kwissa M. et al., 2000), o el promotor de actina (Miyazaki et al., 1989).

[0089] Los plásmidos pueden comprender otros elementos de control de expresión. Es particularmente ventajoso incorporar una secuencia o secuencias estabilizadoras, por ejemplo, una secuencia o secuencias de intrones, 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 (publicación N°. WO1989/01036), el intrón II del gen de  $\beta$ -globina de conejo (van Ooyen et al., 1979). Tal como se describe en el presente documento, los plásmidos pueden comprender 3' UTR. La 3' UTR puede ser, pero no se limita a, una 3' UTR de nopalina sintasa de *agrobacterium* (Nos) (Nopaline synthase: mapping and DNA sequence. Depicker, A. et al. J. Mol. Appl. Genet., 1982; Bevan, NAR, 1984, 12(22): 8711-8721).

[0090] En cuanto a la señal de la poliadenilación (poliA) para los plásmidos y los vectores virales distintos de los virus de la viruela, se puede hacer más uso de la señal de poli(A) del gen de la hormona del crecimiento bovina (bGH) (véase el documento U.S. 5.122.458), o la señal poli(A) del gen de la  $\beta$ -globina del conejo o la señal poli(A) del virus SV40.

[0091] Una «célula huésped» indica una célula procariota o eucariota que ha sido genéticamente alterada o es capaz de ser genéticamente alterada mediante la administración de un polinucleótido exógeno, tal como un plásmido o un vector recombinante. Cuando se hace referencia a células alteradas genéticamente, el término hace referencia tanto a la célula originalmente alterada como a la progenie de la misma.

[0092] En una realización el antígeno de CPV recombinante se expresa en las células de insectos.

[0093] En una realización particular, el antígeno de CPV se expresa en las células SF9.

#### Procedimientos de Utilización

[0094] En una realización, la materia divulgada en el presente documento está dirigida a un procedimiento de vacunación de un animal ovino, bovino, caprino o porcino que comprende la administración al animal ovino, bovino, caprino o porcino de una cantidad eficaz de un antígeno de CPV recombinante o un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

[0095] En una realización de la presente divulgación, el procedimiento comprende una única administración de una composición de vacuna formulada con una emulsión de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, la composición inmunológica o vacuna comprende antígenos de CPV expresados en baculovirus, que incluyen polipéptidos y VLPs (partículas similares a virus) o cápsides vacías. La microscopía electrónica indica que las células de insectos transformadas con vectores de expresión de baculovirus producen VLP de CPV o cápsides vacías de CPV, y de este modo las composiciones inmunológicas o vacunas de acuerdo con la presente invención abarcan aquellas que comprenden VLPs de CPV o cápsides vacías de CPV.

[0096] En una realización, la materia divulgada en el presente documento está dirigida a un procedimiento de vacunación de un animal ovino, bovino, caprino o porcino que comprende la administración al animal ovino, bovino, caprino o porcino del antígeno de CPV producido por un vector de baculovirus en células de insectos.

[0097] En una realización, la materia divulgada en el presente documento está dirigida a un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria que comprende la administración al animal ovino, bovino, caprino o porcino de una vacuna que comprende el antígeno de CPV producido por un vector de baculovirus en células de insectos.

[0098] Tal como se describe en el presente documento, la materia divulgada en el presente documento está dirigida

a un procedimiento de preparación de una vacuna o composición que comprende el aislamiento de un antígeno de CPV producido por un vector de baculovirus en células de insectos y que se combina de manera opcional con un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

5 **[0099]** Ambas cepas de CPV homólogas y heterólogas se utilizan para la estimulación para la prueba de eficacia de la vacuna. La administración puede ser por vía subcutánea o intramuscular. La administración puede realizarse sin agujas (por ejemplo, Bioject).

10 **[0100]** En una realización de la presente invención, se puede utilizar un régimen de vacunación principal seguida de un refuerzo, que está comprendido de al menos una administración primaria y al menos una administración de refuerzo utilizando al menos un polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno común. Típicamente, la composición inmunológica o la vacuna utilizada en la administración primaria es distinta en su naturaleza de aquellas utilizadas como refuerzo. Sin embargo, cabe indicar que la misma composición puede utilizarse como la administración primaria y la administración de refuerzo. El protocolo de administración se llama «principal seguida de un refuerzo».

15 **[0101]** Una vacunación principal seguida de un refuerzo de acuerdo con la presente invención puede incluir un vector viral recombinante que se utiliza para expresar una secuencia codificante de CPV o fragmentos de la misma que codifica un polipéptido antigénico o un fragmento o una variante del mismo. De manera específica, el vector viral puede expresar un gen de CPV o un fragmento del mismo que codifica un polipéptido antigénico. El vector viral contemplado en el presente documento incluye, pero sin limitarse a los mismos, 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, viruela del canario, difteria aviar, viruela de la paloma, viruela de la tórtola, viruela de la paloma, viruela de la codorniz, ALVAC, TROVAC; véanse, por ejemplo, US 5.505.941, US 5.494.8070), virus de la viruela del mapache, virus de la viruela de cerdo, etc.], adenovirus (por ejemplo, adenovirus humano, adenovirus canino), herpesvirus (por ejemplo, herpesvirus canino, herpesvirus de pavo, virus de la enfermedad de Marek, virus de laringotraqueítis infecciosa, herpesvirus felino, virus de laringotraqueítis (ILTV), herpesvirus bovino, herpesvirus porcino), baculovirus, retrovirus, etc. En otra realización el vector de expresión de la viruela aviar puede ser un vector de la viruela del canario, tal como ALVAC. En otra realización adicional, el vector de expresión de la viruela aviar puede ser un vector de la difteria aviar, tal como TROVAC. El antígeno de CPV de la presente invención a expresar se inserta bajo el control de un promotor de virus de la viruela específico, por ejemplo, promotor 42K de *Amsacta moorei* de entomopoxvirus (Barcena, Lorenzo et al. 2000), el promotor de 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 de bovina ATI (Funahashi et al., 1988), el promotor de vaccinia H6 (Taylor et al., 1988b; Guo et al., 1989; Perkus et al., 1989), entre otros.

35 **[0102]** En otro aspecto del protocolo de vacunación primaria-refuerzo de la presente invención, una composición que comprende el antígeno de CPV de la presente invención se administra seguida de la administración de una vacuna o una composición que comprende un vector viral recombinante que contiene y expresa el antígeno de CPV *in vivo*, o una vacuna viral desactivada o una composición que comprende el antígeno de CPV o una vacuna de plásmido de ADN o una composición que contiene o expresa el antígeno de CPV. Del mismo modo, un protocolo de vacunación primaria-refuerzo puede comprender la administración de una vacuna o una composición que comprende un vector viral recombinante que contiene y expresa un antígeno de CPV *in vivo*, o una vacuna viral desactivada o una composición que comprende un antígeno de CPV o una vacuna de plásmido de ADN o una composición que contiene o expresa un antígeno de CPV, seguido de la administración de una composición que comprende el antígeno de CPV de la presente invención. Cabe indicar adicionalmente que tanto la administración primaria como la administración secundaria puede comprender la composición que comprende el antígeno de CPV de la presente invención.

40 **[0103]** Un protocolo de vacunación primaria-refuerzo comprende al menos una administración primaria y al menos una administración de refuerzo utilizando al menos un polipéptido común y/o variantes o fragmentos del mismo. La vacuna utilizada en la administración primaria puede ser de naturaleza diferente de las utilizadas como una vacuna de refuerzo posterior. La administración primaria puede comprender una o más administraciones. De manera similar, la administración de refuerzo puede comprender una o más administraciones.

50 **[0104]** El volumen de la dosis de composiciones para especies diana que son mamíferos basada en vectores virales, por ejemplo, composiciones basadas en vector viral que no es virus de viruela, se encuentra generalmente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5,0 ml, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3,0 ml y entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 2,5 ml.

60 **[0105]** La eficacia de las vacunas puede analizarse desde aproximadamente 2 hasta 4 semanas después de la última inmunización mediante la estimulación de animales, tales como animales felinos o caninos, con una cepa virulenta de CPV.

**[0106]** Los detalles adicionales de estas cepas de CPV se pueden encontrar en las páginas web de European Bioinformatics Information (EMBL-EBI). Los inventores contemplan que todas las cepas de CPV, ambas enumeradas en el presente documento, y aquellas todavía por identificar, podrían expresarse de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación para producir, por ejemplo, composiciones de vacunas eficaces. Ambas cepas homólogas y heterólogas se utilizan para estimulación para analizar la eficacia de las vacunas. Se puede estimular el animal por la

vía intradérmica, subcutánea, mediante pulverización, intranasal, intraocular, intratraqueal y/u oral.

**[0107]** Se pueden llevar a cabo de manera ventajosa administraciones primarias seguidas de refuerzo con una separación desde 1 hasta 6 semanas, por ejemplo, una separación de aproximadamente 4 semanas. De acuerdo con una realización, se contempla también una vacuna de refuerzo bianual o un refuerzo anual, utilizando de manera ventajosa la vacuna basada en un vector viral. De manera ventajosa los animales tienen al menos 6 hasta 8 semanas de vida en el momento de la primera administración.

**[0108]** Las composiciones que comprenden polipéptidos antigénicos recombinantes de la presente invención que se utilizan en los protocolos de administración primaria-refuerzo son sin adyuvantes y se pueden contener opcionalmente en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable. Los protocolos de la presente invención protegen al animal de CPV y/o evitan la progresión de la enfermedad en un animal infectado.

**[0109]** Un experto en la técnica debería entender que la divulgación del presente documento se proporciona a modo de ejemplo y la presente invención no se limita a la misma. A partir de la divulgación del presente documento y el conocimiento de la técnica, el experto puede determinar el número de administraciones, la vía de administración y las dosis que se utilizan para cada protocolo de inyección sin gran experimentación.

**[0110]** La presente invención contempla al menos una administración a un animal de una cantidad eficaz de la composición terapéutica fabricada de acuerdo con la presente invención. El animal puede ser macho, hembra, hembra embarazada y recién nacido. Esta administración se puede realizar mediante diferentes vías que incluyen, pero sin limitarse a las mismas, una inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC) o por la vía de administración intranasal u oral. La composición terapéutica de acuerdo con la presente invención se puede administrar también mediante un aparato sin aguja (tal como, por ejemplo, con un dispositivo de Pigjet, Dermojet, Biojector, Avijet (Merial, GA, Estados Unidos), Vetjet o Vitajet (Bioject, Oregon, Estados Unidos)). Otro enfoque de administración de composiciones de plásmidos es el uso de electroporación (véanse, por ejemplo, Tollefsen et al., 2002; Tollefsen et al., 2003; Babiuk et al., 2002; publicación número WO99/01158). En otra realización, la composición terapéutica se administra al animal mediante una pistola de genes o un bombardeo de partículas de oro.

**[0111]** Tal como se describe en el presente documento, la divulgación da a conocer la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación para la administración y expresión de un antígeno o epítipo de CPV en una célula diana. La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz es una experimentación rutinaria para un experto en la técnica. Tal como se describe en el presente documento, la formulación comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que expresa un antígeno o epítipo de CPV y un portador, vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable. Tal como se describe adicionalmente, 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 la proteína en un huésped.

**[0112]** Tal como se describe en el presente documento, la materia dada a conocer en el presente documento proporciona un procedimiento de detección de diferenciación entre animales infectados y vacunados (DIVA).

**[0113]** En el presente documento se da conocer que el uso de la vacuna o composición de la presente invención permite la detección de la infección por CPV en un animal. En el presente documento se da conocer 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).

#### Artículo de Fabricación

**[0114]** La materia divulgada en el presente documento está dirigida a un kit para llevar a cabo un procedimiento de provocación o inducción de una respuesta inmunitaria que puede comprender cualquiera de las composiciones inmunológicas o vacunas de CPV recombinantes o las composiciones inmunológicas o vacunas de CPV desactivadas, las composiciones o vacunas virales de CPV recombinantes y las instrucciones de realización del procedimiento.

**[0115]** En el presente documento se describe un kit para llevar a cabo un procedimiento de inducción de una respuesta inmunológica o protectora contra CPV en un animal que comprende una composición o una vacuna que comprende un antígeno de CPV de la presente invención y una composición inmunológica o una vacuna viral de CPV recombinante e instrucciones para la realización del procedimiento de administración de una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en un el animal.

**[0116]** En el presente documento se describe un kit para llevar a cabo un procedimiento de inducción de una respuesta inmunológica o protectora contra CPV en un animal que comprende una composición o una vacuna que comprende un antígeno de CPV de la presente invención y una composición inmunológica o vacuna de CPV desactivada e instrucciones para la realización del procedimiento de administración de una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el animal.

**[0117]** Otro aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un kit para una vacunación primaria seguida de

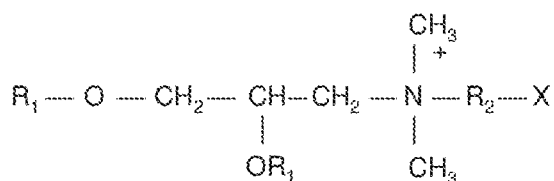
refuerzo de acuerdo con la presente invención tal como se describe anteriormente. El kit puede comprender al menos dos viales: un primer vial que contiene una vacuna o una composición para la vacunación primaria de acuerdo con la presente invención y un segundo vial que contiene una vacuna o una composición de la vacunación de refuerzo de acuerdo con la presente invención. El kit puede contener de manera ventajosa viales primero o segundo adicionales para vacunaciones primarias adicionales o vacunaciones de refuerzo adicionales.

**[0118]** En el presente documento se describe una composición que comprende un antígeno de CPV o un fragmento o una variante del mismo y un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. Se da a conocer adicionalmente la composición descrita anteriormente, en la que el antígeno de CPV o un fragmento o una variante del mismo comprende un fragmento inmunogénico que comprende al menos 15 aminoácidos de un antígeno de CPV. También se dan a conocer las composiciones mencionadas anteriormente en las que el antígeno de CPV o un fragmento o una variante del mismo está parcialmente purificado. También se dan a conocer las composiciones mencionadas anteriormente en las que el antígeno de CPV o un fragmento o una variante del mismo está sustancialmente purificado.

**[0119]** Tal como se describe en el presente documento, se dan a conocer las composiciones mencionadas anteriormente en las que el antígeno de CPV o un fragmento o una variante del mismo es un polipéptido de CPV. En una realización, se dan a conocer las composiciones mencionadas anteriormente en las que el polipéptido de CPV es una proteína de la cápside o un fragmento de la misma. Tal como se describe en el presente documento, se dan a conocer las composiciones descritas anteriormente en las que el antígeno de CPV o un fragmento o una variante del mismo tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia en relación con la secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6 o 8-10. Tal como se describe en el presente documento, se dan a conocer las composiciones descritas anteriormente en las que el antígeno de CPV es codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia en relación con la secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 2, 5, 7, 11 o 12. En otra realización, se da conocer un procedimiento de vacunación de un animal sensible a CPV que comprende la administración de las composiciones descritas anteriormente al animal. En una realización, se da a conocer un procedimiento de vacunación de un animal sensible a CPV que comprende un régimen de vacunación primaria seguida de refuerzo. Tal como se describe en el presente documento, se da a conocer un polipéptido antigénico purificado sustancialmente que se expresa en células de insectos, en las que el polipéptido comprende: una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene la secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6 o 8-10. En cualquier realización, el animal es de manera preferente un animal felino o un canino. En el presente documento se describe un procedimiento de diagnóstico de infección por CPV en un animal. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, se da conocer un kit de vacunación primaria seguida de refuerzo que comprende al menos dos viales, en donde el primer vial contiene la composición de la presente invención y un segundo vial que contiene una composición de vacunación de refuerzo que comprende una composición que comprende un vector viral recombinante o una composición que comprende una composición viral desactivada o una composición de plásmido de ADN que contiene o expresa el antígeno de CPV.

**[0120]** Un experto en la técnica conoce bien los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una solución de NaCl de 0,9 % (por ejemplo, solución salina) o un tampón de fosfato. Otro portador o vehículo o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables que se pueden utilizar en los procedimientos de la presente invención incluye, pero sin limitarse a los mismos, poli-(L-glutamato) o polivinilpirrolidona. El portador o vehículo o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables pueden ser cualquier compuesto o combinación de los compuestos que facilitan la administración del vector (o la proteína expresada a partir de un vector de la invención *in vitro*); de manera ventajosa, el portador, vehículo o excipiente pueden facilitar la transfección y/o mejorar la conservación del vector (o la proteína). En la descripción general del presente documento se describen las dosis y los volúmenes de dosis y un experto en la técnica también puede determinarlas a partir de la lectura de esta divulgación en conjunto con el conocimiento de la técnica, sin mucha experimentación.

**[0121]** Los lípidos catiónicos que contienen sal de amonio cuaternario que son adecuados de manera ventajosa, pero no exclusiva, para los plásmidos, son de manera ventajosa aquellos que tienen la siguiente fórmula:



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

**[0122]** Entre estos lípidos catiónicos, se da preferencia a DMRIE (N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-

propano amonio; documento WO96/34109), asociado de manera ventajosa a un lípido neutro, ventajosamente DOPE (dioleoil-fosfatidil-etanol amina; Behr, 1994), para formar DMRIE-DOPE.

**[0123]** De manera ventajosa, la mezcla de plásmidos con el adyuvante se forma de manera extemporánea y ventajosamente contemporánea con la administración de la preparación o poco antes de la administración de la preparación; por ejemplo, poco antes o antes de la administración, se forma la mezcla de plásmido-adyuvante, ventajosamente de tal modo que haya suficiente tiempo 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.

**[0124]** Cuando DOPE está presente, la proporción molar de DMRIE:DOPE es ventajosamente de aproximadamente 95: aproximadamente 5 a aproximadamente 5: aproximadamente 95, más ventajosamente de aproximadamente 1: aproximadamente 1, por ejemplo, 1:1.

**[0125]** La proporción molar de adyuvante:plásmido DMRIE o DMRIE-DOPE puede ser de aproximadamente 50: aproximadamente 1 y aproximadamente 1: aproximadamente 10, tal como de aproximadamente 10: aproximadamente 1 y aproximadamente 1: aproximadamente 5, y de aproximadamente 1: aproximadamente 1 y aproximadamente 1: aproximadamente 2, por ejemplo, 1:1 y 1:2.

**[0126]** En otra realización, el portador, excipiente, adyuvante o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una emulsión de agua en aceite. Entre los ejemplos de emulsiones de agua en aceite adecuadas se incluyen emulsiones de vacunas de agua en aceite con base de aceite que sean estables y líquidas a 4 °C que contengan: desde 6 hasta 50 % v/v de una fase acuosa que contiene antígeno, de manera preferente, desde 12 hasta 25 % v/v, desde 50 hasta 94 % v/v de una fase oleosa que contiene un aceite no metabolizado de forma total o en parte (por ejemplo, aceite mineral, tal como aceite de parafina) y/o aceite metabolizado (por ejemplo, aceite vegetal o ácido graso, poliol o ésteres de alcohol), desde 0,2 hasta 20 % p/v de tensioactivos, de manera preferente, desde 3 hasta 8 % p/v, el último siendo de forma total o en parte, o en una mezcla de ésteres de poliglicerol, siendo dichos ésteres de poliglicerol de manera preferente (poli)ricinoleatos de poliglicerol o aceites de ricino polioxietilenados u otros aceites de ricino con polioxietileno hidrogenados. Entre los ejemplos de tensioactivos que se pueden utilizar en una emulsión de agua en aceite incluyen ésteres de sorbitano etoxilado (por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) (TWEEN 80®), disponible en AppliChem, Inc., Cheshire, CT) y ésteres de sorbitano (por ejemplo, monooleato de sorbitano (SPAN 80®), disponible en Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Adicionalmente, en lo que respecta a una emulsión de agua en aceite, véase también la Patente de Estados Unidos N.º 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 tamponante adecuada es una solución salina tamponada con fosfato. En una realización ventajosa, la emulsión de agua en aceite puede ser una emulsión triple de agua/aceite/agua (W/O/W) (Patente de Estados Unidos Número 6.358.500). Los ejemplos de otras emulsiones adecuadas se describen en la Patente de Estados Unidos Número 7.371.395.

**[0127]** Las composiciones inmunológicas y las vacunas divulgadas en el presente documento pueden comprender o consistir esencialmente en uno o más adyuvantes. Los adyuvantes adecuados para el uso en la práctica de la presente invención son (1) polímeros de ácido acrílico o metacrílico, polímeros de anhídrido maleico y derivados de alquenilo, (2) secuencias de inmunestimulación (ISS), tales como secuencias de oligodesoxirribonucleótidos que tienen una o más unidades de 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» publicada por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión de MF59 descrita en la página 183 del mismo trabajo, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, por ejemplo, DDA, (5) citocinas, (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, (7) saponina u (8) otros adyuvantes descritos en cualquier documento citado o (9) cualquier combinación o mezcla de los mismos.

**[0128]** La emulsión de aceite en agua (3), que es especialmente adecuada para vectores virales, puede basarse en: aceite de parafina líquida ligero (tipo de Farmacopea Europea), aceite de isoprenoide, tal como escualano, escualeno, aceite que es el resultado 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), glicerol tri(caprilato/caprato) y dioleato de propilenglicol o ésteres de alcoholes o ácidos grasos ramificados, especialmente de ésteres de ácido isoesteárico.

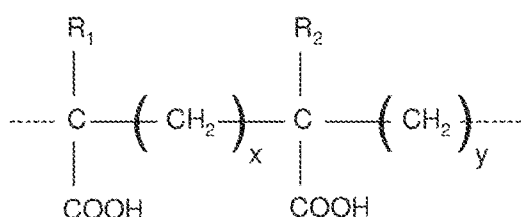
**[0129]** El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar una emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como: por un lado, ésteres de sorbitano, manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), glicerol, poliglicerol o propilenglicol, y, por otra parte, ácidos oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxiesteárico, estando dichos ésteres están opcionalmente etoxilados o bloques de copolímeros de polioxipropileno-polioxietileno, tal como Pluronic, por ejemplo, L121.

**[0130]** Entre los polímeros adyuvantes del tipo (1) se da preferencia a polímeros de ácido acrílico o metacrílico reticulados, especialmente reticulados por éteres de polialquenilo de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen bien bajo el nombre de carbómero (Pharmeuropa, volumen 8, número 2, junio de 1996). Un experto en la

técnica también puede hacer referencia a la Patente de Estados Unidos N°. 2.909.462, que proporciona dichos polímeros acrílicos reticulados por un compuesto de polihidroxiolo que tiene tres grupos hidroxilo, de manera preferente no más de ocho de dichos grupos, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres grupos hidroxilo sustituidos por radicales alifáticos no saturados, que tienen al menos dos átomos de carbono. Los radicales preferidos son aquellos que contienen desde 2 hasta 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos insaturados etilénicamente. Los radicales insaturados pueden contener también otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos que se venden bajo el nombre de Carbopol (BF Goodrich, Ohio, Estados Unidos) son especialmente adecuados. Se reticulan mediante alil sacarosa o mediante alil pentaeritritol. Entre ellos, se hace la referencia a Carbopol 974P, 934P y 971P.

**[0131]** En cuanto a los copolímeros derivados de anhídrido maleico-alqueno, se da la preferencia a EMA (Monsanto), que son copolímeros de etileno-anhídrido maleico de cadena lineal o reticulados y, por ejemplo, se reticulan mediante éter divinílico. También se hace la referencia a J. Fields et al., 1960.

**[0132]** En lo que respecta a la estructura, los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y EMA se forman de manera preferente mediante las unidades básicas que tiene la siguiente fórmula:



en la que: R1 y R2, que pueden ser los mismos o diferentes representan H o CH<sub>3</sub>; x = 0 o 1, de manera preferente x = 1; y = 1 o 2, con x + y = 2.

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

**[0133]** Estos polímeros son solubles en agua o solución salina fisiológica (20 g/l NaCl) y se puede ajustar el pH a un valor de 7,3 a 7,4, por ejemplo, mediante soda (NaOH), para proporcionar la solución de adyuvante en la que se pueden incorporar un 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, entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 1 % p/v y entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,4 % p/v.

**[0134]** La citocina o las citocinas (5) pueden estar en forma de proteína en la composición inmunológica o de vacuna, o pueden expresarse de manera conjunta en el huésped con el inmunógeno o los inmunógenos o el epítipo o epítipos de los mismos. Se da preferencia a la expresión conjunta de la citocina o las citocinas, ya sea por el mismo vector que el que expresa el inmunógeno o los inmunógenos o el epítipo o epítipos de los mismos o por un vector separado del mismo.

**[0135]** La presente invención comprende la preparación de tales composiciones de combinación; por ejemplo, mezclando los componentes activos, de manera ventajosa en conjunto y con un portador, citocina y/o diluyente.

**[0136]** Entre las citocinas que se pueden utilizar en la presente invención se incluyen, pero no se limitan a, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), interferón  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), interferón  $\beta$  (IFN $\beta$ ), interferón  $\gamma$ , (IFN $\gamma$ ), interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-2 (IL-2), interleucina-3 (IL-3), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-7 (IL-7), interleucina-8 (IL-8), interleucina-9 (IL-9), interleucina-10 (IL-10), interleucina-11 (IL-11), interleucina-12 (IL-12), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF $\beta$ ), ácido polinosínico y policitidílico, oligodesoxinucleótidos de citidina-fosfato-guanosina (CpG ODN) y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Se debe entender que las citocinas se pueden administrar conjuntamente y/o se pueden administrar de manera secuencial con la composición inmunológica o de vacuna de la presente invención. Por consiguiente, por ejemplo, la vacuna de la presente invención puede contener también una molécula de ácido nucleico exógena que expresa *in vivo* una citocina adecuada, por ejemplo, una citocina adecuada a este huésped al que se va a vacunar o en el que se debe provocar una respuesta inmunológica (por ejemplo, una citocina bovina para las preparaciones que se administran a animales bovinos).

**[0137]** En el caso de una composición inmunológica y/o vacuna basada en polipéptidos expresados por un baculovirus/células de insectos, una dosis puede incluir, desde aproximadamente 1  $\mu$ g hasta aproximadamente 2000  $\mu$ g, desde aproximadamente 50  $\mu$ g hasta aproximadamente 1000  $\mu$ g y desde aproximadamente 100  $\mu$ g hasta aproximadamente 500  $\mu$ g de antígeno, epítipo o inmunógeno de CPV. La dosis puede incluir desde aproximadamente 10<sup>2</sup> hasta aproximadamente 10<sup>20</sup> VLPs, desde aproximadamente 10<sup>3</sup> hasta aproximadamente 10<sup>20</sup>, desde

aproximadamente  $10^4$  hasta aproximadamente  $10^{20}$ . Los volúmenes de la dosis pueden oscilar entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml, entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 5 ml. De manera general, el experto en la técnica tiene en cuenta muchas estrategias de dosificación y será capaz de optimizar la dosificación sin la realización de trabajo de investigación.

**[0138]** En un aspecto la presente invención da a conocer una vacuna combinada que comprende un componente de partícula similar al virus (VLP) y un componente de virus vivo modificado (MLV), en la que tanto la VLP como el MLV están dirigidos contra el mismo patógeno o enfermedad y en la que la vacuna combinada supera los anticuerpos derivados de la madre (MDA).

**[0139]** En algunas realizaciones, la vacuna combinada proporciona inmunidad protectora con una dosis única.

**[0140]** En algunas realizaciones, el patógeno o la enfermedad es parvovirus canino (CPV).

**[0141]** En algunas realizaciones, el patógeno o la enfermedad es el virus de la enfermedad de pies y boca (FMDV).

**[0142]** En algunas realizaciones, el componente de VLP de la combinación comprende al menos 10 % de VLPs de CPV (p/p) como una función del contenido de proteína total.

**[0143]** En algunas realizaciones, el componente de VLP comprende al menos 20 % de VLPs de CPV (p/p).

**[0144]** En algunas realizaciones, la VLP de CPV se expresa por un vector de baculovirus en células de insectos.

**[0145]** En algunas realizaciones, la VLP de CPV comprende al menos una proteína de cápside de CPV.

**[0146]** En algunas realizaciones, la VLP de CPV comprende un polipéptido de CPV que tiene la secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 8, 9 o 10; o la VLP de CPV comprende un polipéptido de CPV que tiene al menos un 90 % de identidad de una secuencia tal como se establece en SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 8, 9 o 10.

**[0147]** En algunas realizaciones, la VLP de CPV comprende un polipéptido de CPV codificado por un polinucleótido que tiene la secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 2, 5 o 7; o la VLP de CPV comprende un polipéptido de CPV codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 2, 5 o 7.

**[0148]** En algunas realizaciones, la vacuna combinada no presenta adyuvantes y comprende adicionalmente un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

**[0149]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un plásmido útil en la producción de VLP de CPV, que comprende un polinucleótido que codifica un antígeno de CPV que tiene una secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6 o 8-10 o una secuencia de polinucleótido que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6 o 8-10.

**[0150]** En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende o consiste esencialmente en la secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 2, 5, 7, 11 o 12.

**[0151]** En algunas realizaciones, el plásmido consiste en la secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 11 o 12.

**[0152]** En algunas realizaciones, el plásmido se transforma de manera estable en una célula de insecto, que expresa VLPs de CPV.

**[0153]** En otro aspecto, la presente invención da a conocer una cápside vacía de CPV sustancialmente purificada o VLP de CPV expresada en células de insectos, en donde la cápside vacía o VLP de CPV comprende un polipéptido que tiene una secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6 o 8-10; o la cápside vacía o VLP de CPV comprende un polipéptido de que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6 o 8-10.

**[0154]** En algunas realizaciones, la cápside vacía o VLP de CPV consiste en un polipéptido que tiene una secuencia tal como se establece en SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6 o 8-10.

**[0155]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de provocación de una respuesta inmunitaria en un animal contra CPV que comprende la administración de las composiciones, vacunas o vacunas de combinación y VLPs divulgadas en el presente documento al animal.

**[0156]** En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria protege a los vacunados contra la posterior exposición a CPV virulento. La exposición puede ser natural o experimental.

[0157] En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se provoca en los animales vacunados independientemente de la presencia en dichos animales de altos niveles de anticuerpos derivados de la madre (MDA) contra CPV. «Altos niveles» tienen el significado habitual y se refiere de manera general a niveles de MDA que impiden la capacidad de vacunas de la técnica anterior para provocar una respuesta protectora fuerte en animales positivos en MDA.

[0158] A continuación, se describirá la presente invención con más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

## EJEMPLOS

[0159] A menos que se describa lo contrario, la construcción de inserciones de ADN, plásmidos y vectores virales o de baculovirus recombinantes se llevó a cabo utilizando las técnicas de biología molecular estándar 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 Construcción y expresión de antígenos de cápside de CPV en sistema de baculovirus/células de insectos*

[0160] **Objetivo:** Generar un plásmido de transferencia basado en pVL1393 que codifica la proteína de cápside CPV de CPV (parvovirus canino, cepa *Souriou* serotipo 2c) optimizada para las células de insectos y generación del baculovirus recombinante BacMEB072 para expresar las partículas similares a virus (VLP). La secuencia de referencia fue *Souriou* 2c (Merial), que tiene la denominación del Genbank BAD34656 / Swissprot P61826 (SEQ ID NO: 1).

[0161] El gen de cápside de CPV (1755 pb) codifica un polipéptido de 584 aminoácidos (que no contiene ningún péptido señal). Se clonó la secuencia que codifica la proteína VP2 de CPV (SEQ ID NO: 1) y se optimizó mediante codones la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 5) para las células de insectos. Los dominios funcionales potenciales se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1 Los dominios funcionales potenciales son los siguientes (según la anotación de Swiss-prot en P61826)

| Supuestos Dominios        | Desde hasta (o posición) | Longitud |
|---------------------------|--------------------------|----------|
| Secuencia señal           | no                       |          |
| VP2 de cadena madura      | 1-584                    | 584      |
| N-glicosilación           | 25-47-64-180-443-505-517 |          |
| Sitios de N-glicosilación | 490-494                  |          |

[0162] **Generación del plásmido pMEB072.** Se clonó la cápside de CPV optimizada para la expresión por insectos (SEQ ID NO: 1) en plásmido comercial pVL1393 (Pharmlngen) utilizando los sitios XbaI y Bam HI del vector y el inserto para generar el plásmido de expresión pMEB072.

[0163] **Generación de baculovirus recombinante BacMEB072.** El vector de baculovirus utilizado fue AcNPV modificado por una eliminación letal que solamente se rescata mediante recombinación homóloga (BaculoGold DNA, Pharmlngen). Se utilizó el plásmido pMEB072 para generar un baculovirus recombinante, que codificaba el gen de cápside de CPV truncado de la cepa *Souriou* serotipo 2c bajo el control del promotor de polihedrina, mediante recombinación homóloga. 9 células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf) se transfectaron en conjunto con el plásmido pMEB072 y ADN de AcNPV linealizado de triple corte de Bsu36I de acuerdo con el protocolo del fabricante (Baculogold, Pharmlngen). Los baculovirus recombinantes del sobrenadante de la cotransfección se purificaron dos veces en placas. Se amplificaron cinco clones (pasaje 1) a 28 °C a una escala de matraz de monocapa de 25 cm<sup>2</sup>. Las células y los sobrenadantes infectados se analizaron para determinar la expresión de cápside de CPV mediante transferencia Dot Blot utilizando anticuerpos monoclonales específicos de antígeno de cápside de CPV (CPV103B10A). El clon 1 mostró un perfil de transferencia Dot Blot correcto. Este clon se amplificó adicionalmente (pasaje 2) a 28 °C a una escala de 50 ml en Erlenmeyer (suspensión) a 105 rpm. Se llevó a cabo un tercer pasaje (pasaje 3) a una escala de 200 ml para obtener solución madre de virus que se utiliza en la expresión de proteína. A continuación, esta solución madre de virus se valoró en un ensayo de placas. La solución madre del virus se obtuvo utilizando un medio SF900II, suplementado con 2 % de FCS. Después de la valoración, se utilizó la solución madre de baculovirus recombinante (pasaje 3) para la producción de proteínas en medio libre de suero.

Análisis de expresión de baculovirus BacMEB072**[0164]**

Tabla 2

| Plásmido | Tamaño (AA) | PM (kDa) | Péptido señal | Etiqueta | N-glicosilación       | Puente disulfuro | localización |
|----------|-------------|----------|---------------|----------|-----------------------|------------------|--------------|
| pMEB062  | 545         | 59,2     | no            | no       | 10 sitios potenciales | No               | secreción    |

**[0165]** Se infectaron células de insectos (Sf9) con BacMEB072 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 ufp/ml. Las células de insectos se desarrollaron a 105 rpm en un medio Sf900II sin FCS durante 4 días a 28 °C. La producción de proteínas se analizó sometiendo los lisados de Sf9 completos y sobrenadante de cultivo a SDS-PAGE (4-20 %, Invitrogen), seguido de transferencia Dot Blot con anticuerpo monoclonal (CPV103B10A). La solubilidad de las proteínas expresadas se estudió mediante el lisado de los sedimentos celulares en un tampón de lisis (50 mM de Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl + anti proteasa), sonicación 3X (15 segundos a 20 % de potencia, 30 segundos de espera, 15 segundos a 20 % de potencia, 5 minutos de lisis sobre hielo). Las proteínas solubles se separaron del material insoluble mediante centrifugación (30 minutos a 11 000 rcf a 4°C).

**[0166]** Se expresó una banda con un tamaño previsto en el sedimento celular de células infectadas lisadas y depuradas, tal como se observa mediante tinción con coomassie. La proteína se acumuló en las células, pero también se detectó en la fracción soluble después de la lisis. Se confirmó la identidad de la proteína VP2 mediante transferencia Dot Blot utilizando el anticuerpo monoclonal específico contra la cápside de CPV (CPV103B10A).

**[0167]** El análisis de la microscopía electrónica (ME) confirmó el autoensamblaje correcto de la proteína de la cápside en VLPs, que tenía un diámetro de 25-30 nm, y una morfología correcta de viriones similares a parvovirus (Figura 4). Las condiciones óptimas de producción de VLP fueron para el uso de MOI=0,1 y la recogida 5 días después de la infección. Aunque se contemplan otras condiciones, estas condiciones particulares produjeron una concentración de aproximadamente 10<sup>11</sup> VLPs por ml.

Ejemplo 2 - producción de BacMEB073 que contiene VP2 de CPV truncada

**[0168]** El objetivo fue generar un plásmido de transferencia basado en pVL1393 que codifica la proteína de la cápside VP2 truncada de CPV (parvovirus canino, cepa Souriou serotipo 2c) optimizada para mamíferos y, a continuación, generar el baculovirus recombinante correspondiente BacMEB073, que expresa la VLP. Se eliminaron los 9 aminoácidos del extremo N-terminal (-9AA) en un intento de potenciar la expresión de VP2 sin impedir la formación de VLP (Hurtado et al. Journal of Virology, agosto de 1996). Además, se añadieron tres aminoácidos (M, L y K) en un intento de mejorar la estructura y la formación de la cápside (Gilbert et al., Journal of Nanobiotechnology, 2006). Previamente a esta divulgación, se desconocía qué efecto tendría la introducción de la eliminación y las inserciones sobre la expresión de VP2 de CPV y posterior formación de la cápside.

**[0169]** Se clonó adicionalmente el gen de VP2 truncado (eliminación de 9 aminoácidos en el extremo N-terminal reemplazado por MLK adicional) y optimizado para mamíferos (Geneart) en plásmido pVL1393 utilizando los sitios Bam HI y Xba I del vector y el inserto.

**[0170]** La generación del vector de baculovirus y la expresión de proteína. Vector de baculovirus: El AcNPV modificado por una eliminación letal que solamente se rescata mediante recombinación homóloga (BaculoGold DNA, Pharmingen).

**[0171]** Generación de baculovirus recombinante BacMEB073. Se utilizó el plásmido pMEB073 para generar un baculovirus recombinante, que codificaba el gen de cápside de CPV truncado de la cepa Souriou serotipo 2c bajo el control del promotor de polihedrina, mediante recombinación homóloga. 9 células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf) se transfectaron en conjunto con el plásmido pMEB073 y ADN de AcNPV linealizado de triple corte de Bsu36I de acuerdo con el protocolo del fabricante (Baculogold, Pharmingen). Los baculovirus recombinantes del sobrenadante de la cotransfección se purificaron dos veces en placas. Se amplificaron cinco clones (pasaje 1) a 28°C a una escala de matraz de monocapa de 25 cm<sup>2</sup>. Las células y los sobrenadantes infectados se analizaron para determinar la expresión de cápside de CPV mediante transferencia Dot Blot utilizando anticuerpos monoclonales específicos de antígeno de cápside de CPV (CPV103B10A). El clon 1 mostró un perfil de transferencia Dot Blot correcto. Este clon se amplificó adicionalmente (pasaje 2) a 28 °C a una escala de 50 ml en Erlenmeyer (suspensión) a 105 rpm. Se llevó a cabo un tercer pasaje (pasaje 3) a una escala de 200 ml para obtener solución madre de virus que se utiliza en la expresión de proteína. A continuación, esta solución madre de virus se valoró en un ensayo de placas. La solución madre del virus se obtuvo utilizando un medio SF900II, suplementado con 2 % de FCS.

**[0172]** Después de la valoración se utilizó la solución madre de baculovirus recombinante (Pasaje 3) para la producción de proteínas en medio libre de suero.

Análisis de expresión**[0173]**

Tabla 3. Recombinantes previstos

| Plásmido | Tamaño (AA) | PM (kDa) | Péptido señal | Sitio de N-glicosilación                | Puente disulfuro | Localización subcelular |
|----------|-------------|----------|---------------|-----------------------------------------|------------------|-------------------------|
| pMEB073  | 578         | 64,1     | no            | 11, 19, 40, 50, 58, 66, 72, 79, 80, 511 | no               | secretado               |

**[0174]** Se infectaron células de insectos (Sf9) con BacMEB073 a una MOI = 1 ufp/ml. Las células de insectos se desarrollaron a 105 rpm en un medio Sf900II sin FCS durante 4 días a 28 °C. La producción de proteínas se analizó sometiendo los lisados de Sf9 completos y sobrenadante de cultivo a SDS-PAGE (4-20 %, Invitrogen), seguido de transferencia Dot Blot con anticuerpo monoclonal (CPV103B10A).

**[0175]** La solubilidad de las proteínas expresadas se estudió mediante el lisado de los sedimentos celulares en un tampón de lisis (50 mM de Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl + anti proteasa), sonicación 3X (15" a 20 % de potencia, 30" de espera, 15" a 20 % de potencia, 5' de rotura sobre hielo). Las proteínas solubles se separaron del material insoluble mediante centrifugación (30' a 11 000 rcf a 4°C).

**[0176]** Resultados y conclusión. Se expresó una banda con un tamaño esperado de 64 kDa en el sedimento celular de células infectadas lisadas y depuradas, tal como se observa mediante tinción con coomassie. La proteína se acumuló en las células, pero también se detectó en la fracción soluble después de la lisis. Se confirmó la identidad de proteína VP2 mediante transferencia Dot Blot utilizando un mAb de la cápside de CPV específico (CPV103B10A).

**[0177]** El análisis de EM confirmó el autoensamblaje de la proteína de la cápside en VLPs con un diámetro de 25-30 nm, así como una morfología correcta de viriones similares a parvovirus a una concentración de  $10^{12}$  VLPs por ml (Figura 4). La producción de VLP fue óptima a una de MOI=0,1 con la recogida 5 días después de la infección, aunque otras condiciones pueden producir también altos niveles de VLP.

Ejemplo 3 Vacunación de caninos con proteína de la cápside de CPV expresada por baculovirus

**[0178]** El objetivo principal del estudio fue evaluar y comparar la seguridad y la inmunogenicidad de 2 partículas similares a virus (VLPs) de la cepa Souriou de CPV2c en cachorros (es decir, BacMEB072 y BacMEB073, descritos en los Ejemplos 1 y 2). Un objetivo secundario fue evaluar los efectos adyuvantes de hidróxido de aluminio/saponina o iscomatrix sobre la inmunogenicidad de las VLPs producidas por BacMEB072 y BacMEB073. Los cachorros de ocho semanas de edad se vacunaron y se examinaron tal como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Diseño experimental para el estudio de VLP de VP2 de CPV truncado frente a MLV de VP2 de CPV de longitud completa

| Grupo   | Antígeno: VLP CPV2     | Adyuvante                                                             | Vacunación                                                                           | Control clínico                                       | Sueros                           | Sangre entera (heparina de sodio) |
|---------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| A (n=6) | BacME073 (truncado)    | Ninguno                                                               | Día 0 y Día 28 por la vía subcutánea con 1 ml que contenía 25 µg de principio activo | D0, D0+4-6 horas, D1, D2 D28, D28+4-6 horas, D29, D30 | D-7, D0*, D7, D28, D35, D42, D70 | D35, D42                          |
| B (n=6) | BacME073 (truncado)    | Gel Al(OH) <sub>3</sub> (1,7 mg) + Saponina (12 unidades hemolíticas) |                                                                                      |                                                       |                                  |                                   |
| C (n=6) | BacME072 (no truncado) | Ninguno                                                               |                                                                                      |                                                       |                                  |                                   |
| D (n=6) | BacME072 (no truncado) | Gel Al(OH) <sub>3</sub> (1,7 mg) + Saponina (12 unidades hemolíticas) |                                                                                      |                                                       |                                  |                                   |
| E (n=6) | BacME072 (no truncado) | Iscomatrix (75 µg)                                                    |                                                                                      |                                                       |                                  |                                   |
| F (n=5) | Control                |                                                                       | Control                                                                              |                                                       |                                  |                                   |

\* antes de la vacunación

**[0179]** Por lo que respecta a la seguridad, Al(OH)<sub>3</sub>/Saponina no indujo ninguna reacción general ni cualquier otro signo

a excepción de calor local e inflamaciones. Se observó inflamación moderada durante un periodo de 3 a 4 días después de cada vacunación en la mayoría de los perros. Iscomatrix parece ser un adyuvante muy seguro. En lo que respecta a inmunogenicidad, la vacunación de los cachorros con VLP de CPV2 fue capaz de inducir tanto respuesta inmunitaria humoral como celular sin ninguna diferencia significativa entre VP2 truncada o de longitud completa asociadas en VLPs. De forma destacada, aumentó la persistencia de respuesta inmunitaria humoral, cuando las VLPs se utilizaron con adyuvantes de cualquiera de  $Al(OH)_3$ /Saponina o a Iscomatrix con ninguna diferencia significativa entre los dos adyuvantes investigados. Además, el adyuvante Iscomatrix aumentó la magnitud de la respuesta de IFN gamma no solamente en comparación con el grupo sin adyuvante, sino también con el grupo de  $Al(OH)_3$  y Saponina.

Ejemplo 4 Vacunación de caninos con VLPs de CPV o de MLV CPV (cepas Souriou o Bari) expresadas en Baculovirus

**[0180]** El objetivo del estudio fue comparar la respuesta inmunitaria en cachorros vacunados con VLP de CPV, MLV de CPV Souriou o MLV de CVP Bari. El primer experimento comparó 1,52 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml (IFI) Souriou; 1,0 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml (HA) Bari; y VLP de pMEB072 (resultados en la Figura 8). El segundo experimento comparó 2,21 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml (IFI) Souriou; 2,0 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml (HA) Bari; y VLP producida en pMEB073 en adyuvante de  $Al(OH)_3$  + saponina (resultados en la Figura 9). Finalmente, el tercer experimento comparó 3,81 log TCID<sub>50</sub>/ml (IFI) Souriou; 3,0 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml (HA) Bari; y VLP producida en pMEB072 en adyuvante de  $Al(OH)_3$  + saponina (resultados en la Figura 10). En conjunto, estos resultados mostraron que VLP de CPV, fabricada de acuerdo con la presente divulgación, proporcionó una respuesta inmunitaria comparable en comparación con MLV de CPV de ejemplo. De manera importante, las VLPs eran capaces de inducir una respuesta inmunitaria más rápida, cuando se comparaban con las dos dosis baja e intermedia de cualquier cepa de MLV.

Ejemplo 5 Vacunación de caninos con MLV de CPV o proteína de la cápside de CPV expresada en Baculovirus + MLV CPV

**[0181]** El objetivo del estudio fue evaluar la inmunogenicidad de diferentes candidatos de vacunas administradas con diferentes dosis y por vía subcutánea a cachorros con anticuerpos maternos. Antes de este estudio, no se conocía si VLP de CPV podría superar anticuerpos de la madre para inducir inmunidad protectora en cachorros.

Tabla 5. Diseño experimental para el estudio de VLP de CPV frente a MLV de CPV

| Grupo |                                  | Vacuna administrada por la vía subcutánea el Día 0                                       | Muestra de sangre (6 ml /cachorro) | Análisis                                                                           |
|-------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| A     | MLV de CPV (n = 9)               | MLV de CPV2 5,5log <sub>10</sub> (1ml)                                                   | D0*, D7, D14,                      | Determinación de anticuerpos anti-CPV<br>(Inhibición de hemaglutinación y/o ELISA) |
| B     | VLP de CPV + MLV de CPV (n = 10) | VLP de CPV <i>Dosis objetivo: 500 µg (1 ml) + MLV de CPV 5,5 log<sub>10</sub> (1 ml)</i> | D21, D28, D34,<br>D42, D56         |                                                                                    |

**[0182]** Tal como se indica en la Figura 11, la Figura 12 y la Tabla 6, los títulos de anticuerpo para CPV fueron significativamente superiores en el grupo MLV + VLP. Estos datos indican que la adición de VLP de CPV a la formulación de la vacuna era suficiente para superar los anticuerpos de la madre, un resultado sorprendente e inesperado. Los inventores contemplan que VLP capturan una proporción significativa de MDA de CPV circulantes, lo que a su vez facilita a las VLP y MLV contra CPV inmunizar de manera activa a los cachorros.

Tabla 6. Títulos de anticuerpo anti-CPV (IHA) según los días después de la vacunación

| Grupo | ID      | 0   | 7  | 14   | 21  |
|-------|---------|-----|----|------|-----|
| MLV   | 2252826 | 10  | <5 | 2560 | 320 |
| MLV   | 2253001 | 10  | <5 | 1280 | <5  |
| MLV   | 2284928 | 80  | <5 | <5   | <5  |
| MLV   | 2284973 | 80  | 20 | <5   | 20  |
| MLV   | 2284975 | 80  | 20 | <5   | 10  |
| MLV   | 2285160 | <5  | <5 | <5   | 5   |
| MLV   | 2285360 | 160 | 40 | <5   | 20  |

|                                                                                               |         |    |      |      |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------|----|------|------|------|
| MLV                                                                                           | 2285367 | 40 | <5   | <5   | 20   |
| MLV                                                                                           | 2285387 | 10 | 5    | <5   | <5   |
| MLV+VLP                                                                                       | 2252827 | 80 | 640  | 1280 | 320  |
| MLV+VLP                                                                                       | 2252828 | 5  | 160  | 5120 | 2560 |
| MLV+VLP                                                                                       | 2284818 | 10 | 640  | 2560 | 2560 |
| MLV+VLP                                                                                       | 2284843 | 10 | 640  | 2560 | 1280 |
| MLV+VLP                                                                                       | 2284861 | 20 | 1280 | 1280 | 1280 |
| MLV+VLP                                                                                       | 2284935 | 40 | 640  | 1280 | 320  |
| MLV+VLP                                                                                       | 2284941 | 80 | 640  | 1280 | 640  |
| MLV+VLP                                                                                       | 2284943 | 20 | 320  | 1280 | 1280 |
| MLV+VLP                                                                                       | 2284978 | 40 | 1280 | 1280 | 1280 |
| MLV+VLP                                                                                       | 2285000 | 80 | 320  | 640  | 640  |
| MLV: Vacuna viva modificada (PRIMODOG® 5,5log10/ml)<br>VLP: Partícula similar a virus, 500 µg |         |    |      |      |      |

Ejemplo 6 Vacunación de caninos con proteína de la cápside de CPV expresada por Baculovirus, MLV contra CPV o CDV vectorizado con Adenovirus

- 5 **[0183]** El objetivo del estudio fue evaluar la inmunogenicidad de diferentes dosis de diferentes candidatos de vacunas administradas por vías diferentes. Los candidatos diferentes fueron VLP de CPV y adenovirus recombinantes que expresan cualquiera de los dos genes de CPV o CDV (moquillo canino).

Tabla 7. Diseño experimental para el estudio de VLP de CPV frente a Adeno CPV frente a Adeno CDV

10

| Grupo |                | Vacuna administrada el día 0 y el día 28**<br>Dosis y Vía                              | Recogida de muestras                                                                                             | Análisis                                                                           |                                                           |
|-------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| A     | VLP+_1 (n=6)   | VLP de CPV <i>Dosis alta</i><br>(500 µl de solución madre/dosis) SC (1 ml)             | Viales de sangre: D0, D7, D14, D21, D28, D35, D42, D56 y D63<br>Viales de sangre con heparina: D7, D31, D35, D56 | Determinación de anticuerpos anti-CDV (ELISA y/o inhibición de la hemaglutinación) | Respuesta inmunitaria celular y/o de células de memoria B |
| B     | VLP+_2 (n=6)   |                                                                                        |                                                                                                                  |                                                                                    |                                                           |
| C     | VLP-** (n=6)   | VLP de CPV <i>Dosis baja</i><br>50 µl solución madre/ /dosis) SC (1 ml)                |                                                                                                                  |                                                                                    |                                                           |
| D     | VLP_Oral (n=6) | VLP de CPV 2 ml solución madre no diluida Oral                                         |                                                                                                                  |                                                                                    |                                                           |
| E     | Ad5_CPV+ (n=6) | Adeno CPV vAD3032 <i>dosis alta</i> dosis objetivo (8,64 log 10 TCID50/ml**) SC (1 ml) |                                                                                                                  |                                                                                    |                                                           |
| F     | Ad5_CPV (n=6)  | Adeno CPV vAD3032 <i>dosis baja</i> (dosis objetivo 7,64 log 10 TCID50/ml**) SC (1 ml) |                                                                                                                  |                                                                                    |                                                           |
|       |                | Adeno CDV vAD3031 <i>dosis baja</i> (dosis objetivo                                    |                                                                                                                  |                                                                                    |                                                           |

|   |                |                                                                                                |                                                            |  |
|---|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--|
| G | Ad5_CDV-(n=6)  | 7,34 log 10 TCID50/ml*)<br>SC (1 ml)                                                           | Determinación de anticuerpos anti-CDV (Seroneutralización) |  |
| H | Ad5_CDV+ (n=6) | Adeno CDV vAD3031<br><i>dosis alta</i> (dosis objetivo<br>8,34 log 10 TCID50/ml*)<br>SC (1 ml) |                                                            |  |

**[0184]** Tal como se indica en la Figura 13, los Grupos A y E indujeron niveles de protección de títulos de anticuerpos de CPV en cachorros.

- 5 Ejemplo 7 Vacunación de caninos con proteína de la cápside de CPV expresada por baculovirus (VLP), VLP + RECOMBITEK® C4, RECOMBITEK® C4 solo o NOBIVAC® 3

10 **[0185]** El objetivo del estudio fue evaluar la respuesta de anticuerpos después de la administración de diferentes formulaciones de vacunas multivalentes experimentales que contenían MLV de CPV-2 o vacuna de partículas similares a virus (VLP) recombinante de CPV-2c expresadas por baculovirus, y una vacuna competidora/comercial en perros con MDAs contra CPV.

15 **[0186]** Cuarenta perros de raza beagle de 6-7 semanas de vida positivos para anticuerpos derivados de la madre (MDAs) de hembras previamente inmunizadas contra CPV durante el embarazo, se asignaron de manera aleatoria a cuatro grupos de tratamiento (n = 10 perros) utilizando el título de camada y anticuerpo. Las valoraciones de muestras de sangre recogidas el día -27 se utilizaron para la asignación al azar. Todos los perros se vacunaron dos veces, con un intervalo de 21 días con la vacuna asignada de acuerdo con la Tabla 8 a continuación. Los cachorros tenían Ab derivados de la madre de CPV el día 0.

20

Tabla 8. Diseño experimental para el ensayo de VLP de CPV frente a RECOMBITEK® C4 y NOBIVAC®

| Grupos                                                                                                                                                                                                                                                                           | Vacunación el día 0 y el día 21                                                                    | Títulos                                                                                                                                      | Número de perros |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 1                                                                                                                                                                                                                                                                                | VLP de CPV<br>Vacuna de prueba #4 (1 ml)<br>*VLPs CPV-2c                                           | 273,5 µg de proteína total<br>7,1 Log Título HA                                                                                              | 10               |
| 2                                                                                                                                                                                                                                                                                | VLP de CPV<br>#4 (0,5 ml) *VLPs CPV-2c<br>+<br>RECOMBITEK® C4<br>#1 (CDV- CAV-CPI, CPV2)*** (1 ml) | 273,5 µg de proteína total<br>7,1 Log Título HA<br><br>CPV: 6,9 TCID50/ml<br>CDV: 7,1 TCID50/ml<br>CPI: 5,8 TCID50/ml<br>CAV2: 6,0 TCID50/ml | 10               |
| 3                                                                                                                                                                                                                                                                                | RECOMBITEK® C4<br>#1 (CDV- CAV-CPI, CPV2)*** (1 ml)                                                | CPV: 6,9 TCID50/ml<br>CDV: 7,1 TCID50/ml<br>CPI: 5,8 TCID50/ml<br>CAV2: 6,0 TCID50/ml                                                        | 10               |
| 4                                                                                                                                                                                                                                                                                | NOBIVAC® 3 (CDV- CAV2-CPV2) (1 ml)                                                                 | Desconocido                                                                                                                                  | 10               |
| *Partículas similares a virus de VP2 de parvovirus canino: VLPs CPV-2c<br>**Administrados en el mismo lado que la vacuna simultánea a una distancia de aproximadamente 3 cm<br>***A la vacuna de CDV-CAV-CPI-CPV2 se le hace referencia como C4<br>HA: Hemaglutinación en 0,5 ml |                                                                                                    |                                                                                                                                              |                  |

25 **[0187]** Se recogió la sangre de todos los perros en los días 0, 7, 15, 21, 28, 35 y 42 y se puso a prueba el suero para los anticuerpos contra CPV mediante el ensayo de HAI y de anticuerpos de neutralización en suero (SNA).

**[0188]** Los títulos de HAI de CPV se presentaron como el inverso de la dilución más alta que previene la hemaglutinación y un valor <20 se consideró negativo.

**[0189]** A excepción de 2 perros en el grupo 3 (C4), todos los perros en cada grupo dieron positivo para CPV mediante HAI el día 0, antes de la vacunación. La seroconversión después de la vacunación se definió como un aumento del título de 4 veces o más a partir del día 0. Después de la primera vacunación, en 6 de los 10 perros vacunados con VLP-CPV2c (Grupo 1) y en 6 de los 10 perros vacunados con VLP-CPV2c-C4 (Grupo 2) se detectó seroconversión el día 7. No se observaron respuestas en los grupos 3 y 4 (es decir, los grupos que no contenían VLPs) el día 7. Antes del día 21, en 5 de los 10 perros del grupo 2 (VLP-CPV2c- C4), 4 de los 10 del grupo 1 (VLP- CPV2c), 3 de los 10 del grupo 4 (NOBIVAC3®) y 2 de los 10 del grupo 3 (C4) se detectó seroconversión (Figura 15).

**[0190]** Después de la segunda vacunación, antes del día 35 (2 semanas después de la vacunación) se observó la seroconversión en todos los perros de los grupos 2 (VLP-CPV2c- C4) y 4 (NOBIVAC3®) seguido de 9 en el grupo 3 (C4) y 8 en el grupo 1 (VLP-CPV2c). El tratamiento con VLP + C4 (Grupo 2) indujo el título de anticuerpos en media geométrica más alto a lo largo del estudio. Véase la Figura 17. Siete días después de V2, el día 28, el GMT de este grupo fue -7,5 veces más alto que el VLP por sí solo (GMT= 520), -9 veces más alto que C4 solo (GMT = 422) y -28 veces más alto que el grupo con NOBIVAC3® (GMT = 139).

Tabla 9. Títulos de IHA por ID y Día para el estudio de VLP de CPV frente a RECOMBITEC® C4 Y NOBIVAC®

| Grupo | Vacuna            | ID de perro | Día |      |      |      |       |      |      |
|-------|-------------------|-------------|-----|------|------|------|-------|------|------|
|       |                   |             | 0   | 7    | 15   | 21   | 28    | 35   | 42   |
| 1     | VLP CPV-2c        | LCR-5       | 80  | 40   | <20  | <20  | 40    | 40   | 40   |
|       |                   | LCR-5       | 40  | 40   | <20  | <20  | 640   | 1280 | 1280 |
|       |                   | LRR-5       | 20  | 160  | 160  | 160  | 10240 | 1280 | 1280 |
|       |                   | LVQ-5       | 20  | 80   | 80   | 80   | 2560  | 640  | 640  |
|       |                   | QQR-5       | 20  | 320  | 40   | 20   | 160   | 160  | 160  |
|       |                   | RCR-5       | 40  | 320  | 80   | 20   | 640   | 640  | 640  |
|       |                   | RDR-5       | 20  | 160  | 320  | 640  | 2560  | 1280 | 640  |
|       |                   | RGQ-5       | 20  | 320  | 320  | 320  | 1280  | 640  | 320  |
|       |                   | RLQ-5       | 80  | 80   | 40   | <20  | 80    | 160  | 320  |
|       |                   | RRR-5       | 80  | 40   | 20   | <20  | 80    | 320  | 160  |
| 2     | VLP CPV-2c+rDAPPI | LDR-5       | 20  | 160  | 160  | 40   | 5120  | 1280 | 640  |
|       |                   | LHR-5       | 40  | 40   | <20  | <20  | 1280  | 640  | 640  |
|       |                   | LSQ-5       | 20  | 1280 | 1280 | 640  | 20480 | 5120 | 2560 |
|       |                   | LWQ-5       | 40  | 160  | 5120 | 2560 | 20480 | 5120 | 5120 |
|       |                   | PKR-5       | 40  | 20   | <20  | <20  | 1280  | 1280 | 1280 |
|       |                   | PLQ-5       | 40  | 80   | 1280 | 640  | 20480 | 5120 | 5120 |
|       |                   | QRR-5       | 20  | 160  | 1280 | 1280 | 5120  | 2560 | 2560 |
|       |                   | RHQ-5       | 20  | 320  | 640  | 1280 | 5120  | 2560 | 1280 |
|       |                   | ROQ-5       | 40  | 40   | 20   | <20  | 320   | 640  | 640  |
|       |                   | RSQ-5       | 40  | 160  | 40   | 40   | 1280  | 640  | 320  |
| 3     | rDAPPI            | LPR-5       | 20  | <20  | 160  | 160  | 1280  | 640  | 640  |
|       |                   | LQR-5       | 20  | <20  | 160  | 160  | 640   | 640  | 320  |
|       |                   | LTQ-5       | 20  | <20  | <20  | <20  | 640   | 320  | 640  |
|       |                   | PIR-5       | 20  | <20  | <20  | <20  | 160   | 320  | 640  |
|       |                   | POQ-5       | <20 | <20  | <20  | <20  | 1280  | 640  | 1280 |
|       |                   | QSR-5       | 40  | 20   | 20   | <20  | 160   | 320  | 160  |
|       |                   | RER-5       | <20 | <20  | <20  | <20  | 640   | 320  | 640  |
|       |                   | PIQ-5       | 20  | <20  | <20  | <20  | 1280  | 320  | 640  |
|       |                   | PRQ-5       | 80  | 40   | 20   | 20   | <20   | <20  | <20  |
|       |                   | RTQ-5       | 20  | 20   | <20  | <20  | 640   | 320  | 320  |
| 4     | Nobivac           | LER-5       | 40  | 20   | <20  | <20  | <20   | 640  | 640  |
|       |                   | LFR-5       | 20  | <20  | <20  | <20  | 640   | 1280 | 1280 |
|       |                   | LUQ-5       | 40  | 20   | <20  | <20  | 40    | 1280 | 1280 |
|       |                   | PJR-5       | 20  | <20  | <20  | <20  | <20   | 640  | 640  |
|       |                   | QTR-5       | 40  | 20   | <20  | <20  | 160   | 2560 | 1280 |
|       |                   | RFR-5       | 20  | <20  | 1280 | 640  | 1280  | 1280 | 1280 |
|       |                   | RJQ-5       | 20  | <20  | 80   | 640  | 1280  | 2560 | 1280 |
|       |                   | RKR-5       | 40  | 20   | 20   | <20  | 40    | 1280 | 1280 |
|       |                   | RQR-5       | 40  | 20   | <20  | <20  | 160   | 320  | 320  |
|       |                   | RUQ-5       | 40  | 20   | 20   | 640  | 160   | 320  | 640  |

Tabla 10. Estadísticas resumen para el ensayo de VLP de CPV frente a RECOMBITEK® C4 y NOBIVAC®

| Día | Grupo | Vacuna             | N  | Media geométrica | Media Aritmética | Mediana | Minutos | Máx     |
|-----|-------|--------------------|----|------------------|------------------|---------|---------|---------|
| 0   | 1     | VLP CPV-2c         | 10 | 34,82            | 42,00            | 30      | 20,0    | 80,0    |
|     | 2     | VLP CPV-2c+ rDAPPI | 10 | 30,31            | 32,00            | 40      | 20,0    | 40,0    |
|     | 3     | rDAPPR             | 10 | 24,62            | 28,00            | 20      | 20,0    | 80,0    |
|     | 4     | Nobivac            | 10 | 30,31            | 32,00            | 40      | 20,0    | 40,0    |
| 7   | 1     | VLP CPV-2c         | 10 | 113,14           | 156,00           | 120     | 40,0    | 320,0   |
|     | 2     | VLP CPV-2c+ rDAPPI | 10 | 121,26           | 242,0            | 160     | 20,0    | 1280,0  |
|     | 3     | rDAPPR             | 10 | 21,44            | 22,00            | 20      | 20,0    | 40,0    |
|     | 4     | Nobivac            | 10 | 20,00            | 20,00            | 20      | 20,0    | 20,0    |
| 15  | 1     | VLP CPV-2c         | 10 | 64,98            | 110,00           | 60      | 20,0    | 320,0   |
|     | 2     | VLP CPV-2c+ rDAPPI | 10 | 226,27           | 986,00           | 400     | 20,0    | 5120,0  |
|     | 3     | rDAPPR             | 10 | 30,31            | 48,00            | 20      | 20,0    | 160,0   |
|     | 4     | Nobivac            | 10 | 34,82            | 152,00           | 20      | 20,0    | 1280,0  |
| 21  | 1     | VLP CPV-2c         | 10 | 52,78            | 132,00           | 20      | 20,0    | 640,0   |
|     | 2     | VLP CPV-2c+ rDAPPI | 10 | 171,48           | 654,00           | 340     | 20,0    | 2560,0  |
|     | 3     | rDAPPR             | 10 | 30,31            | 48,00            | 20      | 20,0    | 160,0   |
|     | 4     | Nobivac            | 10 | 56,57            | 160,00           | 20      | 20,0    | 640,0   |
| 28  | 1     | VLP CPV-2c         | 10 | 519,84           | 1828,00          | 640     | 40,0    | 10240,0 |
|     | 2     | VLP CPV-2c+ rDAPPI | 10 | 3880,23          | 8096,00          | 5120    | 320,0   | 20480,0 |
|     | 3     | rDAPPR             | 10 | 422,24           | 674,00           | 640     | 20,0    | 1280,0  |
|     | 4     | Nobivac            | 10 | 139,29           | 380,00           | 160     | 20,0    | 1280,0  |
| 35  | 1     | VLP CPV-2c         | 10 | 422,24           | 644,00           | 640     | 40,0    | 1280,0  |
|     | 2     | VLP CPV-2c+ rDAPPI | 10 | 1810,19          | 2496,00          | 1920    | 640,0   | 5120,0  |
|     | 3     | rDAPPR             | 10 | 298,57           | 386,00           | 320     | 20,0    | 640,0   |
|     | 4     | Nobivac            | 10 | 970,06           | 1216,00          | 1280    | 320,0   | 2560,0  |
| 42  | 1     | VLP CPV-2c         | 10 | 367,58           | 548,00           | 480     | 40,0    | 1280,0  |
|     | 2     | VLP CPV-2c+ rDAPPI | 10 | 1371,87          | 2016,00          | 1280    | 320,0   | 5120,0  |
|     | 3     | rDAPPR             | 10 | 367,58           | 530,00           | 640     | 20,0    | 1280,0  |
|     | 4     | Nobivac            | 10 | 905,10           | 992,00           | 1280    | 320,0   | 1280,0  |

\*Los signos "<" se eliminaron de los valores para calcular las estadísticas resumen.

- 5 Ejemplo 8 Vacunación de caninos con proteína de la cápside de CPV expresada por baculovirus (VLP), VLP + RECOMBITEK® C4, RECOMBITEK® C4 solo o NOBIVAC® 3

10 **[0191]** El objetivo de este estudio era evaluar la respuesta de anticuerpos contra CPV después de la administración de las partículas similares a virus experimentales formadas por la proteína de la cápside de VP2 de parvovirus canino del tipo 2c (VLPs CPV-2c) a títulos diferentes en combinación con una formulación de vacuna multivalente de MLV de CPV-2 y una vacuna comercial en perros con MDAs de CPV.

15 **[0192]** Cincuenta perros de raza beagle de 6-7 semanas de edad positivos para anticuerpos derivados de la madre (MDAs) de hembras previamente inmunizados contra CPV durante el embarazo, se asignaron de manera aleatoria a cinco grupos de tratamiento (n = 10 perros por grupo) utilizando el título de camada y anticuerpo. Las titulaciones de muestras de sangre recogidas el día -15 se utilizaron para la asignación al azar.

20 **[0193]** Las vacunas se prepararon mediante la rehidratación de un componente liofilizado con un componente diluyente. El número de serie liofilizada utilizado para las vacunas de prueba #1, #2, #3 y #5 fue la misma vacuna experimental 4-way (C4). Los títulos para cada componente fueron los siguientes: CPV:6,1 Log TCID50/ml (~0,2 ml de 1X cultivo), CDV: 7,3 Log TCID50/ml, CPI: 5,5 Log TCID50/ml y CAV2:6,0 Log TCID50/ml. Todos los perros se vacunaron dos veces, con un intervalo de 21 días con la vacuna asignada de acuerdo con la Tabla 11 a continuación.

## ES 2 974 666 T3

Tabla 11. Diseño experimental para el ensayo de VLP de CPV frente a RECOMBITEK® C4 y NOBIVAC®

| GRUPO (n=10)                          | Componente liofilizado de la vacuna           | Componente diluyente de la vacuna                                                                                                           |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1<br>C4 + Dosis alta de VLP-CPV2c     | CDV-CAV2-CPi-CPV                              | VLPs CPV-2c; lote número: 14 de diciembre de 2015<br>No diluido<br>7,0 Log aHA /ml<br>~10 ml de 1X cultivo                                  |
| 2<br>C4 + Dosis moderada de VLP-CPV2c | CDV-CAV2-CPi-CPV                              | VLPs CPV-2c; lote número: 14 de diciembre de 2015<br>Diluida con una proporción de 1:5 en agua<br>6,3 Log aHA /ml<br>~2 ml de 1X cultivo    |
| 3<br>C4 + Dosis baja de VLP-CPV2c     | CDV-CAV2-CPi-CPV                              | VLPs CPV-2c; lote número: 14 de diciembre de 2015<br>Diluido con una proporción de 1:25 en agua<br>5,7 Log aHA /ml<br>~0,4 ml de 1X cultivo |
| 4<br>Nobivac®<br>3DAPv                | Nobivac® canino3<br>(CDV-CAV2-CPV2)<br>(1 ml) | Desconocido                                                                                                                                 |
| 5<br>C4 sin VLP-CPV2c                 | CDV-CAV2-CPi-CPV                              | Agua                                                                                                                                        |

**[0194]** Se recogió la sangre de todos los perros los días 0, 7, 15, 21, 28, 34 y 42 y se analizó el suero para los anticuerpos contra CPV mediante el ensayo de HAI.

5 **[0195]** Los títulos de HAI de CPV se presentaron como el inverso de la dilución más alta que previene la hemaglutinación y un valor <20 se consideró negativo. Todos los perros en cada grupo dieron positivo para CPV mediante HAI el día 0, antes de la vacunación (los títulos promedios en GMT para todos los grupos estaban entre 42,87 y 80). La seroconversión después de la vacunación se definió como un aumento del título de 4 veces o más a partir del día 0. Los perros con seroconversión se clasificaron como respondedores (Figura 18). Siete días después de la primera vacunación, en 5 de los 10 perros vacunados con la dosis alta de VLP-CPV2c-C4 (Grupo 1) y en 1 de los 10 perros vacunados con la dosis moderada de VLP-CPV2c-C4 (Grupo 2) se detectó seroconversión. No se observaron respondedores en los grupos 3, 4 y 5 (es decir, los grupos que contenían una cantidad baja o ninguna de VLPs) el día 7. Veintiún días después de la primera vacunación, todos los perros del grupo 1 (dosis alta de VLP-CPV2c-C4), 3 de los 10 del grupo 2 (dosis moderada de VLP-CPV2c-C4), 1 de los 10 del grupo 3 (dosis baja de VLP-CPV2c-C4). No se observaron respondedores en los grupos 4 y 5 (es decir, los grupos que no contenían VLPs) (Figura 18).

20 **[0196]** El día 34, 13 días después de la segunda vacunación, se observó seroconversión en todos los perros del grupo 1 (dosis alta de VLP-CPV2c-C4) y 4 (NOBIVAC3®), seguido de 9 en el grupo 2 (dosis moderada de VLP-CPV2c-C4), 6 en el grupo 3 (dosis baja de VLP-CPV2c-C4) y 1 en el grupo 5 (C4 sin VLP).

25 **[0197]** Tal como se muestra en la Figura 19, el tratamiento con la dosis alta de VLP + C4 (Grupo 1) indujo el título de anticuerpos en media geométrica más alto a lo largo del estudio. Trece días después de V2, el día 34, el GMT de este grupo fue 4457,22, seguido de los grupos con la dosis moderada de VLP-CPV2c-C4 y el NOBIVAC3®; (GMT = 1470,33), la dosis baja de VLP-CPV2c-C4 (GMT = 298,57) y C4 solo (GMT = 45,95).

Tabla 12. Resultados de HI por grupo, ID y día para el segundo estudio de VLP de CPV frente a RECOMBITEK® C4 y NOBIVAC®

|       |                                                                |      | Día |      |      |      |       |       |      |
|-------|----------------------------------------------------------------|------|-----|------|------|------|-------|-------|------|
| Grupo | *Vacuna                                                        | ID   | 0   | 7    | 15   | 21   | 28    | 34    | 42   |
| 1     | Vacuna de ensayo número 1 (rDAPP; C4) + VLPs CPV-2c 7,1 Log HA | PFE6 | 40  | 320  | 640  | 1280 | 5120  | 5120  | 2560 |
|       |                                                                | PRD6 | 40  | 5120 | 5120 | 2560 | 5120  | 5120  | 2560 |
|       |                                                                | QFC6 | 40  | 5120 | 5120 | 5120 | 10240 | 10240 | 5120 |

# ES 2 974 666 T3

|   |                                                                |      |       |        |        |        |        |         |         |
|---|----------------------------------------------------------------|------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
|   |                                                                | QOE6 | 20    | 160    | 2560   | 2560   | 10240  | 5120    | 5120    |
|   |                                                                | RIE6 | 80    | 80     | 40     | 20     | 1280   | 2560    | 2560    |
|   |                                                                | RKD6 | 80    | 320    | 1280   | 640    | 10240  | 5120    | 2560    |
|   |                                                                | SPF6 | 160   | 80     | 2560   | 1280   | 10240  | 10240   | 5120    |
|   |                                                                | TAF6 | 80    | 160    | 1280   | 640    | 10240  | 5120    | 5120    |
|   |                                                                | VAF6 | 80    | 160    | 80     | 80     | 640    | 1280    | 1280    |
|   |                                                                | VCE6 | 40    | 80     | 80     | 40     | 5120   | 2560    | 2560    |
|   |                                                                | GMT  | 56,57 | 298,57 | 735,17 | 519,84 | 5120,0 | 4457,22 | 3151,73 |
| 2 | Vacuna de ensayo número 2 (rDAPP; C4) + VLPs CPV-2c 6,4 Log HA | PWF6 | 40    | 160    | 320    | 160    | 2560   | 2560    | 1280    |
|   |                                                                | QBF6 | 160   | 160    | 80     | 40     | 640    | 640     | 320     |
|   |                                                                | QLE6 | 40    | 80     | 1280   | 2560   | 10240  | 10240   | 5120    |
|   |                                                                | RJD6 | 80    | 80     | 320    | 160    | 2560   | 1280    | 1280    |
|   |                                                                | RWE6 | 80    | 80     | 20     | <20    | 80     | 2560    | 1280    |
|   |                                                                | RXE6 | 40    | 80     | 20     | 20     | 320    | 640     | 640     |
|   |                                                                | STE6 | 80    | 40     | 20     | 20     | 40     | 640     | 320     |
|   |                                                                | SUF6 | 40    | 40     | 40     | 20     | 160    | 5120    | 2560    |
|   |                                                                | TBF6 | 80    | 40     | 40     | 40     | 320    | 2560    | 1280    |
|   |                                                                | VDE6 | 80    | 40     | 40     | 20     | 40     | 160     | 160     |
|   |                                                                | GMT  | 64,98 | 69,64  | 74,64  | 56,57  | 393,97 | 1470,33 | 905,10  |
| 3 | Vacuna de ensayo número 1 (rDAPP; C4) + VLPs CPV-2c 5,7 Log HA | QDE6 | 80    | 40     | 20     | 20     | 40     | 80      | 80      |
|   |                                                                | QED6 | 40    | 40     | 320    | 320    | 2560   | 2560    | 1280    |
|   |                                                                | QKE6 | 40    | 20     | <20    | <20    | 40     | 160     | 160     |
|   |                                                                | RGF6 | 40    | 80     | 40     | 20     | 40     | 1280    | 640     |
|   |                                                                | RPD6 | 40    | 40     | 20     | 20     | 40     | 1280    | 640     |
|   |                                                                | RTF6 | 40    | 40     | 20     | <20    | 80     | 1280    | 1280    |
|   |                                                                | SCE6 | 20    | 20     | <20    | <20    | 1280   | 1280    | 1280    |
|   |                                                                | SQF6 | 80    | 40     | 40     | 20     | 40     | 160     | 160     |
|   |                                                                | UOE6 | 40    | 20     | 20     | <20    | 40     | 20      | <20     |
|   |                                                                | UXF6 | 40    | 40     | 20     | 20     | 20     | <20     | <20     |
|   |                                                                | GMT  | 42,87 | 34,82  | 30,31  | 26,39  | 85,74  | 298,57  | 242,51  |
| 4 | Nobivac® Canino 3-DAPv                                         | PCE6 | 20    | <20    | <20    | <20    | 40     | 640     | 640     |
|   |                                                                | QCF6 | 80    | 40     | 20     | <20    | <20    | 2560    | 640     |
|   |                                                                | RFF6 | 160   | 40     | 20     | 20     | 20     | 1280    | 640     |
|   |                                                                | RLD6 | 160   | 160    | 20     | <20    | <20    | 2560    | 1280    |
|   |                                                                | ROD6 | 160   | 40     | 20     | <20    | <20    | 1280    | 1280    |
|   |                                                                | SDE6 | 40    | 40     | 20     | <20    | 40     | 1280    | 1280    |
|   |                                                                | SWE6 | 40    | 20     | <20    | <20    | <20    | 640     | 320     |
|   |                                                                | SXE6 | 40    | 20     | 20     | <20    | <20    | 1280    | 1280    |
|   |                                                                | TCE6 | 160   | 40     | <20    | 20     | <20    | 2560    | 1280    |
|   |                                                                | UYF6 | 160   | 160    | 40     | 40     | <20    | 2560    | 1280    |

# ES 2 974 666 T3

|   |                                       |      |       |       |       |       |       |         |        |
|---|---------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|--------|
|   |                                       | GMT  | 80,00 | 42,87 | 21,44 | 21,44 | 22,97 | 1470,33 | 905,10 |
| 5 | Vacuna de ensayo número 5 (rDAPP; C4) | PBE6 | 20    | <20   | <20   | <20   | 80    | 1280    | 640    |
|   |                                       | REF6 | 80    | 40    | 20    | <20   | <20   | <20     | <20    |
|   |                                       | RHE6 | 160   | 20    | <20   | <20   | <20   | <20     | <20    |
|   |                                       | RUE6 | 80    | 80    | 40    | 20    | <20   | <20     | <20    |
|   |                                       | SVF6 | 160   | <20   | <20   | <20   | <20   | <20     | <20    |
|   |                                       | TDE6 | 160   | 160   | 40    | <20   | <20   | <20     | <20    |
|   |                                       | ULF6 | 20    | 20    | <20   | <20   | <20   | 320     | 320    |
|   |                                       | UPE6 | 80    | 20    | <20   | <20   | <20   | 80      | 320    |
|   |                                       | UZF6 | 160   | 160   | 40    | 20    | 20    | <20     | <20    |
|   |                                       | VPF6 | 80    | 20    | 20    | 20    | <20   | <20     | <20    |
|   |                                       | GMT  | 80,00 | 37,32 | 24,62 | 20,00 | 22,97 | 45,95   | 49,25  |

\*A efectos del Ejemplo 8, los nombres a continuación se utilizarán en las siguientes tablas y gráficos.

\* C4 + Alta dosis de VLP-CPV2c = Vacuna de ensayo número 1

\* C4 + Dosis moderada de VLP-CPV2c = Vacuna de ensayo número 2

\* C4 + Dosis baja de VLP-CPV2c = Vacuna de ensayo número 3

\* C4 + Sin VLP-CPV2c = Vacuna de ensayo número 5

Tabla 13. Estadísticas resumen\* por grupo del segundo estudio para VLP de CPV frente a RECOMBITEK® C4 y NOBIVAC®

| Día | Grupo | Vacuna                           | N  | Media geométrica | Media Aritmética | Mediana | Minutos | Max    |
|-----|-------|----------------------------------|----|------------------|------------------|---------|---------|--------|
| 0   | 1     | C4 + Alta dosis de VLP-CPV2c     | 10 | 56,57            | 66,00            | 60      | 20,0    | 160,0  |
|     | 2     | C4 + Dosis moderada de VLP-CPV2c | 10 | 64,98            | 72,00            | 80      | 40,0    | 160,0  |
|     | 3     | C4 + Dosis baja de VLP-CPV2c     | 10 | 42,87            | 46,00            | 40      | 20,0    | 80,0   |
|     | 4     | Nobivac® Canino 3-DAPv           | 10 | 80,00            | 102,00           | 120     | 20,0    | 160,0  |
|     | 5     | C4 + Sin VLP-CPV2c               | 10 | 80,00            | 102,00           | 80      | 20,0    | 160,0  |
| 7   | 1     | C4 + Alta dosis de VLP-CPV2c     | 10 | 298,57           | 1160,00          | 160     | 80,0    | 5120,0 |
|     | 2     | C4 + Dosis moderada de VLP-CPV2c | 10 | 69,64            | 80,0             | 80      | 40,0    | 160,0  |
|     | 3     | C4 + Dosis baja de VLP-CPV2c     | 10 | 34,82            | 38,00            | 40      | 20,0    | 80,0   |
|     | 4     | Nobivac® Canino 3-DAPv           | 10 | 42,87            | 58,00            | 40      | 20,0    | 160,0  |

# ES 2 974 666 T3

|    |   |                                            |    |         |         |      |        |         |
|----|---|--------------------------------------------|----|---------|---------|------|--------|---------|
|    | 5 | C4 + Sin<br>VLP-<br>CPV2c                  |    | 37,32   | 56,00   | 20   | 20,0   | 160,0   |
| 15 | 1 | C4 + Alta<br>dosis de<br>VLP-<br>CPV2c     | 10 | 735,17  | 1876,00 | 1280 | 40,0   | 5120,0  |
|    | 2 | C4 + Dosis<br>moderada<br>de VLP-<br>CPV2c | 10 | 74,64   | 218,00  | 40   | 20,0   | 1280,0  |
|    | 3 | C4 + Dosis<br>baja de<br>VLP-<br>CPV2c     | 10 | 30,31   | 54,00   | 20   | 20,0   | 320,0   |
|    | 4 | Nobivac®<br>Canino 3-<br>DAPv              | 10 | 21,44   | 22,00   | 20   | 20,0   | 40,0    |
|    | 5 | C4 + Sin<br>VLP-<br>CPV2c                  | 10 | 24,62   | 26,00   | 20   | 20,0   | 40,0    |
| 21 | 1 | C4 + Alta<br>dosis de<br>VLP-<br>CPV2c     | 10 | 519,84  | 1422,00 | 960  | 20,0   | 5120,0  |
|    | 2 | C4 + Dosis<br>moderada<br>de VLP-<br>CPV2c | 10 | 56,57   | 306,00  | 30   | 20,0   | 2560,0  |
|    | 3 | C4 + Dosis<br>baja de<br>VLP-<br>CPV2c     | 10 | 26,39   | 50,00   | 20   | 20,0   | 320,0   |
|    | 4 | Nobivac ®<br>Canino 3-<br>DAPv             | 10 | 21,44   | 22,00   | 20   | 20,0   | 40,0    |
|    | 5 | C4 + Sin<br>VLP-<br>CPV2c                  | 10 | 20,00   | 20,00   | 20   | 20,0   | 20,0    |
| 28 | 1 | C4 + Alta<br>dosis de<br>VLP-<br>CPV2c     | 10 | 5120,00 | 6848,00 | 7680 | 640,0  | 10240,0 |
|    | 2 | C4 + Dosis<br>moderada<br>de VLP-<br>CPV2c | 10 | 393,97  | 1696,00 | 320  | 40,0   | 10240,0 |
|    | 3 | C4 + Dosis<br>baja de<br>VLP-<br>CPV2c     | 10 | 85,74   | 418,00  | 40   | 20,0   | 2560,0  |
|    | 4 | Nobivac®<br>Canino 3-<br>DAPv              | 10 | 22,97   | 24,00   | 20   | 20,0   | 40,0    |
|    | 5 | C4 + Sin<br>VLP-<br>CPV2c                  | 10 | 22,97   | 26,00   | 20   | 20,0   | 80,0    |
| 34 | 1 | C4 + Alta<br>dosis de<br>VLP-<br>CPV2c     | 10 | 4457,22 | 5248,00 | 5120 | 1280,0 | 10240,0 |

ES 2 974 666 T3

|    |   |                                  |    |         |         |      |        |         |
|----|---|----------------------------------|----|---------|---------|------|--------|---------|
|    | 2 | C4 + Dosis moderada de VLP-CPV2c | 10 | 1470,33 | 2640,00 | 1920 | 160,0  | 10240,0 |
|    | 3 | C4 + Dosis baja de VLP-CPV2c     | 10 | 298,57  | 812,00  | 720  | 20,0   | 2560,0  |
|    | 4 | Nobivac® Canino 3-DAPv           | 10 | 1470,33 | 1664,00 | 1280 | 640,0  | 2560,0  |
|    | 5 | C4 + Sin VLP-CPV2c               | 10 | 45,95   | 182,00  | 20   | 20,0   | 1280,0  |
| 42 | 1 | C4 + Alta dosis de VLP-CPV2c     | 10 | 3151,73 | 3456,00 | 2560 | 1280,0 | 5120,0  |
|    | 2 | C4 + Dosis moderada de VLP-CPV2c | 10 | 905,10  | 1425,00 | 1280 | 160,0  | 5120,0  |
|    | 3 | C4 + Dosis baja de VLP-CPV2c     | 10 | 242,51  | 556,00  | 400  | 20,0   | 1280,0  |
|    | 4 | Nobivac® Canino 3-DAPv           | 10 | 905,10  | 992,00  | 1280 | 320,0  | 1280,0  |
|    | 5 | C4 + Sin VLP-CPV2c               | 10 | 49,25   | 142,0   | 20   | 20,0   | 640,0   |

Tabla 14: Número de respondedores (Seroconversión) por grupo y día; 1 = Sí, 0 = No: la seroconversión se define como un incremento de 4 veces o superior en título con respecto a la referencia.

|       |                               |       | Día |   |    |    |    |    |    |
|-------|-------------------------------|-------|-----|---|----|----|----|----|----|
| Grupo | Vacuna                        | ID    | 0   | 7 | 15 | 21 | 28 | 34 | 42 |
| 1     | C4 + dosis alta VLP-CPV2c     | PFE6  | 0   | 1 | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | PRD6  | 0   | 1 | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | QFC6  | 0   | 1 | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | QOE6  | 0   | 1 | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | RIE6  | 0   | 0 | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | RKD6  | 0   | 1 | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | SPF6  | 0   | 0 | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | TAF6  | 0   | 0 | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | VAF6  | 0   | 0 | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | VCE6  | 0   | 0 | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | Total | 0   | 5 | 7  | 7  | 10 | 10 | 10 |
| 2     | C4 + dosis moderada VLP-CPV2c | ID    | 0   | 1 | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | PWF6  | 0   | 0 | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | QBF6  | 0   | 0 | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | QLE6  | 0   | 0 | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | RJD6  | 0   | 0 | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | RWE6  | 0   | 0 | 0  | 0  | 0  | 1  | 1  |
|       |                               | RXE6  | 0   | 0 | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | STE6  | 0   | 0 | 0  | 0  | 0  | 1  | 1  |
|       |                               | SUF6  | 0   | 0 | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | TBF6  | 0   | 0 | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  |
|       |                               | VDE6  | 0   | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|       |                               | Total | 0   | 1 | 3  | 3  | 7  | 9  | 9  |
| 3     | C4 + dosis baja VLP-          | ID    | 0   | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|       |                               | QDE6  |     |   |    |    |    |    |    |

|   |                        |       |   |   |   |   |   |    |
|---|------------------------|-------|---|---|---|---|---|----|
|   | CPV2c                  | QED6  | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1  |
|   |                        | QKE6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | RGF6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | RPD6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | RTF6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | SCE6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1  |
|   |                        | SQF6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  |
|   |                        | UOE6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  |
|   |                        | UXF6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  |
|   |                        | Total | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 6  |
| 4 | Nobivac® 3-DAPv canino | ID    | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | PCE6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | QCF6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | RFF6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | RLD6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | ROD6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | SDE6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | SWE6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | SXE6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | TCE6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | UYF6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| 5 | C4 + No VLP-CPV2c      | ID    | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1  |
|   |                        | PBE6  |   |   |   |   |   |    |
|   |                        | REF6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  |
|   |                        | RHE6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  |
|   |                        | RUE6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  |
|   |                        | SVF6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  |
|   |                        | TDE6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  |
|   |                        | ULF6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1  |
|   |                        | UPE6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  |
|   |                        | UZF6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  |
|   |                        | VBF6  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  |
|   |                        | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2  |

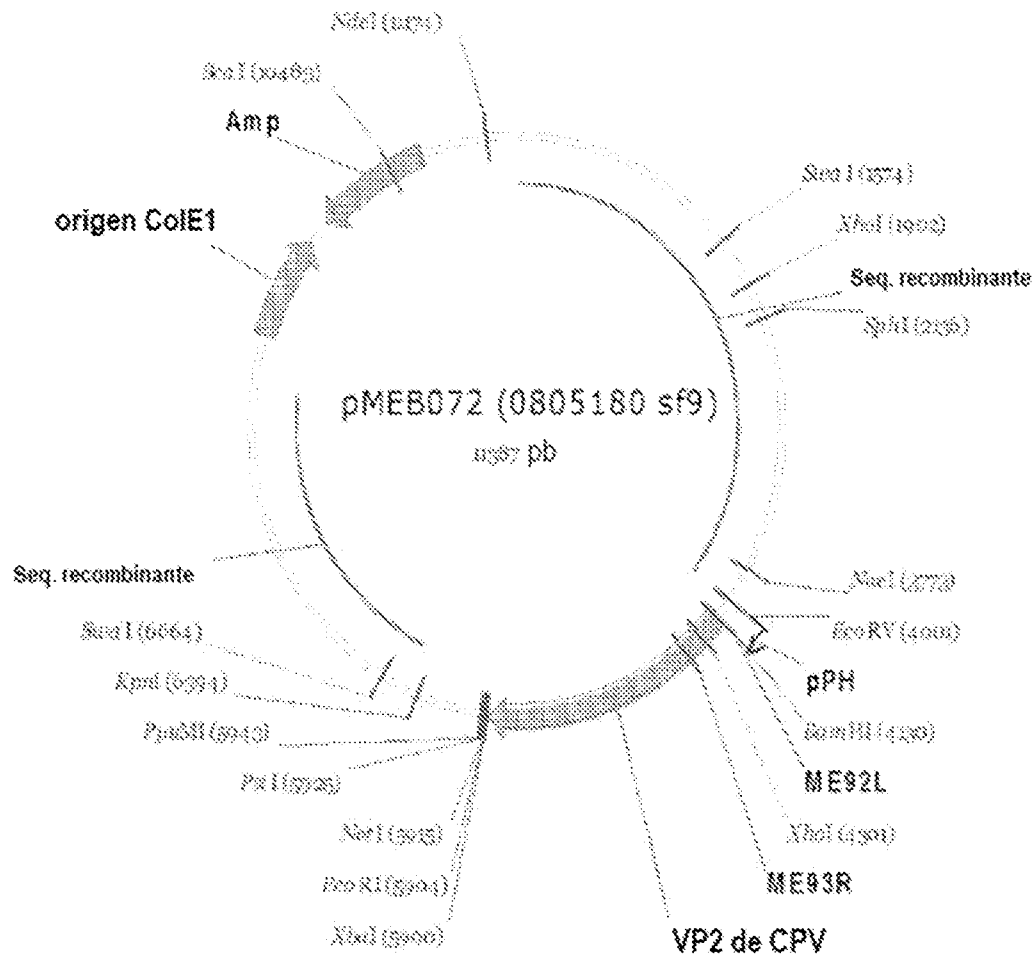
[0198] En consecuencia, las VLP de CPV promovieron un inicio más temprano de inmunidad (OOI, *onset of immunity*) que el MLV solo en cachorros MDA+, y las VLP de CPV tienen sinergia con MLV C4 en cachorros MDA+. El solicitante sostiene que estos resultados fueron inesperados y extremadamente favorables. Superar los anticuerpos derivados de la madre ha sido un desafío para los biólogos de vacunas durante mucho tiempo, y estos datos indican que el enfoque VLP + MLV descrito en este documento puede aplicarse ampliamente al problema de proporcionar inmunidad protectora a la descendencia MDA+.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna combinada que comprende una partícula similar al virus (VLP) del parvovirus canino (CPV) y un virus vivo modificado (MLV) de CPV, en la que tanto la VLP como el MLV provocan una respuesta inmunitaria contra CPV, y en la que la vacuna combinada supera los anticuerpos derivados de la madre (MDA).
2. Vacuna combinada, según la reivindicación 1, que proporciona inmunidad protectora con una sola dosis.
- 10 3. Vacuna combinada, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la VLP de la combinación comprende al menos un 10 % de VLP de CPV (p/p) en función del contenido total de proteínas.
4. Vacuna combinada, según la reivindicación 3, en la que la VLP comprende al menos un 20 % de VLP de CPV (p/p).
- 15 5. Vacuna combinada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la VLP de CPV se expresa mediante un vector de baculovirus en células de insecto.
6. Vacuna combinada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la VLP de CPV comprende al menos una proteína de la cápside de CPV.
- 20 7. Vacuna combinada, según la reivindicación 6, en la que la proteína de la cápside de CPV comprende polipéptidos VP2 de CPV o variantes, incluidas versiones truncadas de los mismos.
8. Vacuna combinada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la VLP de CPV comprende un polipéptido de CPV que tiene la secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 8, 9 o 10; o,
- 25 en la que la VLP de CPV comprende un polipéptido de CPV que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia tal como se establece en las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 6, 8, 9 o 10.
9. Vacuna combinada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la VLP de CPV comprende un polipéptido de CPV codificado por el polinucleótido que tiene la secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 5;
- 30 o,
- en la que la VLP de CPV comprende un polipéptido de CPV codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 5.
10. Vacuna combinada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la vacuna combinada no tiene adyuvante y opcionalmente comprende un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.
- 35 11. Vacuna combinada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria en un animal contra CPV que comprende administrar al animal dicha vacuna combinada.
- 40 12. Vacuna combinada para su uso, según la reivindicación 11, en la que la respuesta inmunitaria es protectora y en la que la respuesta inmunitaria protectora protege a los vacunados contra la exposición posterior al CPV virulento.
- 45 13. Vacuna combinada para su uso, según la reivindicación 12, en la que la respuesta inmunitaria protectora se provoca en los animales vacunados, independientemente de la presencia en dichos animales de niveles elevados de anticuerpos derivados de la madre (MDA) contra el CPV.

FIGURA 1

| SEQ ID NO | Tipo     | Descripción del gen                                                                    |
|-----------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1         | Proteína | VP2 de CPV – GenBank BAD34656.1                                                        |
| 2         | ADN      | pVL1393 – vector de transferencia de baculovirus 9632                                  |
| 3         | Proteína | VP2 de CPV Souriou (serotipo 2c)                                                       |
| 4         | Proteína | VP2 de CPV no truncada en pMEB072                                                      |
| 5         | ADN      | Ácido nucleico optimizado en codones de pMEB072 que codifica VP2 de CPV (SEQ ID NO: 4) |
| 6         | Proteína | VP2 de CPV truncada en pMEB073                                                         |
| 7         | ADN      | Ácido nucleico optimizado en codones de pMEB073 que codifica VP2 de CPV (SEQ ID NO: 6) |
| 8         | Proteína | GenBank: AHW47988.1 (una VP2 de CPV)                                                   |
| 9         | Proteína | GenBank: AHW47989.1 (una VP2 de CPV)                                                   |
| 10        | Proteína | GenBank: ADA61118.1 (una VP2 de CPV)                                                   |
| 11        | ADN      | pMEB072                                                                                |
| 12        | ADN      | pMEB073                                                                                |



- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>⊠ CBP (2 total)</p> <p>⊠ VP2 de CPV</p> <p>Inicio : 14141 Fin : 5908</p> <p>Descripción de localización original:<br/>4125...5908</p> <p>⊠ Amp</p> <p>Inicio : 9000 Fin : 10720 (complementario)</p> <p>Descripción de localización original:<br/>complemento 5908...10720</p> <p>⊠ Cebador (2 total)</p> <p>⊠ Promotor procaríota (1 total)</p> <p>⊠ pPH</p> <p>Inicio : 3990 Fin : 4992</p> <p>Descripción de localización original:<br/>3990...4992</p> | <p>⊠ Site de unión a proteína (2 total)</p> <p>⊠ Seq. recombinante</p> <p>Inicio : 1 Fin : 3997</p> <p>Descripción de localización original:<br/>1...3997</p> <p>⊠ Seq. recombinante</p> <p>Inicio : 6493 Fin : 8787</p> <p>Descripción de localización original:<br/>6493...8787</p> <p>⊠ Origen de replicación (1 total)</p> <p>⊠ origen ColE1</p> <p>Inicio : 9111 Fin : 9204</p> <p>Descripción de localización original:<br/>9111...9204</p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

FIG. 2

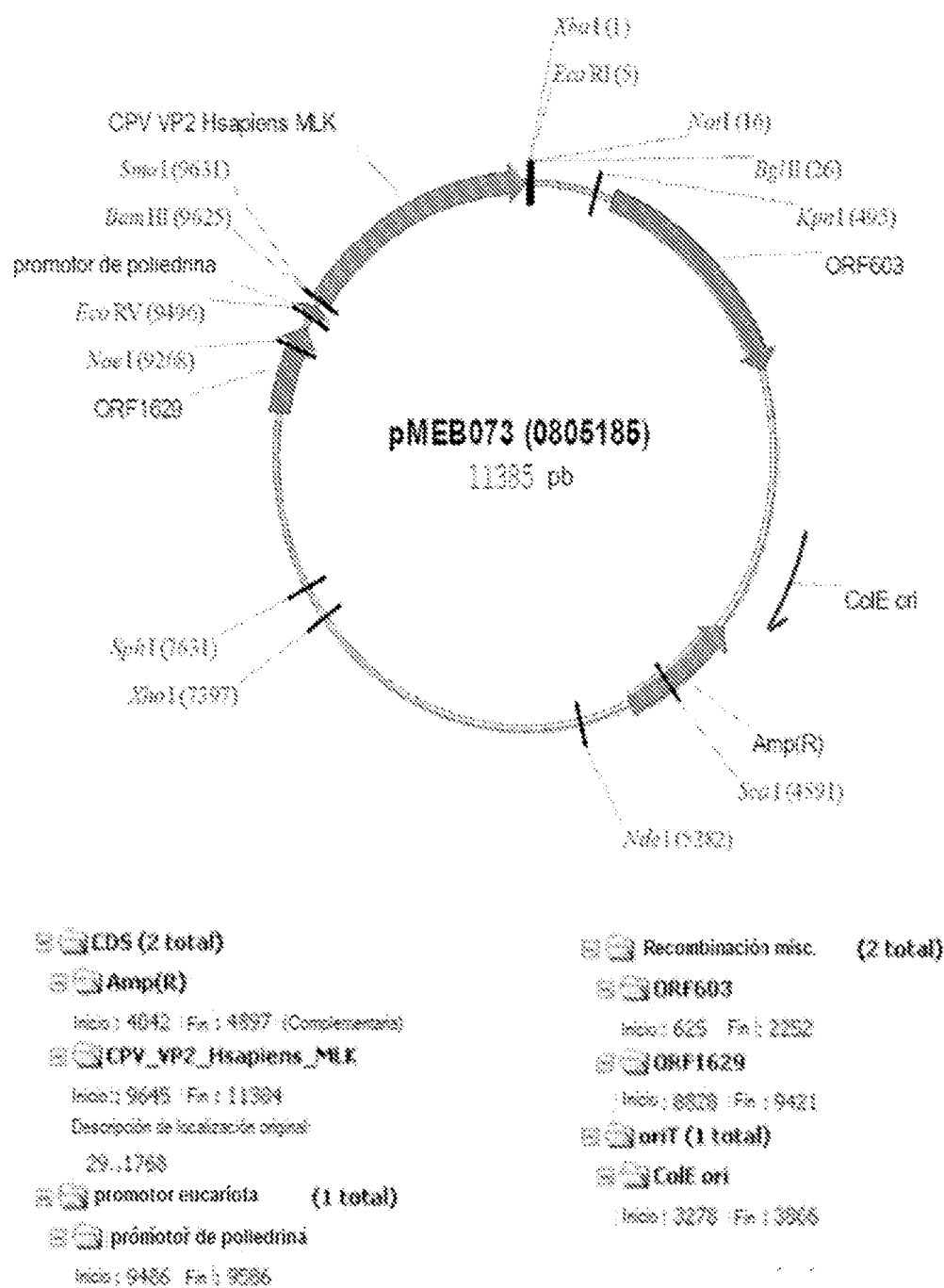
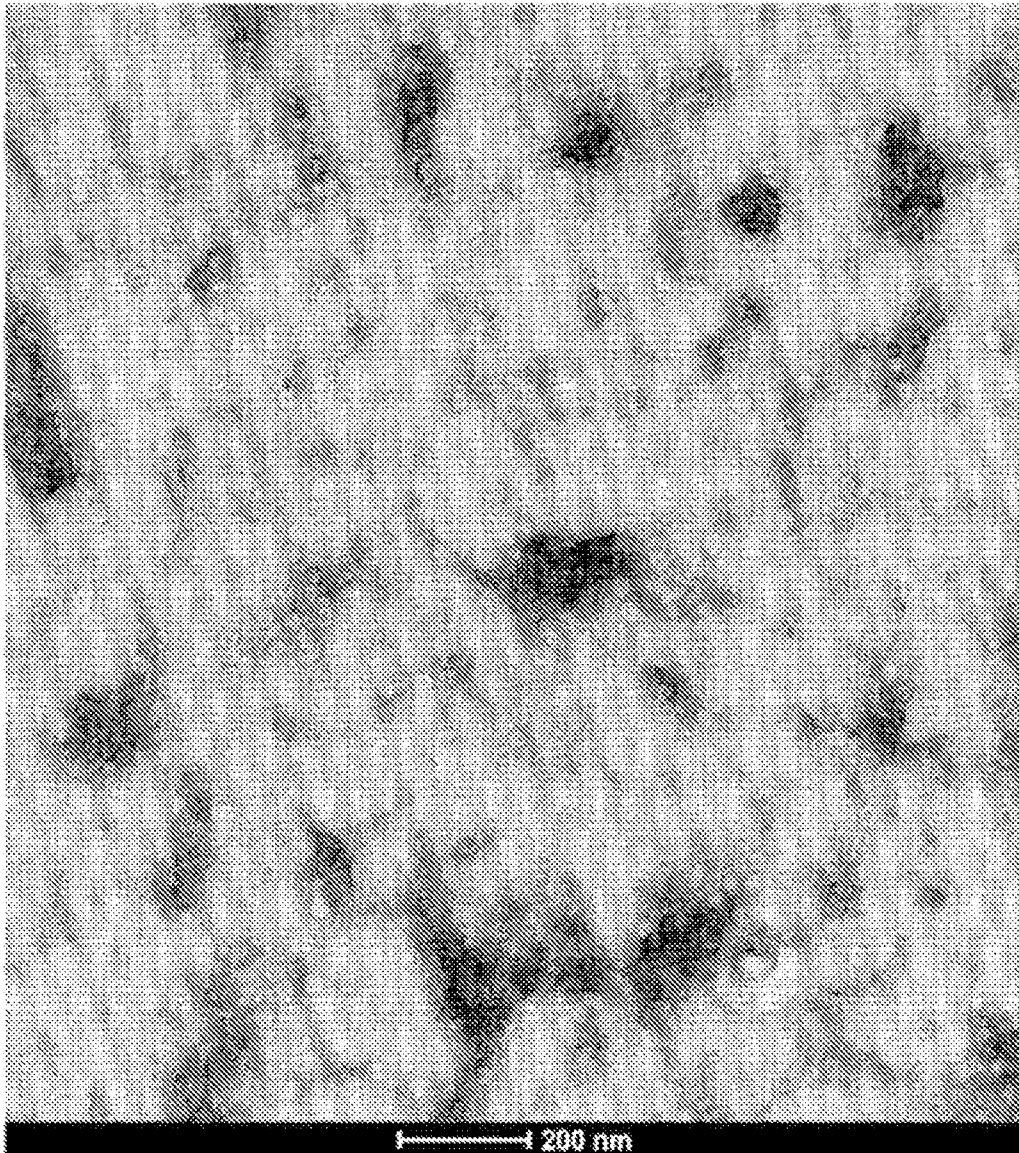
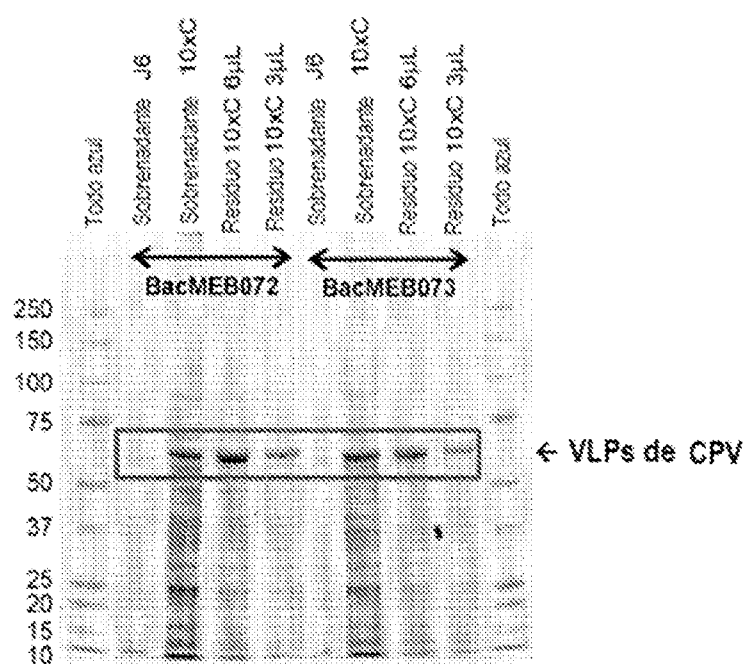


FIG. 3

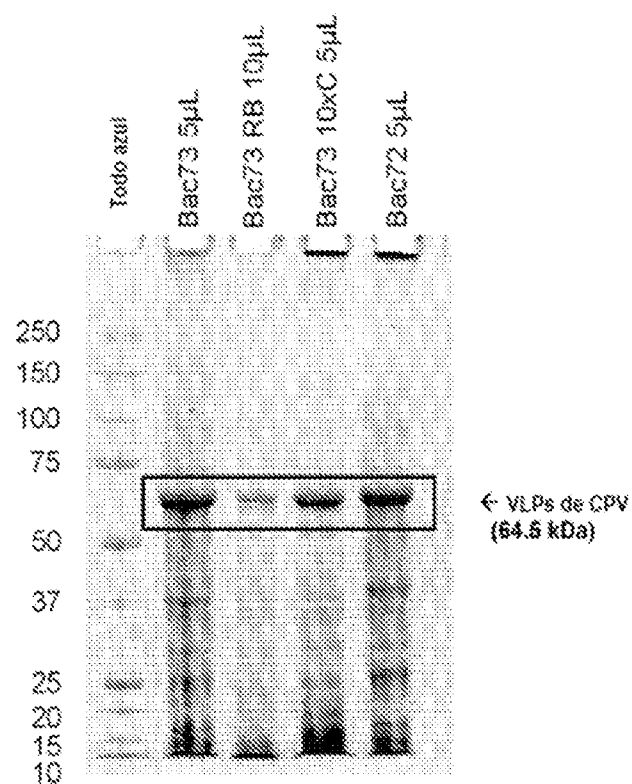


*FIG. 4*



| Lote       | Etapas                       | Escala de VLP | Total | % VLPs |
|------------|------------------------------|---------------|-------|--------|
| BacMEB072  | Sobrenadante D6 :            | 3             | 28    | 11     |
|            | 10x Sobrenadante concentrado | 20            | 90    | 22     |
|            | Residuo 6 µL                 | 41            | 79    | 52     |
|            | Residuo 3 µL                 | 22            | 52    | 42     |
| Bac MEB073 | Sobrenadante D6 :            | 2             | 11    | 18     |
|            | 10x Sobrenadante concentrado | 31            | 121   | 26     |
|            | Residuo 6 µL                 | 35            | 64    | 55     |
|            | Residuo 3 µL                 | 17            | 34    | 50     |

FIG. 5



| Nombre de la muestra                       | Pureza estimada por SDS | Proteína total µg/ml | [VLPs de CPV] µg/ml | Título por ELISA en Log10 DU50/ml |
|--------------------------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------------|
| CPV VLP<br>BacMEBo73 P4<br>10x Concentrada | 53%                     | 2122                 | 1134                | 5.48                              |
| CPV VLP<br>BacMEBo73 P5                    | 54%                     | 503                  | 273                 | 4.99                              |
| CPV VLP<br>BacMEBo73 P5<br>10x Concentrada | 55%                     | 1986                 | 1096                | 5.60                              |
| CPV VLP<br>BacMEBo72 P4<br>10x Concentrada | 43%                     | 2410                 | 1041                | 5.67                              |

FIG. 6

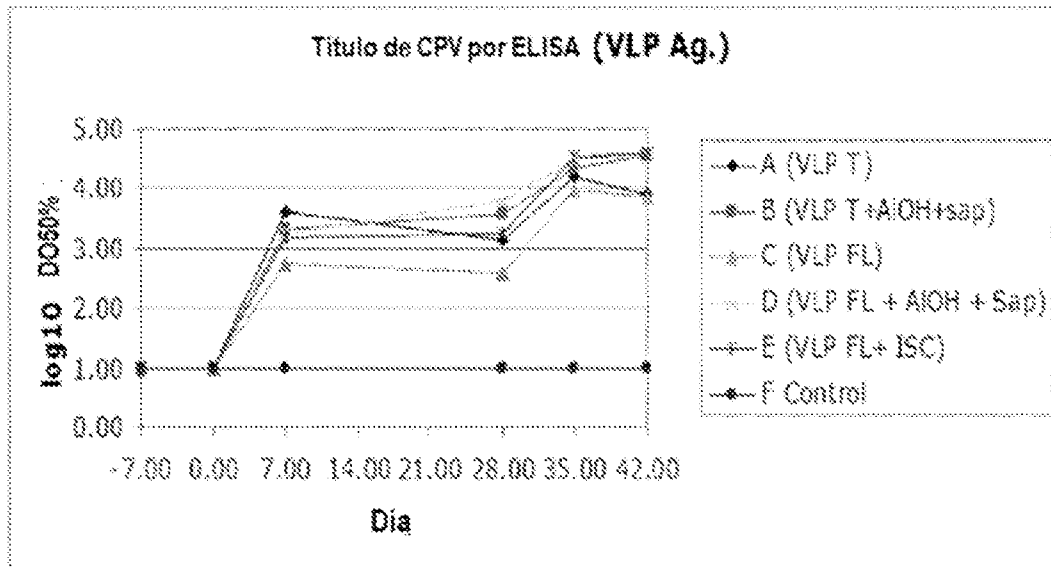


FIG. 7

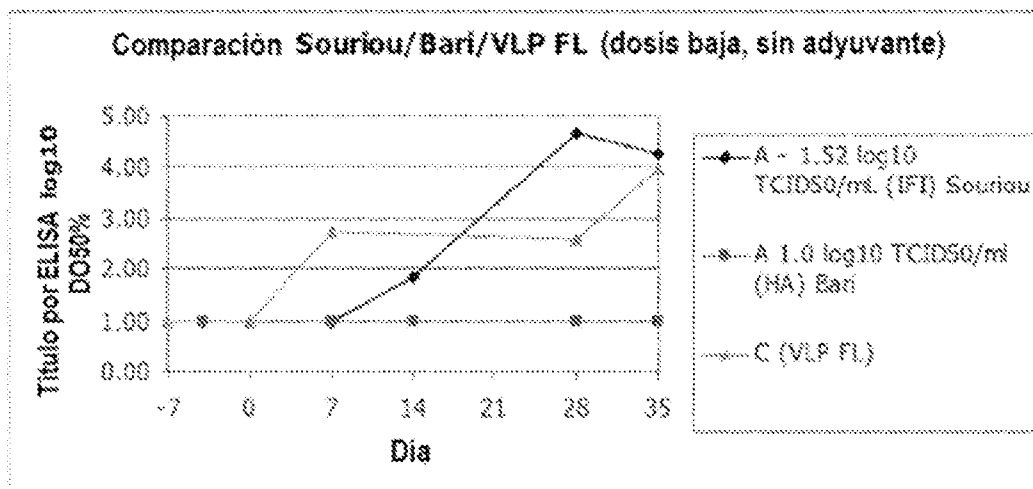


FIG. 8

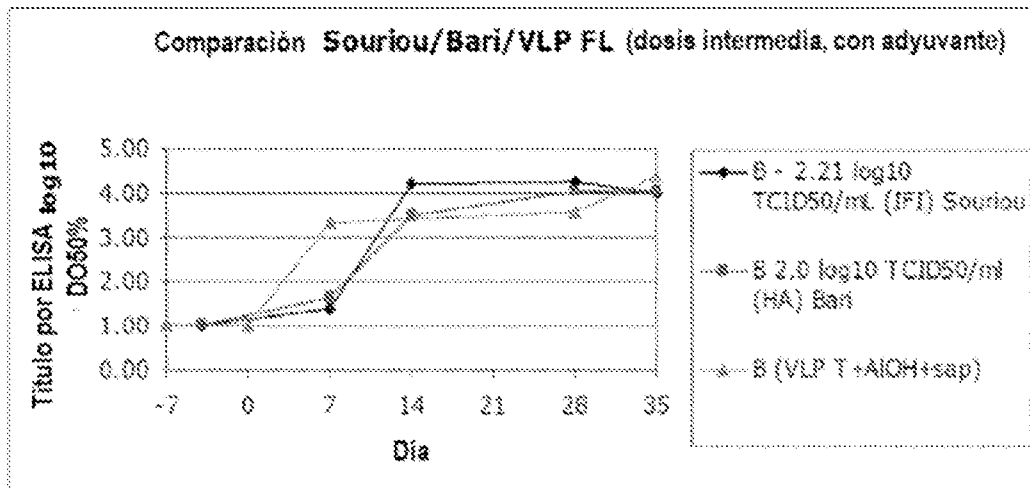


FIG. 9

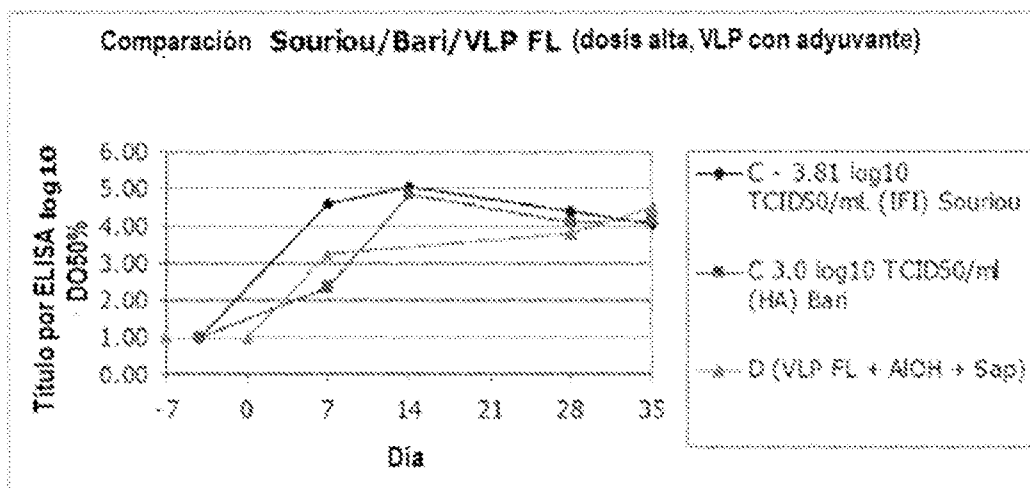


FIG. 10

```

SEQ 1  NSDQAVQPDGGQFAYVNERPATGSGKQSGGSGGGSGGGVGI STGT FNNQTETKFLKXWVE 60
SEQ 2  NSDQAVQPDGGQFAYVNERPATGSGKQSGGSGGGSGGGVGI STGT FNNQYETKFLKXWVE 60
SEQ 4  NSDQAVQPDGGQFAYVNERPATGSGKQSGGSGGGSGGGVGI STGT FNNQYETKFLKXWVE 60
SEQ 6  -----MLGGQFAYVNERPATGSGKQSGGSGGGSGGGVGI STGT FNNQTETKFLKXWVE 64
          *****

SEQ 1  ITANSSRLVHLMPESERYRFRVVRNLDKTA VNGMALDDTHAQIVT PWSLV DANAGCW 120
SEQ 3  ITANSSRLVHLMPESERYRFRVVRNLDKTA VNGMALDDTHAQIVT PWSLV DANAGCW 120
SEQ 4  ITANSSRLVHLMPESERYRFRVVRNLDKTA VNGMALDDTHAQIVT PWSLV DANAGCW 120
SEQ 6  ITANSSRLVHLMPESERYRFRVVRNLDKTA VNGMALDDTHAQIVT PWSLV DANAGCW 114
          *****

SEQ 1  FNFQGSQQLIVNTMSELHLVSPFEQEI FNVVLKTVSESATQPTKVYNNDEL TASLMVALDEN 180
SEQ 3  FNFQGSQQLIVNTMSELHLVSPFEQEI FNVVLKTVSESATQPTKVYNNDEL TASLMVALDEN 180
SEQ 4  FNFQGSQQLIVNTMSELHLVSPFEQEI FNVVLKTVSESATQPTKVYNNDEL TASLMVALDEN 180
SEQ 6  FNFQGSQQLIVNTMSELHLVSPFEQEI FNVVLKTVSESATQPTKVYNNDEL TASLMVALDEN 174
          *****

SEQ 1  NTMPFTTAAMRSETLGFYFWKPTIPTFWRYVQWDRTLIPSHGTGTSGTPTNIYHGTEPDD 240
SEQ 3  NTMPFTTAAMRSETLGFYFWKPTIPTFWRYVQWDRTLIPSHGTGTSGTPTNIYHGTEPDD 240
SEQ 4  NTMPFTTAAMRSETLGFYFWKPTIPTFWRYVQWDRTLIPSHGTGTSGTPTNIYHGTEPDD 240
SEQ 6  NTMPFTTAAMRSETLGFYFWKPTIPTFWRYVQWDRTLIPSHGTGTSGTPTNIYHGTEPDD 234
          *****

SEQ 1  VQFYTTIENSVPVHLLPTGDEFATSTFTFFDCKPCLTHTWQTNALGLPFFINSLPQASOG 300
SEQ 3  VQFYTTIENSVPVHLLPTGDEFATSTFTFFDCKPCLTHTWQTNALGLPFFINSLPQASOG 300
SEQ 4  VQFYTTIENSVPVHLLPTGDEFATSTFTFFDCKPCLTHTWQTNALGLPFFINSLPQASOG 300
SEQ 6  VQFYTTIENSVPVHLLPTGDEFATSTFTFFDCKPCLTHTWQTNALGLPFFINSLPQASOG 294
          *****

SEQ 1  TNFGYIGVQQDKRPGVTQNGRTNYITZATINMPAEVGYSAFYDPEASTQGFNTPIAAG 360
SEQ 3  TNFGYIGVQQDKRPGVTQNGRTNYITZATINMPAEVGYSAFYDPEASTQGFNTPIAAG 360
SEQ 4  TNFGYIGVQQDKRPGVTQNGRTNYITZATINMPAEVGYSAFYDPEASTQGFNTPIAAG 360
SEQ 6  TNFGYIGVQQDKRPGVTQNGRTNYITZATINMPAEVGYSAFYDPEASTQGFNTPIAAG 354
          *****

SEQ 1  RCGAQITENQAADGDPFYAFGRQHQQKTTTGTGETPEASTYIANQDTGRYPEGHWIQNINF 420
SEQ 3  RCGAQITENQAADGDPFYAFGRQHQQKTTTGTGETPEASTYIANQDTGRYPEGHWIQNINF 420
SEQ 4  RCGAQITENQAADGDPFYAFGRQHQQKTTTGTGETPEASTYIANQDTGRYPEGHWIQNINF 420
SEQ 6  RCGAQITENQAADGDPFYAFGRQHQQKTTTGTGETPEASTYIANQDTGRYPEGHWIQNINF 414
          *****

SEQ 1  NLFVTEENVLLPTDPIGGKTGINVTNIFNTYGLTALNNVFPVYFNGQIWDKEFDLXK 480
SEQ 3  NLFVTEENVLLPTDPIGGKTGINVTNIFNTYGLTALNNVFPVYFNGQIWDKEFDLXK 480
SEQ 4  NLFVTEENVLLPTDPIGGKTGINVTNIFNTYGLTALNNVFPVYFNGQIWDKEFDLXK 480
SEQ 6  NLFVTEENVLLPTDPIGGKTGINVTNIFNTYGLTALNNVFPVYFNGQIWDKEFDLXK 474
          *****

SEQ 1  RLNVNAPFVCGQNNCPGQLFVTVAPNLTNEYDPEASANNMSRIVTYSDFWKGGLVFKAKLR 540
SEQ 3  RLNVNAPFVCGQNNCPGQLFVTVAPNLTNEYDPEASANNMSRIVTYSDFWKGGLVFKAKLR 540
SEQ 4  RLNVNAPFVCGQNNCPGQLFVTVAPNLTNEYDPEASANNMSRIVTYSDFWKGGLVFKAKLR 540
SEQ 6  RLNVNAPFVCGQNNCPGQLFVTVAPNLTNEYDPEASANNMSRIVTYSDFWKGGLVFKAKLR 534
          *****

SEQ 1  ASHTWNPICQMSINVDNQFNYYVPSNIGGKIVYERSQLAPRKLY 584
SEQ 3  ASHTWNPICQMSINVDNQFNYYVPSNIGGKIVYERSQLAPRKLY 584
SEQ 4  ASHTWNPICQMSINVDNQFNYYVPSNIGGKIVYERSQLAPRKLY 584
SEQ 6  ASHTWNPICQMSINVDNQFNYYVPSNIGGKIVYERSQLAPRKLY 576
          *****

```

FIG. 11

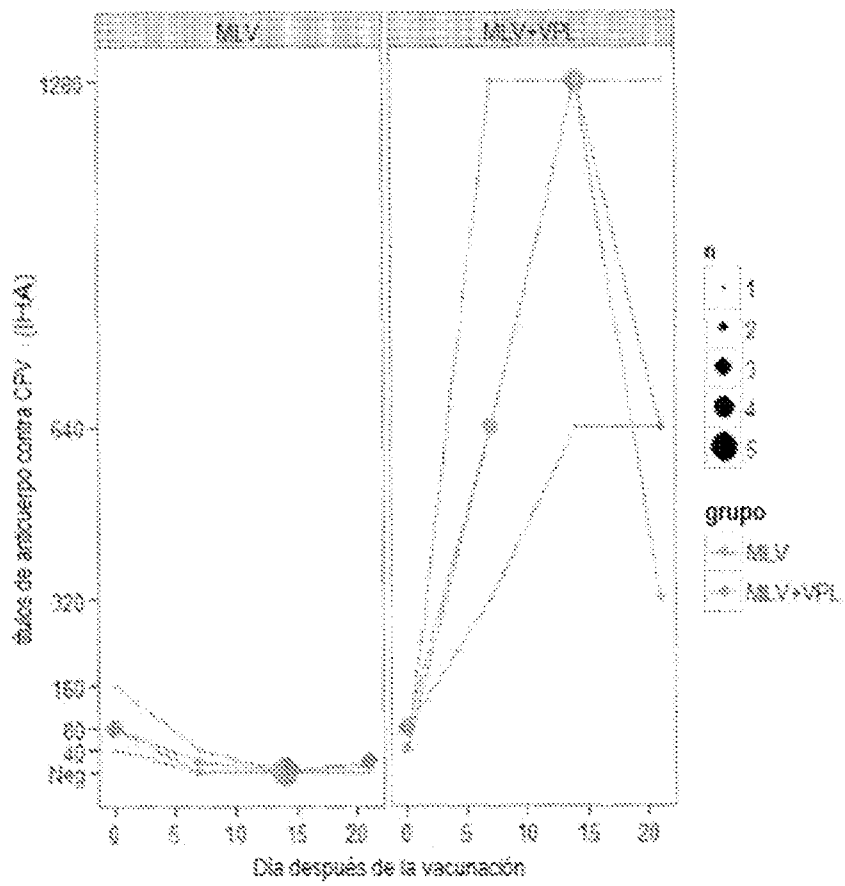


FIG. 12

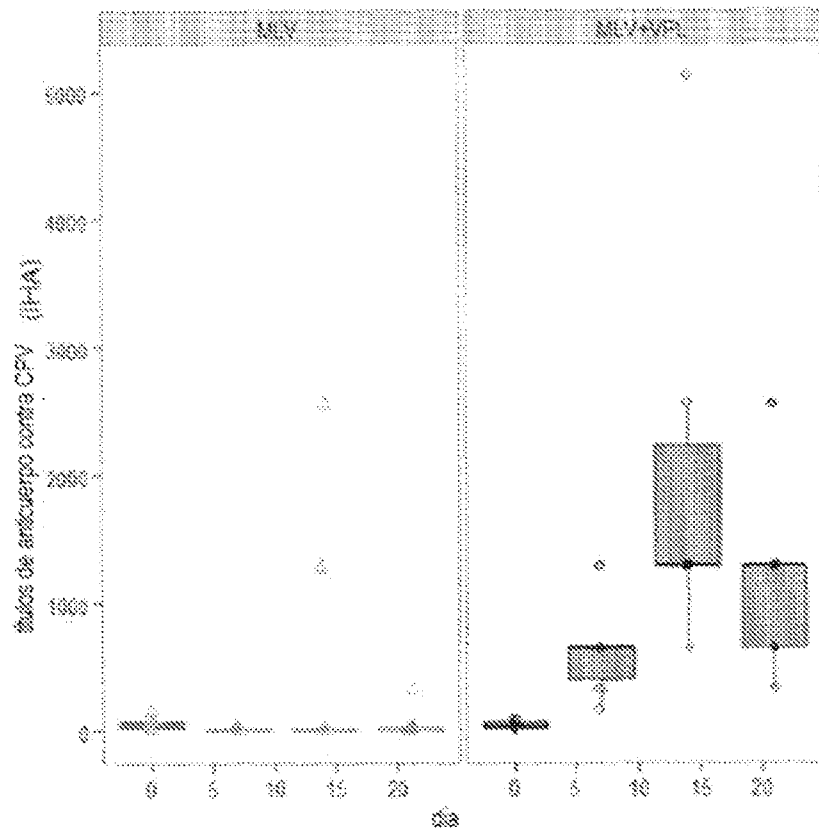


FIG. 13

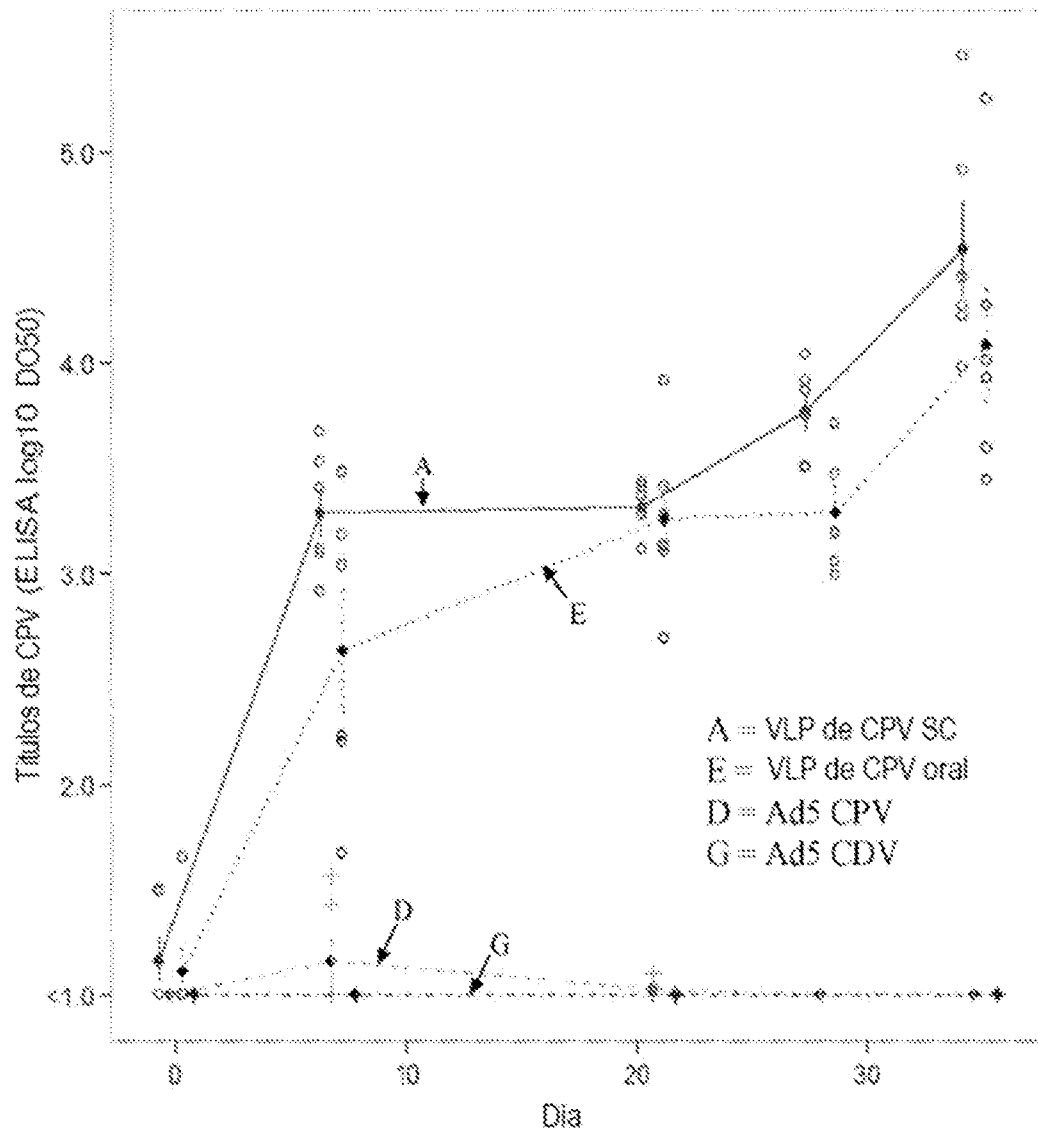


FIG. 14

Ejemplo 7: % Respondedores

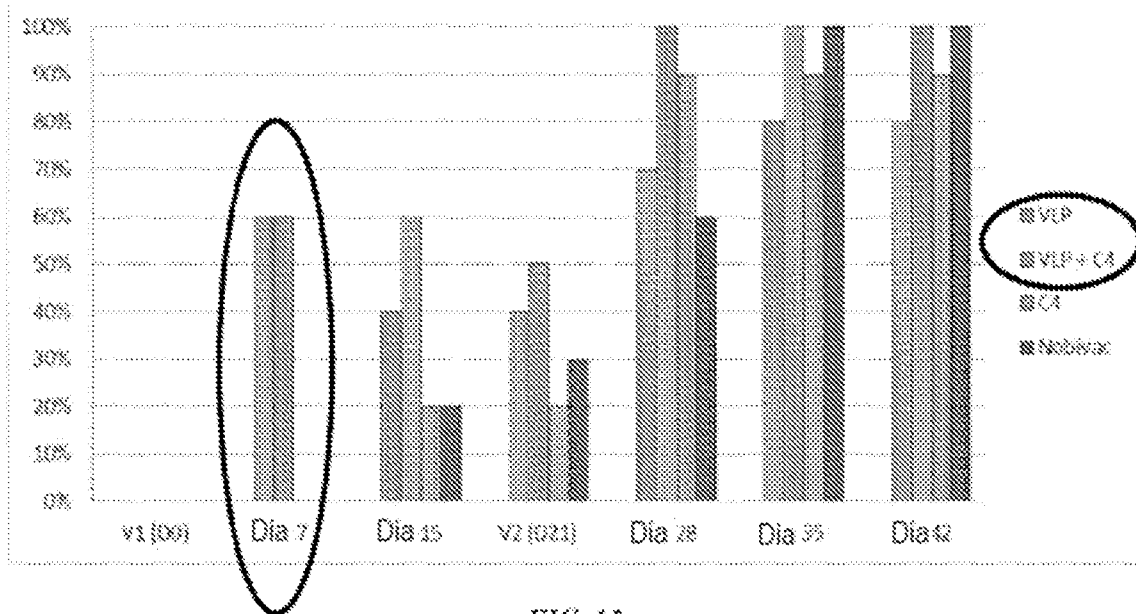


FIG. 15

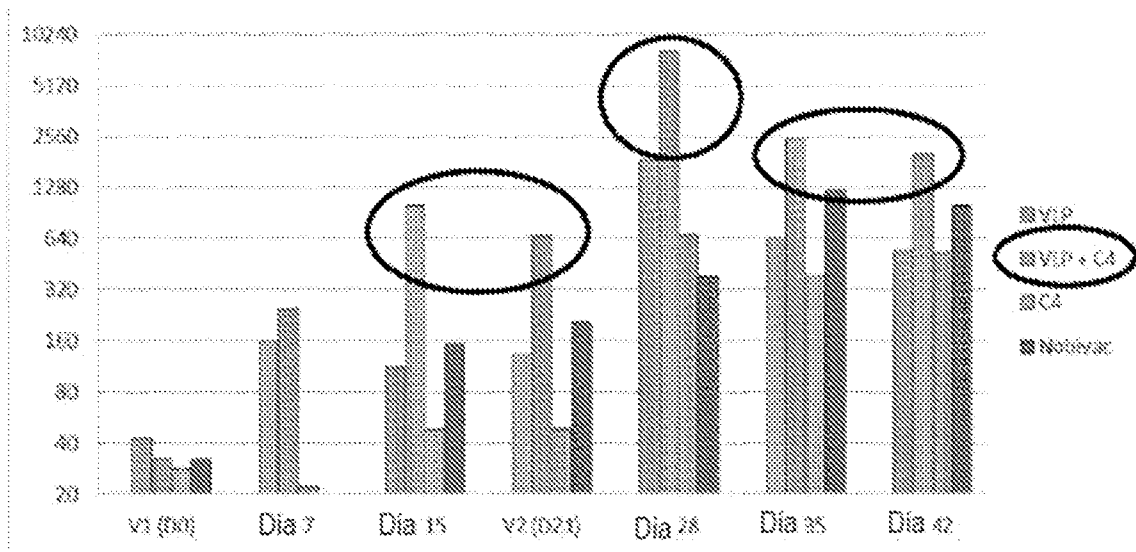


FIG. 16

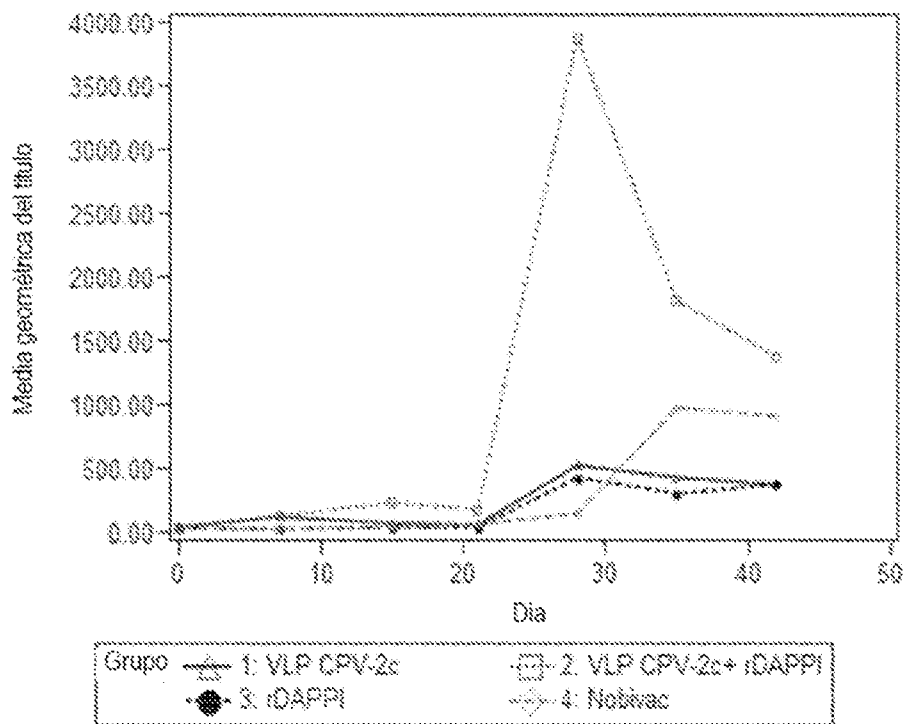


FIG. 17

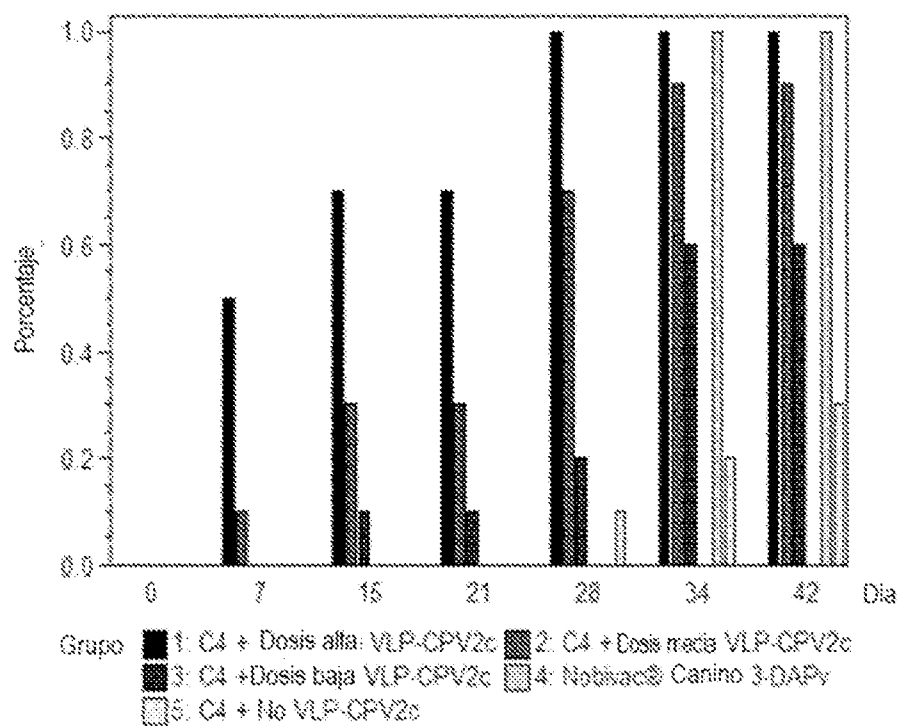
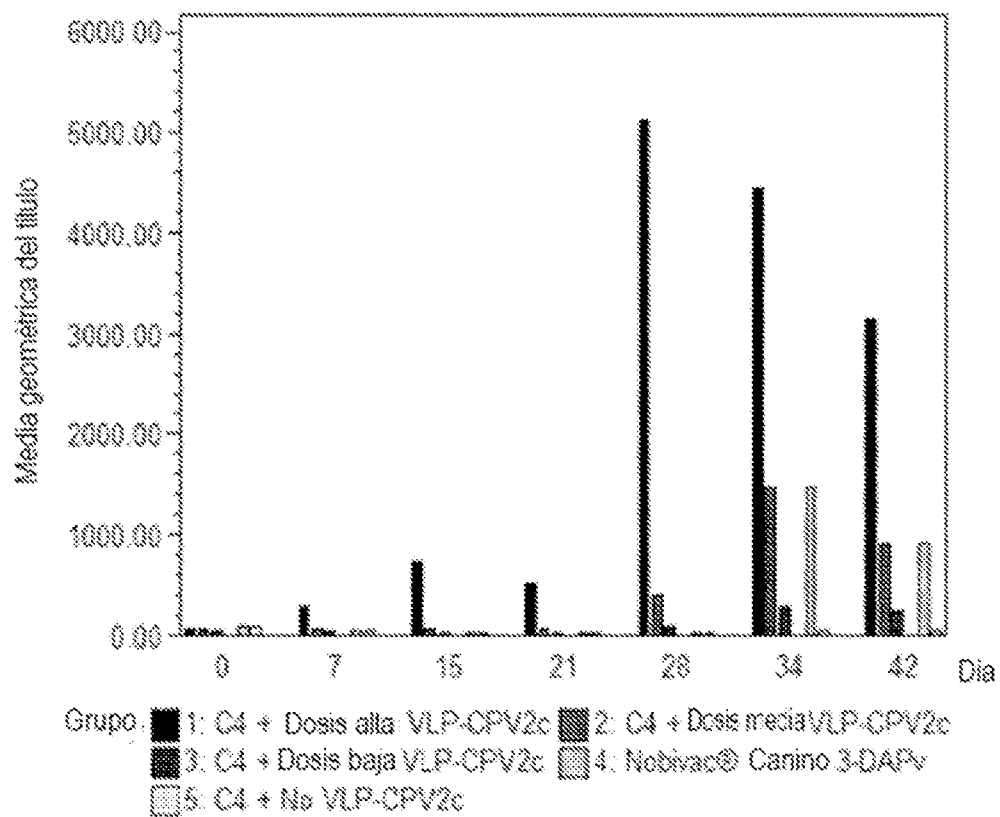


FIG. 18



v1 - Día 0 v2 - Día 21

FIG. 19