



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ N.º de publicación: **ES 2 080 024**

⑫ Número de solicitud: 9401512

⑬ Int. Cl.⁶: A61K 39/125

C12N 15/86

C12N 15/41

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **06.07.94**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.96**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.01.96

⑱ Solicitante/s: **Universidad de Oviedo y en su representación
D. Lorenzo Pueyo Casaus,
Vicerrector de Investigación
C/ San Francisco, 3
33003 Oviedo, ES**

⑲ Inventor/es: **Parra Fernández, Francisco;
Marín Gómez, M. Soledad;
Roca Riveiro, José Antonio;
Casais Goyos, Rosa y
Martín Alonso, José Manuel**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Vacuna subunitaria recombinante contra la enfermedad hemorrágica vírica de los conejos.**

㉒ Resumen:

Vacuna subunitaria recombinante contra la enfermedad hemorrágica vírica de los conejos. Se describe la producción del antígeno estructural (VP60) del virus de la enfermedad hemorrágica de los conejos RHDV (aislado AST/89) así como su utilización como vacuna contra dicha enfermedad. La producción del antígeno y el método de vacunación comprenden las siguientes etapas:

1) Aislamiento del gen que codifica la proteína estructural (VP60) del RHDV (aislado AST/89); 2) Clonación de dicho gen en el vector de transferencia de baculovirus pAcYM1; 3) Obtención y aislamiento del baculovirus recombinante AcVP60; 4) Infección de células de insecto con el baculovirus recombinante AcVP60; 5) Obtención y aislamiento de la proteína VP60 producida por el baculovirus recombinante AcVP60; 6) Inoculación de los conejos con el antígeno.

ES 2 080 024 A1

DESCRIPCION

Vacuna subunitaria contra la enfermedad hemorrágica vírica de los conejos.

La presente invención se refiere a la producción del antígeno estructural (VP60) del virus de la enfermedad hemorrágica de los conejos, RHDV (aislado AST/89) y su utilización como vacuna contra la enfermedad.

Antecedentes

La enfermedad hemorrágica vírica ocasiona grandes pérdidas económicas en la industria cunícola y ha diezmando la población de conejos de los campos y bosques de nuestro territorio con grave perjuicio para las sociedades cinegéticas.

Desde la aparición de la enfermedad en 1984 en la provincia china de Jiangsu (S.J. Liu, H.P. Xue, B.Q. Pu y N. H. Quian. 1984. Anim. Husb. Vet. Med. 16: 253-255), ésta se ha extendido por toda Asia, Europa y norte de Africa.

En España, diversos trabajos determinaron la presencia de la enfermedad a partir del verano de 1988 (J.L. Argüello, L.I. Pérez-Ordoyo y A. Llanos. 1988. Med. Vet. 5:645-650).

El agente etiológico, denominado virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) ha sido incluido recientemente en la familia *Caliciviridae*. Los miembros de esta familia presentan las siguientes características comunes:

- Viriones de 25-40 nm, con simetría icosaédrica y sin envuelta lipídica.
- Una cápsida formada por unidades de un polipéptido cuya masa oscila entre 60 y 71 kdalton.
- Un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva (7.5 kb), unido a una proteína (Vpg) en su extremo 5' y poliadenilado en su extremo 3'.

Además, el RHDV presenta un RNA subgenómico de 2.4 kb, encapsidado, coterminado con el extremo 3' del genoma, con capacidad para codificar la proteína estructural.

En la actualidad, existen varias vacunas comerciales, denominadas tisulares, basadas en la utilización de extractos de órganos de conejos infectados experimentalmente en los que el agente virulento se inactiva térmica o químicamente. La eficacia de estos preparados ha sido probada en el laboratorio (J.E. Peeters, D. Vanderghynst y R. Geeroms. 1992. Cuni-Sciences 7:101-106) y en el campo, pero presentan graves inconvenientes de variabilidad antigénica y riesgo biológico inherentes a su modo de elaboración.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a la producción del antígeno estructural (VP60) del virus de la enfermedad hemorrágica de los conejos RHDV (aislado AST/89) y su utilización como vacuna contra la enfermedad.

La obtención de la proteína VP60 en un sistema heterólogo de células de insecto permite disponer de grandes cantidades de un producto con características antigénicas definidas, evitando la variabilidad y el riesgo biológico derivados de la utilización del agente virulento, como ocurre en la elaboración de las vacunas tisulares. Al mismo tiempo el producto recombinante posibilita un mejor control de calidad y estandarización del preparado vacunal.

La realización de la invención comprende las siguientes etapas:

A/ Clonación del gen de la VP60 del RHDV

Para la clonación del gen de la VP60 del RHDV, se aíslan partículas virales a partir de hígados infectados por el virus y a partir de éstas se obtienen sus RNAs genómico y subgenómico. Estos RNAs se separan por centrifugación zonal en gradientes de sacarosa y el RNA subgenómico se utiliza como molde para la síntesis de un DNA complementario (cDNA). Después, se le añaden unos adaptadores BglII. El fragmento de cDNA resultante comprende los nucleótidos 10 a 1834 del RNA subgenómico a los que se ha añadido la secuencia nucleotídica GATCTTC-CAT al extremo 5' y CAGATC al extremo 3'.

B/ Construcción del vector de transferencia de baculovirus que contiene el gen de la VP60.

Para la construcción del vector de transferencia de baculovirus que contiene el gen de la VP60, el cDNA obtenido en el paso anterior se clona en el sitio BamHI del vector de transferencia de baculovirus pAcYM1 (Y. Matsuura, R.D. Posee, H.A. Overton y D.H.L. Bishop. 1987. J. Gen. Virol. 68:1233-1250). La orientación del gen insertado en el vector pAcVP60 resultante se comprueba por análisis de restricción y secuenciación.

C/ Obtención del baculovirus recombinante que contiene el gen de la VP60: aislamiento y caracterización.

El vector obtenido en el paso anterior, pAcVP60, se cotransfecta con el DNA linealizado del baculovirus AcMNPV.LacZ, en las células del insecto Sf9. Los baculovirus recombinantes presentes en el medio de cultivo tras más de 20 horas de incubación, se separan de los parentales por ensayos en placa de su fenotipo blanco (recombinantes) o azul (parentales) en presencia de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil - β -D-galactopiranosido).

Adicionalmente se investiga su capacidad para producir VP60 por inmunofluorescencia indirecta usando un suero hiperinmune contra la proteína VP60. De este modo, se obtiene el baculovirus recombinante AcVP60 (depósito n° 1 - 1441 CNCM) utilizado en las etapas siguientes para producir la proteína VP60 recombinante en las células de insecto Sf9.

D/ Obtención de la proteína VP60 recombinante

Para la obtención de grandes cantidades de la proteína VP60 recombinante, las células Sf9 son infectadas con baculovirus recombinantes a una multiplicidad de infección 1:5 manteniendo el cultivo 3 días a 28°C. Al cabo de este tiempo las células se recogen, se lavan con tampón fosfato salino y se rompen por congelación y descongelación. Los extractos celulares son clarificados por centrifugación a baja velocidad y se determina la cantidad de proteína total del extracto libre de células por métodos colorimétricos. Para confirmar la producción de la proteína recombinante los extractos se analizan en un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y se evalúa la cantidad correspondiente a la proteína VP60 mediante densitometría.

La Figura 1 ilustra una electroforesis en presencia de SDS (A) e inmunodetección (B) de la proteína VP60 producida en células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante AcVP60.

En las secciones A y B, las referencias 1 a 4 corresponden a:

- 1.- Sf9 no infectadas
- 2.- Sf9 infectadas
- 3.- RHDV purificado
- 4.- Marcadores de peso molecular (94, 67, 43 y 30 kDa)

En la sección A se puede observar que las células infectadas con el baculovirus recombinante producen gran cantidad de la proteína VP60 no presente en las células sin infectar. Esta proteína es inmunológicamente similar a la proteína obtenida del RHDV purificado como se observa en la sección B por su reacción con un suero hiperinmune contra la proteína viral.

La eficacia de la proteína VP60 recombinante como vacuna subunitaria contra la enfermedad hemorrágica vírica de los conejos se evalúa mediante la inoculación de conejos por vía intradérmica con dosis creciente de antígeno, desde 1 μ g hasta 250 μ g/animal. Antes de la inmunización se toman muestras de sangre de todos los animales, así como a los 22 días. Transcurridos 23 días desde la inmunización los animales vacunados y un número equivalente de controles sin inmunizar se exponen al virus causante de la enfermedad.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2, donde se representa el porcentaje de animales supervivientes respecto a la dosis de antígeno usada para la inmunización, así como la evolución de la respuesta inmune de los animales. Se observa un incremento de la supervivencia de los animales con la dosis de antígeno empleada, en paralelo con un incremento en el título de anticuerpos anti VP60. Para la detección de anticuerpos contra la proteína recombinante en el suero de los animales se utiliza un ELISA indirecto empleando como antígeno RHDV parcialmente purificado.

Para la elaboración del preparado vacunal, el extracto celular obtenido en el apartado D se diluye con tampón fosfato salino hasta obtener una concentración de VP60 de 50 μ g/ml. Esta solución, sin otros aditivos potenciadores de la inmunidad, se utiliza para la inmunización de los conejos mediante una única dosis mínima de 1 ml por vía intradérmica. La cantidad de antígeno elegida se seleccionó considerando que la dosis inmunizante media oscila entre 10 y 25 μ g/animal.

En el ejemplo siguiente se ilustra un modo preferible de ejecución de la invención sin carácter limitativo, en el que se describe la clonación del gen que codifica la proteína VP60 del RHDV (aislado AST/89), su expresión en un sistema heterólogo de células de insecto y la utilización del antígeno recombinante para la vacunación de conejos contra la enfermedad hemorrágica.

Ejemplo

A) Clonación del gen del antígeno VP60 del RHDV (AST/89)

En primer lugar se procedió a la purificación de viriones del RHDV (AST/89) mediante varias etapas de ultracentrifugación (F. Parra y M. Prieto. 1990, J. Virol. 64: 4013-4015) utilizando como material de partida extractos de hígado de conejos infectados experimentalmente. El material genético de los viriones fue extraído utili-

zando isotiocianato de guanidina (J.A. Chirgwin y cols. 1979. Biochemistry. 18: 5294-5299). El RNA mensajero (RNAm) subgenómico fue separado del genoma viral mediante centrifugación zonal en gradientes de sacarosa utilizándose luego como molde para sintetizar un DNA complementario (cDNA) en presencia de un cebador oligo dT (J.A. Boga y cols. 1992. Virus Res. 26: 33-40). La secuencia aminoacídica del extremo amino terminal de la proteína VP 60 (F. Parra y cols. 1993. Virus Res. 27: 219-228) ha permitido localizar la región codificadora de este antígeno entre los nucleótidos 10 y 1834 del RNAm subgenómico del aislado AST/89 del RHDV (Base de datos EMBL, número de acceso Z24757).

B) Construcción del vector de transferencia pAcVP60

El procedimiento seguido se esquematiza en la Figura 3. Un fragmento HindIII (4147 pb) procedente del clon de cDNA T35, al que se le habían añadido adaptadores BglII en los extremos, se digirió con los enzimas BamHI y BglII. El fragmento de 1731 pb resultante se insertó en el sitio BamHI del vector pAcYM1. La orientación correcta del inserto presente en el plásmido recombinante pAcVP60BH se investigó mediante análisis de restricción. Partiendo de un fragmento de cDNA de 884 pb, obtenido a partir del cDNA T35 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (J.A. Boga y cols. 1994. J. Gen. Virol. en prensa), se obtuvo un fragmento de restricción BglII/StuI que se insertó en el vector pAcVP60BH digerido con los enzimas BamHI y StuI. El vector de transferencia resultante denominado pAcVP60, fue comprobado mediante análisis de restricción y secuenciación.

C) Obtención del baculovirus recombinante AcVP60

Para realizar la transfección se añaden 24 μ l de una mezcla que contiene 200 μ g de DNA del baculovirus AcMNPV. LacZ linearizado con el enzima Bsu36I, 2 μ g del plásmido pAcVP60 y 8 μ l de lipofectina a una suspensión de 106 células Sf9 en 1 ml de medio TC-100. La mezcla resultante se incuba 7 horas a 28°C y se añade 1 ml de medio cultivo que contiene suero fetal bovino al 5%. 20 horas más tarde se cambia el medio de cultivo por medio fresco y al cabo de 72 horas se recoge el medio para separar los baculovirus recombinantes de los parentales por ensayos en placa en presencia de X-Gal. La expresión del antígeno VP60 en las células infectadas por los baculovirus recombinantes se investiga mediante inmunofluorescencia indirecta usando un suero hiperinmune contra la proteína VP60.

D) Producción de la proteína VP60 recombinante

Para la obtención de cantidades suficientes de la proteína VP60 recombinante, monocapas de 2×10^7 células Sf9 son infectadas con 10^8 baculovirus recombinantes y el cultivo en medio TC-100 conteniendo 5% de suero fetal bovino se mantiene 3 días a 28°C. Al cabo de este tiempo las células se recogen, se lavan con tampón fosfato salino y se rompen por tres procesos sucesivos de congelación y descongelación. Los extractos celulares son clarificados por centrifugación a 1500xg durante 10 minutos y se determina la proteína total del extracto por métodos colorimétricos. Para cuantifi-

car la proporción de proteína VP60 recombinante respecto a la proteína total de los extractos celulares, éstos se analizan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS determinándose la cantidad correspondiente a la proteína VP60 mediante densitometría.

El extracto celular obtenido en el paso ante-

rior se diluye con tampón fosfato salino hasta obtener una concentración de VP60 de 50 $\mu\text{g/ml}$. Este preparado se utiliza para inmunizar directamente a los conejos por vía intradérmica con una única dosis de 1 ml, sin aditivos potenciadores de la inmunidad.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para la preparación de una vacuna subunitaria recombinante para la inmunización de conejos contra la enfermedad hemorrágica causada por el RHDV, en el que el antígeno vacunal VP60 se produce mediante el uso de técnicas de recombinación de DNA **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

a. Construcción de un cDNA del gen de la proteína VP60 partiendo del RNAm subgenómico del aislado de campo AST/89 del RHDV al que se añaden las secuencias nucleotídicas GATCTTCCAT al extremo 5' y CAGATC al extremo 3'.

b. Utilización del vector de transferencia pAcYM1 para introducir el gen VP60 del RHDV en el genoma del virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* AcMNPV. LacZ, generando el baculovirus recombinante AcVP60, mediante un proceso de recombinación homóloga con el gen de la poliedrina.

c. Utilización del baculovirus recombinante denominado AcVP60 generado según se describe en la reivindicación 1b (Depósito n° 1 - 1441 CNCM) para infectar cultivos de la línea celular de insecto Sf9 u otras líneas celulares o larvas de insectos que sean hospedadores permisivos para la replicación del virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica*, durante el tiempo y condiciones necesarias para la producción de la proteína VP60 del RHDV.

d. Obtención de la proteína VP60, libre de otras proteínas del RHDV, a partir de extractos de cultivos celulares o insectos infectados por el baculovirus recombinante AcVP60 para su uso como vacuna en conejos.

2. Método, según la reivindicación anterior **caracterizado** porque el antígeno vacunal VP60 se produce libre de otras proteínas de RHDV durante la replicación del baculovirus recombinante AcVP60 en líneas celulares en cultivo, o en larvas de insectos que sean hospedadores permisivos para los baculovirus seleccionados.

3. Método, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

a.- Construcción de un cDNA del gen de la proteína VP60.

b.- Utilización de un vector de transferencia para introducir el gen VP 60 del RHDV en el genoma de una baculovirus mediante un proceso de recombinación homóloga.

c.- Utilización del baculovirus recombinante para infectar cultivos de la línea celular de insecto Sf9 u otras líneas celulares o larvas de insectos que sean hospedadores permisivos para la replicación del virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica*, durante el tiempo y condiciones necesarias para la producción de la proteína VP60 del RHDV.

d.- Obtención la proteína VP60, libre de otras proteínas del RHDV, a partir de extractos de cultivos celulares o larvas de insectos infectadas por el baculovirus recombinante para su uso como vacuna en conejos.

4. Uso del baculovirus AcVP60 (depósito n° 1 - 1441 CNCM) en la preparación de una vacuna contra la enfermedad hemorrágica vírica de los conejos.

5. Uso de la proteína VP60 en la preparación de una vacuna contra la enfermedad hemorrágica vírica de los conejos.

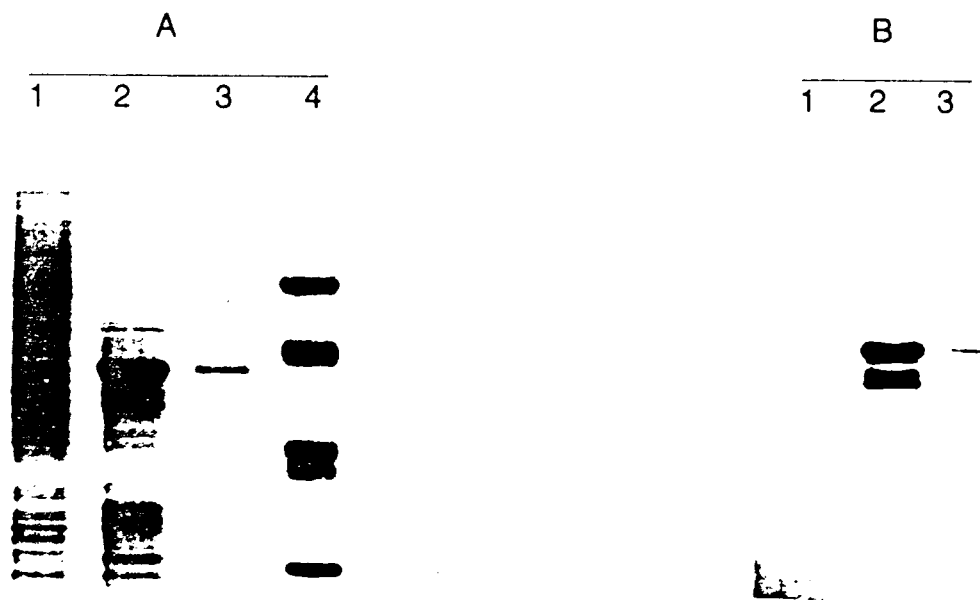


Figura 1

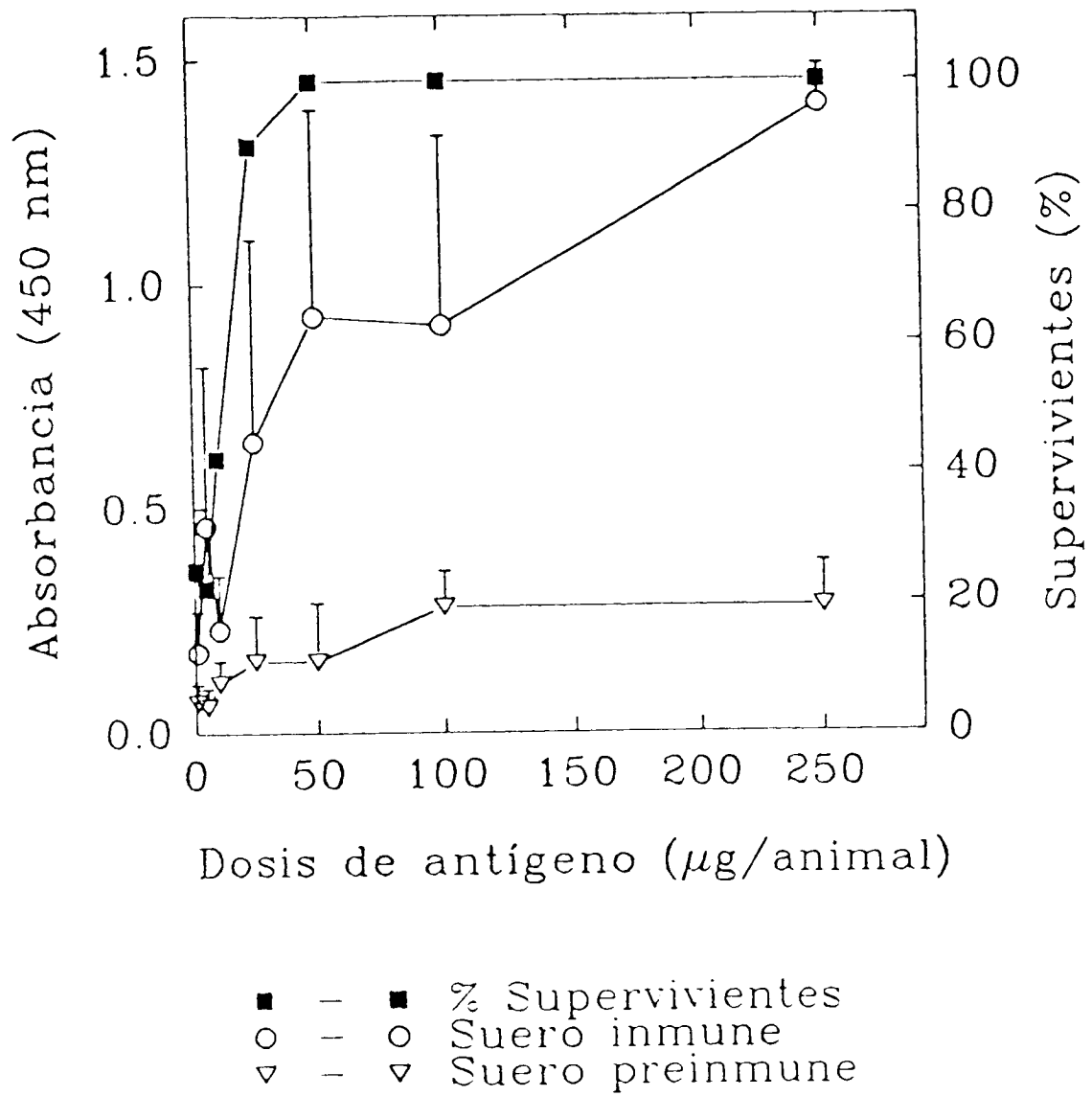


Figura 2

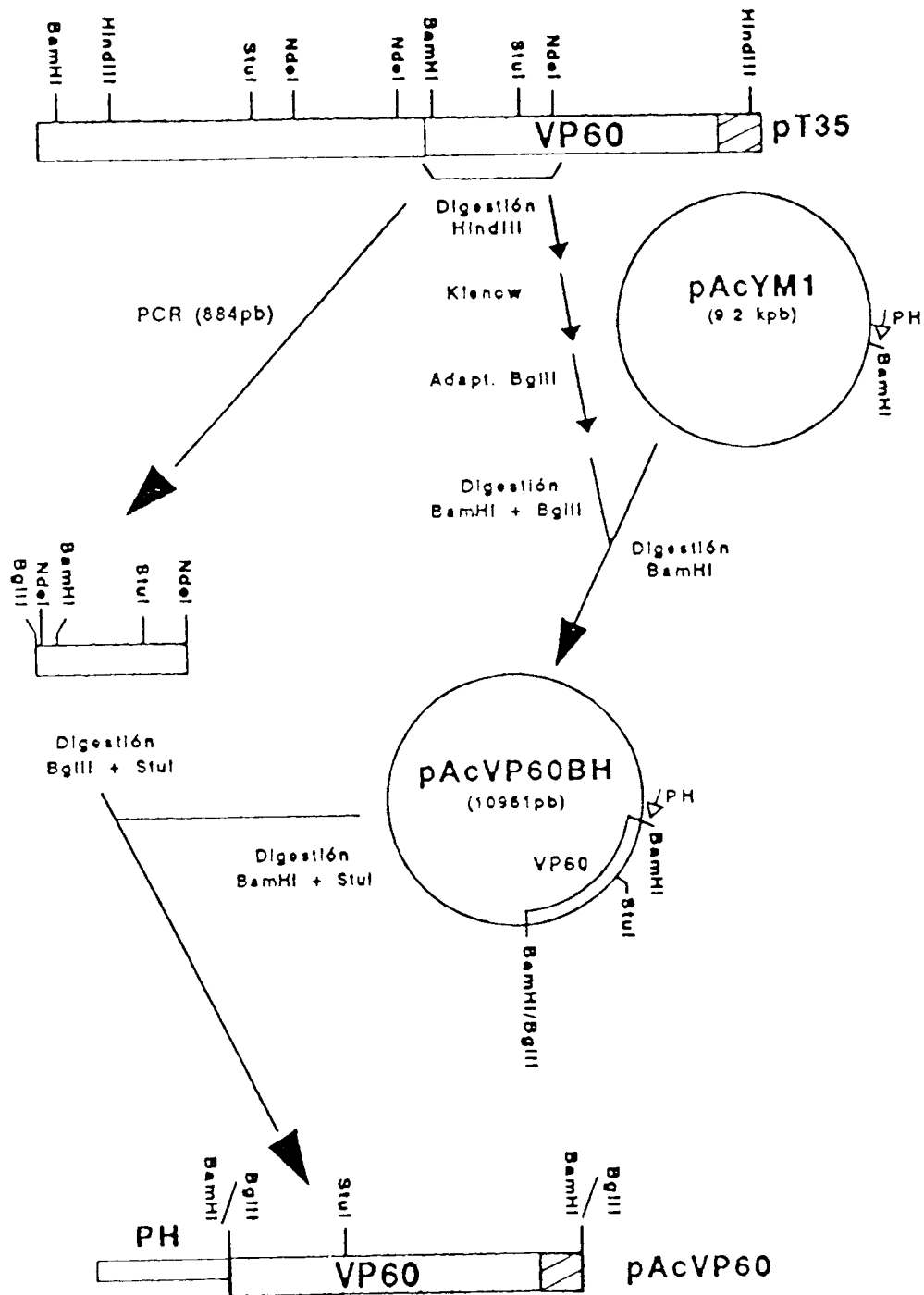


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 080 024
⑫ N.º solicitud: 9401512
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 06.07.94
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: A61K 39/125, C12N 15/86, 15/41

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	MEYERS, G. et al. "Rabbit Hemorrhagic disease virus. Molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome" Virology, 1991, Vol. 184, páginas 664-676 * Todo el documento *	1-5
Y	BISHOP, D.H.L. "Baculovirus expression vectors" Seminars in Virology, 1992, Vol. 3, páginas 253-264 * Todo el documento *	1-3
Y	* Página 262 *	4,5
Y	LUCKOW, V.A. et al. "Trends in the development of baculovirus expression vectors" Biotechnology, Enero 1988, Vol. 6, páginas 47-55 * Todo el documento *	1-3
A	BASE DE DATOS WPIL en QUESTEL, semana 9107, Londres: Derwent Publications Ltd. AN 91-046425, HUT 53809 A (PHYLAXIA OLTOANYAG), resumen	1-5
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones n.º:		
Fecha de realización del informe 30.05.95	Examinador N. Urquía Fernández	Página 1/1