



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 139 537**

②① Número de solicitud: 009800623

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 15/40

C12N 15/82

C12N 7/01

C12N 15/35

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **24.03.1998**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2000**

Fecha de concesión: **07.08.2000**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2000**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**01.10.2000**

⑦③ Titular/es:  
**Inmunología y Genética Aplicada, S.A.**  
**Hermanos García Noblejas, 41**  
**28037 Madrid, ES**  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑦② Inventor/es: **Casal Alvarez, José Ignacio;**  
**Martínez Torrecuadrada, Jorge Luis;**  
**Fernández Fernández, M<sup>a</sup> del Rosario y**  
**García Alvarez, Juan Antonio**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Sistema de presentación de antígenos basado en el virus de la sharka.**

⑤⑦ Resumen:

El sistema de presentación de antígenos heterólogos basado en el virus de la sharka (PPV) comprende una partícula de PPV quimérica formada por ensamblaje de la proteína de la cápsida (CP) de PPV modificada que contiene, al menos, un antígeno heterólogo en dicha CP modificada, estando dicho antígeno dispuesto en la superficie exterior de dicha partícula viral de PPV. Preferentemente, dicho antígeno heterólogo se encuentra en el extremo amino terminal de la CP modificada de PPV. En una realización concreta se describe la construcción de un sistema de presentación de un epítipo inmunológicamente activo derivado de la proteína VP2 del parvovirus canino (CPV). Estos sistemas de presentación de antígenos tienen utilidad en diagnóstico y vacunas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 139 537 B1

## DESCRIPCION

Sistema de presentación de antígenos basado en el virus de la sharka.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se relaciona, en general, con el empleo de virus de plantas como vehículos para la presentación de antígenos heterólogos. En particular, la invención se refiere a un sistema de presentación de antígenos basado en el virus de la sharka.

10 **Antecedentes de la invención**

Actualmente se están manipulando las plantas con el fin de desarrollar nuevos sistemas de elaboración de productos biológicos. Las plantas ofrecen numerosas ventajas frente a otros sistemas de expresión. En particular, constituyen una vía económica, segura y fácil de obtener proteínas de interés, sin requerir  
15 unas instalaciones caras para el escalado, y permiten reemplazar cultivos tradicionales exhaustos. La producción en plantas de proteínas de potencial valor farmacéutico así como la producción de vacunas subunidad tiene un especial interés [Arntzen, C.J. (1997) Nat. Biotechnol. 15, 221-222].

Existen dos estrategias mayoritarias para la producción de moléculas de interés terapéutico en plantas: (i) transformación genética del genoma nuclear de las plantas para crear plantas transgénicas, y (ii) manipulación del genoma de los virus de plantas [Arntzen, C.J. (1997) Nat. Biotechnol. 15, 221-222]. Esta última estrategia presenta la ventaja de que permite que las plantas produzcan cantidades relativamente grandes del producto deseado en un determinado momento de su ciclo de desarrollo, y, además, las reservas (stocks) de virus se pueden mantener durante largos periodos de tiempo sin necesidad de efectuar  
20 pases a través de plantas. Más aún, en el caso particular de las vacunas peptídicas, la inmunogenicidad de los péptidos sintetizados químicamente se potencia por conjugación a moléculas portadoras más grandes, especialmente cuando estas moléculas portadoras tienen una estructura particulada [Fitchen, J., et al., (1995) Vaccine 13, 1051-1057]. Por tanto, la unión de epítopos a la superficie de partículas virales de plantas es una vía potencial para mejorar la presentación del antígeno y para obtener una respuesta de  
25 anticuerpos eficaz.

El hecho de que las plantas y los virus de las plantas ofrezcan la posibilidad de expresar productos heterólogos de interés de forma sencilla y ventajosa, ha ocasionado que actualmente exista una búsqueda  
35 continua de nuevos sistemas y vectores basados en virus de plantas capaces de expresar secuencias de nucleótidos de interés, con el fin de incrementar el espectro de plantas y virus de plantas susceptibles de ser utilizadas para la obtención de productos biológicos de interés.

Se han desarrollado diversos sistemas de presentación de epítopos utilizando tanto virus de plantas filamentosos como icosaédricos [Fitchen, J., et al., (1995) Vaccine 13, 1051-1057; Joelson, T., et al., (1997) J. Gen. Virol. 78, 1213-1217; Sugiyama, Y., et al., (1995) FEBS Lett. 359, 247-250; Turpen, T.H., et al., (1995) Biotechnology 13, 53-57; Usha, R., et al., (1993) Virology 197, 366-374; Yusibov, V., et al., (1997) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94, 5784-5788] y, en algunos casos, como una alternativa a las tradicionales vacunas celulares [Dalsgaard, K., et al., (1997) Nat. Biotechnol. 15, 248-252].

Algunos de los virus de plantas quiméricos, que presentan secuencias antigénicas de interés como parte de su proteína de la cápsida, han mostrado diversas restricciones. Existen algunas construcciones que tienen tendencia a perder la secuencia heteróloga tras un cierto número de ciclos de replicación o de pases en plantas. Existen, asimismo, vectores en los que el tamaño del inserto heterólogo está restringido a unos pocos nucleótidos. Por otra parte, algunas de estas quimeras presentan un rendimiento en planta  
45 reducido respecto al virus salvaje. Por último, en muchos casos las quimeras no inducen respuesta inmunogénica o la producen a niveles inferiores a los deseados.

La presente invención contempla el empleo del virus de la sharka o plum pox virus (PPV) para producir un sistema de presentación de antígenos.  
55

El PPV es un miembro del grupo potyvirus que infecta a plantas. Sus viriones helicoidales están constituidos por una molécula de RNA de polaridad mensajero rodeada por más de 2.000 copias de la única proteína de la cápsida (CP) [Riechmann, J.L., et al., (1992) J. Gen. Virol. 73, 1-16]. La CP de los potyvirus está implicada en diversas funciones durante el ciclo vital del virus ya que, además de su función de encapsidación, tiene una secuencia de aminoácidos (tríada Asp-Ala-Gly) que es esencial para la transmisión del virus por pulgones [Atreya, et al., (1990) Virology 178, 161-165; Atreya, et al., (1991) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88, 7887-7891]. La CP también está implicada en el movimiento del  
60

potyvirus dentro de la planta tanto en el movimiento de célula a célula como en el movimiento sistémico. En concreto, los extremos amino y carboxi terminales de la CP están implicados en el movimiento a larga distancia [Dolja, V.V., et al., (1995) *Virology* 206, 1007-1016; Dolja, V.V., et al., (1994) *EMBO J.* 13, 1482-1491; Mahajan, S., et al., (1996) *J. Virol.* 70, 4370-4379]. También se ha descrito que tanto el extremo amino como el extremo carboxi terminal de la CP están expuestos en la superficie de los viriones de los potyvirus y que son muy inmunogénicos [Allison, R.F., et al., (1985) *Virology* 147, 309-316; Shukla, D.D., et al., (1988) *J. Gen. Virol.* 69, 1497-1508]. Adicionalmente, se han descrito mutantes naturales denominados NAT (non aphid transmissible, es decir, no transmisibles por pulgones) [López-Moya, J.J., et al., (1995) *J. Gen. Virol.* 76, 2293-2297; Maiss, E., et al., (1992) *J. Gen. Virol.* 73, 709-713] que tienen una delección de 15 aminoácidos (aa) en el extremo amino terminal de la CP, incluyendo dicha delección la glicina de la tríada esencial para la transmisión por pulgones.

Un objeto de esta invención lo constituye un sistema de presentación de antígenos basado en PPV. El procedimiento de obtención de dicho sistema de presentación de antígenos constituye un objeto adicional de esta invención.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una representación esquemática de las construcciones de PPV mutante y quiméricas. En la Figura 1A se comparan las secuencias de aminoácidos de la CP de PPV, PPV-NAT y PPV-NATMluI en el sitio de delección, indicando su posición en el mapa genómico del virus. Los aminoácidos delecionados se representan por puntos. También se comparan las secuencias de nucleótidos del cistron de la CP de PPV-NAT y PPV-NATMluI en ese sitio. En el recuadro se muestra el sitio de restricción MluI. La Figura 1B muestra la secuencia de aminoácidos de PPV, PPVCPV, PPV-2CPV y PPV-NATMluI en el sitio de delección NAT. Los aminoácidos heterólogos y delecionados se representan mediante letras en negrilla y puntos respectivamente. En ambos casos, Figuras 1A y 1B, se ha utilizado la nomenclatura convencional de aminoácidos con una sola letra [IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission].

La Figura 2 muestra los resultados de un ELISA-DASI de viriones purificados de PPV, PPV-CPV y PPV-2CPV utilizando los anticuerpos monoclonales anti-PPV 5B (Figura 2A) y anti-CPV 3C9 (Figura 2B). [Leyendas de las figuras: (a) Absorbancia a 405 nm; (b) anti-CP de PPV; (c) anti-CPV; (d) virus purificado (nanogramos, ng)].

### Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un sistema de presentación de antígenos heterólogos basado en el potyvirus PPV que comprende una partícula de PPV quimérica que contiene, al menos, un antígeno heterólogo en la proteína de la cápsida (CP), estando dicho antígeno dispuesto en la superficie exterior de dicha partícula viral de PPV.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “antígeno” incluye cualquier molécula que induce una respuesta inmune específica cuando se inocula en un animal. Entre los antígenos de interés se incluyen aquellos que contengan epítopos que induzcan una respuesta inmunológica tanto de las células B del sistema inmune como de las células T del mismo.

Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, el término “heterólogo (a)”, aplicado a un antígeno o a una secuencia de nucleótidos que codifica a dicho antígeno, se refiere a un antígeno o una secuencia de nucleótidos que no es expresada por el potyvirus PPV tipo salvaje.

En una realización particular de esta invención, dicho antígeno heterólogo se encuentra en el extremo amino terminal de la CP modificada de PPV debido a que:

- es codificado por la región más variable (en longitud y secuencia) del genoma de potyvirus, sugiriendo que algunas modificaciones pueden ser permitidas, lo que es especialmente importante si se tiene en cuenta que la limitación del tamaño de la secuencia a introducir es una de las mayores restricciones encontradas en algunos sistemas virales; y
- está expuesto en la superficie del virión y es muy inmunogénico [Shukla, D.D., et al., (1988), *J. Gen. Virol.* 69, 1497-1508].

En otra realización particular, dicha CP de PPV modificada contiene más de un antígeno heterólogo, que podrían ser iguales o diferentes, preferentemente, dos antígenos heterólogos, iguales, en dicha CP de

## ES 2 139 537 B1

PPV modificada, dispuestos en la superficie exterior de la partícula viral de PPV.

En otra realización particular, el antígeno heterólogo es un epítipo inmunológicamente activo derivado de la proteína VP2 del parvovirus canino (CPV).

5

El sistema de presentación de antígenos proporcionado por esta invención puede utilizarse con fines prácticos tanto en inmunización activa, presentando los péptidos antigénicos de interés, como en el diagnóstico de enfermedades para las que es difícil o peligroso obtener los antígenos necesarios para su detección. Asimismo, dicho sistema de presentación de antígenos puede ser utilizado para obtener anticuerpos contra secuencias de proteínas de interés para las que no se dispone de sueros que permitan un análisis molecular experimental de las mismas.

10

El sistema de presentación de antígenos heterólogos basado en el potyvirus PPV objeto de esta invención puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

15

- a) producir transcritos de RNA a partir de un vector cDNA derivado del potyvirus PPV que además codifica un antígeno heterólogo bien *in vivo* o bien *in vitro* utilizando una RNA polimerasa;
- b) inocular plantas, células de plantas o tejidos de plantas, susceptibles de ser infectadas por el potyvirus PPV, con los transcritos producidos *in vitro* o con los clones cDNA capaces de producir *in vivo* los transcritos infecciosos; y
- c) aislar los sistemas de presentación de antígenos heterólogos obtenidos.

20

25

El vector derivado del potyvirus PPV que codifica un antígeno heterólogo comprende un promotor, una secuencia de DNA complementaria (cDNA) al genoma de PPV, de longitud completa, una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica dicho antígeno heterólogo y un vehículo de clonación.

30

El promotor, o secuencia promotora de la transcripción, es una secuencia de DNA situada en el extremo 5'-terminal e inmediatamente anterior al nucleótido (nt) 1 del cDNA del RNA genómico, a la que se une la RNA polimerasa para iniciar la transcripción del RNA. Dicho promotor puede ser:

35

- un promotor adecuado para la transcripción *in vitro* del cDNA mediante la correspondiente RNA polimerasa, tal como un promotor de un bacteriófago, por ejemplo, del bacteriófago T7; o
- un promotor de un gen funcional en plantas, adecuado para la transcripción *in vivo* del RNA viral, por ejemplo, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

40

Por tanto, en ciertas realizaciones particulares de la invención, la RNA polimerasa adecuada para producir los transcritos de RNA a partir del vector cDNA derivado del potyvirus PPV que además codifica un antígeno heterólogo puede ser la RNA polimerasa del bacteriófago T7 o RNA polimerasas de la planta.

45

El vehículo de clonación es una molécula de DNA que posee un origen de replicación y es, por tanto, potencialmente capaz de replicarse en una célula adecuada. Un ejemplo de replicón es un plásmido, por ejemplo, el pGEM3 (Promega).

50

En una realización particular, la secuencia de cDNA de PPV contiene una mutación de tipo NAT para evitar la transmisión por pulgones del vector recombinante a otras plantas. En otra realización particular, dicha secuencia de cDNA de PPV contiene un sitio único de clonaje, preferentemente situado en el extremo amino terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica la CP de PPV donde se introduce la secuencia de nucleótidos heteróloga.

55

En una realización particular y preferida, la secuencia de cDNA de PPV de longitud completa contiene una mutación de tipo NAT y un único sitio de clonaje MluI.

El vector derivado del potyvirus PPV que codifica un antígeno heterólogo puede obtenerse mediante un método que comprende las etapas de:

60

- efectuar la transcripción inversa del genoma del PPV para obtener un cDNA de PPV de longitud completa;
- introducir una secuencia heteróloga de nucleótidos que codifica un antígeno heterólogo en dicho cDNA de PPV; e

- insertar dicha secuencia de cDNA de PPV que contiene la secuencia de nucleótidos heteróloga en un vehículo de clonación.

En una realización particular, dicho método comprende, antes de introducir dicha secuencia heteróloga de nucleótidos que codifica el antígeno heterólogo, las etapas de:

- efectuar una mutación de tipo NAT en dicho cDNA de PPV consistente en la delección de la secuencia que codifica 15 aminoácidos que incluyen la glicina de la tríada Asp-Ala-Gly, y, opcionalmente,
- crear un sitio único de clonaje en el cDNA de PPV en el extremo amino terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica la CP del PPV.

A modo de ejemplo, la invención describe la construcción de un sistema de presentación de antígenos basado en el potyvirus PPV. Para ello, se ha utilizado un clon de cDNA de PPV de longitud completa [Riechmann, J.L., et al., (1990) Virology 177, 710-716] para manipular un mutante con una delección de tipo NAT y con un único sitio de clonaje MluI, que permite introducir secuencias heterólogas en esa región específica. Este sistema se ha utilizado para producir CP de PPV modificadas que contienen un epítipo inmunológicamente activo derivado de la VP2 de CPV.

La VP2 de parvovirus es la proteína estructural mayoritaria de los parvovirus y ha sido objeto de numerosos y exhaustivos estudios que han conducido al mapeo de epítopos en el extremo amino terminal de dicha proteína VP2. Se han descrito vacunas sintéticas contra CPV a base de péptidos [Langeveld, J., et al., (1994) J. Virol. 68, 4506-4513], uno de los cuales, el identificado como 6L15, es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes frente a CPV tanto en ratones como en conejos [Casal, J.I., et al., J. Virol. 69, 7274-7277].

## Ejemplo

*Construcción de un sistema de presentación de un epítipo neutralizante de CPV inmunológicamente activo*

### 1. Construcción de los clones mutantes

El fragmento BamHI-SacI, que contiene la secuencia que codifica el extremo amino terminal de la CP (extraído del clon de cDNA de longitud completa de PPV denominado pGPPV [Riechmann, J.L., et al., (1990) Virology 177, 710-716]) se introdujo en M13mp19 [Norrander, J., et al., (1983) Gene 26, 101-106] y se efectuó una mutagénesis dirigida al sitio utilizando los oligonucleótidos identificados como SEC. ID. N° 1 y SEC. ID. N° 2 (véase la Lista de Secuencias) para crear las mutaciones NAT y NAT-MluI respectivamente. Los productos de la mutagénesis se verificaron por secuenciación y sus fragmentos BamHI-SacI se volvieron a clonar en el clon de cDNA de longitud completa para crear pGPPV-NAT y pGPPV-NATMluI.

El pGPPV-NAT tiene la delección de 45 nucleótidos (nt) encontrada en los mutantes NAT naturales, pero no presenta otros cambios de secuencia en relación con pGPPV. Sin embargo, el pGPPV-NATMluI tiene la misma delección que el pGPPV-NAT pero tiene, además, unos cambios adicionales en los nucleótidos cercanos al punto de delección que crean un sitio único de restricción MluI (Figura 1A), lo que permite clonar secuencias heterólogas que codifican a péptidos de interés.

### 2. Transcripción *in vitro* e inoculación de plantas

Los transcritos sintetizados en presencia de cap procedentes de los distintos clones de cDNA de longitud completa (tipo salvaje y mutantes), se sintetizaron con el kit de transcripción T7 Cap Scribe (Boehringer Mannheim). Se utilizaron 20 microlitros ( $\mu$ l) de cada mezcla de reacción diluida 1:1 en tampón fosfato sódico 5 mM pH 7,5 para inocular 8 plantas de *Nicotiana clevelandii* (*N. clevelandii*) usando Carborundum [carburo de silicio, Prolabo] como abrasivo (3 hojas por planta).

Todos los transcritos sintetizados con cap procedentes de los clones mutantes y tipo salvaje eran capaces de infectar plantas. El curso de la infección y la sintomatología de la infección causada por los transcritos de los clones mutantes eran similares a los de las plantas infectadas con el tipo salvaje.

### 3. Análisis por Western blot

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se separaron muestras de plantas infectadas homogeneizadas con tampón PBS-Tween-PVP [PBS, solución salina tam-

ponada con fosfato; PVP, polivinil-pirrolidona] (1x PBS, Tween 20 0,5 g/l y PVP K25 2%) [Candresse, T., et al., (1995) Acta Hort. 386, 357-369] o con fosfato sádico 5 mM pH 7,5. A continuación, las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se hicieron reaccionar tal como ya se ha descrito [García, J.A., et al., (1992) Virology 188, 697-703] con el anticuerpo monoclonal antiPPV 5B que se obtuvo a partir del kit REALISA (Durviz). El segundo anticuerpo fue una IgG de cabra anti-ratón conjugada a peroxidasa (Jackson Immuno-Research Laboratories). La reacción de la peroxidasa se reveló con 4-cloro-1-naftol.

El análisis por Western blot de las plantas infectadas puso de manifiesto que los virus mutantes PPV-NAT y PPV-NATMluI se acumulaban en una medida similar a la del PPV tipo salvaje. Tal como se esperaba, las CP de los virus mutantes mostraban mayores movilidades electroforéticas con respecto a la CP del tipo salvaje (datos no mostrados).

#### 4. Inmunocaptura-PCR (IC-PCR)

Se incubaron muestras de plantas infectadas homogeneizadas con tampón PBS-Tween-PVP durante 2 horas a 37°C en tubos previamente recubiertos con IgG anti-PPV y, a continuación, tras dos lavados con tampón PBS-Tween, se efectuó la reacción de transcripción reversa (RT) y posteriormente la amplificación enzimática por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), según la metodología descrita por Candresse y colaboradores [Candresse, T., et al., (1995) Acta Hort. 386, 357-369].

La IC-PCR de muestras procedentes de plantas infectadas amplificó bandas de los tamaños esperados para cada mutante. El mantenimiento de la secuencia mutante en la progenie del virus se corroboró por digestión con MluI y secuenciación nucleotídica de los productos amplificados por IC-PCR (datos no mostrados).

#### 5. Construcción de los clones quiméricos

##### 5.1 Construcción de pGPPV-CPV

Se construyó un clon intermedio, denominado pUC18MluI, que contenía el fragmento BamHI-SacI de pGPPV-NATMluI insertado en pUC18, con el fin de facilitar el clonaje de las secuencias que codifican los péptidos antigénicos. La secuencia que codifica el péptido derivado de la VP2 de CPV identificado como 6L15 (SEC. ID. N° 3) se creó hibridando los oligonucleótidos complementarios identificados como SEC. ID. N° 4 (cadena +) y SEC. ID. N° 5 (cadena -) que dejan extremos cohesivos compatibles. La hibridación se efectuó incubando 1,5 microgramos ( $\mu$ g) de cada oligonucleótido en un tampón que contenía Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 0,1 M y EDTA 1 mM a 90°C durante 5 minutos, y a continuación se enfrió lentamente a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se ligó con pUC18MluI digerido con MluI para crear pUC18CPV. El fragmento BamHI-SacI de este plásmido, que contiene la secuencia que codifica el péptido 6L15, se introdujo posteriormente en el clon de cDNA de PPV de longitud completa para crear pGPPV-CPV.

El clon mutante NATMluI se utilizó para introducir secuencias heterólogas en el genoma de PPV. Se introdujo una secuencia de 45 nt que restauraba el tamaño en número de aminoácidos de la CP del PPV dando lugar al pGPPV-CPV (Figura 1B). Esta secuencia codifica un péptido de 15 aa de la proteína VP2 de CPV que induce protección completa cuando se inmunizan animales experimentales con dicho péptido [Langeveld, J., et al., (1994) J. Virol. 68, 4506-4513].

##### 5.2 Construcción de pGPPV-2CPV

Para comprobar si el vector NAT-MluI podía albergar secuencias más largas, se introdujo un dímero de la secuencia de CPV. Los transcritos procedentes de esta construcción quimérica eran capaces de infectar plantas *N. clevelandii* con las mismas características que las del tipo salvaje.

Para construir el clon con un dímero del epítipo, denominado pGPPV-2CPV a partir del clon intermedio (pUC18MluI) se siguió el mismo procedimiento que el descrito previamente para la obtención del clon con una sola copia de la secuencia codificante del péptido 6L15 de CPV, pGPPV-CPV (Sección 5.1), pero los oligonucleótidos se fosforilaron con la polinucleótido quinasa de T4 antes de la hibridación y el pUC18MluI se trató con fosfatasa alcalina tras la digestión con MluI. Esta estrategia permitió obtener clones derivados de pUC18 que contenían más de una copia de la secuencia codificante del péptido de CPV. Se seleccionaron los clones con dos copias en la orientación correcta.

El clon pGPPV-2CPV contiene una secuencia heteróloga de 90 nt y un tamaño aumentado en 45 nt con respecto al genoma de PPV tipo salvaje, lo que da como resultado una CP con 15 aa más que el tipo salvaje (Figura 1B).

### 5 5.3 Purificación de los viriones

Se purificaron los viriones procedentes de plantas *N. clevelandii* infectadas con PPV, PPV-CPV y PPV-2CPV. Las hojas infectadas se trituraron en una solución que contiene por cada gramo de hoja 20 ml de McIlvaine's/urea pH 7 (ácido cítrico 13 mM, fosfato disódico 175 mM y urea 0,5 M), 3,33 ml de cloroformo, 40  $\mu$ l de ácido tioglicólico y 0,045 g de la sal sódica trihidratada del ácido dietilditiocarbámico. A continuación, se sometió la muestra a ciclos de sedimentación por centrifugaciones diferenciales a baja y alta velocidad para finalmente sedimentarla a través de un colchón de sacarosa y resuspender el sedimento final en tampón borato 50 mM pH 8,5. El rendimiento tras la purificación de ambos virus quiméricos es similar al de PPV y no parece que exista diferencia en la estabilidad del virión ni después de los tratamientos de purificación ni después del almacenamiento en las condiciones usadas habitualmente.

## 6. Caracterización inmunológica de los virus quiméricos

### 6.1 Western blot

Se analizaron muestras de los viriones purificados por tinción con azul de Coomassie y por inmunoreacción con anticuerpos frente a PPV y CPV. Aunque las CP de PPV y de PPV-CPV tenían el mismo número de aa, presentaban una movilidad electroforética ligeramente diferente, tal como cabía esperar a la vista de su diferente composición de aa. Los fragmentos de DNA amplificados por IC-PCR correspondientes a la región amino terminal de la CP de PPV y de PPV-CPV mostraron el mismo tamaño, lo que indicaba que no se habían producido deleciones. El fragmento de DNA amplificado a partir de la quimera PPV-2CPV tenía el aumento de tamaño esperado con respecto a PPV y PPV-CPV. Estos datos se confirmaron por digestión con la enzima de restricción HincII presente en la secuencia de CPV y por secuenciación de los productos amplificados, verificándose además la ausencia de otras mutaciones introducidas durante la replicación de los virus quiméricos (datos no mostrados). Algunas quimeras basadas en virus de plantas que contienen secuencias heterólogas han mostrado una cierta tendencia a perder el inserto heterólogo después de un cierto número de ciclos de replicación o pases en plantas [Usha, R., et al., (1993) *Virology* 197, 366-374]. Sin embargo, los virus quiméricos PPV-CPV y PPV-2CPV son genéticamente estables en plantas hasta 30 días post-infección, y, además, la quimera PPV-CPV mantuvo su estabilidad tras cuatro pases sucesivos en plantas *N. clevelandii* (datos no mostrados).

### 6.2 Antigenicidad

Para los ensayos de antigenicidad, se efectuó un ELISA-DASI con cantidades crecientes de viriones purificados de PPV, PPV-CPV y PPV-2CPV siguiendo el protocolo descrito en el kit REALISA (Durviz). En estos ensayos se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-PPV 5B (suministrado en el kit) y el anticuerpo monoclonal anti-CPV 3C9. Como se observa en la Figura 2, todos los virus fueron reconocidos a niveles similares por el anticuerpo anti-PPV, alcanzándose la saturación a dosis superiores a 100 nanogramos (ng). Como se esperaba, el PPV tipo salvaje no fue reconocido por el anticuerpo monoclonal 3C9, aunque hubo una fuerte reacción de PPV-CPV y PPV-2CPV con ese anticuerpo monoclonal anti-CPV. Los valores de PPV-2CPV eran algo más altos, alcanzándose la saturación a dosis más bajas que las de PPV-CPV, reflejando probablemente el hecho de que el PPV-2CPV mantiene dos copias del epítipo 6L15.

### 6.3 Ensayo de inmunomicroscopía

10  $\mu$ l de una dilución 0,1  $\mu$ g/ml de PPV y PPV-CPV se adsorbieron en rejillas tipo formar durante 2 minutos. Después de un lavado de 8 minutos con tampón TBG (Tris-HCl 30 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, 1% de gelatina, 0,1% de seroalbúmina bovina), ambas muestras se incubaron bien con un anticuerpo policlonal frente a PPV o bien con el anticuerpo monoclonal 3C9 durante 8 minutos. Después de cinco lavados con tampón TBG, las muestras se incubaron durante 8 minutos con IgG anti-conejo marcada con granos de oro de 5 nm o con IgG anti-ratón marcada con granos de oro de 10 nm según el primer anticuerpo utilizado. Finalmente, las rejillas se lavaron cinco veces con tampón TBG y tres veces con agua MilliQ [Millipore] antes de la tinción con acetato de uranilo al 2% durante 30 segundos. Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio electrónico JEOL 1200EXII.

Los inmunoensayos con oro coloidal mostraron que la morfología de las partículas virales de PPV y PPV-CPV es similar. Tanto PPV como PPV-CPV resultaron marcados con granos de oro cuando se

incubaron con el anticuerpo policlonal frente a PPV pero sólo se marcó PPV-CPV cuando la incubación se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-CPV 3C9.

### 7. Inmunización de animales

5

Para evaluar la capacidad para estimular la producción de anticuerpos específicos frente a CPV, se utilizaron varias cantidades de quimeras PPV-CPV y PPV-2CPV para inmunizar animales.

Se inmunizaron grupos de 5 ratones BALB/c, de 3 semanas de edad, mediante inyección intraperitoneal los días 0 y 20. Para la primera inoculación se emulsionaron diferentes cantidades de viriones purificados de PPV-CPV, PPV-2CPV y PPV en PBS en el mismo volumen de adyuvante completo de Freund (Sigma), mientras que para el recuerdo posterior se utilizó adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Los ratones inmunizados se sangraron los días 0 y 35, y los sueros se ensayaron mediante ELISA para determinar los títulos de anticuerpos anti-péptido, anti-CPV y anti-PPV, y mediante un ensayo de protección en monocapa para determinar la actividad neutralizante de CPV.

10

15

Para los conejos (New Zealand White), de 5-6 semanas de edad, el antígeno utilizado para la inmunización varió entre 5  $\mu$ g y 1 mg de PPV-CPV o PPV-2CPV quiméricos, tal como se indica en las Tablas 1 y 2 (véase más adelante). En cada caso, dos o tres animales recibieron dos inyecciones de la misma dosis de virus quimérico con un intervalo de 21 días, por vía intramuscular, con adyuvantes completo e incompleto de Freund (Sigma), respectivamente. Las muestras de sangre se recogieron antes de comenzar los experimentos y 15 días después de la segunda inmunización, y los sueros se ensayaron tal como se menciona posteriormente.

20

25

#### 7.1 Determinación de anticuerpos

##### 7.1.1 ELISA

Para detectar anticuerpos específicos anti-péptido, anti-CPV y anti-PPV en los animales inmunizados se llevaron a cabo tres ELISAs indirectos. El péptido 2L21 que cubre el extremo amino de la VP2 de CPV [Casal, J.I., et al., (1995) J. Virol. 69, 7274-7277] se sintetizó en *Escherichia coli* (*E. coli*) como una proteína de fusión a ubiquitina. Como fuentes de antígenos se utilizaron, respectivamente, el péptido 2L21, CPV purificado y PPV salvaje purificado. Los pocillos de las placas de microtitulación de poliestireno (Labsystem) se recubrieron con péptido, CPV o PPV purificados, a 5 mg/ml diluido en tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6, durante toda la noche a 4°C. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora con el primer anticuerpo (suero de conejo o ratón) diluido en tampón de bloqueo (NaCl 0,35 M, Tween 20 al 0,05 % en PBS). La proteína A (Sigma) marcada con peroxidasa o la IgG anti-ratón (Pierce) se diluyeron 1/1000 en tampón de bloqueo y se utilizaron como conjugado correspondiente por incubación durante 1 hora a 37°C. Los lavados se realizaron con PBS conteniendo 0,05 % de Tween 20. La actividad peroxidasa se detectó añadiendo ABTS [2,2'-azino-di(etilbenzo-tiazolina)] (Sigma) como sustrato y parándose la reacción con SDS al 2 % al cabo de 15 minutos. La densidad óptica de las muestras se determinó a 405 nm (Bio-Tek Instruments).

30

35

40

##### 7.1.2 Ensayos de protección in vitro

45

Para determinar la capacidad de los sueros específicos de conejo y ratón para neutralizar el virus *in vitro*, se realizó un ensayo de protección de células CRFK en monocapa [López de Turiso, J.A., et al., (1991) J. Gen. Virol. 72, 2445-56].

50

#### 7.2 Inmunogenicidad de las quimeras PPV-CPV y PPV-2CPV

La Tabla 1 muestra los títulos por ELISA, el día 35, de los diversos sueros de los ratones inmunizados, expresados como logaritmo decimal de la inversa de la dilución de anticuerpo.

55

60

TABLA 1

*Respuesta de anticuerpos frente a las partículas quiméricas PPV-CPV y PPV-2CPV en ratones*

5	Grupo de ratones	Dosis	ELISA			NT <sup>a</sup>
			Péptido <sup>b</sup>	CPV <sup>c</sup>	PPV <sup>d</sup>	
10	1	0,5 µg PPV-CPV	3,8 <sup>e</sup>	2,8	4,4	2,3 <sup>f</sup>
	2	5 µg PPV-CPV	4,1	3,4	5,0	2,6
	3	50 µg PPV-CPV	2,6	1,9	5,3	1,9
	4	0,05 µg PPV-2CPV	1,7	1,0	2,3	–
15	5	0,5 µg PPV-2CPV	3,8	2,5	4,4	1,9
	6	5 µg PPV-2CPV	4,4	3,7	5,3	3,2
	7	5 µg PPV	–	–	5,0	–
	8	50 µg PPV	–	–	5,0	–

20 <sup>a</sup> Ensayo de neutralización de CPV

<sup>b</sup> ELISA de anticuerpos anti-péptidos. Como antígeno se utilizó el péptido 2L21.

<sup>c</sup> ELISA de anticuerpos anti-CPV. Como antígeno se utilizó CPV purificado.

25 <sup>d</sup> ELISA de anticuerpos anti-PPV. Como antígeno se utilizó PPV purificado.

<sup>e</sup> Los títulos de ELISA se determinaron 2 semanas después de la segunda inmunización y se expresan como el inverso del logaritmo decimal de la dilución de suero que proporcionaba unos valores de absorción que eran tres veces el del blanco (suero preinmunización). Se recogen los valores medios de cada grupo de ratones. [–: inmunorreacción no detectable].

30 <sup>f</sup> Los títulos de neutralización se determinaron 2 semanas después de la segunda inmunización y se expresan como el inverso del logaritmo decimal de la dilución más alta del suero capaz de proteger monocapas de células de la infección causada por CPV. [–: actividad de neutralización no detectable (-log de la dilución de suero más baja ensayada: 1,0)]. Se recogen los valores medios de cada grupo de ratones.

Como puede apreciarse en la Tabla 1, todos los ratones desarrollaron anticuerpos frente a PPV mostrando una buena correlación entre la cantidad de antígeno utilizado y el título anti-PPV. Dosis tan  
40 bajas como 0,05 µg de PPV-2CPV eran capaces de inducir anticuerpos anti-péptido y anti-CPV, aunque a bajos títulos (1,7 y 1,0, respectivamente). La respuesta más fuerte frente al péptido y frente a CPV se desarrolló en ratones inmunizados con 5 µg de PPV-2CPV (grupo 6), alcanzándose unos títulos por ELISA de 4,4 y 3,7 para los anticuerpos anti-péptido y anti-CPV, respectivamente. Estos títulos eran ligeramente más altos que los obtenidos en ratones inmunizados con la misma cantidad de partículas  
45 quiméricas que contenían el monómero (grupo 2). El grupo 3, inmunizado con la dosis más alta (50 µg), respondió frente al péptido de CPV y frente a CPV en una medida significativamente inferior.

Para estudiar la inmunogenicidad de las partículas quiméricas en conejos, se efectuó un segundo experimento de irunización. Siete grupos de 2 6 3 conejos se inmunizaron con diferentes dosis de  
50 PPV-CPV o PPV-2CPV en un intervalo de 21 días. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

55

60

TABLA 2

*Respuesta de anticuerpos frente a las partículas quiméricas PPV-CPV y PPV-2CPV en conejos*

5	Grupo de conejos	Dosis	ELISA			NT <sup>a</sup>
			Péptido <sup>b</sup>	CPV <sup>c</sup>	PPV <sup>d</sup>	
10	1	5 $\mu$ g PPV-CPV	2,0 $\pm$ 0,3 <sup>e</sup>	1,6 $\pm$ 0,6	3,8 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,5 <sup>f</sup>
	2	50 $\mu$ g PPV-CPV	2,4 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,8	4,4 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,9
	3	100 $\mu$ g PPV-CPV	3,5 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,6	4,3 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,6
	4	500 $\mu$ g PPV-CPV	3,5 $\pm$ 0,0	2,8 $\pm$ 0,0	4,7 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 0,2
	5	500 $\mu$ g PPV-2CPV	3,5 $\pm$ 0,0	2,8 $\pm$ 0,0	4,5 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,3
15	6	1 mg PPV-CPV	2,5 $\pm$ 0,6	1,0 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,7
	7	50 $\mu$ g PPV	–	–	4,4 $\pm$ 0,0	–
	8	500 $\mu$ g PPV	–	–	4,4 $\pm$ 0,0	–

20 <sup>a</sup> Ensayo de neutralización de CPV

<sup>b</sup> ELISA de anticuerpos anti-péptidos. Como antígeno se utilizó el péptido 2L21.

<sup>c</sup> ELISA de anticuerpos anti-CPV. Como antígeno se utilizó CPV purificado.

25 <sup>d</sup> ELISA de anticuerpos anti-PPV. Como antígeno se utilizó PPV purificado.

<sup>e</sup> Los títulos de ELISA se determinaron 2 semanas después de la segunda inmunización y se expresan como el inverso del logaritmo decimal de la dilución de suero que proporcionaba unos valores de absorción que eran tres veces el del blanco (suero pre-inmunización). Los datos representan las medias de los valores  $\pm$  DS (desviación estándar) dentro de cada grupo de conejos. [–: inmunorreacción no detectable].

35 <sup>f</sup> Los títulos de neutralización se determinaron 2 semanas después de la segunda inmunización y se expresan como el inverso del logaritmo decimal de la dilución más alta del suero capaz de proteger monocapas de células de la infección causada por CPV. [–: actividad de neutralización no detectable (-log de la dilución de suero más baja ensayada: 1,0)]. Los datos representan las medias de los valores  $\pm$  DS (desviación estándar) dentro de cada grupo de conejos.

40 Como se aprecia en la Tabla 2, en general, los niveles de anticuerpos anti-PPV aumentaron con la dosis del antígeno. Todos los conejos inmunizados con las partículas quiméricas indujeron una respuesta anti-péptido y anti-CPV detectable. Los títulos de anticuerpo más altos se obtuvieron cuando los conejos se inmunizaron con 100  $\mu$ g/dosis de PPV-CPV, alcanzándose títulos de 4,1 para el péptido y de 3,7 para CPV. Los segundos títulos de anticuerpo más altos se observaron en conejos inmunizados con 500  $\mu$ g/dosis de PPV-CPV o de PPV-2CPV, lo que sugería que la cantidad de partículas quiméricas más eficaz para estimular la producción de anticuerpos específicos frente a CPV en conejos estaba comprendida entre 100 y 500  $\mu$ g suministradas en dos dosis. El empleo de dosis más altas, por ejemplo de 1 mg, no aumentó proporcionalmente la respuesta específica frente a CPV, como se observó en ratones, probablemente debido a la saturación antigénica. La inserción de dímeros, en vez de monómeros, de la secuencia del epítipo no parece aumentar significativamente la respuesta específica frente a CPV en conejos, en contraste a lo observado en ratones.

### 7.3 Respuesta de anticuerpos neutralizantes de CPV inducida por las quimeras PPV-CPV y PPV-2CPV

55 Para evaluar la capacidad de las partículas quiméricas PPV-CPV y PPV-2CPV de inducir anticuerpos neutralizantes de CPV, se efectuó un ensayo de protección en monocapa con sueros de ratón y conejo inmunizados, en ausencia de complemento (Sección 7.1.2). Las Tablas 1 y 2 muestran los títulos de neutralización de los sueros de conejo y de ratón, respectivamente. Todos los ratones indujeron niveles detectables de anticuerpos neutralizantes de CPV, excepto el grupo 4, inmunizado con 0,05  $\mu$ g de PPV-2CPV que casi no mostraba respuesta frente a CPV o PPV. La respuesta neutralizante más alta se consiguió en el grupo 6, inmunizado con 5  $\mu$ g de PPV-2CPV, con un título de 3,2, que es ligeramente más alto que el obtenido con la misma dosis de partículas quiméricas del monómero (2,6).

En el experimento de inmunización de conejos, 12 de los 16 animales desarrollaron anticuerpos neutralizantes de CPV detectables, oscilando entre unos títulos de 1,0 en los conejos inmunizados con 5  $\mu\text{g}$  de PPV-CPV y 2,9 correspondiente a conejos inmunizados con 100  $\mu\text{g}$  de PPV-CPV y 500  $\mu\text{g}$  de PPV-2CPV, respectivamente, confirmando de esta manera que la cantidad más adecuada de partículas quiméricas para la inmunización de conejos está comprendida entre 100 y 500  $\mu\text{g}$ . Los sueros procedentes de conejos inmunizados con partículas quiméricas que contenían el dímero, no eran apreciablemente más eficaces para inducir actividad neutralizante, lo que está de acuerdo con los resultados del ELISA. Tal como se esperaba, los conejos con una respuesta muy baja frente al péptido de la VP2 de CPV no eran capaces de inducir neutralización.

#### 8. Conclusiones

- 1) El vector de expresión basado en PPV identificado como PPV-NATMluI se construyó retirando de un clon de cDNA de PPV de longitud completa la región dispensable delecionada en los mutantes naturales NAT, e introduciendo un sitio de restricción para facilitar el clonaje de secuencias heterólogas. La infección con el vector o con quimeras derivadas del mismo quedaría restringida a las plantas inoculadas ya que parte de la región de la CP requerida para la transmisión por pulgones está incluida en la secuencia delecionada. Este punto relativo a la seguridad biológica es muy importante si se tiene en mente la producción a gran escala en el campo.
- 2) Se ha clonado una secuencia de un péptido antigénico de CPV, tanto en forma simple como en tandem, en el vector PPVNATMluI. Las dos quimeras obtenidas (PPV-CPV y PPV-2CPV) son viables y estables genéticamente, y ponen de manifiesto que el sitio de inserción es, de alguna manera, permisible a la modificación y que insertos tan grandes como de 30 aa pueden ser tolerados sin ningún efecto perjudicial sobre el ciclo vital del virus.
- 3) El extremo amino terminal de los potyvirus está implicado en el movimiento sistémico [Dolja, V.V., et al., (1995) Virology 206, 1007-1016; Dolja, V.V., et al., (1994) EMBO J. 13, 1482-14911, sin embargo, las quimeras aquí descritas a pesar de tener una secuencia extraña insertada en esta región parecen no tener un movimiento a larga distancia reducido. Así pues, es de suponer que las secuencias requeridas para dicha función deben estar restringidas a otras partes de la región amino terminal de la CP de PPV.
- 4) El rendimiento en partículas virales de los virus quiméricos es similar al del PPV tipo salvaje, y, además, los viriones quiméricos son estables después de los tratamientos de purificación y almacenamiento.
- 5) La estructura particulada y repetitiva de los viriones de los potyvirus (aproximadamente 2.000 copias de una proteína única), junto con la exposición superficial del extremo amino terminal de CP de potyvirus presupone que las quimeras basadas en PPV-NATMluI podrían comportarse como sistemas de presentación de antígenos competentes que produzcan una fuerte respuesta de anticuerpos. De hecho, PPV-CPV y PPV-2CPV mostraron una elevada antigenicidad y fueron reconocidos eficientemente por anti-cuerpos anti-CPV por análisis ELISA (Figura 2), Western blot e inmunomicroscopía, lo que enfatiza la utilidad del vector basado en PPV para fines de diagnóstico. Por otra parte, ambos virus quiméricos eran inmunogénicos y capaces de inducir altos niveles de anticuerpos tanto en ratones como en conejos, aunque no parece que existan diferencias sustanciales en la calidad de la respuesta inmune inducida por PPV-CPV y PPV-2CPV. Los anticuerpos inducidos eran capaces de neutralizar CPV, aunque los títulos de neutralización no eran muy elevados. Se prevé que posteriores desarrollos de este sistema (modificaciones en las construcciones de los virus y en la forma de inoculación) puedan facilitar su empleo como fuente alternativa de vacunas.

#### Depósito de microorganismos

Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo el plásmido pGPPV-CPV han sido depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Burjasot, Valencia (España), el 21 de Enero de 1998, correspondiéndole el número de acceso CECT 4992.

#### Lista de secuencias

##### (1) INFORMACION GENERAL:

##### (i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.

## ES 2 139 537 B1

(B) CALLE: Hermanos García Noblejas, 41

(C) CIUDAD: Madrid

5 (D) PROVINCIA: Madrid

(E) PAIS: España

(F) CODIGO POSTAL (ZIP): 28037

10 (G) TELEFONO: (91) 368 05 01

(H) FAX: (91) 408 75 98

(i) SOLICITANTE:

15 (A) NOMBRE: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

(B) CALLE: Serrano, 113

(C) CIUDAD: Madrid

20 (D) PROVINCIA: Madrid

(E) PAIS: ES

(F) CODIGO POSTAL (ZIP): 28006

25 (G) TELEFONO: (91) 585 50 00

(H) FAX: (91) 411 30 77

(ii) TITULO DE LA INVENCION:

30 SISTEMA DE PRESENTACION DE ANTIGENOS BASADO EN EL VIRUS DE LA SHARKA

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 5

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

35 (A) TIPO DE SOPORTE: Floppy disk

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

40 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEP)

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N° 1:

45 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

50 (C) NUMERO DE CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Otro ácido nucleico

55 (A) DESCRIPCION: /desc = "DNA sintético"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N° 1:

60 GTGGTTGAAG TGCATCAACT TC

22

## ES 2 139 537 B1

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N° 2:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 26 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NUMERO DE CADENAS: sencilla
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCION: /desc = "DNA sintético"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N° 2:

GAGGTGGTTG TAACGCGTCA ACTTCC

26

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N° 3:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 15 aminoácidos
- (B) TIPO: péptido
- (C) NUMERO DE CADENAS: sencilla
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N° 3:

Val	Gln	Pro	Asp	Gly	Gly	Gln	Pro	Ala	Val	Arg	Asn	Glu	Arg	Ala
1				5					10					15

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N° 4:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NUMERO DE CADENAS: sencilla
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCION: /desc = "DNA, sintético"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N° 4:

CGCGGTTCAA CCAGACGGTG GTCAACCTGC TGTCAGAAAT GAACG

45

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N° 5:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NUMERO DE CADENAS: sencilla
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCION: /desc = "DNA sintético"

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N° 5:

CGCGCGTTCA TTTCTGACAG CAGGTTGACC ACCGTCTGGT TGAAC

45

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de presentación de antígenos heterólogos basado en el virus de la sharka (PPV) que comprende una partícula de PPV quimérica que contiene, al menos, un antígeno heterólogo en la proteína de la cápsida (CP), estando dicho antígeno dispuesto en la superficie exterior de dicha partícula viral de PPV.

2. Sistema según la reivindicación 1, en el que dicho antígeno heterólogo se encuentra en el extremo amino terminal de la CP modificada de PPV.

3. Sistema según la reivindicación 1, en el que dicha CP de PPV modificada contiene más de un antígeno heterólogo.

4. Sistema según la reivindicación 3, en el que dicha CP de PPV modificada contiene 2 antígenos heterólogos iguales.

5. Sistema según la reivindicación 1, en el que dicho antígeno heterólogo es un epítipo inmunológicamente activo derivado de la proteína VP2 del parvovirus canino (CPV).

6. Un procedimiento para la obtención del sistema de presentación de antígenos heterólogos basado en el virus de la sharka (PPV) según las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de:

a) producir transcritos de RNA a partir de un vector cDNA derivado del potyvirus PPV que además codifica un antígeno heterólogo bien *in vivo* o bien *in vitro* utilizando una RNA polimerasa;

b) inocular plantas, células de plantas o tejidos de plantas, susceptibles de ser infectadas por el potyvirus PPV, con los transcritos producidos *in vitro* o con los clones cDNA capaces de producir *in vivo* los transcritos infecciosos; y

c) aislar los sistemas de presentación de antígenos heterólogos obtenidos.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho vector viral derivado del potyvirus PPV que codifica un antígeno heterólogo comprende un promotor, una secuencia de DNA complementaria (cDNA) al genoma de PPV, de longitud completa, una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica dicho antígeno heterólogo y un vehículo de clonación.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho promotor se selecciona del grupo formado por un promotor adecuado para la transcripción *in vitro* del cDNA mediante la correspondiente RNA polimerasa y un promotor de un gen funcional en plantas, adecuado para la transcripción *in vivo* del RNA viral.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho promotor se selecciona del grupo formado por el promotor del bacteriófago T7 y el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

10. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha secuencia de cDNA de PPV contiene una mutación de tipo NAT.

11. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha secuencia de cDNA de PPV contiene un sitio único de clonaje.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho sitio único de clonaje está situado en el extremo amino terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica la CP de PPV.

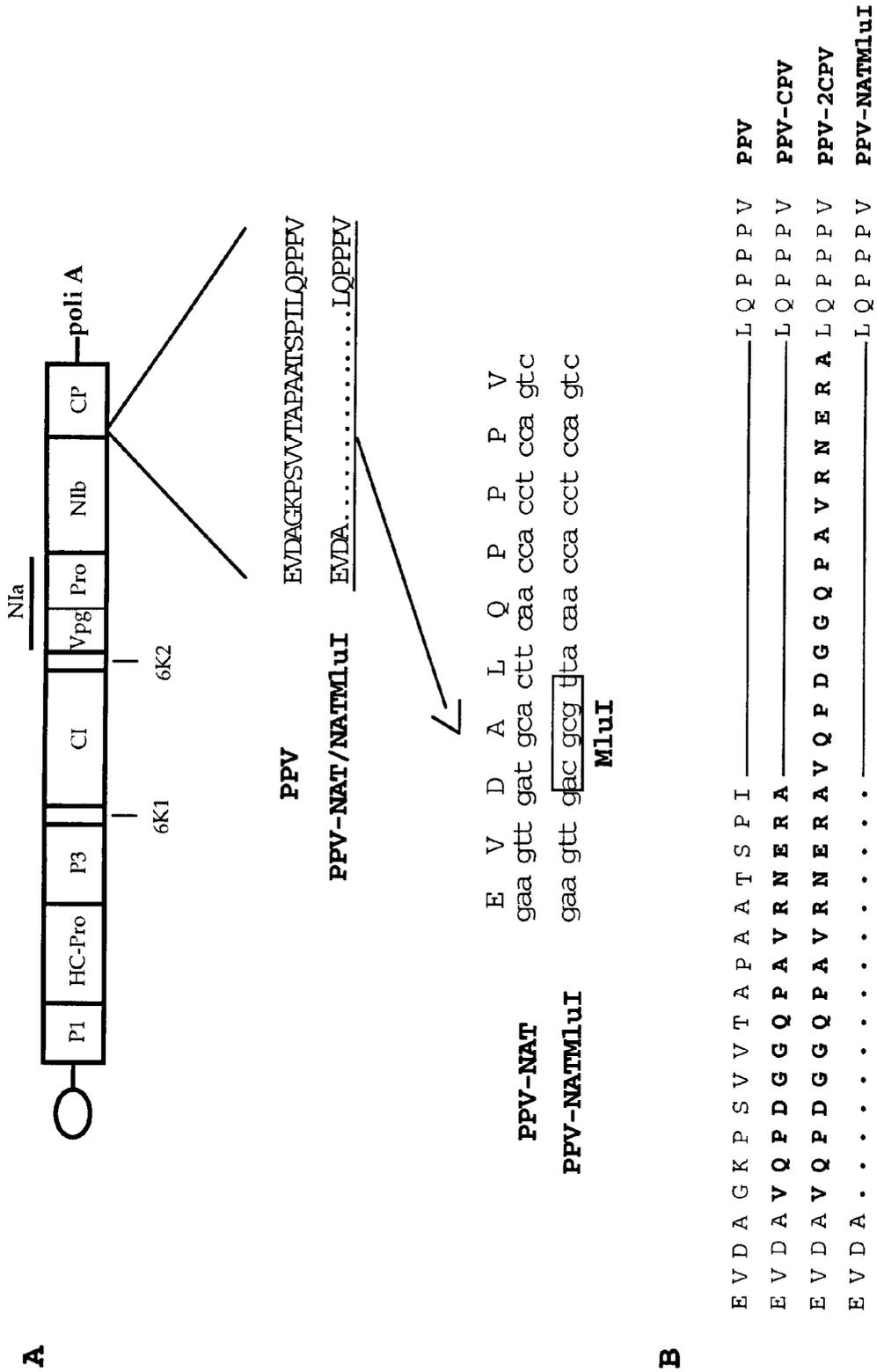


FIGURA 1

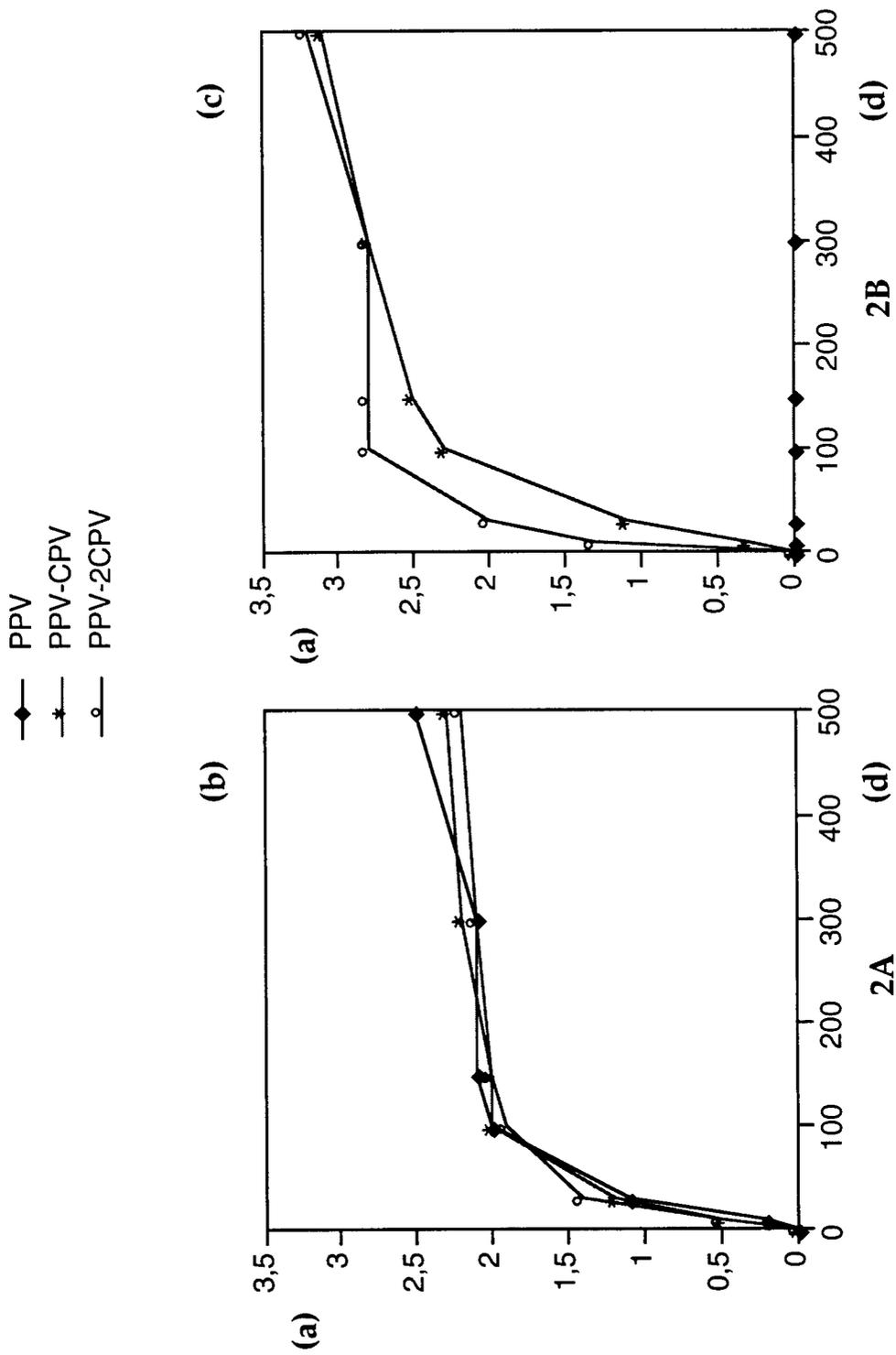


FIGURA 2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 15/40, 15/82, 7/01, 15/35

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 5569823 A (SCHREIER et al.) 29.10.1996, columna 1, línea 55 - columna 4, línea 53.	1,6-9
Y		5
X	WO 9115587 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 17.10.1991, página 3, línea 2 - página 4, línea 10; página 5, línea 28 - página 6, línea 35.	2,3,4
Y	WO 9217589 A1 (ERCROS S.A.) 15.10.1992, página 8, líneas 16-26; página 9, línea 34 - página 10, línea 15.	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**  
20.12.1999

**Examinador**  
A. Collados Martín Posadillo

**Página**  
1/1