



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 952**

51 Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06829221 .8**
96 Fecha de presentación : **30.11.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1951882**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2008**

54 Título: **Ácidos nucleicos que codifican para vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV).**

30 Prioridad: **01.12.2005 EP 05026255**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.03.2011

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
FORT DODGE VETERINARIA, S.A.**

72 Inventor/es: **Sola Gurpegui, Isabel;
Enjuanes Sanches, Luis;
Zúñiga Lucas, Sonia y
Plana Durán, Joan**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 353 952 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

5 La presente invención se refiere a ácidos nucleicos que comprenden: secuencias de un virus de la gastroenteritis transmisible competente para la replicación (TGEV) y una secuencia que codifica para por lo menos un epítipo neutralizante de ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), incluyendo dicha secuencia un residuo de formación de puente disulfuro y habiéndose modificado para desactivar los sitios de glicosilación que interfieren en la inducción de anticuerpos.

10 La presente invención se refiere además a vectores, células huésped y partículas virales que comprenden estas secuencias así como a la utilización de las secuencias para la preparación de composiciones farmacéuticas en general y específicamente para la preparación de vacunas con eficacia mejorada.

15 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

20 Los enfoques de terapia que implican la inserción de un gen funcional en una célula para lograr un efecto terapéutico también se denominan enfoques de terapia génica, dado que el gen actúa como fármaco. La terapia génica es una técnica principalmente para corregir los genes defectuosos responsables del desarrollo de enfermedades.

25 Se utiliza una molécula portadora también denominada vector para suministrar el gen terapéutico a las células diana del paciente. En la actualidad, el vector más común es un virus que se ha alterado genéticamente para portar genes humanos o animales. Los virus han desarrollado un modo de encapsular y suministrar sus genes a células humanas o animales de una manera patógena. Los científicos han aprovechado esta capacidad y manipulan el genoma del virus para eliminar los genes causantes de enfermedades e insertan genes terapéuticos.

30 Estos vectores virales se utilizaron para expresar genes heterólogos que provocan una respuesta inmunógena en el sujeto que recibe el vector y así inmunizar a ese sujeto. En ese caso el vector viral actúa como vacuna.

35 El virus de la gastroenteritis transmisible es un miembro de la familia de los coronavirus. Los coronavirus son virus de ARNss(+) que presentan el genoma más grande encontrado hasta el momento en los virus de ARN con una longitud de entre 25 y 31 kilobases kb (véase SIDDELL S.G. 1995, The Coronaviridae). Cuando un coronavirus infecta una célula, el ARN genómico (ARNg) se replica en el citoplasma y se produce un conjunto de ARN subgenómicos (ARNsg) de polaridad positiva y negativa (SETHNA *et al.*, 1989; SAWICKI & SAWICKI , 1990; y VAN DER MOST y SPAAN, 1995).

40 Debido al hecho de que los coronavirus se replican en el citoplasma, se ha sugerido la utilización de los coronavirus como vector para terapia génica y vacunación (ENJUANES *et al.*, 2003). Específicamente, se produjeron genomas de interferencia defectuosa (DI) de coronavirus. Estos genomas DI son mutantes de delección que requieren la presencia de un virus de complementación o auxiliar para la replicación y/o

transcripción (véase CHANG *et al.*, 1994; documento WO97/34008; solicitud de patente española P9600620; IZETA *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 1999).

5 Se clonó todo el genoma de un coronavirus en forma de un ADNc infeccioso (ALMAZAN *et al.*, 2000 y el documento WO01/39797). La clonación de todo el genoma permitió la preparación de vectores infecciosos que contienen secuencias heterólogas adecuadas para la expresión de proteínas grandes en una célula huésped. El documento WO01/39797 y PLANA-DURBAN - *et al.*, 2003 (Int. Symposium on Emerging and Re-

10 Emerging Pig Diseases, 2003, páginas 115-116) también sugieren expresar las secuencias de PRRSV a partir del vector de ADNc infeccioso de coronavirus.

El potencial del genoma viral clonado para la expresión de secuencias heterólogas se revisó en ENJUANES *et al.*, 2003.

15 Utilizando el virus clonado, se evaluaron la estructura del genoma y la relevancia de los genes coronavirusales para la infección preparando mutantes de delección. Se encontró que los genes 3a, 3b y 7 no son esenciales para la replicación del ácido nucleico viral y que la ausencia de los genes reduce la patogenicidad del virus (ORTEGO *et al.*, 2002 y 2003; SOLA *et al.*, 2003).

20 El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) se identificó por primera vez en 1991 como el agente causante de una nueva enfermedad en los cerdos (WENSVOORT *et al.*, 1991). Desde entonces, el PRRSV se ha convertido en una de las causas principales de pérdidas económicas en explotaciones porcinas en todo el mundo y en la actualidad se acepta como la enfermedad infecciosa más importante del cerdo, que provoca fallos en la reproducción en animales adultos y neumonía grave en cerdos neonatos. El PRRSV es un miembro de la familia *Arteriviridae* que pertenece al orden de los *Nidovirales*. Se reconocen dos genotipos (americano y europeo) (MURTAUGH *et al.*, 1995). El PRRSV es un virus encapsulado con un genoma de ARN de sentido positivo monocatenario de 14,5 Kb. Los dos tercios en el sentido de 5' del genoma codifican para las poliproteínas de replicasa (ppla y pplab), el resto del ARN genómico codifica para tres glicoproteínas asociadas a la membrana secundarias (Gp2, Gp3 y Gp4) y las tres proteínas estructurales principales (Gp5, M y N). Generalmente los cerdos se infectan con PRRSV tras la exposición de la superficie de la mucosa o las vías respiratorias al virus. Un

25 distintivo de la respuesta de los anticuerpos porcinos contra PRRSV son los anticuerpos no neutralizantes abundantes detectados de manera temprana en la infección, seguido de un título bajo de anticuerpos neutralizantes que aparece más de 3 semanas tras la infección. En los últimos años se han recogido datos experimentales que muestran la importancia de los anticuerpos neutralizantes en la protección contra la infección por PRRSV (LOPEZ y OSORIO, 2004, ANSARI *et al.*, 2006). La glicoproteína Gp5 de PRRSV contiene la mayoría de los epítopos neutralizantes del virus. Las proteínas Gp4 y M de PRRSV también inducen anticuerpos neutralizantes, sin embargo, los anticuerpos específicos para Gp5 neutralizan más eficazmente PRRSV que los que se unen a otras proteínas virales (OSTROWSKI *et al.*, 2002). La infección por PRRSV también induce

30 unas respuestas inmunitarias mediadas por células T más débiles y retardadas en relación con las provocadas por otros virus. Ambas respuestas se requieren para completar el aclaramiento de virus.

35

40

45

Se ha observado que las proteínas ORF5 de PRRSV son portadoras de cadenas

de polilactosaminoglicano, sin embargo, en ese momento se desconocía la relevancia de estas cadenas para la neutralización de anticuerpos (CHEN *et al.*, *Virology*, vol. 266, 2000, páginas 88-98).

5 Aunque la respuesta inmunitaria frente a PRRSV se entiende muy poco, se están comercializando algunas vacunas. Las vacunas actuales contra PRRSV presentan varios inconvenientes. El PRRSV, ya sea de tipo natural o atenuado, induce un nivel bajo de inmunidad mediada por células (MEIER *et al.*, 2003) y los anticuerpos neutralizantes (NA) no se desarrollan hasta una fase tardía de la infección (MEIER *et al.*, 2003, VEZINA *et al.*, 10 1996, YOON *et al.*, 1995). Además, se cree que la diversidad genética del PRRSV influye en la eficacia de la vacuna en las condiciones de campo (LABARQUE *et al.*, 2004, PESCH *et al.*, 2005), aunque existe cierto grado de protección cruzada (MENGELING *et al.*, 2003 a, 2003b). Las vacunas vivas modificadas protegen contra la exposición a aislados homólogos, pero generalmente presentan un efecto limitado contra la exposición a virus heterólogos (MENG, 2000). Además, las vacunas vivas proporcionan protección parcial 15 contra la enfermedad clínica, pero no prevenían la infección (OSORIO *et al.*, 1998) y, de manera más importante, pueden revertir a virulencia (BONER *et al.*, 1997, NIELSEN *et al.*, 2001). Por otra parte, las vacunas de PRRSV destruido, han demostrado ser menos eficaces en la prevención tanto de infección como de enfermedad (OSTROWSKI *et al.*, 20 2002).

El problema que subyace a la presente invención consiste por tanto en proporcionar vectores de vacuna eficaces con buena seguridad e inmunogenicidad contra PRRSV.

25

SUMARIO DE LA INVENCION

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden:

30

(a) secuencias de un virus de la gastroenteritis transmisible competente para la replicación (TGEV), codificando las secuencias para una replicasa de TGEV bajo el control de secuencias reguladoras de la expresión, expresándose la replicasa en una célula huésped e iniciará la replicación del ácido nucleico y por tanto aumentará el número de ácidos nucleicos en la célula; y

35

(b) una secuencia que codifica para por lo menos un epítipo neutralizante de ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), incluyendo la secuencia un residuo de formación de puente disulfuro; y

40

(c) una secuencia que codifica para por lo menos un polipéptido adicional que puede aumentar una respuesta inmunitaria frente a PRRSV,

45

en los que se ha modificado la secuencia que codifica para dicho epítipo neutralizante de ORF 5 para desactivar sitios de glicosilación que interfieren con la inducción de anticuerpos.

En una forma de realización preferida, el epítipo neutralizante se define por la

secuencia de aminoácidos TYQYIYN (SEC ID n°: 10).

5 En otra forma de realización preferida, el ácido nucleico comprende las secuencias de ORF5 y ORF 6 de PRRSV cada una bajo el control de una secuencia reguladora de la expresión separada.

10 En una forma de realización más preferida, el ácido nucleico está constituido por (1) la secuencia de ORF5 de PRRSV bajo el control de la secuencia reguladora de la transcripción del gen 3a, (2) la secuencia de ORF6 de PRRSV bajo el control de la secuencia reguladora de la expresión TRS_{22N} expuesta como SEC ID n°: 19 y (3) la secuencia del gen S derivado de la cepa atenuada PTV de TGEV.

15 Las secuencias de TGEV competente para la replicación no necesitan pero pueden codificar además para otras proteínas de TGEV. Por tanto, las secuencias de TGEV pueden codificar para un virus TGEV completamente infeccioso y las secuencias del epítipo neutralizante o multímeros de epítipos neutralizantes sólo comprenden ácido nucleico competente para la replicación. La presente invención se refiere además a
20 vectores que comprenden un ácido nucleico respectivo y células huésped que comprenden el vector. Las células huésped pueden complementar los genes de TGEV que pueden haberse eliminado a partir de los ácidos nucleicos de la presente invención. Por tanto, la célula huésped puede ser una línea celular de empaquetamiento o puede contener un virus auxiliar que expresa genes de TGEV, de modo que se forme una
25 partícula de virus TGEV que comprende las secuencias de por lo menos un epítipo neutralizante de PRRSV. Las partículas de virus obtenidas mediante la asociación de las proteínas de la cubierta de TGEV con los ácidos nucleicos competentes para la replicación pero no infecciosos de la presente invención son una forma de realización especialmente preferida de la presente invención (las partículas de virus correspondientes también se han denominado pseudovirus).

30 Finalmente, la presente invención también se refiere a la utilización médica de los ácidos nucleicos, los vectores de virus y las células huésped específicamente a la utilización como vacuna para tratar o proteger animales, tales como un cerdo frente a enfermedades infecciosas. Por tanto, la vacuna puede administrarse a un animal para reducir o eliminar los síntomas de una infección posterior de un virus de tipo natural.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 Por tanto, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos tal como se describieron anteriormente.

45 En la presente solicitud el término "pase" se utiliza para hacer referencia a un procedimiento, en el que se infecta con el virus una monocapa de células sensibles a TGEV (tales como células ST) en un recipiente de cultivo, tal como una placa Petri, se recoge el sobrenadante tras la replicación del virus, por ejemplo tras 24 horas, y se transfieren a una nueva monocapa de células. La realización del pase puede incluir etapas de clonación, por ejemplo transfección para obtener virus a partir de clones de ADN (utilizando por ejemplo células BHK) o purificación en placa del virus.

Uno de los problemas durante la infección con PRRSV es que los cerdos sólo secretan bajas cantidades de IFN- γ muy tarde durante la infección. La inducción de interferón (IFN- α/β) de tipo 1 es esencial para promover respuestas inmunitarias humorales y celulares antivirales (PFEFFER *et al.*, 1998) (LE BON *et al.*, 2001). Además se ha descrito que el IFN- α y la IL-12 están implicados en la diferenciación de células T en células secretoras de IFN- γ específicas de antígeno (COUSENS *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha mostrado que el TGEV es un potente inductor de IFN- α . La inducción de IFN por TGEV es un proceso mediado por la proteína M (CHARLEY y LAUDE, 1988; LAUDE *et al.*, 1990). Además, los vectores de TGEV presentan antígenos en sitios de la mucosa, provocando respuestas inmunitarias de mucosa y sistémicas. Por tanto, la utilización de TGEV como vector para los epítomos de PRRSV mejorará ventajosamente la inducción de protección frente al PRRSV.

El vector a base de TGEV puede mostrar un tropismo de vector modificado. En una forma de realización de la invención, el vector es un vector dirigido a las vías respiratorias. Esto se logra utilizando el gen de espiga (S) de un virus respiratorio. En una forma de realización alternativa, el vector es un vector dirigido al tracto intestinal. Esto se logra utilizando el gen S de una cepa intestinal de TGEV. El gen S además puede ser una secuencia que dirige el vector tanto al tracto respiratorio como al intestinal (véase la figura 9).

En una forma de realización preferida, se utiliza un gen S modificado (SEQ ID No:1), que proporciona tropismo intestinal y respiratorio y es muy estable en el pase en células de testículo de cerdo (ST) en cultivo. Este gen es una proteína quimérica derivada de la proteína S del clon C₁₁ de TGEV (que es virulento con tropismo intestinal y respiratorio) y el clon de PTV. La proteína S recombinante se diseñó por ingeniería genética utilizando los primeros 1208 nt del gen S de C₁₁ de TGEV y el resto de la secuencia quimérica del virus PTV. Se obtuvo la proteína quimérica final proporcionando un virus recombinante portador de esta proteína a los cerdos y la recuperación de un virus que presenta la secuencia quimérica tal como se expone como SEC ID n^o: 1. Esta proteína proporciona tropismo intestinal y respiratorio al TGEV, es muy estable en el pase en cultivo tisular en testículo de cerdo (ST), proporciona altos títulos ($>10^8$) para el TGEV cuando se hace crecer en cultivo tisular en células ST y no pierde el tropismo dual *in vitro* (tal como puede apreciarse a partir de la figura 9).

En un aspecto el ácido nucleico de la presente invención se caracteriza como un ácido nucleico que codifica para secuencias de TGEV competentes para la replicación que significa secuencias que codifican para una replicasa de TGEV bajo el control de secuencias reguladoras de la expresión de modo que la expresión de la replicasa en una célula que contiene el ácido nucleico iniciará la replicación del ácido nucleico y por tanto aumentará el número de ácidos nucleicos en la célula. Una vez se infecta una célula con los ácidos nucleicos de la presente invención, se expresará el gen para la replicasa y se replicará el ácido nucleico. Cuantas más copias del ácido nucleico estén presentes en la célula más epítomos se expresarán.

La expresión "secuencia reguladora de la transcripción", tal como se utiliza en la presente memoria, significa una secuencia o un fragmento de una secuencia que puede impulsar la síntesis de ARN virales subgenómicos asociados con la secuencia reguladora de la transcripción. Los ejemplos de tales secuencias reguladoras de la transcripción son

5 las secuencias que regulan la transcripción (TRS) asociadas de manera natural con los ARN virales. En una forma de realización preferida, la TRS será la TRS del gen 3a y en el caso de un vector dicistrónico que codifica para dos antígenos, la segunda TRS será una TRS sintética derivada del gen N (TRS_{22N}; SEC ID n°: 19) que se optimizó para la expresión génica tanto en los sistemas de expresión de minigenoma como de ADNc de longitud completa (ALONSO *et al.*, 2002).

10 Según la presente invención “epítipo neutralizante” significa epítipos que están implicados en la neutralización de virus. Los anticuerpos que reconocen Gp5 (codificado por ORF5) de PRRSV neutralizan PRRSV más eficazmente que los específicos para otras proteínas virales (OSTROWSKI *et al.*, 2002). Debe apreciarse que el ácido nucleico de la invención codifica para por lo menos un epítipo neutralizante de ORF5 de PRRSV, pero también puede codificar para más epítipos neutralizantes o una parte más grande de ORF5, por ejemplo la proteína Gp5 completa.

15 En una forma de realización preferida, el epítipo neutralizante se define mediante la secuencia de aminoácidos TYQYIYN (SEC ID n°: 10).

20 En una forma de realización, los ácidos nucleicos de la invención codifican para por lo menos un epítipo neutralizante de ORF5 de PRRSV y un residuo de formación de puente disulfuro que puede usarse para conectar un polipéptido adicional a dicho epítipo neutralizante. Por ejemplo, un epítipo de ORF6, que codifica para la proteína M de PRRSV, o puede acoplarse la proteína M completa al epítipo de ORF 5 a través de un puente disulfuro.

25 En otra forma de realización, los ácidos nucleicos según la invención codifican para multímeros de epítipos neutralizantes de ORF5. Un “multímero” comprende por lo menos 2 copias de un epítipo. Un “multímero” puede comprender repeticiones de Gp5 u otras secuencias de proteínas derivadas de PRRSV que inducen anticuerpos neutralizantes frente a PRRSV. Esta definición incluye dominios de proteína sintéticos (o péptidos) derivados de Gp5 de PRRSV u otras proteínas de PRRSV con una secuencia modificada mediante mutagénesis puntual que conduce a una estructura inmunogénica que proporciona mayor protección debido a una respuesta neutralizante potenciada o la eliminación de epítipos señuelo.

30 Normalmente, un ácido nucleico codificará para multímeros que comprenden de 2 a 5 repeticiones de la secuencia que codifica para el epítipo neutralizante de ORF5 de PRRSV. Estos multímeros pueden estar conectados mediante una secuencia de ácido nucleico que codifica para un conector flexible de 2 a 8, preferentemente de 3 a 6 aminoácidos. Estos “residuos conectores” mejorarán la flexibilidad de los epítipos. Un conector específicamente preferido es la secuencia Gly-Gly-Pro-Gly-Gly (SEC ID n°: 15).

35 40 45 Se han modificando los ácidos nucleicos que codifican para epítipos neutralizantes de ORF5 para desactivar sitios de glicosilación, a partir de un informe reciente que describe que la falta de glicosilación conduce a un aumento en la inducción de anticuerpos neutralizantes frente a PRRSV (ANSARI *et al.*, 2006). En una forma de realización preferida, tales sitios de glicosilación son los aminoácidos 46 y/o 53 de Gp5 de la cepa Olot 91 de PRRSV.

5 La glicosilación de los epítomos de proteína Gp5 puede interferir con la inducción de los anticuerpos dando como resultado una disminución de la respuesta inmunitaria. Por tanto, los epítomos codificados por los ácidos nucleicos de la invención pueden proporcionar un aumento de los efectos estimuladores de la respuesta inmunitaria en comparación con los epítomos que se produce de manera natural.

10 En una forma de realización preferida de la invención, el ácido nucleico codifica para por lo menos un epítomo neutralizante de ORF5 y ORF6 pero no polipéptidos de PRRSV adicionales. Por tanto, en otras formas de realización preferidas de la invención el ácido nucleico comprende un epítomo neutralizante de ORF5 y por lo menos un epítomo de ORF 6 de PRRSV. En otra forma de realización preferida, el ácido nucleico comprende un epítomo neutralizante de ORF5 y un epítomo neutralizante de ORF 6 de PRRSV. Aún en otra forma de realización, el ácido nucleico está constituido por un epítomo neutralizante de ORF5 y un epítomo neutralizante de ORF 6 de PRRSV. Aún en otra forma de realización preferida, el ácido nucleico está constituido por un epítomo neutralizante de ORF5 y ORF 6 completo de PRRSV.

20 Esto da como resultado una vacuna muy eficaz contra PRRSV. En otra forma de realización preferida, el ácido nucleico codifica para el ORF5 y ORF6 completos pero para ningún polipéptido de PRRSV adicional.

25 En otra forma de realización preferida, el ácido nucleico codifica para un epítomo neutralizante de ORF5 y el ORF6 completo pero para ningún polipéptido de PRRSV adicional. Aún en otra forma de realización preferida, el epítomo neutralizante de ORF5 se define mediante la SEC ID nº: 10.

30 En otra forma de realización preferida, el ácido nucleico codifica para por lo menos un epítomo neutralizante de ORF5, ORF6 completo y adicionalmente por lo menos un epítomo neutralizante de Gp4.

35 Las vacunas que comprenden Gp5 de PRRSV solo han demostrado ser eficaces con respecto a la protección de cochinitos frente a la infección por PRRSV. Esto se demostró mediante la prevención de la pérdida de peso en cochinitos vacunados tras la infección con PRRSV (véase la figura 1) y mediante la prevención de una infección con PRRSV en cochinitos vacunados (véase la figura 2). Sin embargo, el virus recombinante que comprende Gp5 solo ha demostrado ser inestable tras la realización del pase del virus en el cultivo tisular. Tal como puede observarse a partir de la figura 3, el ARNm de Gp5 ya no pudo detectarse en células ST infectadas con el virus recombinante del pase 5 en el cultivo tisular (p5), mientras que aún puede detectarse en células ST infectadas con el virus recombinante del pase 2 (p2). Esto puede deberse a deleciones que se producen en el virus durante los pases.

45 Por el contrario, la utilización de ácidos nucleicos que codifican para Gp5 (ORF5) y M (ORF6) de PRRSV ha mostrado que proporciona constructos con estabilidad sustancialmente mejorada. Más específicamente, además de conferir protección contra la infección por PRRSV, los constructos dicistrónicos que comprenden ácidos nucleicos que codifican para Gp5 y M de PRRSV son más estables incluso tras haberse pasado 20 veces en el cultivo tisular (véanse las figuras 5, 6 y 8). Además, el virus podría rescatarse de cochinitos infectados. La estabilidad del constructo se mostró adicionalmente mediante

análisis de RT-PCR (véase la figura 7), que muestra que los transcritos tanto del gen de ORF5 y como del ORF6 podrían detectarse para los clones de virus rescatados de las células ST tras 20 pases *in vitro*. Estos datos muestran claramente que los constructos dicistrónicos de la presente invención que comprenden ácidos nucleicos que codifican para Gp5 y M de PRRSV no sólo pueden proporcionar un virus que conserva su capacidad tanto de hacer crecer, en cultivos celulares incluso tras 20 pases, sino también aún expresa ambas proteínas codificadas por el constructo dicistrónico tras 20 pases. Esta estabilidad mejorada en el cultivo celular es especialmente importante para la propagación del virus recombinante *in vitro* para fines de vacunación. Además, debido a la estabilidad mejorada, también es posible recuperar TGEV recombinante que expresa Gp5 y M de PRRSV de tejidos de pulmón e intestino de cochinitos vacunados que pueden propagarse adicionalmente en cultivo celular utilizando células ST (véanse las figuras 9 y 10).

Otras proteínas derivadas de PRRSV que podrían expresarse para inducir una respuesta inmunitaria protectora son las glicoproteínas Gp2, Gp3 y Gp4. Se ha demostrado que estas proteínas se incorporan en viriones como complejo multimérico (WISSINK *et al.*, 2005) y son esenciales para la infectividad del virus. Por tanto, en otra forma de realización de la invención los ácidos nucleicos codifican para por lo menos un epítipo neutralizante de Gp5 y por lo menos un epítipo neutralizante de Gp2, Gp3 o Gp4. En una forma de realización preferida, los ácidos nucleicos codifican para un epítipo neutralizante de Gp5 y Gp2. En otra forma de realización, los ácidos nucleicos codifican para un epítipo neutralizante de Gp5 y Gp3 y aún en otra forma de realización, los ácidos nucleicos codifican para un epítipo neutralizante de Gp5 y Gp4. Otras formas de realización comprenden las combinaciones Gp5 con Gp2 y Gp3, Gp5 con Gp2 y Gp4 o Gp5 con Gp3 y Gp4.

La utilización de virus virulentos o atenuados y de antígenos recombinantes de PRRSV puede conducir a un retraso en la inducción de anticuerpos neutralizantes frente al virus. En una forma de realización de la invención, los ácidos nucleicos codifican para polipéptidos que mejoran la presentación de antígenos. En una forma de realización preferida, se utiliza para tal fin la señal de direccionamiento lisosómico de la proteína II integral de membrana lisosómica (LIMP-II). En otra forma de realización, se utiliza la proteína LIMP-II completa y otras formas de realización comprenden cualquier fragmento de LIMP-II que contiene la señal de direccionamiento lisosómico. En una forma de realización más preferida, una proteína de fusión que comprende la señal de direccionamiento lisosómico de LIMP-II y ORF5 y/u ORF6, o por lo menos un epítipo neutralizante de la misma, se codifica en los ácidos nucleicos de la invención, estando la señal de direccionamiento lisosómico de LIMP-II o bien fusionada con el ORF5 o bien con el ORF6 y en el caso de que ambos, ORF5 y ORF6, estén presentes, la señal de direccionamiento lisosómico de LIMP-II se fusiona con uno de ellos mientras que el ORF5 y ORF6, o los epítipos neutralizantes de los mismos, se conectan mediante un puente disulfuro.

En otra forma de realización, el polipéptido que puede aumentar una respuesta inmunitaria contra PRRSV es una interleucina. Recientemente, se ha descrito que IL-10 e IL-12 desempeñan un papel en los mecanismos de defensa pulmonar contra infección por PRRSV en cochinitos (CHUNG y CHAE, 2003). La incapacidad del cerdo para resolver una infección por PRRSV podría relacionarse con los bajos niveles de IFN- γ durante la infección (SURADHAT *et al.*, 2003). La IL-12 es una citocina inducible compuesta de dos

subunidades unidas (p35 y p40) que inducen la expresión de IFN por las células T y las células citolíticas naturales. Por consiguiente, interleucinas preferidas son por ejemplo IL-2, IL-10 o IL-12. En una forma de realización preferida, es la interleucina 12 (IL-12) y en una forma de realización todavía más preferida, es sólo la subunidad p35 de IL-12.

5

El vector de TGEV competente para la replicación puede ser infeccioso o no. Según la presente invención se denomina ácido nucleico infeccioso un ácido nucleico que contiene por lo menos todas las secuencias necesarias para la replicación del ácido nucleico, produce una o varias proteínas de la cubierta y se asocia con las proteínas de la cubierta para proporcionar una partícula viral que permitirá la infección de otras células.

10

En un aspecto especialmente preferido, la presente invención proporciona una partícula de virus que comprende el ácido nucleico anterior y por lo menos una proteína de la cubierta de TGEV. La partícula de virus puede comprender más de una e incluso todas las proteínas de la cubierta de TGEV. Una partícula de virus correspondiente podrá entrar en una célula huésped por medio de una infección. Sin embargo, el ácido nucleico de una partícula de virus de este tipo aún puede ser infeccioso o no infeccioso, dado que no necesita codificar para todas las proteínas de la cubierta de TGEV necesarias para producir una partícula de virus. Si el ácido nucleico es un ácido nucleico no infeccioso en el sentido de la presente solicitud, la partícula de virus se prepara utilizando una célula huésped de empaquetamiento o un virus auxiliar que complementa los genes de TGEV. La utilización de las células huésped de empaquetamiento o virus auxiliares para obtener partículas de virus que comprenden un genoma incompleto de un virus se conoce bien en la materia. Esta modo de proceder presenta ventajas específicas, dado que la partícula de virus es infecciosa *per se* (es decir, puede infectar una célula una vez), pero el ácido nucleico no puede producir partículas de virus infecciosas adicionales. En otras palabras, las secuencias derivadas de TGEV no codifican para proteínas que podrán asociarse con el ácido nucleico para formar una nueva partícula de virus. Por tanto, estas partículas de virus son extremadamente seguras y aún proporcionan una alta respuesta inmunogénica contra los epítomos expresados por los ácidos nucleicos.

15

20

25

30

Según una forma de realización alternativa de la presente invención, las partículas virales infecciosas de TGEV que pueden obtenerse a partir de la asociación de proteínas de TGEV y las secuencias de ácido nucleico son partículas virales atenuadas. Esto presenta la ventaja de que el sujeto que va a tratarse utilizando los ácidos nucleicos de la presente invención se vacunará al mismo tiempo contra TGEV y contra PRRSV.

35

Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden comprender secuencias que codifican para todas las proteínas de TGEV. Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden comprender secuencias que sólo codifican para las proteínas de TGEV necesarias para un vector de TGEV competente para la replicación. Por tanto, el ácido nucleico preferentemente codifica para la replicasa de TGEV. Según una forma de realización especialmente preferida, el ácido nucleico codifica para un vector de TGEV competente para la replicación, pero no infeccioso, que comprende secuencias que codifican para la replicasa de TGEV y la proteína N de TGEV y ninguna de las otras proteínas de TGEV. Este vector presenta la ventaja específica de que el vector de TGEV se amplificará en gran medida en la célula huésped y por tanto producirá grandes cantidades de los epítomos. Al mismo tiempo, este vector es extremadamente seguro, ya que no es infeccioso.

40

45

5 La expresión “ácidos nucleicos que codifican para proteínas de TGEV” se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a secuencias de ácido nucleico tal como se dan a conocer en PENZES *et al.* (2001), o a secuencias de ácido nucleico que presentan una similitud de por lo menos el 60%, preferentemente por lo menos el 75% y todavía más preferentemente por lo menos el 95% con estas secuencias. Por ejemplo, pueden utilizarse secuencias alternativas específicas para diferenciar entre animales vacunados contra TGEV y animales infectados con TGEV (tal como explica con mayor detalle a continuación). En el vector a base de TGEV proporcionado a título de ejemplo en la presente solicitud, se han introducido sustituciones de nucleótidos correspondientes utilizando RT-PCR en las posiciones 6752, 18997, 20460 y 21369, respectivamente. Especialmente las secuencias de ácido nucleico que codifican para la replicasa de TGEV, la proteína N, proteína M, proteína E o proteína S de TGEV tal como se utilizan en la presente memoria significa secuencias de ácido nucleico tal como se dan a conocer en PENZES *et al.*, 2001 (con o sin las enmiendas mencionadas anteriormente). De hecho, también es posible utilizar otras cepas de TGEV o incluir deleciones, sustituciones, inserciones o adiciones adicionales en la secuencia de ácido nucleico. Según un aspecto adicional, las secuencias de TGEV difieren por tanto de las secuencias dadas a conocer en PENZES *et al.* pero aún presentan una similitud de por lo menos el 60%, preferentemente por lo menos el 75% y todavía más preferentemente por lo menos el 95% con estas secuencias.

25 La expresión “ácidos nucleicos que codifican para proteínas de PRRSV” se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a secuencias de ácido nucleico de tipo natural de PRRSV o secuencias de ácido nucleico que presentan una similitud de por lo menos el 60%, preferentemente por lo menos el 75% y todavía más preferentemente por lo menos el 95% con estas secuencias.

30 En el contexto de la presente solicitud, se determina la similitud de secuencia utilizando el programa de informático ClustalW disponible del European Bioinformatics Institute (EBI), a menos que se indique lo contrario.

35 El vector de TGEV infeccioso no necesita contener los genes 3a, 3b y 7, dado que se conoce que éstos no son esenciales. Las proteínas codificadas por los genes 3a, 3b y 7 de TGEV pueden modular la respuesta inmunitaria contra TGEV y cuando se desea modular la interacción de TGEV con el huésped, estos genes pueden mantenerse en el vector de TGEV.

40 Adicionalmente, se ha diseñado por ingeniería genética el vector de TGEV infeccioso, expresando antígenos de PRRSV en diferentes posiciones del genoma de TGEV, tal como sustituyendo la proteína nsp2 o entre proteínas nsp1 y nsp2 de las poliproteínas de replicasa, de manera similar a la descrita para MHV y HCoV-229E (GRAHAM *et al.*, 2005; HERTZIG *et al.*, 2004).

45 Además, dado que el retraso en la aparición de anticuerpos neutralizantes tras la infección con PRRSV podría deberse a la presencia de epítomos señuelo (inmunodominantes) o a la presencia de epítomos reconocidos por las células T reguladoras que inhiben una fuerte respuesta inmunitaria, se han diseñado por ingeniería genética vectores de TGEV infecciosos adicionales que expresan proteína M de PRRSV y

versiones modificadas de Gp5. En estas proteínas Gp5 diseñadas por ingeniería genética, se han delecionado el epítipo señuelo y los epítipos de células T reguladoras, manteniendo la capacidad de la Gp5 mutada para interaccionar con la proteína M y, por tanto, mejorando la estabilidad de los virus recombinantes.

5
10
15
Las secuencias que codifican para proteínas dentro de los ácidos nucleicos de la presente invención preferentemente se unen a secuencias que controlan la expresión de estos genes en las células u organismos huésped. Los genes que codifican para los epítipos u otros polipéptidos pueden, por ejemplo, estar flanqueados por secuencias reguladoras de la transcripción (TRS) y/o secuencias del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para aumentar la transcripción y/o traducción de las secuencias que codifican para proteínas. Las secuencias TRS e IRES respectivas se conocen bien en la materia. Preferentemente, la TRS es la TRS del gen 3a, mientras que en el caso de un vector dicistrónico que codifica para dos antígenos, la segunda TRS preferentemente será una TRS sintética derivada del gen N (TRS_{22N}; SEC ID n°: 19).

20
Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden estar en forma de ADN o ARN. Dentro del alcance de la presente invención, están comprendidas específicamente moléculas de ARN recombinante que se codifican por uno de los ácidos nucleicos anteriores.

25
En una forma de realización preferida, el ácido nucleico comprende las secuencias de ORF5 y ORF 6 de PRRSV, cada una, bajo el control de una secuencia reguladora de la expresión separada.

30
En una forma de realización más preferida, el ácido nucleico está constituido por (1) la secuencia de ORF5 de PRRSV bajo el control de la secuencia reguladora de la transcripción del gen 3a, (2) la secuencia de ORF 6 de PRRSV bajo el control de la secuencia reguladora de la expresión TRS_{22N} expuesta como SEC ID n°: 19 y (3) la secuencia del gen S derivada de la cepa atenuada PTV de TGEV. Un ejemplo de una proteína S de este tipo es la de SEC ID n°: 1.

35
Según un aspecto adicional, la presente invención se refiere a vectores que comprenden uno de los ácidos nucleicos anteriores. El vector puede ser un vector de ADNc y preferentemente es un vector derivado de BAC, tal como BAC-TGEV^{FL}. El vector preferentemente puede replicar el ácido nucleico dentro de una célula huésped específica o varias células huésped.

40
45
Las células huésped, que comprenden un vector que comprende uno de los ácidos nucleicos anteriores son otro objeto de la presente invención. La célula puede ser una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula de animal o una célula humana. Según una forma de realización preferida, la célula es una línea celular porcina de testículo de cerdo (ST), tal como la línea celular depositada bajo ATCC CRL1746.

La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden uno de los ácidos nucleicos, ARN virales, polipéptidos o vectores de la presente invención o una célula huésped tal como se describió anteriormente. La composición farmacéutica puede comprender además uno o más vehículo(s),

excipiente(s) y/o adyuvante(s) farmacéuticamente aceptable(s).

5 En una forma de realización especialmente preferida, la presente invención se refiere a vacunas que pueden proteger un animal contra PRRSV que comprenden un ácido nucleico, un ARN viral, un vector, un polipéptido o una célula huésped de la presente invención. La vacuna también puede comprender uno o más vehículo(s), excipiente(s) y/o adyuvante(s) farmacéuticamente aceptable(s).

10 En la técnica se conocen adyuvantes y los vehículos adecuados para administrar vacunas genéticas e inmunógenos a través de la vía mucosa. Los vehículos y adyuvantes convencionales se revisan por ejemplo en KIYONO *et al.*, 1996. La presente invención comprende asimismo la adición de quimiocinas que se utilizan para modular respuestas inmunitarias. Los compuestos respectivos y su utilización médica se han revisado en TOKA *et al.*, 2004. Es específicamente ventajoso utilizar uno de entre factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos, interleucina-2 (IL-2), IL-12, IL-18. La IL-12 es una citocina inducible compuesta por dos subunidades unidas (p35 y p40) que inducen la expresión de IFN por las células T y las células citolíticas naturales. Se ha descrito que la coadministración de IL-12 de cadena sencilla recombinante (rIL-12) como adyuvante con una cepa de vacuna de células productoras de INF- γ específica para PRRSV mejorada con PRRSV (Foss *et al.*, 2002). La IL-12 también redujo el título de PRRSV en cultivo celular y disminuyó la viremia en animales infectados con PRRSV, lo que sugirió que la IL-12 potenciaba el desarrollo de la inmunidad mediada por células específica de antígenos y promovía la producción de IFN- γ en los pulmones de animales infectados con PRRSV (CARTER y CUIEL, 2005). Una limitación de la administración de IL-12 es que la subunidad p40 se expresa en exceso en relación con la subunidad p35 y, aparentemente, los dímeros de p40 se unen al receptor de IL-12 y actúan como un antagonista de IL-12. Recientemente, se ha mostrado que la expresión de la subunidad p35 de IL-12 como adyuvante molecular que potenciaba tanto las respuestas inmunitarias humorales como las mediadas por células sin las preocupaciones asociadas con p40 de IL-12 (OSORIO y GHIASI, 2005). También pueden aplicarse enfoques combinatorios que utilizan varias citocinas y quimiocinas. Además, a medida que se descubre más sobre los requisitos para el desarrollo de memoria de las células T, las administraciones de refuerzo que implican citocinas clave tales como IL-15 y IL-23 pueden resultar beneficiosas para el mantenimiento a largo plazo de la reserva de memoria.

35 La vacuna preferentemente es adecuada para tratar a un mamífero, por ejemplo un cerdo. Resulta especialmente preferida la vacunación de cerdas.

40 Según la presente invención, se proporcionan vacunas, que preferentemente pueden inducir tanto una respuesta inmunitaria sistémica como una respuesta inmunitaria en la mucosa contra PRRSV y/o TGEV.

45 La vacuna puede ser además una vacuna multivalente que puede proporcionar protección contra uno o varios patógenos de cerdo distintos. Por tanto, la vacuna multivalente puede comprender además antígenos derivados de otras proteínas y/o patógenos virales y/o bacterianos que proporcionarán inmunidad contra patógenos. Los ejemplos de antígenos de patógenos virales adicionales comprenden antígenos derivados de uno de virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, circovirus porcino de tipo 2, peste porcina clásica, peste porcina africana, glosopeda, virus de seudorrabia, circovirus porcino

de tipo 1, adenovirus porcinos, enterovirus porcinos, coronavirus respiratorio porcino, rotavirus porcino, virus de encefalomiocarditis, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la enfermedad del ojo azul, virus de la hepatitis E y/o virus del Nilo Occidental, virus Nipah. Específicamente resulta preferida la utilización de antígenos derivados de uno o
 5 varios de virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, circovirus porcino de tipo 2, peste porcina clásica, peste porcina africana y/o glosopeda.

Los ejemplos de antígenos de patógenos bacterianos comprenden antígenos
 10 derivados de uno de entre *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* tipo A (toxinas), *Pasteurella multocida* tipo D (toxinas), *Bordetella bronchiseptica*, *Isospora suis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Mycoplasma hyorinis*,
 15 *Streptococcus suis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium novyi*, *Brucella abortus* y/o *Candidatus helicobacter suis*. Específicamente resulta preferida la utilización de antígenos derivados de uno o varios de *Mycoplasma hyopneumoniae*,
 20 *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* tipo A (toxinas), *Pasteurella multocida* tipo D (toxinas), *Bordetella bronchiseptica*, *Isospora suis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*,
Lawsonia intracellularis, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli* y/o *Salmonella enterica*.

El antígeno viral o bacteriano adicional puede estar presente en la vacuna
 25 multivalente como un virus o una bacteria atenuado o inactivado. Alternativamente, la vacuna multivalente puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica para uno o varios de los antígenos virales o bacterianos adicionales. Esa secuencia puede estar dentro de la misma molécula de ácido nucleico que también codifica para las secuencias de TGEV y PRRSV o puede estar presente en la vacuna como una molécula de ácido nucleico separada.

La vacuna multivalente puede comprender además secuencias de ácido nucleico
 30 que codifican para proteínas que conferirán protección contra patógenos de cerdo. Las secuencias de ácido nucleico respectivas pueden por ejemplo codificar para uno o varios anticuerpos que tienen especificidad para enfermedades bacterianas o virales. Alternativa
 35 o adicionalmente, el ácido nucleico puede codificar para la secuencia de la proteína priónica porcina y por tanto puede utilizarse para vacunar contra enfermedades provocadas por priones. De nuevo, las secuencias que codifican para proteínas que conferirán protección contra patógenos de cerdo pueden estar dentro de la misma molécula de ácido nucleico que también codifica para las secuencias de TGEV y PRRSV o
 40 pueden estar presentes en la vacuna como una molécula de ácido nucleico separada.

Estas vacunas pueden administrarse según métodos utilizados conocidos en la
 45 técnica. Específicamente la vacuna puede administrarse mediante administración intramuscular, intravenosa, intranasal, intravaginal, buconasal o cualquier otro método común conocido en la técnica.

La vacuna puede ser una vacuna viva modificada o una vacuna inactivada (de organismos destruidos).

Las vacunas vivas modificadas (MLV) se producen a partir de un aislado de virus o bacterias. Los virus se atenúan, lo que significa que no pueden provocar enfermedad, pero aún pueden replicarse en las células huésped y por tanto estimular la inmunidad (PANLEY *et al.*, 1989; PASTORET *et al.*, 1997).

5

Las vacunas inactivadas (de organismos destruidos) se producen haciendo crecer los virus o las bacterias y posteriormente inactivando o destruyendo los organismos utilizando o bien calor o bien compuestos químicos. En vacunas inactivadas (de organismos destruidos), se añade un adyuvante a la fase antigénica de los organismos destruidos para apoyar la estimulación del sistema inmunitario, dado que el sistema inmunitario no reconoce fácilmente virus o bacterias muertos en ausencia de un adyuvante. Además el adyuvante mantiene los organismos destruidos en el sitio de inyección y por tanto proporciona tiempo suficiente para que las células inmunitarias le respondan (PARLEY *et al.*, 1989; PASTORET *et al.*, 1997). Las vacunas inactivadas puede ser virus destruidos, bacterias destruidas (también conocidas como bacterinas), o toxinas destruidas (o toxoides).

10

15

En una forma de realización preferida, la vacuna es una vacuna inactivada diluida con vacuna inactivada de circovirus porcino (PCV) de tipo1-tipo2 (FENAUX *et al.*, 2003, 2004) que se adyuvó previamente con sulfolipo-ciclodextrina. En una forma de realización preferida, se diluye la vacuna inactivada con vacuna inactivada de PCV de tipo1-tipo2 que se adyuvó previamente con sulfolipo-ciclodextrina al 20%. En una forma de realización especialmente preferida adicional, se diluye la vacuna inactivada 1:3 con la vacuna inactivada de circovirus porcino (PCV) de tipo1-tipo2.

20

25

La vacuna contiene preferentemente los ácidos nucleicos de TGEV/PRRSV en una concentración que produce un título viral vivo en el intervalo de aproximadamente 10^4 a 10^9 , todavía más preferentemente de aproximadamente 10^5 a 10^8 . El título viral vivo se determina como unidades formadoras de placa (ufp) en células ST.

30

Las vacunas de la presente invención permiten que un experto en la materia diagnostique si un animal está infectado con un virus de tipo natural o si ha sido vacunado. Según un aspecto adicional, la presente invención se refiere por tanto a métodos para diagnosticar si un animal está infectado con un virus o si ha sido vacunado utilizando una vacuna de la presente invención, métodos que comprenden etapas, en los que el diagnóstico utiliza anticuerpos específicos para proteínas del virus de tipo natural no expresadas por la cepa de vacuna (es decir, 3a, 3b, 7 o E). La diferenciación de los animales vacunados contra TGEV de los animales infectados con TGEV puede llevarse a cabo alternativamente utilizando RT-PCR y marcadores de secuencia introducidos en el genoma de TGEV recombinante en las posiciones 6752, 18997, 20460, y 21369, que deben codificar para G, C, T y C, respectivamente.

35

40

La diferenciación entre animales vacunados y animales infectados con PRRSV de tipo natural puede llevarse a cabo utilizando anticuerpos específicos para proteínas no presentes en el virus recombinante.

45

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 representa los resultados de las mediciones de peso de cochinitos tras la inoculación *in vivo* con rTGEV que expresan Gp5 de PRRSV. Se inocularon los cochinitos con rTGEV que expresan Gp5 utilizando TRS_{3a} ($\Delta 3$ -TRS_{3a}-ORF5; símbolo cuadrado) o TRS_{22N} ($\Delta 3$ -TRS_{22N}-ORF5; símbolo triangular). Se midió el peso de los cochinitos a 1, 2, 3 y 4 semanas tras la exposición a PRRSV. Los cochinitos vacunados con virus recombinante que expresa Gp5 de PRRSV aumentan de peso corporal eficazmente (es decir, se desarrollan normalmente), mientras que los cochinitos vacunados con un control ("C-") muestran un desarrollo dañado con sólo aumento mínimo de peso corporal.

La figura 2 representa los resultados de un ensayo ELISA que detecta anticuerpos específicos para N de PRRSV (ORF7). Se recogieron muestras de suero de cochinitos infectados con rTGEV que expresan Gp5 de PRRSV (o bien $\Delta 3$ -TRS_{3a}-ORF5 o bien $\Delta 3$ -TRS_{22N}-ORF5) o cochinitos infectados con un vector de virus que no expresa ORF5 ni ORF6 (control no vacunado) a las 2, 3 y 4 semanas tras la exposición a PRRSV. No pudo detectarse ninguna o sólo cantidades minoritarias de anticuerpos frente a la proteína N de PRRSV en cochinitos vacunados tras la exposición de los cochinitos a PRRSV en comparación con el control no vacunado.

Por tanto, mientras que $\Delta 3$ -TRS_{3a}-ORF5 puede proporcionar protección completa frente a PRRSV, $\Delta 3$ -TRS_{22N}-ORF5 proporciona protección parcial frente a PRRSV. Por el contrario, los animales del grupo control no se protegieron frente a la infección por PRRSV.

La figura 3 representa los resultados del análisis por transferencia de tipo Northern de la estabilidad de los rTGEV que expresan Gp5 de PRRSV. Se sometieron a pases en cultivo tisular virus TGEV recombinantes que expresan Gp5 (utilizando o bien TRS_{3a} o bien TRS_{22N}). Se infectaron las células ST con el virus del pase 2 (p2) y 5 (p5). Tal como se observa en la figura, el virus de p2 expresaba ARNm de Gp5, mientras que el virus de p5 contiene deleciones y no expresaba ARNm de Gp5.

La figura 4 representa la estructura esquemática del ADNc que codifica para el pBAC-TGEV^{FL}-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T). Tal como se muestra, se clonaron los genes de PRRSV heterólogos ORF5 y ORF6 en el mismo vector viral de rTGEV.

La figura 5 representa la expresión de Gp5 (ORF5) de PRRSV en células ST infectadas con TGEV recombinante que expresa proteínas Gp5 y M de PRRSV (pBAC-TGEV^{FL}-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T)) tal como se evaluaron mediante análisis por inmunofluorescencia (se utilizaron anticuerpos específicos para la proteína N de TGEV para visualizar el virus (color rojo) y se utilizaron anticuerpos específicos para la proteína ORF5 (Gp5) de PRRSV para visualizar las células que expresan Gp5 (color verde)). Tras 20 pases en cultivo tisular (incluyendo las etapas de clonación), se recuperó el virus y se utilizó para la infección de células ST. Este análisis mostró que el 80% de las células infectadas expresaba Gp5, y que el 100% de estas células eran positivas para la proteína M (no mostrado en el gráfico). Este gráfico también muestra que el constructo dicistrónico ha mejorado la estabilidad *in vitro* y es estable incluso tras 20 pases en cultivo.

5 La figura 6 representa los resultados de un análisis FACS de las células infectadas de la figura 5. Se utilizaron anticuerpos específicos para la proteína N de TGEV para detectar el virus recombinante, mientras que se visualizaron las células que expresan Gp5 utilizando un anticuerpo polivalente específico para Gp5. Los datos muestran claramente que el 80% de las células infectadas con TGEV recombinante que expresa proteínas Gp5 y M de PRRSV (pBAC-TGEV^{FL}-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T)) sometidas a pase 20 veces en cultivo tisular (incluyendo las etapas de clonación) expresan Gp5 de PRRSV. Esto demuestra de nuevo la estabilidad mejorada *in vitro* del rTGEV recombinante que expresa proteínas Gp5 y M de PRRSV.

15 La figura 7 representa los resultados en un análisis de RT-PCR de la estabilidad del TGEV recombinante que expresa ORF5 y ORF6 (M) tras someterse a pase en células ST. El TGEV recombinante se sometió a pase 20 veces en cultivo tisular. Se clonó en placa el virus recuperado de las células de cultivo y se determinó la expresión de ARNm para seis clones (c1 a c6) mediante RT-PCR. Tal como se muestra en la figura, el 100% de los clones expresaron ARNm-ORF5 y ARNm-ORF6. Esto muestra que el genoma del TGEV recombinante que expresa ORF5 y ORF6 permanece estable tras 20 pases en cultivo celular.

20 La figura 8 representa los resultados de un análisis por inmunotransferencia de tipo Western para la detección de la expresión de proteína Gp5 de PRRSV (ORF5; transferencia de la izquierda) y proteína M (ORF6; transferencia de la derecha) en lisados celulares de células de testículo de cerdo infectadas con el virus recombinante rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T) (abreviado como rTGEV-S_{PTV}-ORFs5+6 en la figura) o un virus control (rTGEV-S_{PTV}-FL). Además, se utilizan varios controles en la inmunotransferencia de tipo Western (“simulado”: células de testículo de cerdo sin infección viral; “PRRSV”: virus PRRS purificado y concentrado de tipo natural; “MA104+PRRSV”: línea celular de riñón de mono verde africano infectada con virus PRRS de tipo natural). Pudo detectarse la proteína respectiva en lisados obtenidos de células infectadas con el virus recombinante rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T), células infectadas con el virus PRRSV y células infectadas con MA104+PRSSV) tal como se indica mediante las flechas.

35 La figura 9 representa los resultados de un análisis del crecimiento de TGEV recombinante que expresa Gp5 y M de PRRSV tras inoculación *in vivo*. El virus utilizado para este análisis contiene el gen S tal como se expone en SEC ID n°: 1 que proporciona tropismo intestinal y respiratorio. La figura representa la cinética de crecimiento del virus en células ST tras su recuperación del pulmón (símbolo circular) e intestino (símbolo cuadrado) de cochinitos vacunados. Se recogieron muestras de tejido 1, 2, 3 y 4 días tras la inoculación con TGEV recombinante que expresa proteínas Gp5 y M de PRRSV.

45 La figura 10 representa los resultados de un análisis adicional de la estabilidad del TGEV recombinante que expresa Gp5 y M de PRRSV (pBAC-TGEV^{FL}-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T)) tras administración *in vivo* del virus recuperado de los cerdos. Se utilizaron anticuerpos en un ensayo de inmunofluorescencia para detectar células ST positivas para Gp5 de PRRSV (color verde en el panel superior), M de PRRSV (color verde en el panel inferior) y N de TGEV (color rojo) infectadas con virus

recuperado del pulmón de cochinitos vacunados. Los resultados muestran que el rTGEV recombinante que expresa proteínas Gp5 y M de PRRSV es estable incluso tras inoculación *in vivo* y recuperación de animales vacunados. Los datos indican que el 80% de las células infectadas expresa proteína Gp5, y el 100% de las células infectadas también expresa proteína M.

La figura 11 representa el esquema seguido para la configuración de dos formulaciones de vacuna utilizando el virus recombinante rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T).

La figura 12 representa una tabla que representa los resultados de una evaluación de la replicación y propagación del virus recombinante rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T) en tejidos diana (pulmón) de cochinitos de dos días de edad inoculados con 2×10^7 ufp/ml por vía intranasal. Los resultados se obtuvieron mediante la titulación del virus e histopatología.

La figura 13 representa ejemplos de inmunohistoquímica realizados en secciones de tejido de pulmón obtenidas de cerdos del grupo #1 y #2, respectivamente, que muestran neumonía intersticial característica de la infección por coronavirus. Las secciones se caracterizan por el engrosamiento de las paredes alveolares debido a la infiltración de linfocitos y macrófagos y espacios alveolares llenos de infiltración mononuclear (linfocitos y macrófagos) y ocasionalmente de neutrófilos polimorfonucleares.

La figura 14 representa los resultados del ELISA de competición utilizado para detectar anticuerpos antigp5 específicos en animales vacunados con vacuna viva modificada en comparación con animales no vacunados.

Se utilizó la absorbancia en D0 PV para calcular el porcentaje de unión en cada suero utilizando un cálculo específico. Los menores porcentajes de unión representan mayores niveles de anticuerpos antigp5 en los sueros sometidos a prueba. Las diferencias en los valores de absorbancia y el % de unión de los mismos entre los animales del grupo vacunado y los animales del grupo no vacunado son estadísticamente relevantes (prueba de la t: valor de $p < 0,05$).

La figura 15 muestra los resultados de un ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa específico (IPMA) realizado para la detección de PRRSV en macrófagos de pulmón alveolares porcinos infectados con las muestras de suero obtenidas de cerdos vacunados y control.

La figura 16 muestra los resultados de la detección de antígenos antiTGEV (imagen A) y antiPRSSV (imagen B) mediante ELISA indirecto presentados como absorbancia del sustrato cromogénico. "Vac." designa sueros de animales vacunados, "Ctrl." designa sueros de animales control no vacunados, "CP" y "CN" designa controles positivos y negativos, respectivamente. Los sueros de animales vacunados y control se diluyeron 60 veces.

La figura 17 representa el porcentaje de animales que presentan una respuesta inmunológica positiva contra TGEV y PRSSV utilizando una dilución de 1:60. El panel

A es una tabla que resume los resultados, mientras que los gráficos muestran los porcentajes de animales positivos en forma gráfica (gráfica B para anticuerpo antiTGEV y gráfica C para anticuerpo antiPRRSV). “Vac.” designa sueros de animales vacunados, “Ctrl.” designa sueros de animales control no vacunados.

5
10
La figura 18 muestra los resultados del ELISA de competición utilizado para detectar anticuerpos antigp5 específicos en animales vacunados con vacuna inactivada en comparación con animales no vacunados. Se utilizó la absorbancia en D0 PV para calcular el porcentaje de unión en cada suero utilizando un cálculo específico. Los menores porcentajes de unión representan mayores niveles de anticuerpos antigp5 en los sueros sometidos a prueba. Las diferencias en los valores de absorbancia y el % de unión de los mismos entre animales del grupo vacunado y animales del grupo no vacunado son estadísticamente relevantes (prueba de la t: valor de $p < 0,05$).

15
La figura 19 muestra los resultados de una RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) utilizada para la cuantificación de los títulos de PRRSV en muestras de suero obtenidas de animales vacunados y no vacunados.

20
La figura 20 muestra la estructura esquemática del ADNc que codifica para una proteína de fusión ORF5-LIMP-II y su efecto sobre la presentación de antígenos por la célula infectada.

25
La figura 21 muestra la estructura esquemática del ADNc que codifica para una proteína de fusión Ub-ORF5 y su efecto sobre la presentación de antígenos por la célula infectada.

30
35
La figura 22 muestra la construcción de TGEV recombinantes con proteínas S quiméricas. La figura representa las diferencias entre las regiones de la secuencia en 5' de los genes S entre los aislados de TGEV parentales TGEV-PUR46-PTV y TGEV-PUR46-C11 (véase el recuadro superior en el lado izquierdo). Los nucleótidos resaltados en la figura reflejan las diferencias entre estas dos secuencias, mientras que el recuadro vertical claro representa una delección de tres nucleótidos. Las posiciones de los nucleótidos se indican por los números en la parte superior de las figuras. La figura representa además la secuencia de varios mutantes del gen S en comparación con la del aislado de TGEV parental TGEV-PUR46-PTV. En la figura también se indica el título de cada virus recombinante *in vivo* en el intestino y en el pulmón de cochinitos recién nacidos infectados.

40
45
La figura 23 muestra la cinética de crecimiento de los TGEV parentales y el TGEV-PUR46-S7.1 recombinante. Se determinó el crecimiento de estos virus tras la inoculación de cochinitos recién nacidos de tres días de edad con 3×10^8 ufp por cochinito. Se sacrificaron los animales en los días indicados y se determinaron los títulos de virus por gramo de tejido mediante titulación en placa en células ST. (■), virus en los pulmones; (●), virus en el intestino. Los valores indicados corresponden a valores medios de tres experimentos independientes.

Los ejemplos siguientes ilustran la construcción y la utilización de los ácidos nucleicos según la invención.

EJEMPLO 1**Crecimiento de células eucariotas**

5 Se realizaron el crecimiento, la titulación y la purificación de TGEV en células ST (testículo de cerdo), una línea celular obtenida a partir de células epiteliales de testículos de cerdo fetal (McCLURKIN y NORMAN, 1966). Se obtuvieron células ST de L. KEMENY (National Animal Disease Centre, Ames, Iowa, EE.UU.).

10 Se realizaron ensayos de transfección de plásmidos en células de riñón de hámster neonato (BHK-21) transformadas de manera estable con el gen que codifica para la aminopeptidasa N porcina (BHK-pAPN) (LAUDE *et al.*, 1990). Se cultivaron células ST en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 10% (GIBCO-BRL), gentamicina 50 mg/ml, glutamina 2 mM y aminoácidos no esenciales al 1%.

20 Se hicieron crecer las BHK-21 transformadas de manera estable con el gen que codifica para la aminopeptidasa N porcina (BHK-pAPN) en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 2% (GIBCO-BRL), gentamicina 50 mg/ml, glutamina 2 mM y aminoácidos no esenciales al 1% y geneticina (G418) (1,5 mg/ml) como agente de selección.

EJEMPLO 2

25

Transformación de bacterias mediante electroporación de plásmidosCepas bacterianas:

30 *Escherichia coli* DH10B (Gibco/BRL) (HANAHAN *et al.*, 1991) fue el huésped para todos los plásmidos construidos. El genotipo de esta cepa bacteriana es: F⁺mcr A Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 (*ara, leu*) 7697 galU galK λ⁻ rspL nupG.

35 Preparación de bacterias competentes para la electroporación:

40 Para la amplificación y producción de bacterias *E. coli* DH10B competentes para la electroporación, se hicieron crecer las bacterias en un medio SOB. Se inocularon 10 ml de medio SOB (triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0,5 g/l) con una colonia a partir de una placa nueva y se incubaron durante 12 h a 37°C con agitación. Con 2 ml de este cultivo, se inoculó 1 l de medio SOB, y se hizo crecer el cultivo a 37°C hasta una densidad óptica de 600 nm entre 0,8 y 0,9 unidades de absorbancia. Entonces, se enfrió el cultivo en hielo durante 20 min., y se centrifugaron las bacterias en el rotor Sorvall GSA a 4.000 X g durante 15 min. a 4°C. Se resuspendieron las bacterias en 1 l de glicerol al 10% frío. Se centrifugó de nuevo la suspensión de bacterias y se resuspendió en 500 ml de glicerol al 10% frío. Se sedimentaron las bacterias y se resuspendieron en 250 ml de glicerol al 10% frío. Finalmente, se centrifugaron las bacterias y se resuspendieron en 3 ml de glicerol al 10%. Se dividió la suspensión final en alícuotas de 50 μl y 100 μl y se mantuvieron a -70°C hasta que se utilizaron para su electroporación. Se calculó la eficacia

de transformación de las bacterias mediante electroporación con una concentración conocida de un plásmido pBluescript como referencia, y se encontró que podía reproducirse a aproximadamente 10^9 colonias/ μg de ADN.

5 Transformación de bacterias mediante electroporación de plásmidos:

Se mezclaron 50 μl de bacterias competentes para la transformación con 1 μl de cada mezcla de reacción, o se añadieron 10 ng de plásmido purificado a las bacterias y se incubaron en hielo durante 1 min. Entonces, se transfirió la mezcla a placas para electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) y se transformaron mediante un pulso eléctrico de 2,5 kV, 25 μF y 200 Ω en un electroporador "Gene Pulser" (Bio-Rad). Tras añadir 1 ml de medio LB frío, se incubaron las bacterias a 37°C con agitación durante 1 h. Se sembraron entre 50 y 100 μl de la suspensión de bacterias transformadas en placas de Petri con LB (medio Luria-Bertani) en un medio sólido (agar 15 g/l) complementado con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) o cloranfenicol (34 $\mu\text{g/ml}$). Las bacterias crecieron durante 16 h a 37°C (BULLOCK *et al.*, 1987).

Para la producción y purificación de plásmidos, se hicieron crecer las bacterias transformadas con plásmidos que conferían resistencia a ampicilina o cloranfenicol a partir de una colonia aislada en una placa en medio LB líquido complementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina o 34 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol.

25 **EJEMPLO 3**

30 **Plásmidos para clonar productos de PCR**

Se utilizó el plásmido pGEM-T (Promega) para clonar productos de PCR. Este plásmido contiene los promotores de los bacteriófagos T7 y SP6 separados por el gen LacZ, interrumpidos por dos secuencias de T protuberantes entre secuencias de clonación múltiple. Este plásmido confiere resistencia a ampicilina para su selección.

35 **EJEMPLO 4**

40 **Manipulación de ADN**

Clonación y enzimas de restricción:

Para la manipulación y clonación de ADN, se adquirieron las enzimas de restricción BamHI, Bbs I, Bsp I, Eco RI, Mlu I, Swa I, Xcm I, Xho I de Roche o de New England Biolabs. Se realizó la desfosforilación de los extremos terminales de ADN con fosfatasa alcalina de camarón (SAP) (USB). Se utilizó una ADN ligasa tal como ADN ligasa de fago T4 (New England Biolabs). Se llevaron a cabo todos los tratamientos con enzimas de restricción, desfosforilación y ligación de ADN utilizando protocolos convencionales descritos anteriormente (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Para amplificar ADN a partir de un molde, frecuentemente plásmidos, se mezclaron 50-100 ng de plásmido de ADN con los correspondientes oligonucleótidos (10 μ M), desoxinucleótidos trifosfato (ATP, GTP, TTP y CTP) 0,25 mM, $MgCl_2$ 1,25 mM, tampón para PCR (Tris-HCl, 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM) y 2,5 U de ADN polimerasa Taq Gold (*Thermus aquaticus*) (Roche) en un volumen final de 50 μ l. Se llevaron a cabo las reacciones en el termociclador GeneAmp PCR System 9600 de Perkin Elmer.

Separación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa:

Para separar fragmentos de ADN, se utilizaron geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (1 μ g/ml) en un tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM).

Purificación de ADN:

Se purificaron los plásmidos bacterianos que se hicieron crecer en presencia de los antibióticos de selección utilizando o bien el “kit Qiaprep Spin Miniprep” (Qiagen) para preparar cantidades pequeñas de ADN de plásmido, o bien el sistema “kit Qiafilter Midi-Plasmid” (Qiagen) para preparar cantidades medias de ADN de plásmido. Se purificó el ADN obtenido a partir de geles de agarosa utilizando el sistema “kit de extracción en gel QiaEx II” (Qiagen). Se llevó a cabo la purificación de los productos de PCR por medio del sistema “kit de purificación de PCR QIA quick” (Qiagen). En todos los casos, se siguieron las instrucciones del fabricante.

EJEMPLO 5**Análisis de ARN**

Para el análisis del ARN producido en infecciones con el clon de TGEV PUR46-MAD, se infectaron monocapas confluentes de células ST (testículo de cerdo) que se hicieron crecer en placas de cultivo de 60 mm de diámetro (NUNC) con inóculos virales a una MOI [multiplicidad de infección] de 1. Se lisaron las células a 16 hpi [horas tras la infección] utilizando un “kit RNeasy Mini” (Qiagen), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (Qiagen). Se purificó el ARN y se resuspendió en 40 μ l de agua tratada con DEPC [pirocarbonato de dietilo] y 20 U de inhibidor de ARNasa (Roche).

EJEMPLO 6**Transfección y recuperación de TGEV infeccioso a partir de clones de ADNc**

Se hicieron crecer células BHK-pAPN (DELMAS, 1994) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 2% y que contenía geneticina (G418) (1,5 mg/ml) como agente de selección. Se hicieron crecer células BHK-pAPN hasta una confluencia del 60% en placas de 35 mm de diámetro y se transfectaron con 10 μ g o 4 μ g de plásmido pBAC-TGEV^{FL}-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T) con 15 μ l o 12 μ l de lipofectina (GIBCO Life Technologies) o lipofectamina

2000 (Invitrogen) según las especificaciones del fabricante. Se incubaron las células a 37°C, CO₂ al 5% y tras 6 h se reemplazó el medio de transfección por DMEM nuevo que contenía FCS al 5% (vol/vol). Dos días después (denominado pase 0), se recogieron los sobrenadantes celulares y se pasaron cuatro veces en monocapa de ST nueva para aumentar el título de rTGEV. Se determinaron los títulos de virus mediante titulación en placa.

Alternativamente, se hicieron crecer células ST en frascos de cultivo de 25 cm² utilizando DMEM (medio esencial mínimo de Dulbecco), FCS al 10% a una confluencia del 90% y se infectaron a una MOI [multiplicidad de infección] de 1 unidad formadora de placas [ufp] por célula. Se recuperó el sobrenadante tras 48 horas y se tituló mediante dilución límite en placa.

Titulación en placa:

Se realizó la titulación de disoluciones madre virales mediante el ensayo de dilución límite en placa en células ST para cuantificar el número de partículas infectivas. Se hicieron crecer células ST en una placa de cultivo de 24 pocillos múltiples a una confluencia del 90%. Se diluyeron en serie virus TGEV recombinantes 10 veces (10E-1, 10E-2, 10E-3; 10E-4, 16E-5, 10E-6, etc.). Se añadieron las diferentes diluciones de virus a cada pocillo de la placa de 24 pocillos y se incubaron durante 1 hora a 37°C, CO₂ al 5%. Tras esa hora, se retiró el sobrenadante que contenía el virus de la monocapa de ST y rápidamente se añadió un agar de recubrimiento sobre la monocapa. Se preparó el agar de recubrimiento utilizando 1 parte de DMEM 2X (medio esencial mínimo de Dulbecco) y 1 parte de agar purificado al 1% en ddH₂O. Tras recubrir las células, se mantuvo la placa de múltiples pocillos durante 15 minutos a temperatura ambiente para solidificar la agarosa y entonces se colocó en un incubador controlado durante 48 horas a 37°C, CO₂ al 5%.

Con el fin de contar las placas virales, se fijaron las monocapas de células ST infectadas con formol al 10% y se tiñeron con violeta cristal, al 0,1%, durante 30 minutos. Se lavó el pocillo con agua destilada y se secó a temperatura ambiente antes de contar finalmente las placas para determinar el título de virus.

Se analizó la expresión de proteínas de TGEV y PRRSV mediante técnicas de inmunofluorescencia convencionales.

EJEMPLO 7

Generación de rTGEV

El virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV) utilizado en la presente memoria pertenece al grupo de aislados de Purdue y se obtuvo en Indiana en 1946 (DOYLE y HUTCHINGS, 1946). Se adaptó el virus para que creciera en cultivos celulares (HAELTERMAN y PENSAERT, 1967) y se proporcionó por E.H. BOHL (Ohio State University, Wooster Ohio). Se ha pasado este aislado de TGEV en células ST 115 veces, y se ha clonado cinco veces consecutivamente en el laboratorio del Dr. Luis Enjuanes (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España). Se marcó el clon seleccionado

PUR46-CC120-MAD, abreviado PUR46-MAD. Es un virus atenuado que crece bien en cultivos celulares, y alcanza títulos entre 10^8 y 10^9 UFP/ml.

Se generaron virus rTGEV a partir de constructos de pBAC-TGEV que contenían el gen S de la cepa de TGEV virulenta PUR-C11 (S_{C11}) tal como se describió (ALAMAZAN *et al.*, 2000; GONZALEZ *et al.*, 2002). Se derivaron los virus que contenían el gen S (que codifica para la proteína de espiga de TGEV) de la cepa atenuada PTV (S_{PTV}) a partir de los vectores pBAC-TGEV correspondientes portadores de S_{C11} reemplazando este gen por S_{PTV} de la cepa respiratoria.

EJEMPLO 8

Construcción de un vector de TGEV recombinante que expresa la proteína Gp5 y M de PRRSV

Con el fin de aumentar la capacidad de clonación del genoma individual de TGEV, se eliminaron los genes no esenciales ORF3a y ORF3b del clon de ADNc de longitud completa, creándose una deleción en el genoma de TGEV. Se insertaron los genes heterólogos ORF5 y ORF6 que codificaban para las proteínas Gp5 y M de PRRSV en el constructo de ADNc reemplazando los ORF 3a y 3b de TGEV delecionados.

Se clonó el ORF5 (606 nt) (SEC ID n°: 2) en constructos de ADNc reemplazando los genes 3a y 3b de TGEV. Se amplificó el gen mediante PCR utilizando los oligonucleótidos PpuMI-ORF5 VS (5'-AACAGGTCCTACCA-TGAGATGTTCT-CACAAATTGGGG-3') (SEC ID n°: 4) y B1p-ORF5 RS mut (5'-CCGCTAAGCCTAGGCTTCCCATTGCT-CAGCCGAAGTCC-3') (SEC ID n°: 5). Se digirió el producto de PCR con PpuMI y B1pI y se clonó en los mismos sitios de restricción del plásmido pSL-TGEV-AvrII, que comprende los nt 22965 a 25865 del genoma de TGEV incluyendo la deleción de 3a y 3b, generando el plásmido pSL-AvrII- Δ 3-PpuMI-ORF5. Para obtener los ADNc infecciosos, se digirió este plásmido con AvrII y se clonó el inserto que contenía ORF5 en el mismo sitio de restricción de pBAC- S_{C11} o pBAC- S_{PTV} (PacI/M1uI) para obtener vectores con tropismo intestinal y respiratorio, respectivamente. Se han notificado anteriormente las secuencias de plásmidos pBAC y del clon de ADNc de TGEV infeccioso (documento WO01/39797).

Se amplificó ORF6 procedente de la cepa Olot91 de PRRSV (SEC ID n°: 3) mediante PCR de solapamiento para introducir una mutación silenciosa eliminando un sitio de restricción AvrII debido a restricciones de clonación, teniendo en cuenta la utilización del codón de *Sus scrofa*. En una primera PCR, se utilizaron los oligonucleótidos B1pIORF6 VS (5'-CGGCTGAGCAATGGGAAGCCTAGAAAATTAT-TACATATGG-TATAACTAAACAAAATGGGAAGCCTAGACGATTTTTG-3') (SEC ID n°:6), siendo la secuencia subrayada el TRS_{22N}, y ORF6-C306T-RS (5'-GCCGGCCTAGACAACACAATC-3') (SEC ID n°: 7). Utilizando un procedimiento similar, en una segunda PCR se utilizaron los oligonucleótidos ORF6-C306T-VS (5'-GATTGTGTTGICTAGGCCGGC-3') (SEC ID n°: 8) y B1pIORF6rs nuevo (5'-GCTAAGCTTACCGCCATACTTGACGAGG-3') (SEC ID n°: 9). Utilizando estos productos de PCR y los oligonucleótidos B1pIORF6 VS y B1pIORF6rs nuevo, se obtuvo el producto final (574 nt). Se digirió este producto de PCR con B1pI y se clonó en el mismo sitio de restricción de pSL-AvrII- Δ 3-PpuMI-ORF5, generando el

plásmido pSL-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T). Para obtener el pBAC-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T) de ADNc infeccioso, se digirió el plásmido pSL-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T) con *AvrII* y se clonó el inserto que contenía ORF5 y ORF6 en los mismos sitios de restricción de pBAC-S_{PTV}(*PacI*/*MluI*) (figura 4). Se utilizó el mismo procedimiento de clonación para obtener el ADNc que codificaba para el TGEV con tropismo intestinal (adaptado para crecer en cultivo celular) que expresaba Gp5 y M de PRRSV.

Se rescató el virus recombinante con tropismo respiratorio, rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T), y se clonó en placa tres veces. Se confirmó la presencia de los ARNm para ORF5 y ORF6 mediante RT-PCR. Se seleccionó un clon de expresión y, tras dos pases en cultivo celular, se detectó el ARNm de ORF5 y ORF6, respectivamente, indicando que el virus era estable. No obstante, para mejorar los niveles de expresión adaptando el virus recombinante para que crezca en células ST, se realizaron dos etapas más de clonación en placa. Se evaluó la expresión de Gp5 por los clones virales mediante inmunofluorescencia (véase la figura 5) y se cuantificó la cantidad de células infectadas que expresaban Gp5. El virus seleccionado (rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T)) expresaba altas cantidades de Gp5 en el 80% de las células de testículo de cerdo (ST) infectadas tal como se evaluó mediante citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS).

EJEMPLO 9

Estudios *in vitro* para caracterizar el virus de TGEV rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T)

Para caracterizar el virus de TGEV recombinante rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T), se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y análisis de inmunotransferencia de tipo Western con el fin de detectar la expresión de las diferentes proteínas gp5 y M de PRRSV por el vector viral.

Ensayos de inmunofluorescencia

Se hicieron crecer células ST hasta una confluencia del 30% en cámaras de 8 ó 12 pocillos. Se infectaron las células a una MOI de 5 ufp/célula a 37°C en MEME (medio esencial mínimo de Earle) que contenía suero FetalClone III al 2% (adquirido de Hyclone). Ocho horas tras la infección, se extrajo el inóculo y entonces se lavaron las células con PBS y se fijaron mediante adición de paraformaldehído al 4% durante 30 min. a TA. Para un doble marcaje en el que un anticuerpo primario se derivó de ratón y el otro de conejo, se combinaron los anticuerpos primarios en un diluyente que contenía PBS-SFB al 20%/saponina al 0,2%. Se permitió que los anticuerpos se adsorbieran durante 90 min. a TA y entonces se lavaron las células tres veces con PBS. Después, se incubaron las células durante 30 min. a temperatura ambiente con una dilución 1:1.000 de anticuerpos secundarios antirratón y anticonejo conjugados con rodamina y fluoresceína. Se lavaron las cámaras de la placa cinco veces con PBS, se montaron y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia.

Análisis por inmunotransferencia de tipo Western

Se hicieron crecer células ST hasta una confluencia del 100% en frascos de cultivo tisular de 12,5 cm². Se infectaron las células a una MOI de 5 a 37°C en MEME (medio esencial mínimo de Earle) que contenía suero FetalClone III al 2% (Hyclone) durante 8 horas. Se rompieron las células con tampón de carga de muestra 1 X. Se analizaron los lisados celulares mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida con un gradiente del 12,5% (SDS-PAGE). Se transfirieron las proteínas separadas sobre una membrana de PDVF utilizando SDS al 0,02% (100 V; límite de amp. 0,30; tiempo 1:30 horas). Tras la transferencia, se bloquearon las membranas de PDVF con PBS:leche al 5% durante 2 horas a TA y entonces se incubaron durante la noche a 4°C con una dilución 1:100 de anticuerpo policlonal específico para la proteína Gp5 de PRRSV (8676) o una dilución 1:50 de un anticuerpo policlonal específico para la proteína M de PRRSV (7718). Tras esta incubación, se lavaron las membranas de PDVF tres veces con PBS:leche al 5%:Tween-20 al 0,05%. Entonces se incubaron las membranas de PDVF con anticuerpo de cabra anticonejo conjugado con peroxidasa durante 1 hora y se lavaron después cinco veces con PBS:leche al 5%:Tween-20 al 0,05%. Se detectaron los anticuerpos unidos con sustrato para HRP quimioluminiscente de tipo Western Inmobilon (Millipore). Los resultados se muestran en la figura 8.

Se detectaron proteínas gp5 y M de PRRSV en lisados obtenidos a partir de células ST infectadas con el virus recombinante o células MA104 infectadas con virus de tipo natural de PRRS. También se utilizaron las células MA104 como control, porque este sistema está más relacionado con el modelo de infección en cultivo celular, es decir células ST infectadas con virus rTGEV-ORF5-ORF6.

El virus TGEV recombinante rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORS5-TRS_{22N}-ORF6_(C306T) es estable tras haberse pasado 20 veces en cultivo tisular y también tras el rescate de cochinitos infectados (véanse las figuras 5 y 6). Tras 20 pases en cultivo tisular, el virus todavía expresa los genes ORF5 y ORF6 de PRRSV (véase la figura 7).

EJEMPLO 10**Producción de una vacuna viva modificada (MLV)**

Partiendo de un virus de semilla maestra de rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6, se produjo la vacuna viva modificada que contenía el sobrenadante de células de testículo de cerdo (ST) infectadas con el rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 recombinante que expresaba las proteínas gp5 y M de PRRSV recombinantes como se expone a continuación (véase también la figura 11):

se obtuvo el virus rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 a partir de la infección de diez placas de cultivo de 100 cm² de células ST con el virus de semilla maestra a una alta MOI [multiplicidad de infección] de 1. Se recuperaron los sobrenadantes, se centrifugaron y se congelaron a -80°C (± 10°C). Se tituló el virus recombinante obtenido. Se ha diluido 1:10 el virus recombinante obtenido a partir de los sobrenadantes con medio de cultivo DMEM hasta obtener una dosis final de ~1 X 10⁷ UFP/ml.

Se ha evaluado esta formulación de vacuna designada MLV en experimentos *in vivo* adicionales (véanse los ejemplos 12 y 13).

5

EJEMPLO 11

Producción de una vacuna inactivada (de organismos destruidos)

10 Se produjo la vacuna inactivada que contenía extractos de células de testículo de cerdo (ST) lisadas infectadas con el rTGEV-S_{P_{TV}}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 recombinante que expresaba las proteínas gp5 y M de PRRSV recombinantes como se expone a continuación (véase también la figura 11):

15 se obtuvo el antígeno de rTGEV-S_{P_{TV}}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 a partir de la infección de diez placas de cultivo de 100 cm² de células ST con el virus de semilla maestra a una alta MOI [multiplicidad de infección] de 3. Se recuperaron las células, se lavaron con tampón fosfato de sodio (PBS) y se sedimentaron. Se congeló el sedimento celular a -80°C (± 10°C). Considerando que aproximadamente el 70% de las células ST infectadas están produciendo proteínas recombinantes gp5 y M, se resuspendió el sedimento en bicarbonato de sodio, pH 8,3, a una concentración de 3,9 X 10⁶ células productoras infectadas/ml. Se lisaron las células y se centrifugó el extracto celular 30 min. a 15000 X g y 4°C.

25 Se inactivaron los sobrenadantes mediante etilenimina binaria (BEI) a una concentración final del 5% durante 72 h con agitación continua a 37°C.

30 Se diluyó 1:3 el antígeno inactivado con vacuna inactivada de circovirus porcino (PCV) de tipo1-tipo2 (FENAUX *et al.*, 2003; FENAUX *et al.*, 2004) adyuvada previamente con sulfolipo al 20%-ciclodextrina (SLCD; obtenido de Fort Dodge, Iowa, EE.UU.) tal como se expone a continuación: se mezclaron 32 ml de antígeno inactivado de ST-rTGEV-S_{P_{TV}}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 con 3,7 X 10⁶ células productoras infectadas/ml con 64 ml de vacuna de PCV de tipo1-tipo2. Se agitó la mezcla durante 3,25 h a TA.

35 Se ha evaluado esta formulación (inactivada) de vacuna en un experimento *in vivo* (véase el ejemplo 14).

EJEMPLO 12

40

Evaluación de la patogenicidad *in vivo* en cochinitos del virus recombinante rTGEV-S_{P_{TV}}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 que expresa dos proteínas de PRRSV heterólogas

45 Se realizó esta evaluación para evaluar la replicación y propagación de rTGEV-S_{P_{TV}}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 en tejidos diana (intestino y pulmón) *in vivo* mediante titulación de virus y mediante inmunohistoquímica así como se evaluó la expresión de las proteínas de PRRSV heterólogas (Gp5 y M) y el genoma de TGEV en estos tejidos mediante inmunohistoquímica. Se realizó adicionalmente la evaluación para confirmar que

rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 se replica en pulmones de cochinitos de dos días de edad inoculados con 2×10^7 ufp/ml por vía intranasal. También se evalúan los títulos de virus en lesiones histopatológicas y de pulmón.

5 Se seleccionaron 17 cochinitos de dos días de edad, híbridos de Large White y Landrace belga, libres de anticuerpos frente a TGEV y PRRSV, y se dividieron en tres grupos. Se inocularon los cerdos del grupo #1 (7 animales) con 2×10^7 ufp/ml del virus control rTGEV-S_{PTV}-FL, se inocularon los cerdos del grupo n.º 2 (7 animales) con 2×10^7 ufp/ml del virus recombinante rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6, mientras que los
10 cerdos del grupo # 3 (3 animales) representan el grupo control.

Tras la inoculación en el día 0, se sacrificaron los animales de cada grupo y se realizó la autopsia tal como se muestra en la tabla 1.

15

Tabla 1

Grupo	Número de cerdos	D0 + 1d	D0 + 2d	D0 + 3d	Do + 4d
#1	7	1	2	2	2
#2	7	1	2	2	2
#3	3	--	--	--	3

20 En los días 1, 2, 3 y 4 tras la inoculación, se han sacrificado los cerdos de los grupos #1 y #2, mientras que se han sacrificado los cerdos del grupo #3 sólo en el día 4 tras la inoculación.

25 Tras la autopsia, se examinaron macroscópicamente secciones de pulmón. Se describieron el tipo y la magnitud de las lesiones de pulmón y se evaluaron siguiendo el sistema de puntuación descrito por HANNAN *et al.*, 1982. La denominada puntuación de neumonía de las lesiones de pulmón se presenta en la figura 12.

30 Se homogenizaron muestras de tejido de los pulmones de estos animales con PBS con el fin de determinar el título del virus recombinante en el tejido diana (pulmón). Se titularon los virus recuperados de los tejidos de pulmón en monocapas de células ST como unidades formadoras de placas (ufp/ml).

35 También se colocaron muestras de tejido en formaldehído (formalina tamponada al 10%) para estudios histopatológicos. Se distribuyeron muestras de tejido de 2-3 mm en casetes de plástico, se deshidrataron en series de alcohol graduado y se incrustaron en parafina utilizando un sistema de procesador de tejidos automático (Cytadel). Se prepararon bloques de tejido y se cortaron secciones de 4-5 μ m de estos bloques utilizando un microtomo automático (Finesse). Se tiñeron las secciones con hematoxilina-eosina utilizando un equipo de tinción automático (Linistain GLX).

40 Se tomaron secciones incrustadas en parafina adicionales en portaobjetos silanizados y se prepararon para una técnica de inmunohistoquímica (IHC) para detectar antígenos de TGEV y PRRSV expresados por el virus recombinante. Se calentaron las secciones hasta 60°C durante 10 minutos hasta que se funde la parafina. Entonces se

5 sumergieron las muestras dos veces en xilol durante 10 minutos y dos veces en etanol absoluto durante 10 minutos. Tras sumergir las muestras en una disolución para la inhibición de peroxidasa endógena (metanol + peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% (v/v)) durante 30 minutos en la oscuridad, se lavaron las muestras tres veces en tampón Tris-solución salina (TBS) (0,05 M), antes de sumergir las muestras durante 15 minutos en una disolución de citrato de sodio calentada previamente en el horno de microondas, seguido por lavado de las muestras tres veces en tampón Tris-solución salina (TBS) (0,05 M). Después, se sumergieron las muestras en disolución de TBS (0,05 M)-BSA durante 10 minutos para bloquear la unión no específica. Antes de añadir el anticuerpo primario, se añadieron dos gotas de disolución de avidina (Vector Laboratories, kit de bloqueo) a las muestras seguido por incubación durante 15 minutos, seguido por la adición de dos gotas de disolución de biotina (Vector Laboratories, kit de bloqueo) e incubación durante 15 minutos. Entonces se sumergieron las muestras en la disolución de anticuerpo primario anticuerpo monoclonal 3BB3 frente a la proteína M de TGEV (dilución 1/100) y se incubaron durante la noche a 4°C. Se lavaron las muestras tres veces en tampón Tris-solución salina (TBS) (0,05 M) y entonces se sumergieron durante 1 hora en la disolución de anticuerpo secundario IgG antirratón (Vector Laboratories, kit Vectastain ABC) (dilución 1/100). Tras lavar las muestras tres veces en tampón Tris-solución salina (TBS) (0,05 M), se sumergieron en disolución de avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories, kit Vectastain ABC) durante 1 hora, de nuevo seguido por 3 lavados en tampón Tris-solución salina (TBS) (0,05 M). Tras sumergir las muestras en disolución de DAB (3,3'-diaminobencidina, SIGMA) durante 7 minutos, lavar las muestras tres veces en tampón Tris-solución salina (TBS) (0,05 M), se sumergieron en H₂O destilada durante 10 minutos. Entonces se tiñeron las muestras con hematoxilina durante 1-2 minutos, se sumergieron en H₂O destilada durante 10 minutos, se sumergieron en etanol al 96% durante 5 minutos, se sumergieron en etanol al 100% durante 5 minutos y finalmente se sumergieron en xilol durante 5 minutos. Antes de evaluar las muestras con un microscopio óptico, se prepararon las muestras con medio de montaje hidrófobo y cubreobjetos.

30 La detección de la proteína S del vector de TGEV en las muestras de cerdos de los grupos #1 y #2 tal como se confirmó mediante inmunohistoquímica muestra que el virus recombinante se replica en el pulmón de los cerdos tras la vacunación por vía intranasal (véase la figura 12). Los títulos de virus detectados en las muestras de pulmón y lesiones histopatológicas encontradas en las secciones de tejido confirman estos resultados. La neumonía intersticial detectada mediante examen histopatológico puede estar asociada con la infección viral y es una lesión característica de una infección por coronavirus (ejemplos de inmunohistoquímica de secciones de tejido de un cerdo del grupo #1 y #2 se representan en la figura 13).

40 La detección simultánea del antígeno de TGEV mediante inmunohistoquímica y altos títulos de virus recombinante mediante titulación de virus confirma la replicación del virus recombinante en el pulmón.

45 Además, debido a la estabilidad mejorada del virus TGEV recombinante puede recuperarse de tejidos de pulmón e intestino de cochinitos vacunados. El virus rescatado de estos tejidos puede propagarse adicionalmente en cultivos de células ST (véase la figura 9) y las células ST infectadas con el virus rescatado expresan tanto Gp5 (aproximadamente el 80% de las células infectadas) y M (aproximadamente el 100% de las células infectadas; véase la figura 10).

EJEMPLO 13

Evaluación de la eficacia de la vacuna viva modificada de rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 en cerdos contra la exposición a la cepa Olot/91 de PRRSV de aislado de campo

Se realizó esta evaluación para evaluar la eficacia del rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 que expresaba diferentes proteínas de PRRSV heterólogas como vacuna viva modificada (MLV) en la prevención de enfermedad respiratoria y reproductiva en cochinitos de una semana de edad inoculados por vía intranasal y entonces expuestos a la cepa Olot/91 de PRRSV de aislado de campo. Se evaluó la eficacia de la vacuna mediante la producción de anticuerpos en suero (se valoró mediante ELISA, IPMA y neutralización en suero).

Se seleccionaron 39 cochinitos de una semana de edad, seronegativos o con bajos títulos de anticuerpo con respecto a TGEV y PRRSV, y se dividieron en tres grupos. Se vacunaron los cerdos del grupo #1 (17 animales) con el virus control rTGEV-S_{PTV}-FL, se vacunaron los cerdos del grupo #2 (17 animales) con el virus recombinante rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6, mientras que los cerdos del grupo #3 (5 animales) representan el grupo control.

Se realizó la vacunación de los cerdos siguiendo el diseño experimental mostrado en la tabla 2, representando "D₀" el primer día de vacunación de los cerdos de una semana de edad.

Tabla 2

Grupo	Número de cerdos	1ª vacunación (D ₀)	2ª vacunación (D ₀ +3s)	Exposición (D ₀ +6s)
#1	15	rTGEV-S _{PTV} -FL	rTGEV-S _{PTV} -FL	PRRSV
#2	15	rTGEV-S _{PTV} -TRS _{3a} -ORF5-TRS _{22N} -ORF6	rTGEV-S _{PTV} -TRS _{3a} -ORF5-TRS _{22N} -ORF6	PRRSV
#3	5	---	---	---

Se vacunan los cerdos con 0,5 ml de suspensión viral en cada orificio nasal para obtener un volumen total de 1 ml/cochinito en cada vacunación por vía intranasal dos veces, teniendo lugar la primera vacunación a una semana de edad y teniendo lugar la segunda vacunación (revacunación) a las 4 semanas de edad. Se eligió la vía intranasal con el fin de potenciar la replicación y propagación en los tejidos diana (pulmón) del virus recombinante en los cerdos inoculados. Se asignaron aleatoriamente los cerdos a cada grupo de tratamiento. Se expusieron todos los cerdos diez semanas tras la primera vacunación, teniendo los cerdos 11 semanas de edad en el momento de la exposición. Se inocularon los cerdos con la cepa española de PRRSV (Olot/91) a 10^{4,7}-10^{4,8} TCID₅₀/cerdo por vía intranasal. Se llevó a cabo la inoculación en posición erguida sin sedación y utilizando una jeringuilla de 10 ml. Se dividió el inóculo en dos partes iguales, una para cada orificio nasal. Se seleccionó la vía intranasal, porque se considera que es la vía natural de infección.

Tras la vacunación y tras la exposición, se observaron los cerdos diariamente para detectar signos clínicos para comprobar la seguridad de la vacuna. Tras la observación de cualquier anomalía, se llevó a cabo un examen clínico completo por el investigador principal.

Se extrajeron muestras de sangre en los D0, D21 y D28 PI en tubos para obtener suero para la determinación de títulos serológicos y para estudiar la respuesta inmunitaria frente a TGEV y PRRSV.

Se evaluó el efecto de la exposición a PRRSV midiendo la presencia de anticuerpos antigp5 específicos utilizando el ELISA de competición INGEZIM PRRS gp5 Compac (INGENASA). Utilizando un sustrato cromógeno, se detectó la presencia de anticuerpos antigp5 específicos en sueros de animales control y vacunados extraídos en los días D0 PV (tras la vacunación), D0 PI, D14 PI y D28 PI (figura 14). Se utilizó la absorbancia en el D0 PV (cuando no ha tenido lugar ninguna competición) para calcular el porcentaje de unión en cada uno de los sueros tal como sigue:

$$\% \text{ de unión} = \frac{\text{absorbancia en suero de Dx}}{\text{absorbancia de suero de D0 PV}} \times 100$$

Los porcentajes de unión inferiores representan niveles superiores de anticuerpos antigp5 en los sueros sometidos a prueba. Tal como puede observarse en la figura 14, los animales vacunados desarrollaron títulos de anticuerpo antigp5 superiores y una respuesta de anticuerpos más rápida a los 14 días tras la exposición que los animales control no vacunados.

Se realizó un ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa específico (IPMA) esencialmente tal como se describe en WENSVOORT *et al.* (1986) para la detección de PRRSV en macrófagos de pulmón alveolares porcinos infectados con las muestras de suero obtenidas a partir de diferentes cerdos incluidos en este ejemplo. La única diferencia con el método descrito por WENSVOORT *et al.* (1986) es la utilización de proteína-A conjugada con peroxidasa del rábano como anticuerpo secundario en lugar de una inmunoglobulina de oveja anticerdo conjugada con peroxidasa del rábano. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 14.

Tal como puede observarse a partir de la figura 15, la mayoría de los cerdos fueron seropositivos con respecto a PRRSV en el D28 PI. Sin embargo, en el grupo de animales vacunados con la MLV 5 de los 16 animales (que correspondían al 31%) fueron seropositivos con respecto a PRRSV incluso en el D14 PI, mientras que ninguno de los animales control vacunados con rTGEV-S_{PTV}-FL fue seropositivo en el D14 PI, lo que indicaba una respuesta de anticuerpos más rápida contra PRRSV en los animales vacunados.

EJEMPLO 14**Evaluación de la eficacia de una vacuna de rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 destruido en cerdos contra la exposición a la cepa Olot/91 de PRRSV de aislado de campo**

5

Se realizó esta evaluación para evaluar la eficacia de la vacuna de subunidades inactivadas (vacuna de organismos destruidos) derivada de rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 que expresaba diferentes proteínas de PRRSV heterólogas. Se utilizó la vacuna inactivada para la prevención o reducción del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en cochinitos inoculados con la vacuna de subunidades por vía intramuscular (IM) expuestos a la cepa Olot/91 de PRRSV de aislado de campo. Se evaluó la eficacia de la vacuna mediante la prevención de neumonía intersticial, viremia y también mediante la capacidad de inducir anticuerpos en suero (evaluado mediante ELISA, ensayo de seroneutralización (SN), etc.).

10

15

20

Se produjo la vacuna de subunidades inactivadas derivada de rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 que expresa las proteínas gp5 y M de PRRSV utilizada para este estudio de eficacia tal como se describe en el ejemplo 11.

Vacunación

25

Se seleccionaron 27 cerdos de seis a siete semanas de edad y se dividieron en dos grupos. Se vacunaron los cerdos del grupo #1 (14 animales) dos veces (a las 6-7 semanas de edad y 3 semanas más tarde) con la vacuna con PCV inactivada de PRRSV (3 ml por vía IM), mientras que se mantuvieron los cerdos del grupo #2 (13 animales) como cerdos control no vacunados.

30

Tras la vacunación, se observaron los cerdos diariamente para detectar signos clínicos para comprobar la seguridad de la vacuna. Tras la observación de cualquier anomalía, se llevó a cabo un examen clínico completo por el investigador principal.

35

Para los estudios de serología, se extrajeron adicionalmente muestras de sangre en los D0, D21 y D49 tras la vacunación (PV) y se utilizaron los sueros obtenidos a partir de estas muestras para realizar análisis serológicos con respecto a PRRSV, TGEV y PCV2 (véase a continuación).

40

Se analizó la respuesta humoral inducida por la vacuna de rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 mediante ELISA indirecto para PRRSV que detectaba anticuerpos tanto anti-gp5 como anti-M utilizando PRRSV concentrado mediante ultracentrifugación como antígeno de recubrimiento (imagen B en la figura 16 e imagen C en 17).

45

Se incubó el antígeno diluido de PRRSV durante la noche a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Tras lavar, se bloqueó la superficie vacía de los pocillos con PBS, fracción V de BSA al 5% y se incubó 1 h a $3,7 \pm 1^\circ\text{C}$. Se diluyeron los sueros de animales control y vacunados en los D0, D21 y D42 PV así como los controles positivos y negativos para PRRSV en PBS, Tween-20 al 0,05% y se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 1 h. Tras lavar, se incubó la proteína A conjugada con peroxidasa diluida en PBS, Tween-20 al 0,05% (1:1000) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 1 h. Tras un lavado final, se añadió el sustrato cromógeno (o-fenilendiamina

(OPD)) a los pocillos. Se detuvo la reacción añadiendo H_2SO_4 3 N. Se leyeron las placas con un lector de microplacas de ELISA utilizando un filtro de 450 nm.

5 Se analizó la respuesta humoral frente al vector de TGEV inducida por la vacuna de rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 de la misma manera que se describió anteriormente para el ELISA indirecto para PRRSV utilizando TGEV concentrado mediante ultracentrifugación como antígeno de recubrimiento en lugar de PRRSV (imagen A en la figura 16 e imagen B en 17).

10 Con el fin de evaluar la respuesta humoral provocada contra la vacuna de circovirus porcino (PCV) de tipo1-tipo2 incluida en la vacuna inactivada de rTGEV-S_{PTV}-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6, se analizó la presencia de anticuerpos antiPCV2 de ORF2 en los D0 PV, D49 PV y D0 PI (D63 PV) mediante IPMA (véase anteriormente). Esta técnica inmunológica cuantifica los anticuerpos frente a la proteína de la cápsida de PCV2 (producto de ORF2) presente en células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante BAC-ORF2 PCV2.

20 Se infectaron las células Sf9 con el baculovirus recombinante Bac-ORF2 PCV2 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. Se hicieron crecer las células infectadas a $27 \pm 0,5^\circ C$ durante 4 días y entonces se fijaron. Se diluyeron los sueros de animales control y vacunados en PBS, Tween-80 al 0,05% y se incubaron a $37 \pm 1^\circ C$ durante 1 h. Tras lavar, se incubó la proteína A conjugada con peroxidasa diluida en PBS, Tween-20 al 0,05% (1:1000) a $37 \pm 1^\circ C$ durante 1 h. Tras un lavado final, se añadió el sustrato cromógeno (3-amino-9-etilcarbazol) a los pocillos. Se detuvo la reacción mediante dos lavados con PBS. La reacción era positiva cuando el citoplasma de las células infectadas mostraba una tinción roja. El título de anticuerpos corresponde a la inversa de la dilución más alta que muestra una reacción positiva.

30 En el D0 PV, la mayoría de los animales fueron negativos con respecto a anticuerpos frente a PCV2 (el 58% de los animales vacunados y el 92% de los animales del grupo control). Tras la segunda inmunización (D49 PV y D63 PV), los animales no vacunados del grupo control permanecieron casi seronegativos con respecto a PCV2, mientras que los animales vacunados habían experimentado seroconversión con respecto a PCV2 (véase la tabla 3).

35

Tabla 3

Grupo n#1 rTGEV-S _{PTV} -TRS _{3a} -ORF5-TRS _{22N} - ORF6				Grupo #2 animales no vacunados			
cerdo #	D0 PV	D49 PV	D0 PI (D63PV)	cerdo #	D0 PV	D49 PV	D0 PI (D63PV)
294	320	320	320	293	320	ND	<20
295	320	320	80	301	<20	<20	<20
296	320	1280	1280	303	<20	<20	<20
297	1280	320	320	306	<20	<20	<20
298	320	320	80	831	<20	<20	<20
299	<20	5120	5120	833	<20	<20	320
300	<20	320	320	834	<20	20	320
304	<20	<20	320	835	<20	<20	<20
305	<20	320	320	836	<20	<20	<20
828	<20	1280	1280	837	<20	<20	<20
832	<20	1280	1280	838	<20	<20	<20
841	<20	320	320	839	<20	<20	<20
				840	<20	<20	<20
ND: no determinado							

5 Exposición

Seis semanas tras la segunda vacunación, se expusieron todos los cerdos de ambos grupos a la cepa Olot91 de PRRSV ($10^{4,7}$ - $10^{4,8}$ TCID₅₀/cerdo) por vía intranasal (IN).

10 Se extrajeron muestras de sangre los días 0, 7, 12, 20 y 27 PI en tubos para obtener suero para la determinación de títulos serológicos y para estudiar la respuesta inmunitaria contra PRRSV (ELISA para medir anticuerpos frente a proteínas gp5 y N, y prueba de SN). También se utilizaron los sueros para medir la viremia de PRRSV
15 mediante RT-PCR cuantitativa.

Estudios serológicos

20 Se analizó la producción de anticuerpos neutralizantes (AcN) en sueros obtenidos a partir de sangre extraída en los D0 PV, D0 PI, D12 PI y D27 PI de animales control y vacunados mediante ensayo de seroneutralización (SN; véase la tabla 4). Antes de la exposición (D0 PV y D0 PI), no se detectó ningún AcN en ningún grupo. En el D12 PI, algunos animales desarrollaron AcN (el 21,4% en el grupo #1 (animales vacunados) y el 23% en el grupo #2 (animales no vacunados)), pero incluso se observaron títulos de AcN
25 superiores y un número superior de animales positivos en el día 27 tras la exposición (el

75% de positivos en el grupo #1, el 46% de positivos en el grupo #2).

Tabla 4

Grupo #1 rTGEV-S _{PTV} -TRS _{3a} -ORF5-TRS _{22N} -ORF6					Grupo #2 animales no vacunados				
cerdo #	D0 PV	D0 PI	D12 PI	D27 PI	cerdo #	D0 PV	D0 PI	D12 PI	D27 PI
294	<2	<2	<2	4	293	<2	<2	4	4
295	<2	<2	<2	16-32	301	<2	<2	<2	<2
296	<2	<2	<2	<2	303	<2	<2	2	<2
297	<2	<2	16	16-32	306	<2	<2	<2	<2
298	<2	<2	<2	16	831	<2	<2	<2	<2
299	<2	<2	2	4-8	833	<2	<2	<2 (D7 PI)	ND
300	<2	<2	<2	4	834	<2	<2	<2	<2
304	<2	<2	2	2	835	<2	<2	<2	4
305	<2	<2	<2	2	836	<2	<2	<2	8
828	<2	<2	<2	<2	837	<2	<2	<2	4
829	<2	<2	<2	ND	838	<2	<2	<2	<2
830	<2	<2	<2	ND	839	<2	<2	<2	4-8
832	<2	<2	<2	32-128	840	<2	<2	4	8-16
841	<2	<2	<2	<2					
% de positivos	0	0	21,4	75	% de positivos	0	0	23	46

5 ND: no determinado

10 Se analizó la presencia de anticuerpos antigp5 específicos mediante el ELISA de
competición INGEZIM PRRS gp5 Compac (INGENASA) según las instrucciones del
fabricante. Este método mide la competición entre los sueros problema porcinos y un
anticuerpo monoclonal (AcM) marcado con peroxidasa antigp5 para determinar su unión a
15 una proteína gp5 recombinante previamente aplicada sobre la superficie de los pocillos de
una placa de prueba. Utilizando un sustrato cromógeno, se detectó la presencia de
anticuerpos antigp5 específicos en sueros de animales control y vacunados extraídos en
los D0 PV, D0 PI, D14 PI, D21 PI y D28 PI (véase la figura 18). Se utilizó la absorbancia
en el D0 PV (cuando no ha tenido lugar ninguna competición) para calcular el porcentaje
de unión en cada uno de los sueros tal como sigue:

$$\% \text{ de unión} = \frac{\text{absorbancia en suero de Dx}}{\text{absorbancia de suero de D0 PV}} \times 100$$

20 Porcentajes de unión inferiores representan niveles superiores de anticuerpos
antigp5 en los sueros sometidos a prueba. Tal como puede observarse en la figura 18, los

animales vacunados desarrollaron títulos antigp5 superiores y una respuesta de anticuerpos más rápida a los 14 días tras la exposición que los animales control no vacunados.

5 Para la cuantificación de PRRSV en suero (viremia) y en lavados pulmonares, se extrajeron muestras de sangre en los D0, D3, D7, D14, D20 y D28 PI en tubos para aislar suero y se mantuvieron a $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis. Además, en el D27 PI se sacrificaron todos los cerdos y se les realizó la autopsia. Se evaluaron lesiones macroscópicas de pulmón y se realizaron lavados pulmonares. Para obtener los lavados pulmonares, se extrajeron los pulmones y se introdujeron 100 ml de PBS por la tráquea hacia los pulmones seguido por un masaje leve y recuperación del PBS en tubos estériles mediante decantación. Se mantuvieron alícuotas de los lavados pulmonares a $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$.

15 Se realizó la purificación de ARN a partir del suero y a partir de los lavados pulmonares utilizando el kit Nucleospin 96 RNA (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mantuvieron las muestras de ARN a $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$.

20 Para la cuantificación de PRRSV, se ha establecido una técnica de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR). En primer lugar, se diseñaron cebadores específicos (cebador directo (Olot91F): 5' TTCCCTCTGCTTGCAATCG 3' (SEC ID n°: 16) y cebador inverso (Olot91R): 5' GGATGAAAGCGACGCAGTTC 3' (SEC ID n°: 17)) y una sonda MGB® (sonda (Olot91S): 5' 6-FAM-ACGGCTTTTAATCAAGGC-MGB 3' (SEC ID n°: 18)) que comprendía 6-FAM como colorante indicador en el extremo 5' y un resto MGB (ligando de unión al surco menor) en el extremo 3' que servía como extintor no fluorescente utilizando el programa Primer Express de Applied Biosystems para la amplificación de un fragmento de 67 pb del genoma de Olot/91 de PRRSV. En segundo lugar, se preparó ARN patrón purificando ARN a partir de la cepa de exposición de PRRSV y ajustando el mismo a 10^4 TCID₅₀ de PRRSV / μl de ARN. Se dividió el ARN en alícuotas y se mantuvieron a $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$. Se optimizaron la concentración de reactivos y condiciones de reacción utilizando el kit de sistema de qRT-PCR de una etapa UltraSense™ para ARN (Invitrogen).

35 Se utilizó el ARN viral purificado como molde, se transcribió mediante transcripción inversa a 50°C durante 30 min. y se desnaturalizó a 95°C durante 5 min. El programa utilizado para la PCR consistió en 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 20 s e hibridación a 56°C durante 40 s. Se llevó a cabo la qRT-PCR en un termociclador PCR System 7500 en tiempo real. Se analizaron los resultados con el software SDS 1.2 (Applied Biosystems) (véase la figura 19).

40 Tal como puede observarse a partir de la figura 19, debido a la vacunación puede observarse una clara disminución de los títulos de PRRSV en suero (desde 911 TCID₅₀ de PRRSV/ml hasta 144 TCID₅₀ de PRRSV/ml) en el D14 PI en los animales vacunados. Puede observarse una disminución adicional en los D20 y D28 PI.

45 Los macrófagos alveolares porcinos obtenidos a partir de cerdos vacunados realizando lavados de pulmón contenían mucho menos virus (9606,74 TCID₅₀ de PRRSV/ml de lavado) que los de los cerdos control (71518,33 TCID₅₀ de PRRSV/ml de lavado). Debe apreciarse, que la presencia de PRRSV en secciones de pulmón también era inferior en cerdos vacunados (25%) que en cerdos control (66,6%), lo que indicaba la

capacidad de la vacuna inactivada de reducir la replicación de PRRSV en su tejido diana.

En los pulmones obtenidos de los animales sacrificados en el D27 PI, se analizaron lesiones de pulmón macroscópicas y se puntuaron según el procedimiento descrito por HANNAN *et al.* (1982). La tabla 5 muestra las medias de la puntuación de neumonía que revelan diferencias estadísticas entre animales del grupo control y animales vacunados. Los animales del grupo control presentaron puntuaciones de neumonía medias superiores a los cerdos vacunados.

Tabla 5

Grupo	Puntuación de neumonía (valor medio)
grupo control	8,956
animales vacunados	4,801
valor de p	estadísticamente relevante (0,0184)

EJEMPLO 15

Vector que expresa la proteína de fusión ORF5-LIMP-II

Se diseñó por ingeniería genética el vector recombinante utilizando el mismo protocolo de clonación que se describió anteriormente. Se dirigió la expresión de la proteína de fusión por TRS-3a, y se diseñó el vector con tropismo intestinal. Se obtuvo el vector pBAC-Sc11-TRS3a-ORF5-LIMP-II (véase la figura 20) clonando el ORF5 de PRRSV fusionado a los últimos 20 aa (SEC ID nº: 11) de LIMP-II porcina (número de registro de GeneBank AAS55916), que contenía la secuencia de direccionamiento lisosómica de esta proteína.

Se recuperó virus recombinante estable a partir del ADNc de pBAC-Sc11-TRS3a-ORF5-LIMP-II.

Se detectó la expresión de Gp5-LIMP-II mediante inmunotransferencia de tipo Western e inmunofluorescencia utilizando inhibidores específicos del pH lisosómico (es decir, cloroquina, NH₄Cl). Se encontró una expresión alta y estable del antígeno.

También se expresó esta proteína de fusión específica del vector de TGEV que expresaba la proteína Gp5-LIMP-II y M. Esto dio como resultado una mejora adicional de la estabilidad del vector dicistrónico.

EJEMPLO DE REFERENCIA 16

Construcción de clones de TGEV recombinantes con genes S mutados

Se construyó una colección de TGEV recombinantes que sólo difieren en el gen S en 5', pero por lo demás presentan una secuencia idéntica. Se generaron todos los virus

recombinantes partiendo del mismo clon de ADNc infeccioso de TGEV, que presentaba la secuencia tal como se describió por ALMAZÁN *et al.* (2000) con la excepción de que la proteína S se derivó del aislado de TGEV-PUR46-PTV con un tropismo exclusivamente respiratorio (PENZES *et al.*, 2001). Se construyeron los TGEV recombinantes tal como se describió previamente (ALMAZÁN *et al.*, 2000) utilizando un ADNc infeccioso clonado como cromosoma artificial bacteriano (BAC).

Los dos aislados de TGEV parentales TGEV-PUR46-PTV (que infecta el tracto respiratorio) y TGEV-PUR46-C11 (que infecta el tracto respiratorio e intestinal) difieren en el extremo 5' del gen S tal como se muestra en la figura 22 (véase el recuadro superior en la columna izquierda). Los nucleótidos resaltados reflejan diferencias entre las dos secuencias, mientras que el recuadro vertical claro representa una delección de tres nucleótidos. Además, algunos clones también presentan una delección de 6 nucleótidos ya presentes en la proteína S del gen S de TGEV-PUR46-PTV (PENZES *et al.*, 2001).

Partiendo del virus rTGEV-S_{PTV}, se generó una colección de virus recombinantes introduciendo sucesivamente secuencias presentes en el gen S de TGEV-PUR46-C11 pero no en PTV en la secuencia del gen S del rTGEV-S_{PTV} (véanse las secuencias en la figura 22). Los nucleótidos en los recuadros oscuros representan los nucleótidos que se han modificado.

Se sembraron en placa los virus recombinantes, se purificaron tres veces en células ST y amplificaron mediante dos pases adicionales en estas células. Se utilizaron las disoluciones madre de virus obtenidas como disoluciones madre de trabajo [pase 0 con WS, acrónimo WS(P0)]. Tras propagar los virus en células ST, se determinó la secuencia de los aislados recuperados y es tal como se indica en la figura 22.

Se administraron los virus a cochinitos recién nacidos de 3 días de edad. Se muestran los títulos de virus medios en los pulmones o el intestino 2-3 días tras la infección para cada virus recombinante.

El clon denominado "clon 1 de R7" (o S_{7.1}) muestra la actividad más alta tanto en el pulmón como en el intestino de los cochinitos tras 2-3 días tras la infección.

EJEMPLO DE REFERENCIA 17

Cinética del crecimiento de clones de TGEV recombinantes seleccionados con genes S mutados

Se evaluó adicionalmente el crecimiento de virus TGEV recombinantes rTGEV-PUR46-PTV, rTGEV-PUR46-C11 y TGEV-PUR46-S7.1 *in vitro* en células ST e *in vivo* en cochinitos.

Para los estudios *in vitro*, se evaluó el título de células ST infectadas con cualquiera de TGEV-PUR46-C11 (TGEV C11) y TGEV-PUR46-S7.1 (TGEV7.1). Se inocularon las células ST o bien con virus de la disolución madre de trabajo (en el pase 0; véase el ejemplo 16 anteriormente) o bien con virus tras 6 pases adicionales en células ST. Se titularon los títulos de virus utilizando un ensayo en placa en células ST. Los

resultados se muestran en la tabla 6 y representan valores medios de tres experimentos independientes.

Tabla 6

Virus	Título (UFP/ml)	
	WS (P0)	Pase 6
rTGEV-PUR46-C11	3×10^7	4×10^8
TGEV-PUR46-S7.1	5×10^8	3×10^8

Tal como puede observarse a partir de la tabla 6, tanto TGEV-PUR46-C11 como TGEV-PUR46-S7.1 crecen hasta títulos altos en cultivo celular en células ST sin ninguna pérdida significativa de actividad incluso tras 6 pases.

Para estudios *in vivo*, se inocularon cochinitos recién nacidos de 3 días de edad con 3×10^8 ufp por cochinito de TGEV-PUR46-C11 (TGEV C11) y TGEV-PUR46-S7.1 (TGEV7.1). Se infectaron los cochinitos o bien con virus de la disolución madre de trabajo (P0) o bien con virus obtenidos tras 6 pases adicionales en células ST. Se sacrificaron los animales en el día 2 tras la inoculación y se titularon los títulos de virus por gramo de tejido animal (intestino o pulmón) utilizando un ensayo en placa en células ST. Los resultados se muestran en la tabla 7 y representan valores medios de tres experimentos independientes.

Tabla 7

Virus	Título (UFP/g de tejido)			
	WS (P0)		Pase 6	
	Pulmón	Intestino	Pulmón	Intestino
rTGEV-PUR46-C11	5×10^6	5×10^6	2×10^6	5×10^5
TGEV-PUR46-S7.1	4×10^7	8×10^6	8×10^6	4×10^6

Los resultados representados en la tabla 7 ilustran que ambos virus crecieron bien tanto en el pulmón como en el intestino, cuando se infectaron los animales con virus de la disolución madre de trabajo (P0). Además, también el virus pasado seis veces en células ST antes de la infección creció hasta títulos altos en ambos órganos. Sin embargo, en ambos órganos el $S_{7.1}$ proporciona títulos significativamente más altos que el S_{C11} .

En un experimento adicional, se inocularon cochinitos recién nacidos de tres días de edad con 3×10^8 ufp por cochinito de rTGEV-PUR46-PTV, TGEV-PUR46-C11 y TGEV-PUR46-S7.1. Se sacrificaron los animales en los días 1, 2, 3 y 4 tras la inoculación, respectivamente, y se determinaron los títulos de virus por gramo de tejido mediante titulación en placa en células ST (véase la figura 23).

Tal como puede observarse a partir de la figura 23, el rTGEV-PUR46-PTV sólo

5 presenta tropismo respiratorio. Además, el título de virus no es estable durante los cuatro días *in vivo* sino que disminuye lentamente (véase el gráfico izquierdo de la figura 22). Tanto el TGEV-PUR46-C11 como el TGEV-PUR46-S7.1 presentan tropismo doble y crecen en el tracto respiratorio (pulmón) e intestinal (intestino) (véase la figura 23). Sin embargo, mientras que el título del TGEV-PUR46-C11 en ambos órganos disminuye significativamente durante los cuatro días en el cochinito, el título de TGEV-PUR46-S7.1 permanece casi estable (en el pulmón) o disminuye hasta un grado menor que el TGEV-PUR46-C11 (intestino). En cualquier caso, los títulos de virus obtenidos para TGEV-PUR46-S7.1 son superiores en ambos órganos a los obtenidos para TGEV-PUR46-C11, es decir el TGEV recombinante que comprende el gen S S7.1 es más estable *in vitro* e *in vivo* que el TGEV-PUR46-C11.

15 Bibliografía

- 15 Almazan F., Gonzales J.M., Penzes Z., Izeta A., Calvo E., Plana-Duran J., Enjuanes L. (2000). Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5516-5521.
- 20 Alonso S., Izeta A., Sola I., Enjuanes L. (2002). Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* 76:1293-1308.
- 25 Ansari I.H., Kwon B., Osorio F.A., Pattnaik A.K. (2006). Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J Virol.* 80(8):3994-4004.
- 30 Botner A., Strandbygaard B., Sorensen K.J., Have P., Madsen K.G., Madsen E.S., Alexandersen S. (1997). Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet. Rec.* 141:497-499.
- 35 Bullock W., Fernández J.M., Short J.M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA E.coli strain with P-galactosidase selection. *Biotechniques* 8:26-27.
- Carter Q.L., Curiel R.E. (2005). Interleukin-12 (IL-12) ameliorates the effects of porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV) infection. *Vet Immunol Immunopathol* 107:105-118.
- 40 Chang K.-Y., Tinoco I. (1994). Characterization of a "kissing" hairpin complex derived from the human immunodeficiency virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8705-8709.
- 45 Charley B., Laude H. (1988). Induction of alpha-interferon by transmissible gastroenteritis coronavirus: Role of transmembrane glycoprotein E1. *J. Virol.* 62:8-10.
- Chung H.K., Chae C. (2003). Expression of interleukin-10 and interleukin-12 in piglets experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J. Comp. Path.* 129(2-3): 205-212.

- 5 Cousins L.P., Peterson R., Hsu S., Dorner A., Altman J.D., Ahmed R., Biron C.A. (1999). Two roads diverged:interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *J. Exp. Med* 189:1315-1328.
- 10 Delmas B, Gelfi J., Kut E., Sjostrom H., Noren O., Laude H. (1994). Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site. *J Virol.* 68(8):5216-24.
- Doyle L.P., Hutchings L.M. (1946). A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 108:257-259.
- 15 Enjuanes L., et al. (2003). Virus based vectors for gene expression in mammalian cells; Coronaviruses; in *Gene transfer and expression in mammalian cells*; Ed. S.C. Makrides, págs. 151-158.
- 20 Fenaux M., Opriessnig T., Halbur P.G., Meng X.J. (2003). Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J. Virol.* 77(20):11232-43.
- 25 Fenaux M., Opriessnig T., Halbur P.G., Elvinger F., Meng X.J. (2004). A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J. Virol.* 78(12):6297-6303.
- 30 Foss D.L., Zilliox M.J., Meier W., Zuckermann F., Murtaugh M.P. (2002). Adjuvant danger signals increase the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol.* 15(4): 557-566.
- 35 Gonzalez J.M., Penzes Z., Almazan F., Calvo E., Enjuanes L. (2002). Stabilization of a full-length infectious cDNA clone of transmissible gastroenteritis coronavirus by the insertion of an intron. *J. Virol.* 76:4655-4661.
- Graham R.L., Sims A.C., Brockway S.M., Baric R.S., Denison M.R. (2005). The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J. Virol.* 79:13399-13411
- 40 Haelterman E.O., Pensaert M.B. (1967). Pathogenesis of transmissible gastroenteritis of swine. *Proc. 18th World Vet. Congress* 2:569-572.
- 45 Hanahan D., Jessee J., Bloom F.R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 204:63-113.
- Hannan P.C., Bhogal B.S., Fish J.P. (1982). Tylosin tartrate and tiamutilin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Res. Vet. Sci.* 33:76-88

- Hertzog T., Scandella E., Schelle B., Ziebuhr J., Siddell S.G., Ludewig B., Thiel V. (2004). Rapid identification of coronavirus replicase inhibitors using a selectable replicon RNA. *J. Gen. Virol* 85:1717-1725.
- 5 Izeta A., Smerdou C., Alonso S., Penzes Z., Méndez A., Plana-Durán J., Enjuanes L. (1999). Replication and packaging of transmissible gastroenteritis coronavirus-derived synthetic minigenomes. *J. Virol.* 73:1535-1545.
- 10 Kiyono et al. (1996). *Mucosal Vaccines*. Academic Press, Nueva York.
- Labarque G., Reeth K.V., Nauwynck H., Drexler C., Van Gucht S., Pensaert S. (2004). Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain on vaccine efficacy. *Vaccine* 22:4183-4190.
- 15 Laude H., Rasschaert D., Delmas B., Godet M., Gelfi J., Bernard C. (1990). Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol.* 23:147-154.
- 20 Le Bon A., Schiavoni G., D'Agostino G., Gresser I., Belardelli F., Tough D.F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14:461-470.
- Lopez O.J., Osorio F.A. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 102:155-163.
- 25 McClurkin A.W., Noman J.O. (1966). Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 30:190-198.
- 30 Meier W.A., Galeota J., Osorio F.A., Husmann R.J., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A. (2003). Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309:18-31.
- 35 Meng X.J. (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet. Microbiol.* 74:309-329.
- 40 Mengeling W.L., Lager K.M., Vorwald A.C., Koehler K.J. (2003a). Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 93 (1):13-24.
- Mengeling W.L., Lager K.M., Vorwald A.C., Clouser D.F. (2003b). Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Microbiol.* 93(1):25-38.
- 45 Murtaugh M.P., Xiao Z., Zuckermann F. (1995). Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch. Virol.* 140:1451-1460.

- Nielsen H.S., Oleksiewicz M.B., Forsberg R., Stadejek T., Botner A., Storgaard T. (2001). Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J. Gen. Virol.* 82:1263-1272.
- 5 Ortego J., Escors D., Laude H., Enjuanes L. (2002). Generation of a replication-competent, propagation deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J. Virol.* 76:11518-11529.
- 10 Ortego J., Sola I., Almazan F., Ceriani J.E., Riquelme C., Balach M., Plana-Duran J., Enjuanes L. (2003). Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo replication and virulence. *Virology* 308:13-22.
- 15 Osorio F.A., Zuckermann F., Wills R., Meier W., Christian S., Galeota J., Doster A.R. (1998). PRRSV: comparison of commercial vaccines in their ability to induce protection against current PRRSV strains of high virulence. In Allen D. Lennan Swine Conf., págs. 179-182.
- 20 Osorio Y., Ghiasi H. (2005). Recombinant herpes simplex virus type 1 (HSV-1) codelivering interleukin-12p35 as a molecular adjuvant enhances the protective immune response against ocular HSV-1 challenge. *J. Virol.* 79(6): 3297-3308.
- 25 Ostrowski M., Galeota J.A., Jar A.M., Platt K.B., Osorio F.A., Lopez O.J. (2002). Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76:4241-4250.
- Panley R., Høglund S., Prasad G. (Eds.) (1989). *Progress in Vaccinology. Veterinary Vaccines Volumen 4*, Springer Verlag.
- 30 Pastoret P.P., Blancou P., Vannier, Verschueren C. (Eds.). (1997) *Veterinary Vaccinology*, Elsevier Science B.V.
- 35 Penzes Z., Gonzales J.M., Calvo E., Izeta A., Smerdou C., Mendez A., Sanches C.M., Sola I., Almazan F., Enjuanes L. (2001). Complete genome sequence of Transmissible Gastroenteritis Coronavirus PUR46-MAD clone and evolution of the purdue virus cluster. *Virus Genes* 23(1):105-118.
- 40 Pesch S., Meyer C., Ohlinger V.F. (2005). New insights into genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 107:31-48.
- 45 Pfeffer L.M., Dinarello C.A., Herberman R.B., Williams B.R., Borden E.C., Bordens R., Walter M.R., Nagabhushan T.L., Trotta P.P., Pestka S. (1998). Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res.* 58:2489-2499.
- Rodriguez F., Harkins S., Redwine J.M., De Pereda J.M., Whitton J.L. (2001). CD4+ T cells induced by a DNA vaccine: immunological consequences of epitope-specific lysosomal targeting. *J. Virol.* 75(21):10421-10430.

- Sambrook et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed Cold Spring Harbor Laboratory.
- 5 Sánchez C.M., Izeta A., Sánchez-Morgado J.M., Alonso S., Sola I., Balasch M., Plana-Durán J., Enjuanes, L. (1999). Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J. Virol.* 73:7607-7618.
- 10 Sawicki & Sawicki (1990). Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J. Virol.* 64(3):1050-6.
- Sethna P.B., Hung S.-L., Brian D.A. (1989). Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5626-5630.
- 15 Siddell S.G. (1995). "The Coronaviridae." *The Viruses* (H. Fraenkel-Conrat y R. R. Wagner, Eds.) Plenum Press, Nueva York.
- 20 Sola I, Alonso S., Zúñiga S., Balasch M., Plana-Duran J., Enjuanes L. (2003). Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *J. Virol.* 77:4357-4369.
- 25 Suradhat S., Thanawongnuwech R., Poovorawan Y. (2003). Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84:453-459.
- Thacker E.L., Halbur P.G., Ross R.F., Thanawongnuwech R., Thacker B.J. (1999). *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol.* 37(3):620-627.
- 30 Thacker E.L., Thacker B.J., Young T.F., Halbur P.G. (2000). Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine* 18(13):1244-52.
- 35 Toka F.N. *et al.* (2004). Molecular adjuvants for mucosal immunity. *Immunol Rev.* 199:100-112.
- 40 van der Most R.G., Spaan W.J.M. (1995). Coronavirus replication, transcription, and RNA recombination. In "The Coronaviridae" (S. G. Siddell, Ed.), págs. 11-31. Plenum Press, Nueva York.
- Vezina S.A., Loemba H., Fournier M., Dea S., Archambault D. (1996). Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Q.* 13:121-130.
- 45 Wensvoort G., Terpstra C., Boonstra J., Bloemraad M., Van Zaane D. (1986). Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.* 12(2):101-108
- Wensvoort G., Terpstra C., Pol J.M., ter Laak E.A., Bloemraad M., de Kluyver E.P.,

Kragten C., van Buiten L., den Besten A., Wagenaar F., et al. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13:121-130.

5 Wissink E.H.J., Kroeke M.V., van Wijk H.A.R., Rijsewijk F.A.M., Meulenber J.J.M., Rottier P.J.M. (2005). Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 79(19):12495-12506.

10 Yoon K.J., Zimmermann J.J., Swenson S.L., McGinley M.J., Eernisse K.A., Brevik A., Rhinehart L.L., Frey M.L., Hill H.T., Platt K.B. (1995). Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:305-312.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas	
5	<120> Ácidos nucleicos que codifican para secuencias de TGEV y PRRSV para la expresión mejorada de secuencias de PRRSV	
	<130> P71617	
10	<150> Documento EP05026255 <151> 01-12-2005	
	<160> 19	
15	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 4350	
	<212> ADN	
20	<213> PRRSV	
	<400> 1	
	atgaaaaaac tatttgtggt ttgggtcgta atgccattga tttatggaga caattttcct	60
	tgttctaaat tgactaatag aactataggc aaccagtgga atctcattga aaccttcctt	120
	ctaaactata gtagtagggt accacctaatt tcagatgtgg tgtaggtga ttattttcct	180
	actgtacaac cttggtttaa ttgcattcgc aataatagta atgaccttta tgttacactg	240
	gaaaatctta aagcattgta ttgggattat gctacagaaa atatcacttg gaatcacaga	300
	caacggttaa acgtagtcgt taatggatac ccatactcca tcacagttac aacaaccgc	360
	aattttaatt ctgctgaagg tgctattata tgcatttgta agggctcacc acctactacc	420
	accacagaat ctagtttgac ttgcaattgg ggtagtgagt gcagggttaa ccataagttc	480

ES 2 353 952 T3

cctatatgtc cttctaattc agaggcaaat tgtggaata tgctgatgg cctacaatgg 540

tttgcagatg aggttggtgc ttatttacat ggtgctagtt accgtattag tttgaaaat 600

caatggctcg gcactgtcac atttggtgat atgcgtgcca caacattaga agtcgctggc 660

acgctttag acctttggtg gtttaatect gtttatgatg tcagttatta tagggttaat 720

aataaaaatg gtactaccgt agtttccaat tgcaactgac aatgtgctag ttatgtggct 780

aatgttttta ctacacagcc aggaggtttt ataccatcag attttagttt taataattgg 840

ttccttctaa ctaatagctc cacgttgggt agtggtaaat tagttaccaa acagccgta 900

ttagttaatt gcttatggcc agtcocctagc ttgaagaag cagcttctac atttgtttt 960

gagggtgctg gctttgatca atgtaatggt gctgttttaa ataatactgt agacgtcatt 1020

aggttcaacc ttaattttac tacaatgta caatcaggta aggtgcccac agtgttttca 1080

ttgaacacaa cgggtggtgt cactcttgaa atttcatggt ataatactac agtgagtgc 1140

tcgagctttt tcagttacgg tgaattccg ttcggcgtaa ctgatggacc acggtactgt 1200

tacgtacact ataatggcac agctcttaag tatttaggaa cattaccacc tagtgtcaag 1260

gagattgcta ttagtaagtg gggccatttt tatattaatg gttacaattt ctttagcaca 1320

tttctattg attgtatac ttttaatttg accactggtg atagtgacgt tttctggaca 1380

atagcttaca catcgtacac tgaagcatta gtacaagttg aaaacacagc tattacaaag 1440

gtgacgtatt gtaatagtca cgtaataac attaaatgct ctcaaattac tgctaatttg 1500

aataatggat tttatcctgt ttcttcaagt gaagttggtc ttgtcaataa gagtgttgtg 1560

ttactaceta gcttttacac acataccatt gttaacataa ctattggtct tggatgaag 1620

cgtagtggtt atggtcaacc catagcctca acattaagta acatcacact accaatgcag 1680

ES 2 353 952 T3

gatcacaaca ccgatgtgta ctgtattcgt tctgaccaat tttcagttta tgttcattct 1740

acttgcaaaa gtgctttatg ggacaatatt ttttaagcgaa actgcacgga cgttttagat 1800

gccacagctg ttataaaaac tggacttgt cctttctcat ttgataaatt gaacaattac 1860

ttaactttta acaagtctg tttgtcgtg agtcctggtg gtgctaattg taagtttgat 1920

gtagctgccc gtacaagaac caatgagcag gttgtagaa gtttgtatgt aatatatgaa 1980

gaaggagaca acatagtggg tgtaccgtct gataatagtg gtgtgcacga tttgtcagtg 2040

ctacacctag attcctgcac agattacaat atatatggta gaactggtgt tggattatt 2100

agaaaaacta acaggacgct acttagtggc ttatattaca catcactatc aggtgattg 2160

ttaggtttta aaaatgtag tgatggtgtc atctactctg taacgccatg tgatgtaagc 2220

gcacaagcag ctgttattga tggaccata gttggggcta tcacttccat taacagtga 2280

ctgttaggtc taacacattg gacaacaaca cctaattttt attactactc tatatataat 2340

tacacaaatg ataggactcg tggcactgca attgacagta atgatgttga ttgtgaacct 2400

gtcataacct attctaacat aggtgtttgt aaaaatggtg cttttgtttt tattaacgtc 2460

acacattctg atggagacgt gcaaccaatt agcactggta atgtcacgat acctacaaac 2520

tttaccatat ccgtgcaagt cgaatatatt caggtttaca ctacaccagt gtcaatagac 2580

tgttcaagat atgtttgtaa tggtaaccct aggtgtaaca aattgttaac acaatacgtt 2640

tctgcatgtc aaactattga gcaagcactt gcaatgggtg ccagacttga aaacatggag 2700

gttgattcca tgttgtttgt ttctgaaaat gcccttaa at tggcatctgt tgaagcattc 2760

aatagttcag aaactttaga ccctatttac aaagaatggc ctaatatagg tggttcttgg 2820

ctagaaggtc taaatacat acttccgtcc cataatagca aacgtaagta tcgttcagct 2880

ES 2 353 952 T3

atagaggact tgctttttga taaggttgta acatctgggt taggtacagt tgatgaagat 2940
 tataaacggt gtacaggtgg ttatgacata gctgacttag tatgtgctca atactataat 3000
 ggcatcatgg tgctacctgg tgtggctaata gctgacaaaa tgactatgta cacagcatcc 3060
 cttgcaggtg gtataacatt aggtgcactt ggtggaggcg ccgaggctat accttttgca 3120
 gtagcagttc aggctagact taattatggt gctctacaaa ctgatgtatt gaacaaaaac 3180
 cagcagattc tggctagtgc tttcaatcaa gctattggta acattacaca gtcatttggt 3240
 aaggttaatg atgctataca tcaaacatca cgaggctctg ctactgttg c taaagcattg 3300
 gcaaaagtgc aagatgttgt caacatacaa gggcaagctt taagccacct aacagtacaa 3360
 ttgcaaaata atttccaagc cattagtagt tctattagtg acatttataa taggcttgac 3420
 gaattgagtg ctgatgcaca agttgacag cctgatcacag gaagacttac agcaactaat 3480
 gcatttggtg ctgagactct aaccagacaa ggggaggtta gggctagtag acaacttgcc 3540
 aaagacaagg ttaatgaatg cgttaggtct cagtctcaga gattcggatt ctgtggtaat 3600
 ggtacacatt tgttttctact cgcaaatgca gcaccaaagc gcatgatttt ctttcacaca 3660
 gtgctattac caacggctta tgaaactgtg actgcttggc caggatattg tgcttcagat 3720
 ggtgatcgca cttttggact tgcgttaaa gatgtccagt tgactttggt tcgtaaatcta 3780
 gatgacaagt tctatttgac cccagaact atgtatcagc ctagagttgc aactagttct 3840
 gactttgttc aaattgaagg gtgcatgtg ctgtttgtta atgcaactgt aagtgattg 3900
 cctagtatta tacctgatta tattgatatt aatcagactg ttcaagacat attagaaaat 3960
 tttagaccaa attgactgt acctgagttg acatttgaca tttttaacgc aacctattta 4020
 aacctgactg gtgaaattga tgacttagaa tttaggtcag aaaagctaca taacaccact 4080

gtagaacttg ccattctcat tgacaacatt aacaatacat tagtcaatct tgaatggctc 4140
aatagaattg aaacctatgt aaaatggcct tggtatgtgt ggctactaat aggcttagta 4200
gtaataatfff gcataaccatt actgctatfff tgctgttgta gtacagggtg ctgtggatgc 4260
ataggttggt taggaagttg ttgtcactct atatgtagta gaagacaatt tgaaaattac 4320
gaaccaattg aaaaagtgca cgtccattaa 4350

<210> 2
<211> 606
<212> ADN
<213> PRRSV

5

<400> 2
atgagatggt ctcacaaatt ggggcgtttc ttgactcctc actcttgctt ctgggtggctt 60
tttttgctgt gtaccggctt gtcctgggcc tttgtcgtg gcagcggcag cagctcgaca 120
taccaataca tatataactt aacgatatgc gagctgaatg ggaccgactg gttgtccaac 180
cattttgatt gggcagtcga ga^occtttgtg ctttaccggg ttgccactca t^octctca 240
ctggg^ottttc tcacaacaag ccattttttt gacgcgctcg gtctcggcgc tgtgtccact 300
acaggat^ottg ttggcggg^ocg gtatgtactc agcagcgtgt acggcgttg tgctttcgca 360
gcgctcgtat gttttgtcat ccgtgctggt aaaaattgca tggcttgccg ctatgcccac 420
acc^ogg^ottta ccaacttcat tgtggacgac cgggggagaa tccatcggtg gaagtctcca 480
atagtggtag agaaattggg caaagctgaa gtcgggtggc accttgtcac catcaa^ocat 540
gtcgtcctcg aagg^ogt^otaa agctca^occc ttgacgagga ct^ocg^octga gcaatgggaa 600
gcctag 606

10

<210> 3
 <211> 522
 <212> ADN
 <213> PRRSV

5

<400> 3
 atgggaagcc tagacgattt ttgcaatgat tctaccgccg cacaaaagct tgtgctagcc 60
 tttagcatta catatacacc tataatgata tacgccctta aggtgtcagc cggccgactc 120
 ctggggctgt tgcacatcct aatattcctg aattggtcct tcacattcgg atacatgaca 180
 tatgtgcggt ttcaatccac caaccgtgc gcacttactc tgggggctgt tgcgcctt 240
 ctgtggggtg tttacagctt cacagagtca tggaagtttg ttacttccag atgcagattg 300
 tgttgcttag gccggcgata cattctggcc cctgcccac acgtagaaag tgctgcaggt 360
 ctccattcaa tcccagcgtc tggtaacga gcatacgtc tgagaaagcc cggactaaca 420
 tcagtgaacg gcactctagt tccaggactt cggagcctcg tgctgggagg caaacgagct 480
 gttaaacgag gagtgggtaa cctcgtcaag tatggccggt aa 522

<210> 4
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> cebador de oligonucleótido

15

<400> 4
 aacaggtcct accatgagat gttctcaca attgggg 37

20

<210> 5
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 5
 ccgctaagcc taggctccc attgctcagc cgaagtcc 38

5 <210> 6
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 6
 cggtgagca atgggaagcc tagaaaatta ttacatatgg tataactaaa caaatggga 60
 agcctagacg atttttg 77

15 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador de oligonucleótido

25 <400> 7
 gccggcctag acaacacaat c 21

30 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador de oligonucleótido

35 <400> 8
 gattgtgttg tctaggccgg c 21

40 <210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador de oligonucleótido

45 <400> 9
 gctaagctta ccggccatac tgacgagg 29

5 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> PRRSV

 <400> 10

 Thr Tyr Gln Tyr Ile Tyr Asn
 1 5

 10 <210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

 15 <400> 11

 Arg Gly Gln Gly Ser Met Asp Glu Gly Thr Ala Asp Glu Arg Ala Pro
 1 5 10 15

 Leu Ile Arg Thr
 20

 20 <210> 12
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> *Sus scrofa*

 <400> 12
 agaggacagg gatccatgga tgaggaact gcagacgaac gagcaccct catacgaacc 60

 25 <210> 13
 <211> 564
 <212> ADN
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> epítipo neutralizante ORF5-ORF6 de PRRSV

 <400> 13

ES 2 353 952 T3

tcgacatacc aatacatata taacttaacg atatgcgagc tgatgggaag cctagacgat 60
 ttttgcaatg attctaccgc cgcacaaaag cttgtgctag cctttagcat tacatatata 120
 cctataatga tatacgcct taaggtgtca cgcggccgac tcctggggct gttgcacatc 180
 ctaatattcc tgaattgttc tttcacattc ggatacatga catatgtgcg ttttcaatcc 240
 accaaccgtg tcgcacttac tctgggggct gttgtcgccc ttctgtgggg tgtttacagc 300
 ttcacagagt catggaagtt tgttacttcc agatgcagat tgtgttgctt aggccggcga 360
 tacattctgg cccctgccca tcacgtagaa agtgctgcag gtctccattc aatcccagcg 420
 tctggtaacc gagcatacgc tgtgagaaaag cccggactaa catcagtga cggcactcta 480
 gttccaggac ttcggagcct cgtgctgggc ggcaaacgag ctgttaaacg aggagtggtt 540
 aacctcgtca agtatggccg gtaa 564

5
 <210> 14
 <211> 624
 <212> ADN
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> Epítopo ORF5-ORF6-LIMP-II

<400> 14

tcgacatacc aatacatata taacttaacg atatgcgagc tgatgggaag cctagacgat 60
 ttttgcaatg attctaccgc cgcacaaaag cttgtgctag cctttagcat tacatataca 120
 cctataatga tatacgcct taaggtgtca cgcggccgac tcctggggct gttgcacatc 180
 ctaatattcc tgaattgttc tttcacattc ggatacatga catatgtgcg ttttcaatcc 240
 accaaccgtg tcgcacttac tctgggggct gttgtcgcgc ttctgtgggg tgtttacagc 300
 ttcacagagt catggaagtt tgttacttcc agatgcagat tgtgttgccct aggccggcga 360
 tacattctgg cccctgccca tcacgtagaa agtgctgcag gtctccattc aatcccagcg 420
 tctggtaacc gagcatacgc tgtgagaaag cccggactaa catcagtga cggcactcta 480
 gttccaggac ttcggagcct cgtgctgggc ggcaaacgag ctgttaaagc aggagtgggt 540
 aacctcgtca agtatggccg gagaggacag ggatccatgg atgagggaac tgcagacgaa 600
 cgagcacccc tcatacgaac ctaa 624

5 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> conector peptídico
 <400> 15

Gly Gly Pro Gly Gly
 1 5

15 <210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

<223> cebador de oligonucleótido

<400> 16
 ttcctctgc ttgcaatcg 19

5

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 17
 ggatgaaagc gacgcagttc 20

15

<210> 18
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> sonda de oligonucleótido (sonda MGB)

<400> 18
 acggcttta atcaaggc 18

25

<210> 19
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> secuencia artificial derivada del gen N

35

<400> 19
 aaaattatta catatggtat aactaaaca a 31

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico que comprende:

5

(a) las secuencias de un virus de la gastroenteritis transmisible competente para la replicación (TGEV), codificando dichas secuencias para una replicasa de TGEV bajo el control de secuencias reguladoras de la expresión, en el que la replicasa es expresada en una célula huésped e iniciará la replicación del ácido nucleico y aumentará así el número de ácidos nucleicos en la célula; y

10

(b) una secuencia que codifica para por lo menos un epítipo neutralizante de ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), incluyendo dicha secuencia un residuo de formación de puente disulfuro; y

15

(c) una secuencia que codifica para por lo menos un polipéptido adicional que puede aumentar una respuesta inmunitaria contra el PRRSV,

20

en el que se ha modificado la secuencia que codifica para dicho epítipo neutralizante de ORF 5 para desactivar los sitios de glicosilación que interfieren en la inducción de anticuerpos.

25

2. Ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico codifica para una replicasa de TGEV y una secuencia que codifica para la proteína N de TGEV.

30

3. Ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2, en el que el vector de TGEV competente para la replicación no es infeccioso.

35

4. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el vector de TGEV competente para la replicación es infeccioso.

40

5. Ácido nucleico según la reivindicación 4, en el que el ácido nucleico comprende además uno o más de los genes de TGEV siguientes: S, E, M y/o N.

45

6. Ácido nucleico según la reivindicación 4 ó 5, en el que las partículas virales infecciosas de TGEV que pueden obtenerse de la asociación de las proteínas de TGEV y las secuencias de ácido nucleico son partículas virales atenuadas.

7. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el gen S se deriva de un virus respiratorio.

8. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el gen S deriva de una cepa intestinal de TGEV.

5

9. Ácido nucleico según la reivindicación 5, en el que se ha modificado el gen S y presenta la SEC ID nº: 1.

10

10. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la secuencia comprende un epítipo neutralizante de ORF5 y por lo menos un epítipo de ORF 6 de PRRSV.

15

11. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la secuencia comprende un epítipo neutralizante de ORF5 y un epítipo neutralizante de ORF 6 de PRRSV.

20

12. Ácido nucleico según la reivindicación 10, en el que la secuencia está constituida por un epítipo neutralizante de ORF5 y la totalidad del ORF 6 de PRRSV.

25

13. Ácido nucleico según la reivindicación 11, en el que la secuencia está constituida por un epítipo neutralizante de ORF5 y un epítipo neutralizante de ORF 6 de PRRSV.

30

14. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el ácido nucleico comprende las secuencias de ORF5 y ORF6 de PRRSV cada una bajo el control de una secuencia reguladora de la expresión separada.

35

15. Ácido nucleico según reivindicación 14, en el que la secuencia está constituida por (1) la secuencia de ORF5 de PRRSV bajo el control de la secuencia reguladora de la transcripción del gen 3a, (2) la secuencia de ORF6 de PRRSV bajo el control de la secuencia reguladora de la transcripción TRS_{22N} expuesta como SEC ID nº: 19 y (3) la secuencia del gen S derivado de la cepa atenuada PTV de TGEV.

40

16. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el ácido nucleico codifica además para la señal de direccionamiento lisosómico de la proteína II integral de membrana lisosómica (LIMP II).

45

17. Ácido nucleico según la reivindicación 16, en el que dicho ácido nucleico codifica para una proteína de fusión constituida por LIMP II y ORF5 y/u ORF6 de PRRSV.

18. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el ácido nucleico codifica además para la subunidad p35 de IL-12 u otras interleucinas.

5 19. ARN recombinante codificado por un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

10 20. Vector que comprende un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 19.

21. Vector según la reivindicación 20, en el que el vector es un vector de ADNc.

15 22. Vector según la reivindicación 21, en el que el vector es un vector BAC-TGEV^{FL}.

20 23. Vector según la reivindicación 22, en el que el vector BAC-TGEV^{FL} contiene la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 17 ó 18.

25 24. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en el que el vector puede replicar el ácido nucleico dentro de una célula huésped.

30 25. Célula huésped que comprende un vector según una de las reivindicaciones 20 a 24.

35 26. Célula huésped según la reivindicación 25, en la que la célula es una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula animal o una célula humana.

40 27. Célula huésped según la reivindicación 26, en la que la célula es una línea celular porcina de testículo de cerdo, tal como la línea celular depositada como ATCC CRL-1746.

45 28. Partícula de virus que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 y por lo menos una proteína de la cubierta de TGEV.

29. Partícula de virus según la reivindicación 28, que comprende todas las proteínas de la cubierta de TGEV de la partícula de virus de TGEV natural.

30. Preparación farmacéutica que comprende un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 18, un ARN viral o un vector según una de las reivindicaciones 19 a 24 o una célula huésped según una de las reivindicaciones 25 a 27 o una partícula de virus según la reivindicación 28 ó 29.

5

31. Preparación farmacéutica según la reivindicación 30, que comprende además un vehículo, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

10

32. Vacuna que puede proteger un animal contra PRRSV que comprende un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 18, un ARN o vector viral según una de las reivindicaciones 19 a 24, una célula huésped según una de las reivindicaciones 25 a 27 o una partícula de virus según la reivindicación 28 ó 29.

15

33. Vacuna según la reivindicación 31, en el que la vacuna es una vacuna multivalente que puede proporcionar protección contra uno o varios patógenos de cerdo distintos de PRRSV.

20

34. Vacuna según la reivindicación 33, que comprende además los antígenos derivados de otras proteínas y/o patógenos virales y/o bacterianos que proporcionarán inmunidad contra los patógenos.

25

35. Vacuna según la reivindicación 33 ó 34, que comprende además uno o varios antígenos derivados de otros patógenos virales seleccionados de virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, circovirus porcino de tipo 2, peste porcina clásica, peste porcina africana, glosopeda, virus de seudorrabia, circovirus porcino de tipo 1, adenovirus porcinos, enterovirus porcinos, coronavirus respiratorio porcino, rotavirus porcino, virus de encefalomiocarditis, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la enfermedad del ojo azul, virus de la hepatitis E y/o virus del Nilo Occidental, virus Nipah.

35

36. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, que comprende además uno o varios antígenos derivados de otros patógenos virales seleccionados de entre virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, circovirus porcino de tipo 2, peste porcina clásica, peste porcina africana y/o glosopeda.

40

37. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, que comprende además uno o varios antígenos derivados de patógenos bacterianos seleccionados de entre *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* tipo A (toxinas), *Pasteurella multocida* tipo D (toxinas), *Bordetella bronchiseptica*, *Isospora suis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Mycoplasma hyorinis*, *Streptococcus suis*, *Clostridium*

45

perfringens, Clostridium difficile, Clostridium novyi, Brucella abortus y/o Candidatus helicobacter suis.

5 38. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, que comprende además uno o varios antígenos derivados de patógenos bacterianos seleccionados de entre *Mycoplasma hyopneumoniae, Actinobacillus pleuropneumoniae, Actinobacillus suis, Haemophilus parasuis, Pasteurella multocida* tipo A (toxinas), *Pasteurella multocida* tipo D (toxinas), *Bordetella bronchiseptica, Isospora suis, Brachyspira hyodysenteriae, Brachyspira pilosicoli, Lawsonia intracellularis, Erysipelothrix rhusiopathiae, Escherichia coli* y/o *Salmonella enterica*.

10

15 39. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 38, en la que el antígeno viral o bacteriano adicional está presente en la vacuna multivalente como un virus o bacteria atenuado o inactivado o como una secuencia de ácido nucleico que codifica para uno o varios de los antígenos virales o bacterianos adicionales.

20 40. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 39, que comprende además las secuencias de ácido nucleico que codifican para las proteínas que conferirán protección contra los patógenos de cerdo, tales como las secuencias de ácido nucleico que codifican para uno o varios anticuerpos que presentan especificidad para las enfermedades bacterianas o virales o las secuencias de ácido nucleico que codifican para la proteína priónica porcina.

25

30 41. Vacuna según una de las reivindicaciones 32 a 40 que comprende además un vehículo, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

35 42. Vacuna según una de las reivindicaciones 32 a 41, en la que la vacuna resulta apropiada para vacunar un cerdo, preferentemente una cerda.

40 43. Vacuna según una de las reivindicaciones 32 a 41, en la que la vacuna puede inducir tanto una respuesta inmunitaria sistémica como una respuesta inmunitaria de la mucosa contra los agentes virales infecciosos.
