



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 669**

51 Int. Cl.:
C12N 15/40 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
A61K 39/187 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00909798 .1**
86 Fecha de presentación : **08.03.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1161537**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2001**

54 Título: **Pestivirus que no se propagan.**

30 Prioridad: **08.03.1999 EP 99200669**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73 Titular/es:
**Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Bornsesteeg 53
6708 PD Wageningen, NL**

72 Inventor/es:
**Moormann, Robertus, Jacobus, Maria;
Widjoatmodjo, Myra, Noorely y
Van Rijn, Petrus Antonius**

74 Agente: **Cañadell Isern, Roberto**

ES 2 273 669 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

Pestivirus que no se propagan.

5 La invención se refiere a vacunas utilizadas en la erradicación o control de infecciones por pestivirus, particularmente las utilizadas en cerdos o rumiantes.

10 El género Pestivirus de la familia Flaviridae suele consistir en el virus de la fiebre porcina clásica (CSFV), el virus de la enfermedad de Border (BDV) y el virus de la diarrea viral bovina (BVDV). Se han secuenciado genomas de diversas cepas de BVDV, BDV y CSFV, se han expresado proteínas pestivirales individuales y se han generado virus derivados de copias de ADN (longitud normal/total) del genoma de ARN de BVDV y CSFV (Renard *et al.*, 1987 solicitud de patente EP 0208672; Collet *et al.*, 1988, *Virology* 165, 191-199; Mendez *et al.*, *J. Virol.* 72:4737-4745; 1988; Deng and Brock, 1992, *Virology* 1991, 865-679; Meyers *et al.*, 1989, *Virology* 171, 555-567; Moormann and Wensvoort, 1989, PCT/NL90/00092; Moormann and Van Rijn; 1994, PCT/NL95/ 00214; Ridpath *et al.*, 1997, *Virus Res*, 50: 237-243; Becker *et al.*, 1998, *J. Virol.* 72:5165-5173, Meyers *et al.*, *J. Virol.* 70:1588-1595, 1996.

15 El genoma del pestivirus es una molécula de ARN de cadena positiva de aproximadamente 12,5 kilobases, que contiene un gran marco de lectura abierto. El marco de lectura abierto se traduce a una poliproteína hipotética de aproximadamente 4.000 aminoácidos, que es procesada por proteasas codificadas por célula y virus. El marco de lectura abierto está flanqueado por dos regiones no traducidas conservadas que intervienen probablemente en la replicación del genoma. La región no codificadora 5' también juega un papel en el comienzo de la traducción.

20 La poliproteína que está procesada co- y post- traduccionalmente por proteasas virales y celulares contiene todas las proteínas virales estructurales y no estructurales (para una idea general, véase C.M. Rice: In *Fields Virology* (Virología de campo), tercera edición, 1996 Flaviridae; *The Viruses and their Replication*, Chapter 30 pp. 931-959) (Los virus y su replicación, capítulo 30, páginas 931-959). Las proteínas virales estructurales, la proteína de cápside C y las proteínas de envoltura E^{ms}, E1 y E2 están situadas en la parte N-terminal de la poliproteína. La proteína no estructural entre las cuales está la proteasa de serina NS3 y complejo de replicasa ARN NS5A y NS5B están situadas en la parte C-terminal de la poliproteína.

25 Los pestivirus están estrechamente relacionados, tanto estructural como antigénicamente. Hasta la fecha, los pestivirus como BDV, BVDV y CSFV han sido aislados de especies diferentes, principalmente de rumiantes y cerdos, aunque también se ha informado de infecciones de seres humanos. Todos los pestivirus tienen en común la aptitud para inducir infecciones congénitas de fetos cuando queda infectado un animal preñado. Estas infecciones fetales se producen por infección a través de la placenta si la madre padece una infección aguda durante la preñez o si es infectada de forma persistente por un pestivirus (Oirschot, J.T.van Vet, *Microbiol.* 4:1178-132, 1979; Baker J.C. *JAVEA* 190:19949-1458, 1987; Nettleton P.F. *et al.*, *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 15:179-188, 1992, Wensvoort G. and Terpstra C. *Res. Vet. Sci.* 45:143-148, 1988).

30 En la actualidad se dispone de vacunas contra pestivirus de sub-unidad y vivas-modificadas y muertas. Las vacunas de virus vivos presentan la ventaja, respecto de los demás tipos de vacuna, de lograr niveles de inmunidad más elevados sin necesidad de vacunación de refuerzo. No obstante, entre las desventajas se encuentra la aptitud de las cepas vacunales para cruzar la placenta e inducir todas las consecuencias conocidas de infección por pestivirus fetal (Liess B *et al.*, *Zentralblat Veterinarmed. [B]* 31:669-681, 1984). Además, las vacunas contra pestivirus vivas-modificadas son las causantes, según se ha indicado, de efectos inmuno supresores, probablemente debido a su aptitud para propagarse por el animal vacunado y replicar durante varios días en linfocitos y neutrófilos, causando de este modo leucopenia y propagación horizontal (Roth J.A. and Kaeberle M.L., *Am. J. Vet. Res.* 44:2366-2372, 1983). Además, se ha informado de epizotia de enfermedad mucosal (consecuencia de una infección persistente por BVDV) y de infecciones agudas por BVDV tras la vacunación con vacunas con virus vivos (Lambert G., *JAVEA* 163:874-876, 1973).

35 Por consiguiente, a pesar de que se considera por lo general que las vacunas vivas tienen propiedades inmunológicas óptimas, existe una clara desventaja en la utilización de una vacuna de pestivirus vivo en el control y la erradicación de infecciones por pestivirus.

40 Estas desventajas están relacionadas con el hecho de que una vacuna pestiviral viva convencional, tras la inoculación del animal con la vacuna, está sujeta a toda una serie de replications y se propaga por todo el animal vacunado. Esto puede tener como resultado el derrame (shedding) mencionado anteriormente del virus (propagación horizontal), que después de todo constituye un resultado normal de cualquier infección viral, en la que un animal es infectado por un virus, tras lo cual dicho virus replica, se propaga por el cuerpo, puede volver a replicar y, finalmente, es expulsado del animal infectado propagándose e infectando a un segundo animal, por contacto.

45 Todavía más graves son sin embargo las infecciones congénitas por pestivirus, que causan la denominada propagación vertical. Los fetos son infectados cuando el virus se propaga por el cuerpo de un animal preñado y el virus cruza la barrera trans-placentar. Según el momento de gestación y la virulencia del virus infectante, se pueden observar varios efectos. Entre los efectos graves se encuentra la muerte de embriones o fetos, malformaciones, momificación, el hecho de que nazcan muertos o la muerte perinatal (Liess B, Vol. 2 *Disease Monographs* (E.P.J. Gibas, Editor) Academia Press, London, pp. 627-650, 1982). Las infecciones por virus menos virulentos o las infecciones en estadios posteriores de la gestación suelen tener como resultado el nacimiento de descendencia infectada congénitamente (van

Oirschot, J.T., en: Classical swine fever and related viral infections B. Liess (fiebre porcina clásica e infecciones virales afines) B. Liess (ed) Martines Nijhoff Publishing Boston páginas 1-25, 1988), es decir que las terneras, los corderos o los cerditos suelen quedar infectados de por vida de modo persistente, muchas veces no se desarrollan bien y son propensos a la inmuno supresión y a patologías (sub clínicas) tales como patología mucosal con BVDV (Brownlie J. Arch. Virol. [Suppl. 3]: 73-96, 1991)), y finalmente una fuente continua de infección para el resto de la población.

La invención presenta partículas similares al pestivirus y una vacuna de pestivirus viva-modificada que comprende un ácido nucleico o dicha partícula es capaz de producir una respuesta inmune adecuada sin que se propague por el animal vacunado, evitando así las consecuencias negativas de la propagación viral. De preferencia, dicha respuesta inmune permite la discriminación serológica entre animales vacunados y animales infectados por pestivirus naturales.

La propagación viral o la propagación de ácido nucleico viral en un animal inoculado se podría evitar también teóricamente inoculando un animal con una partícula de interferencia defectuosa pestiviral (DI) como por ejemplo la conocida por Meyers *et al.*, (J. Virol. 70: 1588-1595, 1996) o Kupfemann *et al.*, J. Virol 70: 8175-8181, 1996) si se pudiera obtener las partículas DI libres del pestivirus ayudante necesario para su replicación, lo cual es, para todos los efectos prácticos, casi imposible. La inoculación del animal con una preparación DI que contiene el virus ayudante también frustraría todos los objetivos; el virus ayudante se propagaría por todo el animal sometiéndole a la infección no deseada por pestivirus y permitiendo la transmisión horizontal y vertical. Por consiguiente, la discriminación serológica tampoco es posible ya que los anticuerpos dirigidos contra el virus ayudante serían detectados.

No obstante, incluso si se lograra obtener las partículas DI libres del virus ayudante, no daría ningún resultado ya que las partículas de DI pestiviral no contienen ácido nucleico que permita obtener una respuesta inmune adecuada, porque el ácido nucleico DI no contiene esencialmente el ácido nucleico codificador para proteínas estructurales o partes inmuno-dominantes de las mismas, responsables de dicha respuesta inmune adecuada.

En una primera realización, la invención se refiere a un ácido nucleico recombinante derivado de un pestivirus del que se suprime funcionalmente ácido nucleico, un fragmento que codifica al menos una proteína pestiviral o prácticamente parte de la misma relacionada con la propagación viral, permitiendo dicho ácido nucleico la replicación de ARN en una célula adecuada y codificando al menos una proteína estructural funcional o por lo menos una parte inmuno dominante de la misma.

La expresión “suprimido funcionalmente” aquí empleada se refiere a cualquier inserción, modificación o supresión del genoma viral que tiene como resultado la producción, a través de la transcripción y la traducción del ácido nucleico en una célula, de preferencia una célula apta para la transcripción y la traducción de dicho ácido nucleico, de preferencia una célula en un animal que se va a vacunar, de una proteína viral por lo menos funcionalmente inactivada o un fragmento de la misma en su estado natural que interviene en la propagación viral o por lo menos en la transmisión hacia o la infección de células. Debido a dicha proteína inactivada, incluso cuando se incorpora en la partícula viral que comprende dicho ácido nucleico, la citada supresión funcional ha incapacitado dicha partícula para que no pueda entrar o infectar una célula que normalmente quedaría infectada por la partícula si dicha proteína o fragmento funcional hubiera funcionado adecuadamente en la partícula. De este modo, aunque la partícula todavía puede formarse, dicha partícula ya no es infecciosa para otras células y ya no puede contribuir, por la vía de la infección, a la propagación o transmisión de dicha partícula a otra célula, pese al hecho de que una célula una vez infectada puede fusionarse/condensarse y/o dividirse, generando así múltiples células que comprenden dicha partícula.

Dicho ácido nucleico permite la replicación del ARN en una célula adecuada y codifica por lo menos una proteína protectora funcional o por lo menos una parte inmuno dominante de la misma. En una realización preferida de la invención, la proteína protectora es una proteína estructural, en general, las partes inmuno dominantes de proteínas de envoltura estructural montan la mejor respuesta inmune de las proteínas pestivirales, aunque algunas proteínas no estructurales, como por ejemplo NS3, también son capaces de montar/organizar una respuesta inmune suficiente para algunos fines y por lo tanto también se pueden incluir. Por consiguiente, aunque la propagación por infección ha sido evitada ahora, el hecho de que sea posible la replicación de ARN permite una o más series de transcripción y traducción en dicha célula de proteínas inmunológicamente dominantes contra las cuales un animal vacunado organiza una respuesta inmune mediante la cual queda por lo menos en parte protegido contra las consecuencias de la infección con un pestivirus natural. La/las proteínas traducidas o fragmento/fragmentos de las mismas son en si mismas responsables de dicha respuesta inmune y pueden también formar parte de una partícula similar a un virus, que comprenda incluso el ARN replicado, pero dicha partícula no es infecciosa debido al hecho de que una característica funcional esencial de la proteína funcionalmente suprimida no existe.

Aunque en una realización el ácido nucleico aquí descrito puede comprender ADN con el fin de permitir la vacunación por ADN, en otra realización la invención se refiere a ácido nucleico, donde dicho ácido nucleico es ARN, para permitir la vacunación de ARN. Dicho ARN es por ejemplo empaquetado en una partícula similar a un virus en una célula de complemento como presenta la invención provista de una proteína funcional o fragmento (derivado de dicha célula complementaria) responsable de interacciones virus-célula que permiten que dicha partícula entre en o infecte una célula adecuada o pueda introducirse de otro modo en las células del animal, como por ejemplo por vía intradermal.

En una realización preferida, la invención se refiere a un ácido nucleico en el que dicha supresión funcional está en un fragmento que codifica la proteína de envoltura. Lo esencial en la infección con pestivirus es la interacción de

ES 2 273 669 T3

5 proteínas estructurales virales con la superficie o un receptor de la célula susceptible. Es a través de esta interacción que se produce la infección. Especialmente las proteínas de envoltura E² y/o E^{ms} proporcionan esta interacción y la supresión funcional de por lo menos una de estas proteínas de envoltura o fragmentos funcionales de la misma (en particular aquellos fragmentos que intervienen en la interacción del receptor o de la superficie) conduce a la construcción de infectividad.

10 En la descripción detallada de la invención, se dan varios ejemplos de estas supresiones funcionales en un ácido nucleico que codifica proteína relacionada con propagación viral. Uno de los ejemplos comprende una modificación de una cisteína codificadora de codón de ácido nucleico, donde se induce un cambio conformacional en un fragmento de proteína pestiviral, de preferencia una proteína de envoltura, de tal forma que dicha proteína funcionalmente suprimida, al incorporarse en dicha partícula incapacita a dicha partícula para que no pueda entrar en una célula que, de otro modo, es accesible. Uno de los ejemplos es la modificación de un codón, que da como resultado un cambio de cisteína, por ejemplo en la posición de aminoácido 422 o para este caso, en la posición 381 de la secuencia de aminoácidos de la proteína E^{ms} de CSFV, o en ubicaciones funcionalmente correspondientes en la proteína E^{ms} o de CSFV u otros pestivirus que, obtenidos por ejemplo por comparación de secuencia, también son ofrecidos por la invención. Otro ejemplo comprende la supresión de grandes fragmentos de un ácido nucleico que codifica una proteína pestiviral suprimiendo por ejemplo por lo menos un fragmento que codifica posiciones aproximadamente correspondientes 170-268 u otros fragmentos funcionalmente afines de las proteínas de cápside C de CSFV u otros pestivirus o suprimiendo por lo menos un fragmento que codifica posiciones aproximadamente correspondientes 500-665 u otros fragmentos funcionalmente afines de las proteínas E1 de CSFV u otros pestivirus o comprende la supresión de fragmentos que codifican etc. Otro ejemplo comprende la supresión de grandes fragmentos de un ácido nucleico que codifica una proteína pestiviral, por ejemplo suprimiendo al menos un fragmento que codifica posiciones correspondientes 381, 422, 381-422, 405-436, 422-488 o 273-488 u otros fragmentos funcionalmente afines de la proteína E^{ms} de CSFV u otros pestivirus o comprende la supresión de fragmentos que codifican posiciones correspondientes 698-1008 o 689-1062 en la proteína E2 de CSFV u otros fragmentos funcionalmente afines de la proteína E2 de CSFV u otros pestivirus.

30 En una realización preferida, la invención se refiere a un ácido nucleico en el que la citada supresión funcional comprende una parte inmuno dominante de dicha proteína. Por ejemplo, suprimiendo un fragmento correspondiente a aproximadamente las posiciones de aminoácidos 422-436 o 422-488 de la proteína E^{ms}, o correspondiente a las posiciones aproximadas de aminoácidos 693-746, 785-870, 689-870 u 800-864 de la proteína E2 o cualquier otro fragmento relacionado con una respuesta inmune discernible contra dicha proteína presenta la ventaja adicional de obtener una vacuna discernible.

35 Suprimiendo dicho fragmento serológicamente discernible, al final se obtiene una vacuna marcadora que permite la discriminación serológica entre animales vacunados y animales infectados por un pestivirus natural.

40 Cuando se construye una vacuna, hay que tener en cuenta que (tipo de) test serológico se prefiere, una vez que se ha empleado la vacuna en el campo. Para CSFV, deberá ser específica del genotipo que bloquea, utilizando tests diagnósticos basados en NS3. No obstante, la selección de E2 o E^{ms} como antígenos diagnósticos dificulta el desarrollo de una vacuna que utiliza las propiedades protectoras de estas proteínas. La invención ofrece, sorprendentemente, una vacuna de pestivirus, en la cual se ha suprimido (funcionalmente) una proteína, de preferencia una proteína de envoltura que comprende una parte inmuno dominante específica que, según se piensa es responsable de la protección, que permite, sorprendentemente, la discriminación serológica sin dificultar gravemente las propiedades protegidas.

45 Dichas propiedades protectoras son aportadas, de forma óptima, por un ácido nucleico como el que se describe aquí, que tiene un fragmento que codifica una proteína protectora que es una proteína estructural funcional, de preferencia una proteína de envoltura funcional o por lo menos una parte inmuno dominante de la misma. Se prefiere todavía más, en la invención, un ácido nucleico que comprende un fragmento que codifica una supresión funcional en una proteína de envoltura pestiviral, por ejemplo E2 o E^{ms}, respectivamente, y que comprende además un ácido nucleico que codifica otra proteína de envoltura protectora, o una parte inmuno dominante de la misma, por ejemplo E^{ms} o E2 o parte de las mismas, respectivamente.

55 En otra realización, la invención se refiere a un ácido nucleico que comprende adicionalmente un fragmento de ácido nucleico no-pestivirus, a un ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga o fragmentos de la misma. La proteína heteróloga (fragmentos) se puede usar como marcador o se puede emplear para obtener una inmuno respuesta protectora). Las secuencias del marcador son de preferencia altamente antigénicas y en una realización de la invención, derivadas de preferencia de un (micro) organismo que no replica en animales. Pueden codificar productos génicos completos conocidos (p. ej. proteínas de cápside o de envoltura o partes antigénicas de productos génicos (p. ej. epítotos). Las secuencias de marcador pueden codificar también antígenos artificiales que no se suelen encontrar en la naturaleza o marcadores histoquímicos como galactosidasa de *Escherichia coli* β , alcohol de hidrogenasa de drosófila, fosfatasa alcalina placentar humana, luciferasa de luciérnaga y cloranfenicol acetil transferasa. La invención se refiere también a un ácido nucleico en el que dicho fragmento nopestivirus se deriva de un patógeno que deriva de una o más proteínas (fragmentos) induciendo inmunidad protectora contra la enfermedad causada por el patógeno, como un fragmento derivado de parvovirus, coronavirus, virus del síndrome reproductor y virus respiratorio porcino, virus del herpes, virus de la gripe y otros muchos patógenos conocidos en el estado de la técnica. La invención se refiere también a un ácido nucleico en el que dicho fragmento no-pestivirus se deriva de una citoquina que induce señales

de inmuno regulación o inmuno estimulación cuando se expresa. En el estado de la técnica, se conocen numerosas citoquinas como las interleuquinas, interferonas y factores de estimulación de colonia o de necrosis tumoral.

La invención se refiere además a un ácido nucleico como el descrito aquí donde la citada célula adecuada comprende un constructo de ácido nucleico que codifica por lo menos dicha proteína pestiviral o prácticamente parte de la misma relacionada con la propagación viral. Esta célula adecuada comprende una célula que contiene un ácido nucleico recombinante que codifica por lo menos una proteína pestiviral o una parte sustancial de la misma relativa a la propagación viral y permite el empaquetado de dicha proteína pestiviral o una parte importante de la misma en una partícula similar al pestivirus. Esta célula complementaria o de empaquetado según la invención permite que el ácido nucleico o el ácido nucleico replicado que se describe aquí forma parte de una partícula similar al pestivirus, donde una parte importante de la proteína (fragmentos) que compone dicha partícula se deriva de la traducción y la transcripción en dicha célula de ácido nucleico como el descrito aquí, que se complementa con una proteína (fragmento) relativa a la propagación viral derivada de dicho constructo de ácido nucleico que se expresa también en dicha célula complementaria. Dicha proteína o parte sustancial de la misma relativa a la propagación viral se expresa de forma estable, de modo inducible o constitutivo, a partir de un ácido nucleico integrado en el genoma celular.

La invención ofrece también un método para obtener una partícula similar al pestivirus que comprende la transfección de una célula de este tipo según la invención con un ácido nucleico según la invención, y que permite además que el citado ácido nucleico replique en la mencionada célula, permitiendo además que el ácido nucleico replicado forme parte de una partícula que comprende por lo menos dicha proteína pestiviral o parte de la misma derivada de la mencionada célula, y comprende además la recolección de dicha partícula. Esta utilización de ácido nucleico según la invención o una célula según la invención en la producción de una partícula similar al pestivirus es lo que ofrece la invención. Transfectando dicha célula con ácido nucleico según la invención y permitiendo que dicho ácido nucleico replique, se empaqueta un ARN replicado de dicho ácido nucleico en la partícula similar al pestivirus mencionada, partícula que comprende también una proteína funcional o un conjunto de proteínas relacionadas con la propagación viral, por lo menos parcialmente derivadas del constructo de ácido nucleico con el que se ha proporcionado también dicha célula complementaria o de empaquetado. Asimismo, la invención proporciona una partícula similar al pestivirus, que se puede obtener mediante un método según la invención; por ejemplo la invención proporciona una partícula similar al pestivirus (o una multitud de partículas de este tipo) que comprende ácido nucleico derivado de un pestivirus, suprimiéndose funcionalmente el ácido nucleico un fragmento que codifica por lo menos una proteína pestiviral o una parte sustancial de la misma relacionada con la propagación viral, permitiendo dicho ácido nucleico la replicación de ARN en una célula adecuada y codificando por lo menos una proteína estructural funcional o por lo menos una parte inmuno dominante de una proteína estructural inmuno dominante. Dicha partícula se puede derivar de un tipo de pestivirus, aunque también puede ser una partícula llamada híbrida, donde su genoma y parte de su proteína constitutiva (fragmento) se derivan de un tipo de pestivirus como BVDV o BDV, pero donde la proteína complementaria (fragmento) se derivan de otro tipo de pestivirus como CSFV. Dicha partícula, por haber sido producida en la mencionada célula complementaria o de empaquetado es en sí mismo infecciosa y por lo tanto capaz de introducirse en una segunda célula adecuada, como una célula no complementaria capaz de ser infectada con un tipo de pestivirus en general o una célula susceptible como la de un animal que se va a vacunar. Cuando se replica en dicha segunda célula (que es una célula no complementaria) se produce una nueva partícula que carece sin embargo de la posibilidad de infectar otra célula por lo que resulta incapaz de propagarse por infección. Por consiguiente, cuando las partículas producidas en una célula complementaria se utilizan para infectar un animal, como cuando se utilizan en o como vacuna, las partículas infectarán células adecuadas en el animal vacunado, a partir de las cuales no se generarán sin embargo nuevas partículas que se propaguen por infección a otras células, demostrándose de este modo los requisitos de una vacuna no propagable (no transmisible).

La invención también ofrece un método para obtener una vacuna de pestivirus no propagable que comprende la obtención de una multitud de partículas con un método según la invención y la preparación de una suspensión de dichas partículas en un diluyente adecuado. En el estado de la técnica, se conocen diluyentes adecuados, de preferencia a base de agua, como medio (de cultivo) o solución de sal (tamponada). La invención también ofrece un método para obtener una vacuna de pestivirus no propagable que comprende la obtención de una multitud de partículas con un método según la invención y la preparación de una suspensión de dichas partículas, combinando dicha suspensión con un adyuvante. Como adyuvantes adecuados se pueden citar las emulsiones agua-aceite, sales de aluminio u otros adyuvantes conocidos en el estado de la técnica; véase por ejemplo Vogel F.R. and Powell M.F, A compendium of adjuvants and excipients. In: Vaccine design (Compendio de adyuvantes y excipientes en: Diseño de vacuna) (eds) Powell and Newmann, Pharmaceutical Biotechnology Series, Plenum, Nueva York, 1994. La invención proporciona por lo tanto una vacuna de pestivirus no propagable que se puede obtener con un método según la invención. La invención proporciona una vacuna que comprende un ácido nucleico según la invención o una partícula similar al pestivirus según la invención y comprende además por lo menos un adyuvante. La eficacia óptima de la vacuna se consigue si su ácido nucleico se dirige/apunta hacia células que presentan antígeno adecuado. La replicación y la traducción del ARN viral en estas células darán como resultado el proceso de antígeno viral para su presentación óptima al sistema inmunológico.

En una realización de la invención, la vacuna consiste en partículas similares al pestivirus producidas en una célula de empaquetadura complementaria que, con o sin adyuvante, se aplican al animal por vías diferentes como por ejemplo, sin que esto suponga limitación, vacunación intranasal, intramuscular, intradérmica o intravenosa o una combinación de dichas vías. En otra realización de la invención, la vacuna consiste en ADN o ARN esencialmente desnudo según

la invención que, con o sin adyuvante, se aplica de preferencia al animal por vía intradermal. No obstante, también resultan adecuadas vías alternativas como, sin que esto suponga limitación alguna, la vía intramuscular.

Se proporciona una vacuna de este tipo donde el citado ácido nucleico se deriva de una cepa de pestivirus (vacuna) a partir de la cual se proporciona o se pueden proporcionar copias infecciosas y de cADN (de longitud completa), como por ejemplo virus de cepa C o de otro pestivirus, otro tipo de vacuna o tipo natural de un virus de la fiebre porcina clásica, virus de diarrea viral bovina o virus de enfermedad de Border o virus híbrido. Para mayor sencillez, se utiliza aquí la numeración de la secuencia de cepa C para todas las secuencias de pestivirus. De hecho, en otras secuencias de pestivirus la numeración de las proteínas E^{RNS} y E2 en la (poli) proteína pueden diferir ligeramente debido a diferencias de longitud en las secuencias (poli) proteínicas de cepas de pestivirus. Basándose en la homología, los términos N y C de la secuencia E2 o E^{RNS} de cualquier cepa de pestivirus pueden determinarse sin embargo fácilmente como lo indica Rumenapf T. *et al.*, J. Virol 67:3288-3294, 1993 o Elbers K. *et al.* J. Virol. 70:4131-4135, 1996.

La invención también ofrece un método para controlar y/o erradicar una infección por pestivirus, que comprende la vacunación de por lo menos un animal con una vacuna según la invención. Dicha vacunación sirve para evitar o mitigar una infección por pestivirus natural que pueda tener dicho animal o con la que pueda encontrarse debido a la presencia de un virus natural en su entorno. Como no se produce ninguna propagación de la vacuna, el animal vacunado puede ser vacunado de forma seguro incluso si está preñado y no se produce ningún riesgo de infecciones vaginales congénitas de sus fetos o propagación de la vacuna de un animal vacunado a un animal no vacunado debido a la naturaleza no propagable de la vacuna.

Además, la invención proporciona un método para controlar y/o erradicar una infección por pestivirus que comprende la realización de un test en un animal vacunado con una vacuna según la invención para detectar la presencia de anticuerpos específicos de un pestivirus natural. En una realización preferida, en dicho método para controlar dicha vacuna se utiliza una vacuna de marcador. La utilización de dicha vacuna de marcador, como la que ofrece la invención, permite la discriminación serológica entre animales vacunados y animales infectados por virus y también la eliminación controlada del virus. Para la discriminación serológica de genotipos de pestivirus no basta con ofrecer protección con una vacuna que contiene las proteínas de protección E2 o E^{RNS} pero no la proteína NS3 y detectar infecciones con tests basados en NS3. NS3 no es específico del genotipo, por lo menos no produce anticuerpos específicos del genotipo para permitir la discriminación entre genotipos. Aunque no se puede hacer ninguna objeción a la utilización de los tests para diagnosticar infecciones BVDV o BDV, dichas pruebas diagnosticas difícilmente se pueden utilizar en el período posterior a las campañas de vacunación contra por ejemplo CSFV en cerdos. La circulación de anticuerpos NS-BVD o NS3-BVDV producirá toda una serie de resultados positivos-falsos, que conducen a sospechas de infección por CSFV cuando en realidad no existen en las poblaciones de cerdo sometidas a prueba. De preferencia, las pruebas se usan para detectar anticuerpos con E2 o fragmentos serológicamente discernibles del mismo cuando la supresión funcional es en el fragmento de ácido nucleico que codifica la proteína E2 y la proteína protectora comprende principalmente proteína protectora E^{ms} o fragmentos de la misma opcionalmente suplementados con otros (fragmentos) de proteína protectora o viceversa, las pruebas se usan para detectar anticuerpos contra E^{ms} o fragmentos serológicamente discernibles de los mismos, si la supresión funcional es en el fragmento de ácido nucleico que codifica la proteína E^{ms} y la proteína protectora comprende principalmente proteína E2 o fragmentos de la misma, opcionalmente suplementados con otros (fragmentos) de proteína protectora.

La invención también presenta un animal vacunado con una vacuna de pestivirus no propagable (no transmisible) según la invención. Como este animal no corre el peligro de propagar la vacuna a animales con los que entre en contacto o con sus fetos, dicho animal presenta ventajas considerables respecto de los animales vacunados con vacunas de pestivirus convencionales. Puede ser vendido por ejemplo durante el período inmediatamente posterior a la vacunación, mientras que de otro modo la venta se tiene que restringir debido al riesgo de propagación.

La invención se explica a continuación con más detalle sin que esto suponga limitación alguna.

Ejemplo 1

Construcción y caracterización de cepas de CSFV recombinante Flc22, Flc23, Flc30, Flc31, Flc32 y Flc33

Materiales y métodos

Células y virus

Se cultivaron células de riñón de cerdo (SK6-M, EP 0 351 901 B1) en medio basal de Eagle que contenía 5% de suero bovino fetal, glutamina (0,3 mg/ml) y los antibióticos penicilina (200 U/ml), estreptomocina (0,2 mg/ml) y micostatina (100 U/ml). Se comprobó la ausencia de anticuerpos BVDV y BDV en el suero bovino fetal según lo descrito anteriormente (Moormann *et al.*, 1990. Virology 177:184-198).

Se cultivaron virus de CSFV cepa C recombinante Flc22, Flc23, Flc30, Flc31, Flc32 y Flc33 y se prepararon en la forma descrita anteriormente (Moormann *et al.*, 1996. J. Virol. 70: 763-770) con una ligera modificación, el medio de cultivo de células SK6 se cambió por medio basal de Eagle suplementado. Se prepararon estirpes (stocks) de virus sometiendo a "passaging" el virus de 8 a 10 veces por células SK6c26. Los títulos de los virus obtenidos oscilaron entre 0,5 y 5,8 TCID₅₀/ml.

ES 2 273 669 T3

Construcción de una línea celular estable SK6 que expresa E^{ms}

El plásmido pPRKc16 contiene el gen E2 de C cepa CSFV bajo control de las señales de transcripción y de traducción del vector de expresión pEVhisD12. El plásmido pEVhis D12 es un vector que contiene secuencias de potenciador/ promotor del gen inmediatamente anterior del cito megalovirus humano seguido de un codón de iniciación de traducción y el gen histidinol de hidrogenasa (hisD) bajo control del promotor temprano SV40 que se puede utilizar como marcador selectivo (Peeters *et al.*, 1992, J. Virol. 66: 894-905). El gen E^{ms} del C cepa CSFV se amplificó mediante reacción PCR con iniciadores p974 5' AAG AAA AGA TCT AAA GCC CTA TTG GCA TGG 3' y p976 5' TTGTT ACA GCT GCA TAT GTA CCC ATAT TTT GCT TG 3'. Tras la digestión de Bg/III, el fragmento PCR se ligó dentro del vector pPRKc16, que fue digerido con SalI rellenado y posteriormente digerido con Bg/II. El plásmido resultante pPRKc26 contiene el gen E^{ms} del CSFV cepa C.

Para la transfección de células SK6 con pPRKc26, se diluyó lipofectamina (20 µg) (Gibco-BRL) en 50 µl Optimem-I mezclado con ADM plásmido (1 ug) diluido en 50 µl de Optimem-I (Gibco-BRL) y se dejó reposar esta mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células SK6 cultivadas en placas para cultivo de tejido de 10 cm² se lavaron con Optimem-I. Se añadió Optimem-I fresco (0,5 ml) seguido de la mezcla de transfección de ADN. Tras 4 horas de incubación a 37°C, se quitó la mezcla de transfección y se aportó a los pocillos medio que contenía 5 mM de histidinol. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se tripsinizaron y cultivaron células en placas de 90 mm². El medio se cambió cada 3-4 días. Después de 15 días se recogieron colonias individuales y se cultivaron en placas de 20 cm². La expresión de E^{ms} se determinó inmuno-tiñendo las células con Mabs C5 (Wensvoort 1989, Thesis, Universidad de Utrecht) dirigida contra E^{ms} de CSFV cepa C. Se realizó una segunda serie de clonación tripsinizando y cultivando las células en dilución (10 veces) en placas de microtitulación en un medio que contenía 5 mM de histidinol. Se tripsinizaron pocillos con colonias individuales y se determinó la expresión de E^{ms} por inmuno-tinción (Wensvoort *et al.*, 1988, Vet Microbiol. 17 129-140) de las células Mab C5. La línea celular establecida SK6 que expresa constitutivamente E^{ms} recibió el nombre de SK6c26.

Caracterización de la línea celular estable SK6c26

Se comprobó la expresión de E^{ms} de la línea celular SK6c26 en una tinción de inmuno peroxidasa con anticuerpos monoclonales específicos de E^{ms} (Mabs) C5, específico de E^{ms} de la cepa C (Wensvoort 1989, Thesis Universidad de Utrecht), 140,1 y 137,5 dirigido contra E^{ms} de cepas CSFV y Brescia (de Smit *et al.*, datos no publicados), y un suero de conejo policlonal, R716 (Hulst *et al.*, J. Virol. 1998, 72:151-157). La actividad RNasa de E^{ms} expresada en la línea celular de SK6c26 se midió modificando el método de Brown and Ho (Plant Physol. 1986, 82: 801-806) tal como se describe en Hulst *et al.* (J. Virol. 1998, 72:151-157). La cantidad de E^{ms} se determinó mediante un ELISA indirecto basado en Mab C5 como anticuerpo de recubrimiento y Mab 140,1 conjugado con peroxidasa de rábano picante como anticuerpo de detección según lo descrito por Hulst *et al.*, (J. Virol. 1998, 72:151-157).

Construcción de CSFV E^{ms} recombinante

pPRKc5 (Hulst *et al.*, Virol. 1998, 72: 151-157) es un derivado de pEVhisD12 que contiene la secuencia de nucleótido de la autoproteasa y genes estructurales de C cepa CSFV (CSFV cepa C ¿??), sin E^{ms} (N^{pro} C y E1-E2, aminoácidos (a.a) 5-267 y 495-1063 de la secuencia de aminoácidos de CSFV cepa C) (Moormann *et al.*, 1996, J. Virol. 70: 763-770). Se introdujo una zona única Stu I en pPRKc5 en la posición en que se suprimió E^{ms}.

Dos oligómeros complementarios, el oligómero directo p1135 (5'CCG AAA ATA TAA CTC AAT GGT TTG GCG CTT ATG 3') y el oligómero inverso p1136 (5' CAT AAG CGC CAA ACC ATT GAG TTA TAT TTTCGG 3') se fosforilaron con T4 ADN quinasa, se hibridaron e insertaron por medio de ligación en un vector pPRKc5 digerido con StuI tratado con fosfatasa alcalina. Este constructo recibió el nombre de pPRKc48. Este constructo alberga los cinco aminoácidos N-terminal más lejanos y los seis aminoácidos C-terminal más lejanos de E^{ms} (supresión a.a. 273-488) (figura 1 y figura 2A).

Se realizó una supresión de aminoácidos 422 a 488 en E^{ms} de cepa C mediante amplificación PCR del gen E^{ms} utilizando el iniciador directo p974 y el iniciador inverso p1120 5' GAC GAG TTC GGC ATA GGC GCC AAA CCA TGG GCT CTC TATA AC TGT AAC 3'. El epítipo HA, secuencia a.a. YPYDVPDYA (Wilson *et al.*, Cell 1984, 37, 767-78) se construyó hibridando los nucleótidos complementarios 3' de P1125 5' GAC AGA TCT ATC GAT TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT 3' y P 1125 5' GAC GTC GAC GGA TCC AGC GTA ATC TGG AAC ATC 3' (subrayado en la secuencia HA) y rellenando los nucleótidos de cadena simple 5' en un PCR con polimerasa Vent (New England Biolabs). El producto PCR del epítipo HA fue digerido con Cla/SalI y el producto PCR de E^{ms} fue digerido con BglIII/ NarI. Los dos productos PCR digeridos se ligaron por medio de ligadura de tres puntos en el vector pPRKc16 que fue digerido con BglII y SalI. El resultado fue un plásmido pPRKc43 que contenía un E^{ms} recombinante con una supresión de aminoácidos 422 a 488 con un epítipo HA terminal C (Figura 1 y figura 2B). Tras la amplificación de PCR del plásmido pPRKc43 con el iniciador directo p935 5' CCG AAA ATA TAA CTC AAT GG 3' y el iniciador inverso p925 5' CATA AG CGC CAA ACC AG GTT 3', el producto PCR se fosforiló con T4 ADN quinasa y ulteriormente se ligó dentro del vector pPRKc5 digerido con StuI tratado con fosforilasa alcalina. El constructo resultante que alberga la secuencia de nucleótidos de la autoproteasa, las proteínas estructurales de cepa C y el E^{ms} recombinante que carece de a.a. 422 a 488 recibió el nombre de pPRKc50 (figura 2).

ES 2 273 669 T3

Se realizó un mutante de supresión que carece de aminoácidos 436 a 488 de E^{ms} de cepa C mediante amplificación PCR del gen E^{ms} utilizando el iniciador directo p974 y el iniciador inverso p1121 5' GAC GGA TTC GGC ATA GGC GCC AAA CCA ATC CCC ATA CAA GGT ATC CTC 3'. Tras la digestión de Bgl/II/NarI, el fragmento se ligó con el producto PCR de epítipo HA digerido con ClaI/SalI mediante una ligadura de tres puntos en el vector pPRKc16, que fue digerido con BglIII/SalI. El plásmido resultante pPRKc42 fue amplificado PCR con el iniciador directo p035 y el iniciador inverso p925. Ese producto PCR se fosforiló con T4 ADN quinasa y se ligó ulteriormente dentro del vector pPRKc5 digerido con StuI tratado fosfatasa alcalina. El constructo resultante que alberga la secuencia de nucleótidos de la autoproteasa, las proteínas estructurales de cepa C y el E^{ms} recombinante que carece de a.a. 436-488 recibe el nombre de pPRKc49.

Se realizó un mutante de supresión que carece de aminoácidos 422 a 436 mediante amplificación de PCR de plásmido pPRKc129 con los iniciadores p1147 5' CAA ACT GCC GCA CTA ATG TGG GCT CTC TAT AAC TGT 3' y p925. Seguidamente, el producto PCR obtenido se aisló de gel agarosa y se utilizó como iniciador inverso en una segunda reacción PCR con iniciador p935 como iniciador directo para la amplificación de pPRKc129. Este segundo producto PCR fue quinado y se ligó dentro del vector pPRKc5 tratado con StuI tratado con fosfatasa alcalina, obteniéndose como resultado el plásmido pPRKc51.

Una sustitución de cisteína (CYS) a serina (SER) en posición de a.a. 422 se construyó con amplificación PCR de pPRKc129 con el iniciador directo p1140 5' GAC AGC CCT TCG AAT TTC AAT GT 3' y el iniciador inverso p925. Las demás etapas fueron las mismas que las del mutante de supresión que carece de a.a. 422 a 436. El plásmido pPRKc52 contiene el gen de autoproteasa y las proteínas estructurales de cepa C con un E^{ms} mutado que contiene una sustitución CYS-a-SER en la posición 422.

Se construyó una mutación cisteína a serina en la posición a.a. 405 mediante amplificación PCR de pPRKc129 con el iniciador directo p1148 5'-CCT GAC CGG TTC GAA GAA AGG GAA-3' y el iniciador inverso p925. Las demás etapas fueron las mismas que las del mutante de delección que carece de a. a. 422 a 436. El plásmido pPRKc54 contiene el gen de autoproteasa y las proteínas estructurales de cepa C con un E^{ms} mutado que contiene una mutación CYS-a-SER en la posición 405.

Se construyó una sustitución de cisteína a serina en una posición a.a. 381 por amplificación PCR de pPRKc129 con el iniciador directo p1149 5'-TGC GCT GTG ACT AGT AGG TAC GAT AAA-3' y el iniciador inverso p925. Las etapas siguientes fueron las mismas que las del mutante de supresión que carecía de a.a. 422 a 436. El plásmido pPRKc56 contiene el gen de autoproteasa y las proteínas estructurales de cepa C con un E^{ms} mutado que contiene una mutación CYS-a-SER en la posición 381.

Se transfectaron en células SK6 clones en los cuales se había insertado el gen E^{ms} mutado en la orientación correcta y se comprobó la expresión de E^{ms} y E2 por inmunotinción con anticuerpos con E^{ms} (C5, 140, 1, 137, 5, R716) y Mabs b3 y b4 específicos de E2 (Wensvoort 1989, J. Gen. Virol. 70:2865-2876).

40 *Construcción de constructos CSFV de longitud completa que albergan mutantes de supresión E^{ms}*

Se aisló un fragmento ClaI/NgoI de pPRKc48 y pPRKc50 y se ligó dentro del vector digerido ClaI/NgoIMI, pPRKf1c2, designado anteriormente pPRKf1c133 (Moormann *et al.*, 1996, J. Virol 70: 763-770) y los mutantes E^{ms} cepa C CSFV de cADN de longitud completa resultantes recibieron el nombre de pPRKf1c23 y pPRKf1c22. El esquema de construcción completa de los constructos de longitud total pPRKf1c22 y pPRKf1c23 se muestra en las figuras 2A y 2B y en la figura 1 se da una vista general del plásmido E^{ms}.

De forma similar se transfirieron el mutante de supresión 422-436 de pPRKc51 y las sustituciones CYS-a-SER de pPRKc52, pPRKc54, pPRKc56, al vector pPRKf1c2 mediante digestión CLAI/NgoIMI dando como resultado los clones de cADN de longitud completa recombinantes pPRKf1c30, pPRKf1c31, pPRKf1c32 y pPRKf1c33, respectivamente.

Aislamiento de virus recombinantes

Se purificó en columna (Qiagen) ADN plásmido de pPRKf1c22, pPRKf1c23, pPRKf1c30, pPRKf1c31, pPRKf1c32 y pPRKf1c33, y se linealizó con XbaI. El ADN se extrajo con fenol-cloroformo, precipitado con etanol y se disolvió en agua. Se transcribió ADN del plásmido linealizado (1 µg) en un volumen de reacción de 100 µm que contenía 40 mM trisHCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 2 mM de espermidina, 10 mM de ditiotreitol, 40 U de rARNsin (Promega), 0,5 mM de cada rNTP y 35 U de T7 ARN polimerasa (Pharmacia). Tras 1 hora de incubación a 37°C, se añadieron 10 U de DNaseI libre de RNasa (Pharmacia) y la mezcla se incubó durante otros 15 minutos. Se extrajo ARN con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y se disolvió en 10 µl de agua.

Para la transfección de ARN, se diluyeron 10 g de lipofectina en 50 µl de Optitem-I. Tras 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió 1 µg de ARN diluido en 50 µl de Optitem-I y se incubó durante 15 minutos más. Unas células de SK6c26 cultivadas en placas de cultivo de tejido de 10 cm² se lavaron con Optitem-I y se incubaron con la mezcla de transfección de ARN durante 4 horas a 37°C. Luego, los pocillos recibieron medio fresco y se incubaron durante 4 días a 37°C. La transfección de ARN se realizó por duplicado. Se procedió a la inmuno-tinción de una muestra con Mabs b3/b4 específicos de E2. En cuanto se vio que la inmuno-tinción E2 era negativa, se hizo pasar

ES 2 273 669 T3

la muestra duplicada y se dividió en dos muestras. Una de estas muestras se usó para la inmuno-tinción 4 días después de someter al passaging. Se aplicó sobrenadante de pocillos en los cuales se vio expresión de E2 sobre células frescas de SK6c26 o SK6 para determinar la presencia de virus infeccioso. A los cuatro días, se fijaron las monocapas y se sometieron a inmuno-tinción en la forma antes descrita.

5

Cinética de crecimiento/cultivo de Flc22 y Flc23

La cinética de crecimiento de los virus se determinó en células SK6c26. Se infectaron monocapas subconfluentes en pocillos M24 con una multiplicidad de infección de 0,1. Los virus fueron adsorbidos durante 1,5 horas. Antes de aportarse medio fresco a las células, se recogió la primera muestra en el momento cero. A los 0,1,2,3,4,5,6 y 7 días de la infección las placas M24 se congelaron/descongelaron dos veces y se aclararon por centrifugación durante 10 minutos a 5.000 x g a 4°C. Se determinaron los títulos de virus (log TCID₅₀ por mililitro) de lisatos totales (lisatos celulares más sobrenadantes) sobre células SK6c26.

Caracterización de virus E^{ms} recombinantes

Los genes E^{ms} de Flc22 y Flc23 se secuenciaron. Por consiguiente se aisló ARN citoplásmico de células de SK6c26 infectadas con estos virus respectivos utilizando el kit de aislamiento de ARN total RNeasy (Qiagen). Se analizaron por RT-PCR fragmentos de ADN que cubrían los genes de E^{ms} utilizando iniciadores p1154 5' GTT ACC AGT TGT TCT GAT GAT 3' y p305 5' GGG GTG CAG TTG TAT CCA 3' amplificando secuencias de nucleótidos 865 a 1920, se analizaron sobre un gel de agarosa al 1,5% en 1 x TAE y se purificaron sobre columnas Costar Spin-X. Se realizó un RT PCR del gen E2 con par de iniciadores p307 TGG AAT GTT GGC AAA TAT GT y p304 CAC TTA CCT AT[A,G] GGG TAG TGT GG amplificando la posición de nucleótidos 2200-3174.

Se determinaron por secuenciación de ciclo PCR las secuencias de los fragmentos de PCR purificados utilizando el kit de secuenciación de ciclo de reacción Big dye dRhodamine terminador ready (PE) según las condiciones del fabricante con iniciadores de flanco y se analizaron sobre un analizador genético 310 ABI PRISM.

Se caracterizaron además los virus recombinantes en un ensayo monocapa de inmuno peroxidasa. Para ello, se infectaron células de SK6 con los virus recombinantes y Flc2. Tras la incubación durante 4 horas a 37°C, se inmunotñeron monocapas con Mabs específicos de CSFV E2 (Mabs b3/b4), CSFV E^{ms} Mabs 140,1, C5, 137,5 y un suero de conejo policlonal contra E^{ms} R716.

Se determinó el índice de neutralización de virus (reducción log de título viral [TCID₅₀/ml] mediante suero de neutralización) a una dilución 1:250 de suero 716 específicamente dirigido contra Erns de CSFV cepa C y a una dilución de 1:1000 de un suero porcino 539 específicamente dirigido contra E2 de CSFV cepa Brescia (Hulst *et al.*, Virol 1998, 72:151-157). Se valoraron las estirpes virales de Flc2, Flc22 y Flc23 por dilución de punto final en presencia o ausencia de estos anticuerpos neutralizadores de CSFV.

Resultados

Expresión transitoria de E^{ms} recombinante en células SK6

Estudios anteriores han mostrado que los anticuerpos producidos contra CSFV E^{ms} no inhiben la actividad de la RNase (Hulst *et al.*, 1998, J. Virol. 72: 151-157). Los dominios activos de la RNasa de E^{ms} están situados en la mitad N-terminal de la proteína (Schneider *et al.*, 1993, Science 261: 1169-1711, Hulst *et al.*, 1994 Virol. 200: 558-565) (véase figura 1 para una representación esquemática de E^{ms}) El análisis Pepscan no reveló ningún epítipo lineal en E^{ms} para los anticuerpos C5, 140,1 y 137,5 (no se muestran datos), lo cual indica que los epítipos son conformacionales. Por consiguiente, se construyó un conjunto de recombinantes E^{ms} con supresiones de longitudes diferentes en el término C (figura 1). Estos mutantes de supresión se construyeron en un plásmido de expresión pPRKc5 que albergaba la secuencia de nucleótidos de la autoproteasa y los genes estructurales (N^{pro}-cap-sid-E1-E2) sin E^{ms}. La expresión de estos constructos nos permitió utilizar el gen E2 como control para un marco de lectura abierto correcto ya que el gen E2 está situado en el terminal C del gen E^{ms}. Se transfectoron células SK6 con estos plásmidos y se realizó una tinción por inmuno peroxidasa 24 horas después de la transfección (cuadro 1).

55

Las células transfectadas con el plásmido pPRKc49 que alberga una supresión de una posición a.a. 436 a 488 se pueden inmuno teñir específicamente con todos los anticuerpos que reconocen CSFV E^{ms} (Mab C5, 1501, 137,5) y el suero policlonal R716, como el plásmido de tipo natural pPRK83. No obstante el plásmido pPRKc50 que alberga una supresión de posición 422 a 488 ya no es reconocido por los anticuerpos contra E^{ms} sino que es positivo con Mabs b3/b4 contra E2. Estos resultados muestran la presencia de un dominio antigénico distinto en E^{ms} y/o un papel importante de a.a. 422 a 436 para la ligadura y la conformación de los epítipos en E^{ms} Esta región contiene una cisteína en la posición 422 que posiblemente interviene en las estructura conformacional de E^{ms}.

Para investigar el papel de esta región, se construyó el plásmido pPRKc51 que alberga la pequeña supresión de a. a. 422-436. Como se muestra en el cuadro 1, la tinción por inmuno peroxidasa de las células transfectadas solo mostró Mab ligado a E2 y no a E^{ms} Estos resultados mostraron la importancia de esta región para la conformación de estos epítipos de E^{ms}.

65

ES 2 273 669 T3

Establecimiento de una línea celular SK6 que expresa CSFV E^{rms}

Se transfectaron células SK6 con plásmido pPRKc26 que alberga el CSFV cepa C gen E^{rms} y el gen de resistencia histidinol (hisD). A las tres semanas se criaron colonias supervivientes de la selección de 5 mM histidinol, para
5 comprobar la expresión de E^{rms} por inmuno-tinción de las células con Mab C5 específico de CSFV E^{rms}. Las células positivas se clonaron una vez más para garantizar la clonalidad.

Uno de los clones obtenidos mostró expresión de E^{rms} en más del 95% de las células y este clon recibió el nombre
10 de SK6c26. La línea celular produjo cantidades sustancialmente más importantes de E^{rms} que los otros cinco clones obtendos, como se pudo determinar por inmuno tinción. El passaging continuo de esta línea celular SK6c26 en presencia de 5 mM de histidinol retuvo una expresión persistente en más del 95% de las células durante por lo menos 10 meses (46 passaging). En paso en ausencia de histidinol para 10 passaging dio como resultado una ligera disminución de las células que expresan E^{rms}, hasta aproximadamente 80%.

La línea celular estable se siguió caracterizando con respecto a las características bioquímicas de E^{rms} producida.
15 La línea celular SK6c26 reaccionó en IPMA con todos los anticuerpos E^{rms} testados (cuadro 2A). La cantidad de E^{rms} en los lisatos celulares de SK6c26 y células SK6 infectadas con Flc2 se determinó mediante un ELISA indirecto y se extrapoló en una curva standard preparada a partir de una preparación purificada por inmuno afinidad de E^{rms}, preparada en células de insectos. Los lisatos de las células de SK6c26 reaccionaron con el Mab específico de E^{rms} y anticuerpos
20 policlonales en un ELISA indirecto, como el E^{rms} natural (cuadro 2B). La cantidad de E^{rms} producida en las células SK6c26 (10 ng por cm²) fue tres veces inferior a la de células SK6 infectadas con Flc2 (30 ng por cm²). Las células SK6c26 y las Flc2 infectadas con células SK6 poseían una actividad de RNasa comparable a la medida con un ensayo de RNasa de captura de antígeno (cuadro 2B). La proteína E^{rms} de la línea celular estable tenía una movilidad similar a E^{rms} natural según se determinó con SDS-PAGE y se dimerizó eficazmente como el E^{rms} encontrado en viriones (Thiel
25 *et al.*, 1991, J. Virol. 65: 4705-4712) (Cuadro 2B).

Construcción y recuperación de virus recombinantes de E^{rms} CSFV de cepa C Flc22 y Flc23

Dos recombinantes del gen E^{rms} se sustituyeron en pPRKflc2, la copia infecciosa de longitud completa del CSFV
30 cepa C (Moormann *et al.*, J. Virol 70: 763-770). El clon de longitud completa pPRKflc22 se deriva de pPRKc50 que posee una supresión de a.a. 422 a 488 en E^{rms} (figura 1). El clon de longitud completa pPRKc23 se deriva de pPRKc48 y alberga los cinco aminoácidos N-terminales más lejanos y los seis aminoácidos C-terminales más lejanos de E^{rms} (supresión de a.a. 273-488) (figura 1). La figura 2 muestra una representación esquemática de la construcción de estos clones de longitud completa de E^{rms} recombinantes

El ARN transcrito del cADN de longitud completa linealizado se transfectó en la línea celular SK6 que expresa
E^{rms}. Cuatro días después de la transfección, la tinción por inmunoperoxidasa del monocapa con Mab b3 no mostró
expresión de E2, incluso con ARN transcrito de pPRKflc2. La cantidad de proteína E2 del virus recombinante es
40 posiblemente demasiado baja para detectar por inmuno-tinción. Por consiguiente, las células se sometieron a passaging para obtener valores superiores de virus. Un passaging tras la transfección se obtuvo virus natural Flc2, mientras que cuatro passaging después de la transfección, la expresión de E2 se pudo detectar con los clones recombinantes de pPRKflc22 y pPRKflc23. Fueron necesarias de 3 a 5 passaging adicionales para obtener un título de virus de aprox. 5,5 TCID₅₀/ml y esta estirpe (stock) se usó para la caracterización ulterior de los virus que recibieron el nombre de Flc22 y Flc23 para los clones pPRKflc22 y pPRKflc23 respectivamente.

Se utilizaron sobrenadantes de células SK6c26 infectadas con Flc22 y Flc23 para la infección de células SK6c26
y SK6. Cuatro días después de la infección, para ambos virus, aproximadamente 50-70% de las células SK6c26 eran
positivas por tinción por inmuno peroxidasa E2 mientras que la infección en células SK6 solo dio como resultado
algunas células individuales o pares de células individuales que expresan E2. Teniendo en cuenta que las células
50 infectadas con CSFV se dividen normalmente (una vez en 24 horas), el número de células positivas observadas en células SK6c26 indicó replicación y propagación secundaria del virus mutado. Debido a que únicamente células individuales o pares de células individuales expresaron E2 en las células SK6, esto indica que los sobrenadantes derivados de las células SK6c26 contienen virus infecciosos que pueden infectar y replicar en células SK6 si bien no hay propagación de célula a célula o infección secundaria de los virus mutados en estas células.

El sobrenadante o lisatos celulares de células SK6 infectadas con Flc22 y Flc23 se usaron para la infección de
nuevas células SK6 y SK6c26, aunque eso tampoco condujo a células infectadas. Para la infección de pestivirus, la
interacción de las proteínas de envoltura viral E2 y E^{rms} con la superficie celular se consideran esenciales. Debido a la
ausencia de E^{rms} en las células SK6 no se pudieron formar partículas infecciosas a partir de los virus Flc22 y Flc23.

Por consiguiente, los sobrenadantes de las células infectadas SK6 no contenían virus infeccioso (figura 3), mientras
que el sobrenadante de las células infectadas SK6c26 con Flc22 y Flc23 pueden infectar células SK6 y SK6c26, y por
consiguiente contenían virus infeccioso.

Las células SK6 infectadas con Flc22 y Flc23 derivadas de los sobrenadantes de las células SK6c26 se pudieron
inmuno-teñir con Mabs dirigidos contra E2, pero no se encontraron células positivas con anticuerpos contra E^{rms} (Mabs
C5 y R716). Como control, la infección de células SK6 con sobrenadante de células SK6c26 infectadas con Flc2 dio
como resultado una tinción por inmuno peroxidasa positiva para E2 y E^{rms} y una infección secundaria (figura 3).

ES 2 273 669 T3

La transfección de cADN de longitud completa linealizados pPRKflc22 y pPRKflc23 en una línea celular SK6 que expresa constitutivamente la polimerasa del ARN T7 bacteriófago en el citoplasma de la célula (Van Gennip 1999, J. Virol. Métodos, aceptado para su publicación), dio como resultado la expresión transitoria de E2 después de la transfección, pero los seis passaging de las células transfectadas no tuvo como resultado la recuperación de virus recombinantes infecciosos (datos no mostrados).

Tomados juntos, estos resultados muestran que los virus mutantes E^{ms} recombinantes Flc22 y Flc23 requieren complementación de E^{ms} por medio de la línea celular complementaria para empaquetar el genoma del virus recombinante para producir virus infecciosos.

Caracterización de virus recombinantes CSFV Flc22 y Flc23

Para confirmar la presencia de las mutaciones en los genomas de Flc22 y Flc23, se analizó ARN celular de células SK6c26 infectadas con RT-PCR con iniciadores específicos CSFV. Los fragmentos, tras RT-PCR con iniciadores que flanquean el gen E^{ms} fueron de tamaños esperados de aproximadamente 857, 401 y 1055 respectivamente para Flc22, Flc23 y Flc2, mientras que el producto de RT-PCR del gen E2 fue para todos los virus del tamaño esperado de 974 bp (figura 4). Los productos de amplificación del gen E^{ms} se secuenciaron y las secuencias obtenidas fueron las esperadas. No se observó ninguna reversión al tipo natural o recombinación con los genes E^{ms} codificados por la línea celular.

Se determinó la cinética de crecimiento de Flc22 y Flc23 y el Flc2 natural en la línea celular complementaria SK6c26. Como se muestra en la figura 5, la curva de crecimiento en varias etapas de los virus recombinantes Flc22 y Flc23 fueron muy similares aunque mostraron un crecimiento más lento comparado con el virus emparentado Flc2. Se alcanzaron títulos comprendidos entre 5,0-5,8 TCID₅₀/ml con los virus recombinantes después de seis días, mientras que la cepa emparentada Flc2 alcanzó este título ya al cabo de tres días. El título observado obtenido para Flc2 cuatro días después de la infección en la línea celular complementaria es 10 veces inferior a lo obtenido en la línea celular parental SK6 (6,8 TCID₅₀/ml).

Se realizaron experimentos para determinar si se incorporaba E^{ms} en la envoltura viral. Por consiguiente, se valoraron las estirpes virales de Flc2, Flc22 y Flc23 en presencia de anticuerpos neutralizadores de CSFV. El cuadro 3 muestra la reducción del título viral por incubación por anticuerpos neutralizantes. Todos los virus recombinantes se neutralizaron en la misma medida que el virus emparentado Flc2 con los anticuerpos policlonales neutralizantes específicos de E2 y de E^{ms}. E^{ms} en la envoltura viral de Flc22 se pudo derivar de la línea celular complementaria así como de la proteína E^{ms} recombinante codificada por el genoma viral. Pero el E^{ms} recombinante de Flc22 no es reconocido por el suero policlonal R716 (figura 3) utilizado para neutralizar los virus. Por consiguiente, el índice de neutralización similar obtenido con el suero policlonal muestra que la cantidad de E^{ms} derivado de la línea celular complementaria en las envolturas virales de Flc22 era comparable a los de Flc2 y Flc23.

La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de Flc22 y Flc23 en comparación con Flc2. Flc23 es un mutante de supresión de E^{ms} en el que la zona de división entre C-E^{ms} así como E^{ms}-E^{ms} se dejó intacta; la presencia de estas zonas de división puede influir en la viabilidad del virus.

Construcción de pPRKflc30, pPRKflc31, pPRKflc32, pPRKflc33

Los resultados del cuadro 1 muestran la función importante de la región de aminoácidos 422-436 para la conformación de los epítomos de los anticuerpos E^{ms}. Esta región contiene, en la posición 422 una cisteína, que puede ser responsable del reconocimiento de epítomo. Para estudiar el papel de esta región, construimos un conjunto de clones recombinantes de longitud completa de E^{ms}: uno carecía de a. a. 422-436 (pPRKflc30), un mutante de cisteína-a-serina en la posición 422 (pPRKflc31) y dos mutantes adicionales de cisteína-a-serina en las posiciones 405 y 381 (pPRKflc32 y pPRKflc33, respectivamente) (figura 1).

El ARN transcrito de los cADN de longitud completa linealizados se transfectó en la línea celular SK6c26. Las células se volvieron positivas tras inmuno-tinción con Mab b3 después de proceder al passaging de las células transfectadas. Seguidamente, las células se sometieron 5 veces a passaging para obtener títulos superiores de virus.

Caracterización de virus CSFV recombinantes Flc30, Flc31, Flc32 y Flc33

Se utilizaron sobrenadantes de células SK6c26 infectadas con Flc30, Flc31, Flc32 y Flc33 para infectar células SK6c26 y SK6. Para todos los virus aprox. 30-50% de las células SK6c26 eran positivas al teñir por inmuno peroxidasa E2, cuatro días después de la infección. Para Flc30, Flc31 y Flc33 la infección en células SK6 dio únicamente resultados células individuales o pares de células individuales que expresan E2 y ninguna expresión de E^{ms} (figura 3). Esto indica que la infección y la replicación se produjeron en las células SK6 pero que no hay propagación de célula a célula ni infección secundaria de los virus mutantes.

Se utilizó sobrenadante de células SK6 infectado con Flc30, Flc31 o Flc33 para infectar nuevas células SK6 y SK6c26, pero esto no dio como resultado células infectadas. Por consiguiente, los sobrenadantes de estas células infectadas SK6 no contenían virus infeccioso (figura 3). Para la infección de pestivirus, se considera esencial la interacción de las proteínas de envoltura viral E2 y E^{ms} con la superficie celular. Debido a la ausencia de E^{ms} en las células SK6, no se pudo formar ninguna partícula infecciosa de los virus Flc30, Flc31 y Flc33.

ES 2 273 669 T3

Como contraste, la infección con Flc32 derivado de sobrenadantes de células SK6c26 mostró que 30-50% de las células SK6 estaban infectadas. Se pudo detectar E2 y E^{ms} mediante los anticuerpos E2 y E^{ms} (figura 3). El sobrenadante de células SK6 infectadas con Flc32 puede infectar nuevas células SK6 y SK6c26 y por consiguiente contiene virus infeccioso (figura 3).

5 Esto indica que el virus Flc32 es capaz de replicar y de infectar células SK6. Por ello, el virus recombinante con una sustitución 405CYS-SER (figura 32) produce virus infeccioso, mientras que los virus recombinantes con sustituciones CYS-SER en la posición 422 (Flc31) y 381 (Flc33) y una supresión de a.a. 422-436 (Flc30) no lo hacen.

10 Estos resultados muestran el papel importante de las cisteínas en la posición 422 y 381 para la actividad funcional de E^{ms} como propagación célula-a-célula, infectividad, y reconocimiento de epítipo.

pPRKflc23 para la expresión de proteínas heterólogas

15 El pPRKflc23 se puede utilizar como vector para incorporar proteínas heterólogas y fragmentos de proteínas ya que las zonas de división entre C-E^{ms} así como entre E^{ms}. El se dejaron intactas. La figura 7 muestra una representación esquemática de pPRKflc23 que alberga el epítipo HA una secuencia no-pestivirus. El epítipo Ha está flanqueado por los 5 a.a terminal N más lejanos y los 6 a.a. terminal-C más lejanos de E^{ms}.

20 Ejemplo 2

Construcción y caracterización de cepas CSFV recombinantes Flc4 y Flc47

Material y métodos

25 *Células y virus*

Se cultivaron células de riñón de cerdo (SK6-M, EP 0 351 901 B1) en medio basal de Eagle que contenía 5% de suero bovino fetal, glutamina (0,3 mg/ml) y los antibióticos penicilina (200 U/ml), estreptomycin (0,2 mg/ml) y micostatina (100 U/ml). Se comprobó la ausencia de anticuerpos BVDV y BDV en el suero bovino fetal según lo descrito anteriormente (Moormann *et al.*, 1990. *Virology* 177:184-198).

30 Se cultivaron virus de CSFV cepa C recombinante Flc4 y Flc47 y se prepararon en la forma descrita anteriormente (Moormann *et al.*, 1996. *J. Virol.* 70: 763-770) con una ligera modificación, el medio de cultivo de células SK6 se cambió por medio basal de Eagle suplementado. Se prepararon estirpes (stocks) de virus sometiendo a "passaging" el virus de 5 a 10 veces en células SK6b2. Los títulos de los virus obtenidos oscilaron entre 3,5 y 4,5 TCID₅₀/ml.

Construcción de una línea celular estable SK6 que expresa E2

40 El plásmido pPRb2 contiene el gen E2 de CSFV cepa Brescia bajo control de las señales de transcripción y de traducción del vector de expresión pEVhisD12 (van Rijn *et al.*, 1992, *Vet. Microbiol.* 33:221-230). El plásmido pEVhis D12 es un vector que contiene secuencias de potenciador/ promotor del gen inmediatamente anterior del cito megalovirus humano seguido de un codón de iniciación de traducción y el gen histidinol dehidrogenasa (hisD) bajo control del promotor temprano SV40 que se puede utilizar como marcador selectivo (Peeters *et al.*, 1992, *J. Virol.* 66:894-905).

45 Para la transfección de células SK6 con pPRKflc2, se diluyó lipofectamina (20 µg) (Gibco-BRL) en 50 µl de Optimem-I (Gibco-BRL) mezclada con ADN plásmido (1 µg) diluido en 50 µl de Optimem-I (Gibco-BRL) y se dejó reposar esta mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron células SK6 cultivadas en placas de cultivo de tejido de 10 cm² con Optimem-I. Se añadió Optimem-I fresco (0,5 ml) seguido de la mezcla de transfección de ADN. Después de 20 horas de incubación a 37°C, las células transfectadas se tripsinizaron y volvieron a preparar en una dilución 10 veces superior en placas de microvaloración en un medio que contenía mM de histidinol. Se sustituyó el medio cada 3-4 días hasta que se pudieron ver colonias individuales. Los pocillos con colonias individuales se reclonaron por dilución limitada. La expresión de E2 se determinó por inmuno - tinción de las células Mabs b3 y b4 (Wensvoort *et al.*, 1986, *Vet. Microbiol.* 21: 9:20) dirigidos contra epítipos conservados de CSFV E2.

Caracterización de la línea celular estable SK6b2

50 Se detectó la expresión de E2 de la línea celular SK6b2 en una tinción por inmuno peroxidasa con anticuerpos monoclonales específicos de E2 (Mabs) b3 y b4 (Wensvoort *et al.*, 1986, *Vet. Microbiol.* 21:9-20) dirigidos contra dominio A conservado de CSFV E2 y Mabs b6 y b8 (Wensvoort *et al.*, 1986, *Vet. Microbiol.* 21:9-20) dirigidos contra dominio B y C de Brescia E2.

55 Se determinó la cantidad de E2 mediante un Cedites ELISA basado en Mab b3 como anticuerpo de revestimiento y Mab b8 conjugado con peroxidasa de rábano picante como anticuerpo de detección según lo descrito por Colijn *et al.*, (*Vet. Microbiol.* 59:15-25, 1997).

ES 2 273 669 T3

Construcción de constructos CSFV de longitud completa que albergan mutantes de supresión E2

El plásmido pPRKflc4 es un plásmido de longitud completa que alberga una supresión de dominio B/C en CSFV-E2 de aminoácidos 693-746 (figura 8A). Por consiguiente, el gen E2 que alberga la supresión del plásmido pPAB16 (van Rijn *et al.*, 1996, J. Gen. Virol. 77:2737-2745) se insertó en pPRc129 (Moormann *et al.*, 1996, J. Virol. 70:763-770) por ligadura de NgoMI/Bg/II, lo que dio como resultado el plásmido pPRc144. El fragmento ClaI/NcoI de pPRc144 se aisló y se ligó en el vector pPRKflc2 digerido con ClaI/NcoI, que recibe el nombre formal de pPRKflc133 (Moormann *et al.*, 1996, J. Virol. 70:763-770) lo cual dio como resultado el clon de longitud completa denominado pPRKflc4.

El plásmido pPRKflc47 es un plásmido de longitud completa que alberga una supresión del gen completo CSFV-E2 de aminoácidos 689-1062 (figura 8B). Por consiguiente se amplificó un fragmento PCR que alberga la supresión de plásmido pPRKflc2 con iniciador directo p1195(5'GGC.TGT.TAC. TAG. TAA.CTG.GGG.CAC.AAG.GCT.TAC.CAT. TGG.GGC.AGG.GT G-3') en la posición 2412 de la secuencia de nucleótidos del iniciador inverso y cepa C p403 (5'-CCC.GGG.ATC.CTC.CAG.TTT. TTT.GTA.AGT.GGA-3') en la posición de nucleótido 5560. El fragmento SpeI/Af/II se aisló y se ligó en pPRc144 digerido con SpeI/Af/II dando como resultado el plásmido pPRc58. El fragmento ClaI/NcoI de pPRc58 se aisló y se ligó en el vector pPRKflc2 digerido con ClaI/NcoI, dando como resultado el clon de longitud completa designado pPRKflc47.

Aislamiento de virus recombinantes Flc4 y Flc47

Se purificó en columnas (Qiagen) ADN plásmido de pPRKflc4 y pPRKflc47 y se linealizó con XbaI. El ADN se extrajo con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y se disolvió en agua. El ARN se transcribió del plásmido linealizado (1 µg) en un volumen de reacción de 100 µl que contenía 40 mM TrisHCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 2 mM espermidina, 10 mM ditiotreitól, 40 U rRNAsin (Promega), 0,5 mM cada arNTP, y 35 U T7 ARN polimerasa (Pharmacia). Tras 1 hora de incubación a 37°C, se añadieron 10 U de RNase libre de DNaseI (Pharmacia) y la mezcla se incubó durante otros 15 minutos. Se extrajo ARN con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y se disolvió en µl de agua.

Para la transfección de ARN se disolvieron 10 pg de lipofectina en 50 µl de Optimem-I. Después de 45 de incubación a temperatura ambiente, se añadió 1 g de ARN diluido en 50 µl de Optimem-I y se incubó durante otros 15 minutos. Se lavaron células de SK6b2 cultivadas en placas de cultivo de 10 cm² con Optimem-I y se incubaron con la mezcla de transfección de ARN durante 4 horas a 37°C. Luego, se aportó medio fresco a los pocillos y se incubó durante 4 días a 37°C. La transfección de ARN se realizó por duplicado. Una muestra se inmuno-tiñó con Mab C5 (Wensvoort 1998, Thesis, Universidad de Utrecht) específico de E^{ms} cepa C. Cuando se vio que la inmuno-tinción E^{ms} era positiva, se sometió a passaging la muestra duplicada y se dividió en dos muestras. Una de estas muestras se usó para la inmunotinción 4 días después del passaging. En los pocillos en los que se observó expresión de E^{ms} se aplicó sobrenadante sobre células SK6 frescas para determinar la presencia de virus infeccioso. Después de cuatro días, las monocapas se fijaron e inmuno-tiñeron en la forma descrita anteriormente.

Caracterización de Flc4 y Flc47

Se caracterizaron unos virus con un ensayo monocapa por inmuno peroxidasa. Para ello, se infectaron células SK6 con virus Flc2, Flc4 y Flc47. Después de incubación durante 4 días a 37°C, se inmuno tiñeron monocapas con Mabs específicos de CSFV E2 (Mabs b3/b4) y CSFV Eres Mab C5.

Resultados

Establecimiento de una línea celular SK6 que expresa CSFV E2

Se transfectaron células SK6 con plásmido pPRb2 que contenía el gen E2 Brescia cepa CSFV y el gen de resistencia a histidinol (hisD). A las dos semanas, se reclonaron colonias que sobrevivieron a la selección de 10 mM histidinol mediante dilución limitada y se cribaron para encontrar la expresión de E2 por inmuno-tinción de las células con Mab b3 específicos de CSFV E2. Este clon se designó SK6b2. Se caracterizaron las propiedades bioquímicas del E2 producido de la línea celular SK6b2. Las células SK6b2 reaccionaron con los Mab específicos de E2 en un ensayo por inmuno peroxidasa (cuadro 4A) y en un ELISA indirecto como E2 natural (cuadro 4B). La cantidad de E2 en los lisatos celulares de las células SK6b2 y SK6 infectadas con Flc2 se determinó mediante un ELISA indirecto y se extrapoló una curva standard preparada a partir de una preparación purificada por inmuno afinidad de E2 preparado en células de insecto. La cantidad de E2 determinada en la línea celular SK6b2 (115 ng por cm²) fue tres veces superior a la de las células SK6 infectadas con Flc2 (30 ng por cm²). La proteína E2 de la línea celular estable tenía una movilidad similar a la de E2 natural determinado por SDS-PAGE y se dimerizó eficazmente como el E2 encontrado en viriones (Thiel *et al.*, 1991, J. Virol. 65:4705-4712) (cuadro 4B).

Construcción y recuperación de virus recombinante E2 CSFV cepa C

Unos estudios previos han mostrado que E2 está constituido por dos unidades antigénicas A y B/C y que las unidades antigénicas separadas de E2 pueden proteger a los cerdos contra la fiebre porcina clásica (van Rijn *et al.*, 1996, J. Gen Virol. 77:2737-2745). Por consiguiente se construyeron dos mutantes de supresión: plásmido pPRKflc4, que

ES 2 273 669 T3

posee una supresión en E2 de dominio B/C entre aminoácidos 693-746 y pPRKflc47, donde se suprimió la totalidad del gen E2 entre los aminoácidos 689-1062. La figura 8 muestra una representación esquemática de la construcción de estos clones de longitud completa de E2 recombinantes.

5 Se transfectó ARN transcrito del cADN de longitud completa linealizado en la línea celular SK6b2 que expresa E2. Las células eran positivas después de inmuno-tinción con Mab C5. Luego, las células transfectadas se sometieron a passaging para obtener títulos más elevados de virus. Los sobrenadantes aislados de las pasadas en serie contenían virus infecciosos. Entre 5 a 10 pasadas fueron necesarios para obtener un título viral de aprox. 3,5-4,5 TCID₅₀/ml y este stock se usó para seguir caracterizando los virus.

10

Caracterización de los virus CSFV E2 recombinantes

Se utilizaron sobrenadantes de células SK6b2 para la infección de células SK6 y SK6b2, para caracterizar Flc4 y Flc47. Cuatro días después de la infección, aproximadamente 30-50% de las células SK6b2 eran positivas por tinción de inmuno peroxidasa E^{ms}.

15

La infección en células SK6 dio como resultado que únicamente ciertas células individuales o pares de células individuales expresaron E^{ms} cuatro días después de la infección. Esto indica que la infección y la replicación se produjeron en las células SK6 pero que no existe ninguna propagación de célula a célula o infección secundaria de los virus recombinantes.

20

Se usó sobrenadante de células SK6 infectada con Flc4 y Flc47 para infectar nuevas células SK6 y SK6b2 pero esto no dio como resultado la infección de células. Por tanto, los sobrenadantes de estas células infectadas SK6 no contienen virus infecciosos (cuadro 5). Para la infección de pestivirus, la interacción de las proteínas de envoltura viral E2 y E^{ms} con la superficie celular se considera esencial. Debido a la ausencia de E2 en las células SK6, no se pudo formar ninguna partícula infecciosa. La infección de células SK6 con Flc2 procedentes de células SK6b2 infectadas resultó en una tinción por inmuno peroxidasa positiva para E2 y E^{ms} y una infección secundaria del virus.

25

Las células SK6 infectadas con los virus Flc4 y Flc47 se pudieron inmuno-teñir con Mab C5 dirigido contra E^{ms}, mientras que únicamente Flc4 y Flc2 reaccionaron con Mab b3 dirigido contra el dominio A, de CSFV E2 (cuadro 5). Según lo esperado, Flc47 era completamente negativo para los Mabs los dominios A, B y C (cuadro 5).

30

La transfección de ARN *in vitro* derivado de pPRKflc4 y pPRKflc47 en la línea celular SK6 dio como resultado la expresión transitoria de E^{ms}, pero el passaging de las células transfectadas seis veces no dio como resultado la recuperación de virus recombinantes. Esto indica que los virus recombinantes de E2, Flc4, y Flc47 requieren complementación de E2 para obtener virus infeccioso.

35

Ejemplo 3

40 *Experimento animal, 298-47042-00/98-06*

Los cerdos vacunados con Flc22 y Flc23 están protegidos contra una exposición letal a CSFV virulento cepa Brescia.

45 *Materiales y métodos*

Animales

Se obtuvieron cerdos de 6-7 semanas de edad de puerkas convencionales. Los cerdos se dividieron aleatoriamente en grupos y se alojaron en establos separados de las instalaciones de alta contención de ID-DLO. Los cerdos fueron llevados una vez al día a un comedero con pienso completo y pudieron beber agua de una boquilla *ad libitum*.

50

Vacunación y exposición

Los cerdos se dividieron en dos grupos de dos cerdos. Los cerdos del grupo A se vacunaron con la cepa Flc23; los cerdos del grupo B se vacunaron con la cepa Flc22. Los cerdos se vacunaron utilizando diversas vías de inoculación. Los cerdos se sedaron y se colocaron patas arriba antes de la inoculación con una suspensión de virus (2 ml que contenía 10⁵ TCID₅₀/ml) que se instiló gota a gota en las narices. Además, se inocularon por vía intravenosa 2 ml de suspensión viral, y por vía intradermal se inocularon 2 ml de virus. Las vacunas se emulsionaron en un adyuvante de agua-aceite-agua (Hulst *et al.*, 1993. J. Virol. 67:5435-5442) y 2 ml de esta vacuna se inocularon por vía intramuscular en el cuello detrás de las orejas. En total, cada cerdo recibió 8 ml de vacuna, que corresponde a 8 x 10⁵ TCID₅₀/ml.

60

Los cerdos se expusieron por vía intranasal a 100 dosis letales al 50% (=100 LD₅₀) de CSFV cepa Brescia 456610 (Terpstra and Wensvoort, 1988, Vet. Microbiol. 16:123-128) cuatro semanas después de la vacunación. El contenido viral del inoculum de la vacuna se determinó por valoración de una muestra tomada después de volver del establo. Los cerdos fueron sometidos a eutanasia 7 semanas tras la exposición.

65

Observación clínica

Los cerdos fueron controlados diariamente por los especialistas, señalándose las circunstancias anormales y, en caso necesario se llamó al veterinario supervisor. Se observó cada grupo por lo menos 15 minutos al día antes y durante la alimentación y la limpieza del establo. Se anotó cualquier reducción en el consumo de alimentos del grupo o de un animal individual. Se registraron las temperaturas corporales durante varios días antes de la exposición y hasta 20 días después de la misma.

Análisis de sangre tras la exposición

Se recogieron muestras de sangre EDTA los días -1, 2, 6, 9, 12 y 15 después de la exposición para controlar y seguir los cambios relativos al número de leucocitos y trombocitos en la sangre. Uno de los signos típicos de CSF es la reducción en el número de leucocitos (leucopenia) y de trombocitos (trombocitopenia). Los recuentos de células normales en cuanto a glóbulos blancos y trombocitos en cerdos convencionales oscilan entre $11-23 \times 10^9/l$ y $320-720 \times 10^9/l$, respectivamente. Los dos límites mencionados varían en cada cerdo. Los análisis de glóbulos se realizaron con un contador coulter Medonic CA 570. La leucopenia y la trombocitopenia se definieron como recuentos de plaquetas considerablemente más bajos que el número mínimo mencionado anteriormente, de preferencia durante más de un día.

Aislamiento de virus y detección de antígeno viral

Aislamiento de virus: Se extrajeron leucocitos de la sangre periférica de muestras de sangre EDTA tomadas los días -1, 2, 6, 9, 12 y 15 tras la exposición para controlar y seguir la viremia. Las muestras se almacenaron a -70°C . La presencia de CSFV en los leucocitos se examinó del siguiente modo. En una placa M24 (Greiner) se añadieron $300 \mu\text{l}$ (que contenían aproximadamente 5×10^6 células) de una suspensión de célula renal porcina (SK6) a cada pocillo y se cultivaron a 37°C y $5\% \text{CO}_2$ en una cámara húmeda durante 24 horas. Después de 24 horas, se quitó el medio y se añadieron $300 \mu\text{l}$ de una muestra de leucocito congelada/ descongelada por cada pocillo. Después de una hora de incubación a 37°C y $5\% \text{CO}_2$, la muestra se quitó. Se lavó entonces la monocapa añadiendo y quitando $400 \mu\text{l}$ de medio de cultivo (medio basal de Eagle). Posteriormente, se añadió por cada pocillo, $800 \mu\text{l}$ de medio de cultivo (medio basal de Eagle) con 5% de suero bovino fetal (FBS), libre de anticuerpos de pestivirus y 1% de un stock antibiótico (que contenía glutamina ($0,3 \text{ mg ml}^{-1}$), penicilina ($200 \text{ unidades ml}^{-1}$), estreptomycin ($0,2 \text{ mg ml}^{-1}$) y micostatina (100 U ml^{-1}). Después de cuatro días, se lavaron las monocapas en una solución de NaCl al 10% , se secaron durante 1 hora a 80°C , se incubaron con una solución tamponada que contenía anticuerpos conjugados específicos de CSFV, y se procedió al lavado y a la tinción. Las monocapas se leyeron por microscopio como células teñidas. Los resultados se expresaron como positivos o negativos para virus.

IFT: En el post-mortem se recogieron muestras de tejidos de amígdalas, bazo, riñón e íleo y se sometieron a test utilizando una técnica de inmuno fluorescencia directa (Ressang and De Boer, 1967. Tijdschrift loor Diergeneeskunde 92:567-586) para comprobar la presencia de antígeno viral. Se fijaron e incubaron muestras de secciones de triostato ($4 \mu\text{m}$ de espesor, dos por órgano) de estos tejidos con un suero conjugado FITC anti-pestivirus porcino policlonal. Después de lavar, se leyeron las secciones bajo microscopio de fluorescencia. Los resultados se expresaron como positivo (= fluorescencia) o negativos (= no fluorescencia).

Respuesta serológica

Se recogieron muestras de sangre-suero de todos los cerdos, salvo los controles, a intervalos de una semana después de la exposición durante 6 semanas. Las muestras se almacenaron a -20°C y se sometieron a ensayo en una prueba de neutralización de virus (NPLA) específica de CSFV (Terpstra and Wensvoort. 1994. Vet. Microbiol. 33:113-120), Cedites ELISA para detectar anticuerpos específicos de CSFV contra E2 (Colijn *et al.*, 1997. Vet. Microbiol. 59:15-25) y en un Cedites ELISA para detectar anticuerpos contra E^{ms} (Smith. *Et al.*, in prep.).

Se determinaron los títulos de anticuerpo de neutralización específicos de CSFV en suero en un sistema de microvaloración. Se mezclaron diluciones dobles en serie de suero con un volumen igual de una suspensión de CSFV (cepa Brescia) que contenía $30-300 \text{ TCID}_{50}$. Después de incubar durante 1 hora a 37°C en un incubador CO_2 se añadieron aproximadamente 25.000 células PK-15 por pocillo. Después de 4 días, las placas de microvaloración se trataron en la forma mencionada anteriormente y se leyeron por microscopio. El título de neutralización de CSFV se expresó como la recíproca de la máxima dilución que neutralizó todos los virus.

El CSFV E2 ELISA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Colijn *et al.*, 1997. *ibid*). El CSFV E^{ms} -ELISA se realizó de la forma siguiente. Se preincubaron sueros de test ($30 \mu\text{l}$) con antígeno E^{ms} CSFV ($70 \mu\text{l}$ de una dilución activa de E^{ms} expresado baculovirus de CSFV cepa Brescia) en una placa de microvaloración no recubierta de 96 pocillos que contenía $45 \mu\text{l}$ de tampón ELISA durante 30 minutos a 37°C . Seguidamente, se añadieron $50 \mu\text{l}$ de esta mezcla de preincubación a una placa de microvaloración recubierta con el anticuerpo monoclonal específico de Eras 137,5, y que contenía $50 \mu\text{E}^{\text{ms}}$ de una solución activa del anticuerpo monoclonal específico de E^{ms} conjugado de peroxidasa de rábano picante 140.1.1. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C , se lavaron seis veces con $200 \mu\text{l}$ de solución de lavado y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente con $100 \mu\text{l}$ de un cromógeno listo para utilizar (3,3',5,5'-tetrametil bencidina)/solución de sustrato. La reacción de color se detuvo añadiendo $100 \mu\text{l}$ de una solución de H_2SO_4 $0,5 \text{ M}$ y se midió la densidad óptica a 450 nm usando un espectro fotómetro Easy Reader (SLT Vienna).

ES 2 273 669 T3

Resultados

Observación clínica, detección de antígeno viral, recuentos de leucocitos/trombocitos

5 Tras la vacunación ninguno de los animales desarrollo signos clínicos o fiebre (cuadro 6). Ambos grupos A y B de cerdos desarrollaron una leve fiebre ($40^{\circ}\text{C} < T < 41^{\circ}\text{C}$) durante tres días, comenzando a los tres días de la exposición. Ninguno de los cerdos vacunados, ya sea del grupo A (Flc23) o B (Flc22) desarrolló leucopenia o trombocitopenia (cuadro 6), aunque seis días después de la exposición se observó una ligera reducción del recuento de trombocitos y de leucocitos en la mayoría de los cerdos. En ambos grupos A y B no se detectó ningún virus en los leucocitos. Además, los órganos de todos los cerdos fueron IFT-negativos al final del experimento, lo cual indica la ausencia de infecciones persistentes.

Respuesta serológica

15 Tras la vacunación de los cerdos del grupo A (Flc23) y del grupo B (Flc22), no se detectó ningún anticuerpo ESPECÍFICO del CSFV con E^{tns} ELISA (cuadro 7) y E^{tns} -ELISA (cuadro 8). Este resultado se correspondía con los resultados NPLA: todos los cerdos vacunados siguieron siendo negativos para neutralizar anticuerpos contra CSFV (cuadro 9).

20 Tras la inoculación de exposición, se observaron porcentajes de inhibición máximos en el E2-ELISA en todos los cerdos inoculados. Asimismo, los cuatro cerdos seroconvirtieron en el E^{tns} -ELISA. En los ensayos de neutralización de anticuerpos todos los cerdos inoculados mostraron elevados valores contra CSFV. Estos resultados muestran claramente que ambas vacunas Flc22 y Flc23 protegen contra una exposición letal de Brescia virulento y se pueden discriminar de animales infectados por E^{tns} -ELISA específico de CSFV.

CUADRO 1

IPMA sobre monocapas SK6 transfectados con plásmidos de expresión de E^{tns} que albergan la secuencia de uncléotidos de la autoproteasa y genes estructurales (N^{pro} -C-recombinante E^{tns} E1-E2)

plásmido	supresión*	E ^{tns}						
		E2	C5	140,1	R716	137,5	b3	b4
pPRK83	ninguno	+	+	+	+	+	+	+
pPRKc49	436 a 488	+	+	+	+	+	+	+
pPRKc50	422 a 488	-	-	-	-	-	+	+
pPRKc51	422 a 436	-	-	-	-	-	+	+
pPRKc48	272 a 488	-	-	-	-	-	+	+

* numeración a.a. de cepa C de CSFV (Moormann et. Al., 1996, J. Virol. 70:763-770)

CUADRO 2A

reactividad IPMA de la célula SK6c26 y SK6 con anticuerpos CSFV E^{tns}

células	Mab C5	anticuerpos CSFV		
		Mab 140.1	Mab 37,5	R716
SK6c26	+	+	+	+
SK6	-	-	-	-

ES 2 273 669 T3

CUADRO 2B

Comparación de E^{RNS} de células infectadas SK6c26 y SK6 con Flc2

5	células	ng E ^{RNS} . cm ² a	actividad RNasa (A ₂₆₀ .min ⁻¹ .mg ⁻¹)b	Dimerización c
	SK6c26	10	130	+
	SK6	<0,1	0	-
10	SK6 Flc2 infectado	30	171	+

^a la cantidad de E^{RNS} en los lisatos celulares por cm² se extrapola en una curva standard preparada a partir de una preparación purificada por inmuno afinidad de E^{RNS} producido en células de insecto.

15 ^b la actividad RNasa se determinó como unidades A₂₃₆₀ por mg E^{RNS} por minuto según lo descrito por Hulst et. Al., 1998, J. Virol. 72:151-157

^c detección de dímeros de E^{RNS} por SDS-PAGE no reductor.

20

CUADRO 3

Neutralización de virus de CSF por anticuerpos

25

Reducción neutralizante de virus (log TCID₅₀/ml) con suero^a

30	Virus	716 (dirigido contra E ^{RNS}) ^b	539 (dirigido contra E2) ^c
	Flc2	-3,0	-1,75
	Flc22	-3,0	-1,75
35	Flc23	-3,25	-1,0

^a Log TCID₅₀/ml reducción de títulos de CSFV debido a la presencia de suero

^b suero de conejo preparado contra E^{RNS} de cepa C de CSFV

^c suero porcino específicamente dirigido contra E2 de cepa Brescia CSFV

40

CUADRO 4A

Reactividad de células SK6b2 y SK6 con CSFV E2 Mabs

45

Reactividad de anticuerpos de CSFV en IPMA

50	células	B3	b8	b6
	SK6b2	+	+	+
	SK6	-	-	-

55

60

65

ES 2 273 669 T3

CUADRO 4B

Caracterización de la línea celular SK6b2

5	células	Dimerización ^a	ng E2.cm ² ^b
	SK6b2	+	115
	SK6	-	0
10	SK6 Flc2 infectado	+	38

^a La dimerización de E2 se determinó en SDS-PAGE

en condiciones no reductoras

^b La cantidad de E2 en los lisatos celulares por cm² medida en el E2 ELISA se extrapolo de una curva standard preparada a partir de una preparación purificada por inmuno afinidad de E2 producido en células de insecto.

CUADRO 5

Caracterización de virus E2 recombinantes en células SK6

30	Virus	Reactividad IPMA en células SK6			virus infeccioso recuperado ^a	
		C5	b3	b6	células SK6b2	células SK6
	Flc2	+	+	+	+	+
35	Flc4 (supresión B/C dominio de E2)	+	+	-	+	-
	Flc47 (supresión E2)	+	-	-	+	-

^a Se recupera el virus infeccioso si los sobrenadantes de células infectadas pueden infectar nuevas células SK6 y SK6b2. No se considera la propagación de virus de célula a célula ni la propagación de virus debido a la división de células debido a infección de virus.

CUADRO 6

Resultados de aislamiento de virus, citopenia y fiebre después de exposición a CSFV

fiebre después de exposición a CSFV

55	Grupo	cerdo n°.	# días con fiebre ^a	Viremia	IFT	Citopenia ^b	muerte
	A	469	3	-	-	-	-
	Flc23			-	-	-	-
		476	5	-	-	-	-
60	B	477	5	-	-	-	-
	Flc22			-	-	-	-
		478	6	-	-	-	-

a) Fiebre: temperatura del cuerpo > 40°C

b) Citopenia: trombocitopenia y/o leucopenia

ES 2 273 669 T3

CUADRO 7

Resultados de Cedites® ELISA para la detección de anticuerpos de CSFV-E2^a

	Días después de la exposición									
5	A.	469	0	0	27	34	17	61	100	100
		476	0	0	0	0	18	97	100	100
10	B.	477	0	0	11	17	32	93	100	100
		478	0	0	15	24	34	51	100	100

^a El Cedites® E2-ELISA detecta específicamente anticuerpos contra proteína de envoltura E2 de CSFV. Los resultados de la prueba se expresan como la inhibición porcentual de una señal standard; <30% es negativo, 30-50% inhibición es dudosa, >50% inhibición es positiva.

CUADRO 8

Resultados de Cedites® ELISA para la detección de anticuerpos^a de CSFV-E^{tns}

Grupo	n°	Animal					Días después de la exposición				
		-28	-15	-1	6	12	19	27	33	49	
30	A. Flc23	469	17	29	26	22	76	80	81	74	83
		476	15	28	25	14	70	76	81	69	79
35	B. Flc22	477	13	30	13	20	70	54	49	50	62
		478	12	34	35	22	68	84	81	87	92

^a El Cedites® E^{tns} ELISA detecta específicamente anticuerpos contra proteína de envoltura E^{tns} de CSFV. Los resultados de la prueba se expresan como inhibición porcentual de una señal standard, <50% es negativo, ≥50% es positivo.

CUADRO 9

Resultados del NPLA para la detección de anticuerpos neutralizantes específicos de CSFV Brescia

Grupo	Anim	días después de exposición alno											
		-28	-21	-15	-9	-1	6	12	19	27	33	49	
50	A	469	<10	<10	<10	<10	15	80	>1280	>1280	>1280	>1280	7680
	Flc23	476	<10	<10	<10	<10	<10	80	>1280	>1280	>1280	>1280	7680
55	B	477	<10	<10	<10	<10	10	80	>1280	>1280	>1280	>1280	>20480
	Flc22	478	<10	<10	<10	<10	<10	480	>1280	>1280	>1280	>1280	7680

ES 2 273 669 T3

Leyendas

Figura 1. Representación esquemática de E^{ms} de cepa C de CSFV (superior) y vista superior de plásmidos de E^{ms} (parte interior). Los dominios de la actividad RNasa se muestran mediante barras cerradas. Las posiciones de las cisteínas se indican con puntos negros.

^a Posiciones de las detecciones o mutaciones puntuales con respecto a la secuencia de aminoácidos del marco de lectura abierto (ORF) de cepa C de CSFV (Moormann *et al.*, J. Virol. 1996, 70: 763-770).

^b Las mutaciones de cisteínas a serina se indican con puntos blancos.

^c El E^{ms} recombinante en estos plásmidos no aloja una etiqueta HA C-terminal.

NA: No disponible.

Figura 2. Representación esquemática de la construcción de las copias de ADN de longitud completa pPRKflc23 (A) y pPRKflc22 (B) que aloja supresiones de E^{ms}. La numeración de la secuencia de aminoácidos es del marco de lectura abierta de la cepa C de CSFV (Moormann *et al.*, 1996, J. Virol., 70:763-770). Los iniciadores de PCR se indican con líneas ininterrumpidas y designan: p(número), N^{pro}, autoproteasa; C, proteína nuclear; E^{ms}, E1 y E2 proteínas de envoltura; 5', región no codificadora 5', 3, región no codificadora 3'. Amp, gen de resistencia a ampicilina; CIP, fosfatasa intestinal de ternera; Kan, gen de resistencia a canamicina; ORF, marco de lectura abierto; PNK, polinucleótido quinasa, PhCMV secuencia potenciadora promotor del gen inmediato temprano de cito megalovirus humano; T7, promotor T7 bacteriófago; pPRKflc2 es la copia de longitud completa natural de cADN de la cepa C de CSFV. (B) plásmido pPRK129 era la plantilla para el primer PCR de E^{ms}. La zona NarI de este producto PCR y la zona ClaI del epítipo de hemaglutinina (HA) tienen extremos compatibles. Estos dos fragmentos PCR se insertaron en el vector digerido de BgIII/SalI pPRKc16 a través de una unión de 3 puntos. Véase texto para información detallada sobre la construcción de las copias de ADN de longitud completa y las secuencias del iniciador.

Figura 3. Caracterización de virus recombinantes

^a Las posiciones de cisteínas se indican con puntos negros, las mutaciones de cisteína a serina se representan con puntos blancos.

^b Posiciones de las supresiones o mutaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos de cepa C CSFV ((Moormann *et al.*, 1996, J. Virol., 70: 763-770).

^c Los sobrenadantes de células infectadas con SK6c26 se utilizaron para la infección de células SK6 y SK6c26. Las células se inmuno-tiñeron con anticuerpos específicos E^{ms} (R716 y C5) o un Mab (b3) específico de E2 y se contaron como positivo (+) o negativo (-).

^d Se consideran que los virus son infecciosos si el sobrenadante de las células infectadas puede infectar células SK6 o SK6b26. La propagación de virus de célula a célula y la propagación de virus debida a división de células no se considera virus infeccioso.

Figura 4. Células RT-PCR de SK6c26 infectadas con Flc22, Flc23 y Flc2 con iniciadores que flanquean E^{ms} y E2. (-) control negativo; células SK6c26 infectadas por mock; M: marcador 200 bp.

Figura 5. Cinética de crecimiento de los virus recombinantes de CSFV, Flc22, Flc23 y el virus de tipo natural Flc2. Se infectaron monocapas subconfluentes de células SK6c26 en una multiplicidad de 0,1. Se adsorbieron virus durante 1,5 horas. Se determinaron los títulos virales de lisatos celulares y sobrenadante en diversos momentos mediante dilución de punto final en células SK6c26.

Figura 6. Secuencia de aminoácidos E^{ms} del recombinante Flc22, Flc23 y la cepa natural Flc2; I: indica la posición de la supresión.

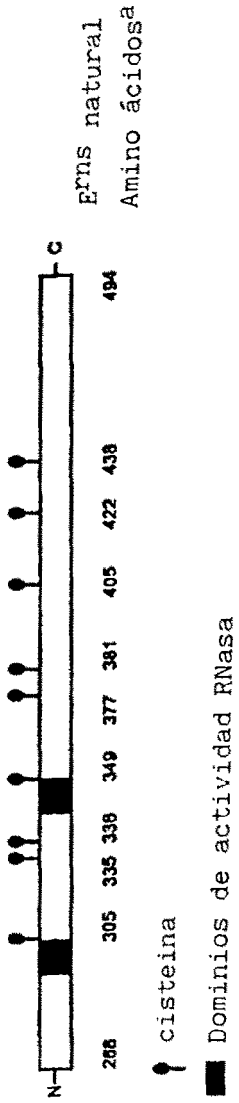
Figura 7. Representación esquemática de pPRKflc23 que alberga el epítipo HA, una secuencia no pestivirus. El epítipo está flanqueado por los 5 a.a más N-terminales y los 6 a.a más C-terminales de E^{ms}.

Figura 8. Representación esquemática de la construcción de las copias de ADN de longitud completa pPRKflc4 (a) y pPRKflc47 (b). La numeración de la secuencia de aminoácidos es del marco de lectura abierta de la cepa C de CSFV (Moormann *et al.*, 1996, J. Virol.). Los iniciadores PCR se indican con líneas ininterrumpidas y designan p (número), N^{pro}, autoproteasa; C, proteína nuclear; proteínas de envoltura E^{ms}, E1 y E2; p7: proteína p7, NS: proteína no estructural, 5', región no codificadora 5'; 3', región no codificadora 3', Amp; resistencia a ampicilina, Kan: resistencia canamicina, pPRKflc2 es la copia de ADN de longitud completa, natural de la cepa C de CSFV. (a) el gen E2 de plásmido pPAB16 se insertó en plásmido pPRKc129 por digestión de NgoMI/BgI. (b) pPRKflc2 fue la plantilla para la amplificación de PCR con iniciadores p1195 y p403. Véase texto para información detallada sobre la construcción de las copias de ADN de longitud completa y la secuencias de iniciadores.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para obtener una partícula similar al pestivirus que comprende la aportación de una célula según la reivindicación 9, que contiene un constructo de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína pestiviral o una parte importante de la misma relativa a la propagación viral, la transfección de dicha célula con un ácido nucleico recombinante derivado de un pestivirus, habiéndose suprimido funcionalmente del ácido nucleico un fragmento que codifica dicha al menos una proteína pestiviral relativa a la propagación viral, permitiéndose que replique en dicha célula el mencionado ácido nucleico recombinante derivado del pestivirus, permitiendo que dicho ácido nucleico replicado forme parte de una partícula que comprende por lo menos dicha proteína pestiviral o parte importante de la misma derivada de dicha célula y recolectando dicha partícula.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho constructo de ácido nucleico se expresa de forma estable.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho ácido nucleico recombinante derivado de un pestivirus comprende adicionalmente un fragmento de ácido nucleico no-pestivirus.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, en el que dicho fragmento no pestivirus se deriva de un patógeno o una citoquina.
5. Método según las reivindicaciones 3 o 4, donde dicho ácido nucleico es ARN.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde la citada supresión funcional está en un fragmento que codifica una proteína de envoltura.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde la mencionada supresión funcional comprende una parte inmuno dominante de dicha proteína.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, donde la citada proteína estructural es una proteína de envoltura funcional o por lo menos una parte inmuno dominante de la misma.
- 30 9. Célula de empaquetadura que comprende un constructo de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína de pestivirus o parte importante de la misma relacionada con la propagación viral, donde dicha proteína pestiviral o parte sustancial de la misma relacionada con la propagación viral es expresada de forma estable a partir de un ácido nucleico integrado en el genoma celular y permite empaquetar dicha proteína pestiviral o parte sustancial de la misma en una partícula similar a pestivirus después de la transfección de dicha célula con un ácido nucleico recombinante derivado de un pestivirus del que se ha suprimido funcionalmente la citada proteína pestiviral.
- 35 10. Partícula similar a pestivirus que se puede obtener con un método según la reivindicación 1 o 2.
- 40 11. Método para obtener una vacuna de pestivirus no propagable que comprende la obtención de una multitud de partículas con un método según la reivindicación 1 o 2 y la preparación de una suspensión de dichas partículas en un diluyente adecuado.
- 45 12. Método según la reivindicación 11, que comprende además la combinación de dicha suspensión con un adyuvante.
13. Vacuna de pestivirus no propagable que se puede obtener con un método según la reivindicación 11 o 12.
- 50 14. Vacuna que comprende una partícula según la reivindicación 10 y un diluyente.
15. Vacuna según la reivindicación 14, que comprende además un adyuvante.
16. Vacuna según la reivindicación 14 o 15, en la que dicho ácido nucleico se deriva de una cepa de vacuna pestivirus, como virus de cepa C.
- 55 17. Vacuna según la reivindicación 14 o 15, en la que dicho ácido nucleico se deriva de un virus clásico de fiebre porcina.
- 60 18. Vacuna según la reivindicación 14 o 15, en la que dicho ácido nucleico se deriva de un virus de diarrea viral bovina.
19. Vacuna según la reivindicación 14 o 15, en la que dicho ácido nucleico se deriva de un virus de enfermedad de Border.
- 65

Representación esquemática de E^{rns} de cepa C de CSFV y vista general de plásmidos E^{rns}



Plásmidos		E ^{rns} recombinante	
E ^{rns} con terminal C HA etiqueta	E ^{rns} en contexto de N ^{pro} -C-rec. E ^{rns} -E1-E2 cDNA c	supresion o mutacion	lo ng. total
NA	pPRKc2	ninguno	pPRKc2
pPRKc42	pPRKc49	438-488	NA
pPRKc43	pPRKc50	422-488	pPRKc22
NA	pPRKc51	422-436	pPRKc30
NA	pPRKc48	273-488	pPRKc23
CYS->SER	pPRKc52	422	pPRKc31
CYS->SER	pPRKc54	405	pPRKc32
CYS->SER	pPRKc56	381	pPRKc33

Fig. 1

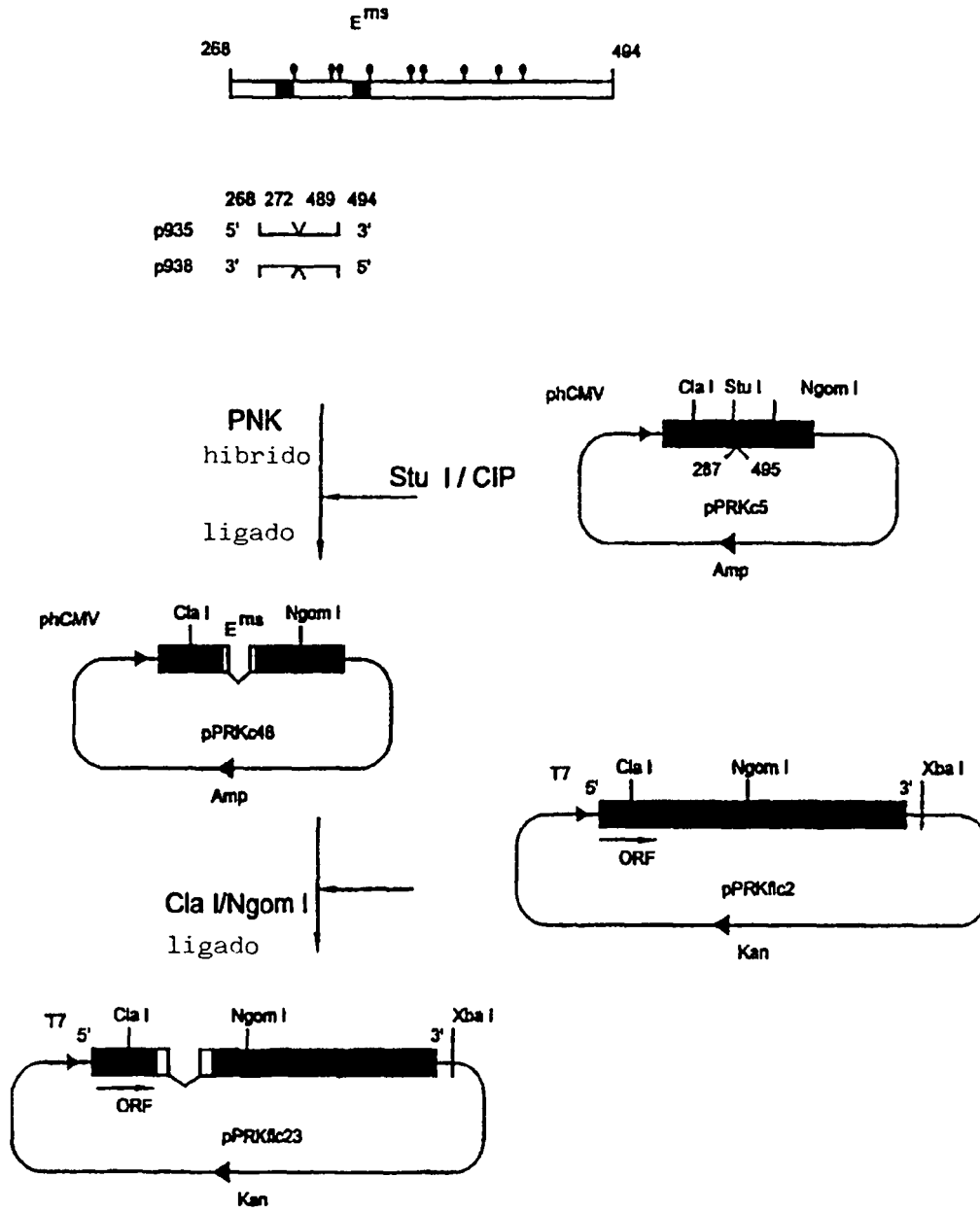


Fig. 2A

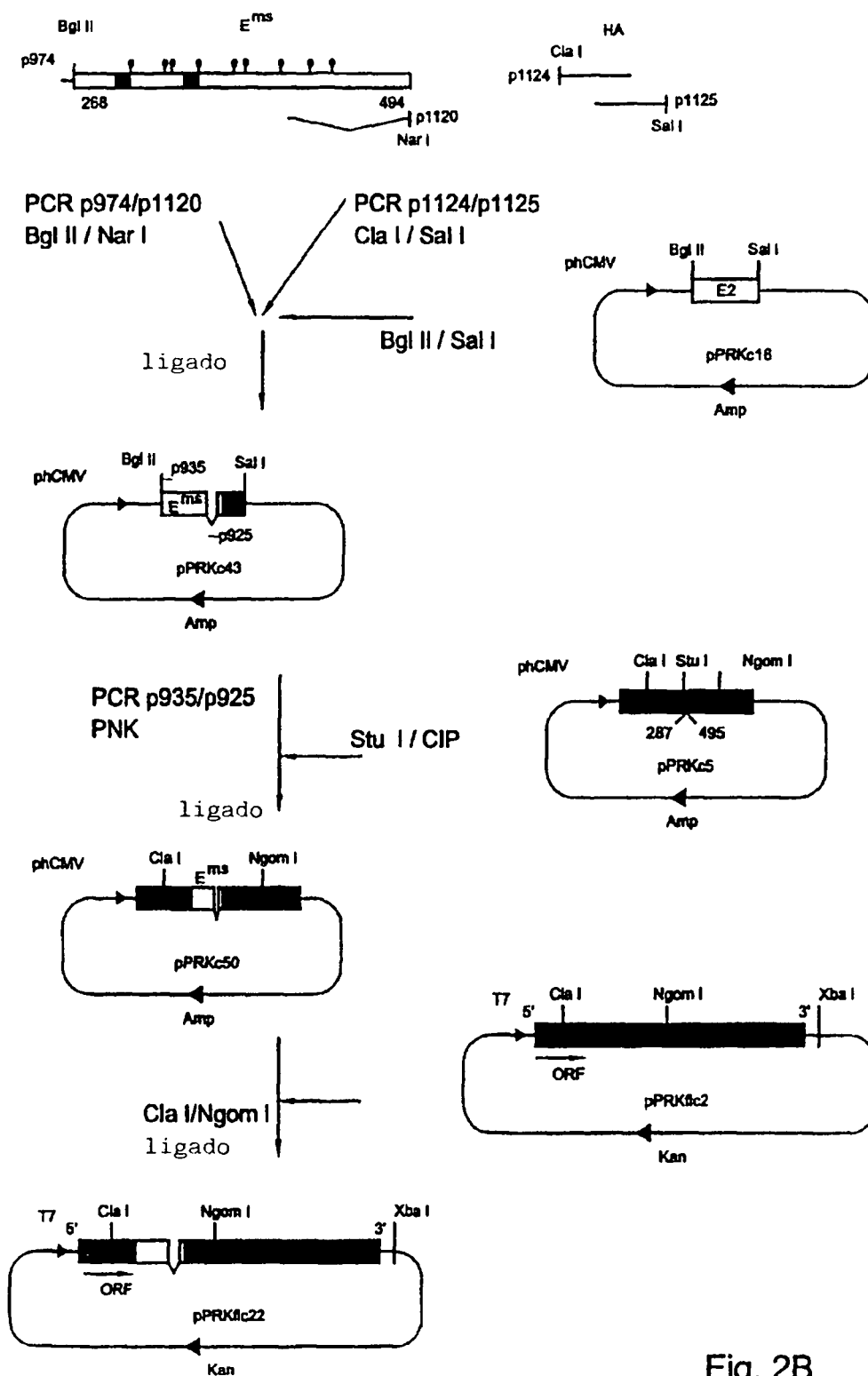


Fig. 2B

Caracterización de virus recombinantes

Representación esquemática de Erns recombinante	Supresión o mutación	virus	Reactividad IpMA ^a				Virus infeccioso recup.	
			SK6c26 b3	SK6 b3	células R716	C5	SK6c26	SK6celulas
	ninguno	F1c2	+	+	+	+	+	+
	422-488	F1c22	+	+	-	-	+	-
	273-488	F1c23	+	+	-	-	+	-
	422-436	F1c30	+	+	-	-	+	-
	422 CYS->SER	F1c31	+	+	-	-	+	-
	405 CYS->SER	F1c32	+	+	+	+	+	+
	381 CYS->SER	F1c33	+	+	-	-	+	-

Fig. 3

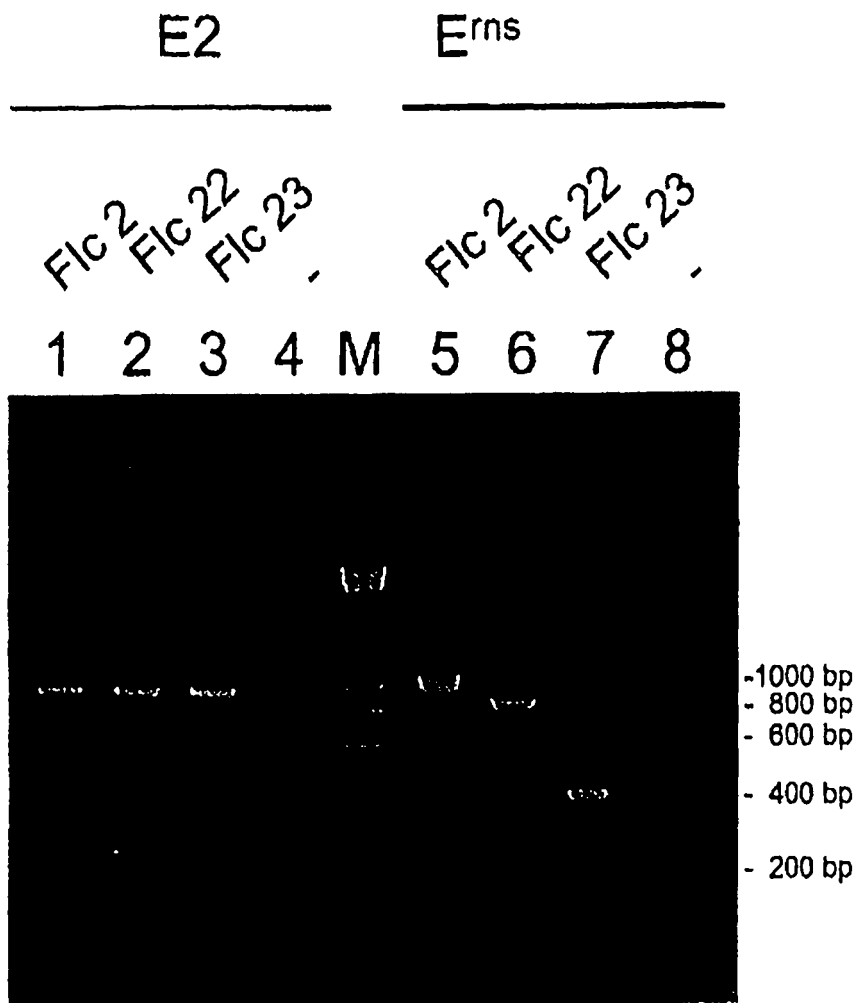


Fig. 4

Curva de crecimiento CSFV recombinante de longitud completa en SK6c26
TCID50/ml

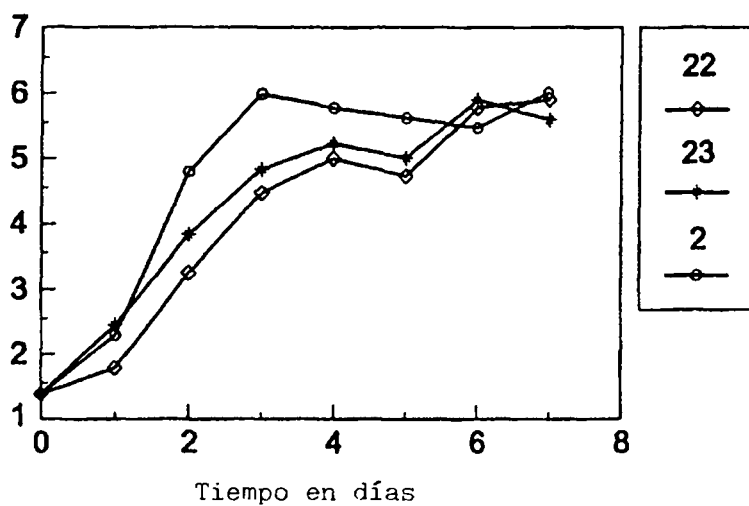


Fig. 5

Fic2

**ENITQWNLSDNGTNFTGIQHAMYLRGVNRS LHGIWPGKICKGVPTHLATDVELKEIQGMMDASE
GTNYTCCKLQRF THEWNKHGWCNWHNIDPWIQLMNRTQADLAEGPPVKECAVTCRYDKDADI
NVVTQARNRPFTTTLTGCKKGKNFSFAGTVIESPCNFNVSVEDTLYGDHECGSLLQDAALYLYDGI
MTNTIEFTNARQGAARVTSWLGRQLRTAGKRLEGRSKTWFGAYA**

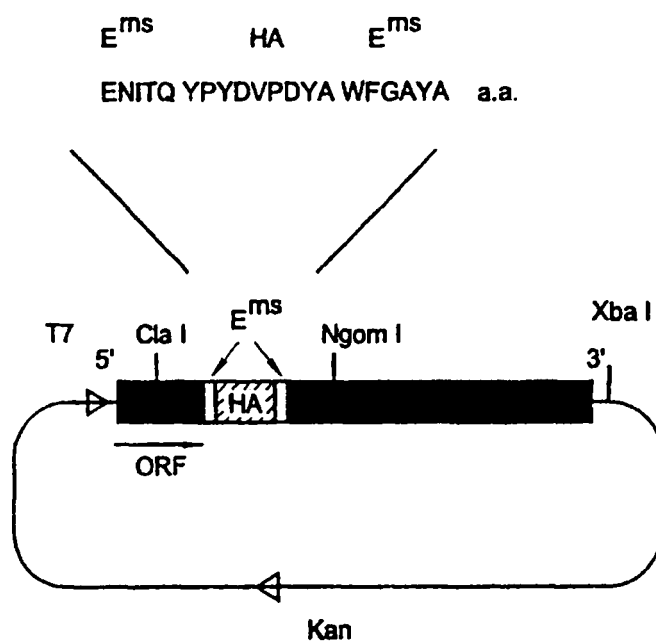
Fic22

**ENITQWNLSDNGTNFTGIQHAMYLRGVNRS LHGIWPGKICKGVPTHLATDVELKEIQGMMDASE
GTNYTCCKLQRF THEWNKHGWCNWHNIDPWIQLMNRTQADLAEGPPVKECAVTCRYDKDADI
NVVTQARNRPFTTTLTGCKKGKNFSFAGTVIESPWFGAYA**

Fic23

ENITQWFGAYA

Fig. 6



pPRKflc23 con un epítipo HA incorporado

Fig. 7

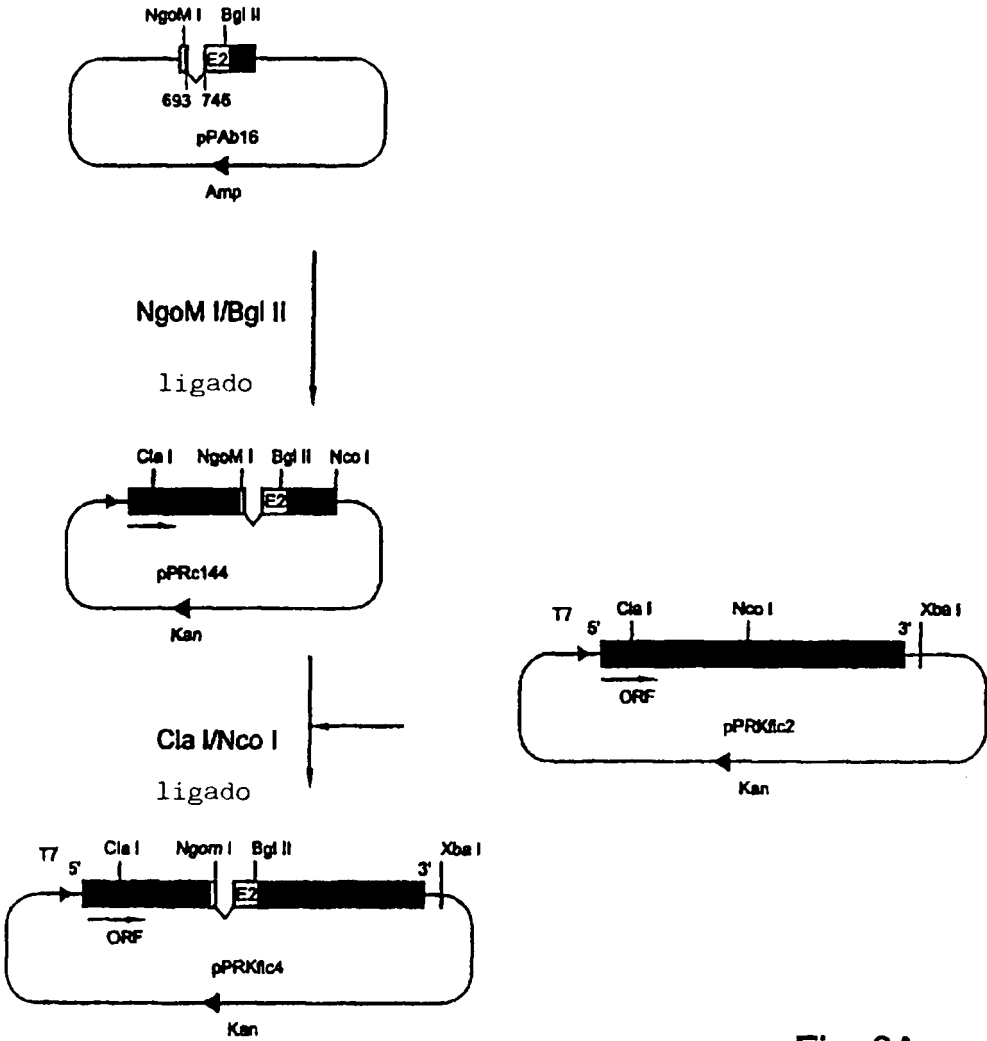


Fig. 8A

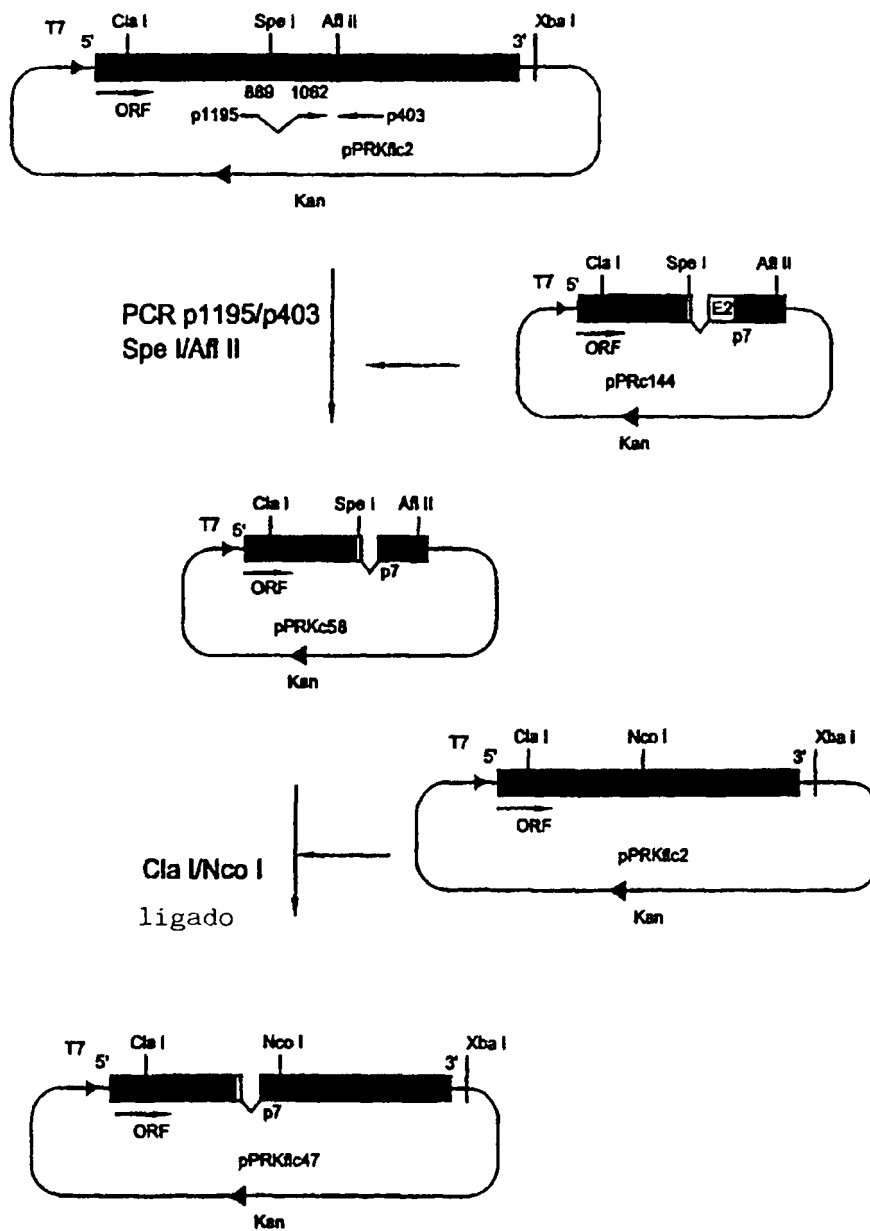


Fig. 8B