



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101995900439917
Data Deposito	10/05/1995
Data Pubblicazione	10/11/1996

Priorità	9401027
Nazione Priorità	ES
Data Deposito Priorità	

Priorità	9500815
Nazione Priorità	ES
Data Deposito Priorità	

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

PROTEINE DI PRRSV RICOMBINANTI, CORREDI DIAGNOSTICI E VACCINI CONTENENTI TALI PROTEINE DI PRRSV RICOMBINANTI.

DESCRIZIONE

del brevetto per Invenzione Industriale di
CYANAMID IBERICA, S.A., di nazionalità spagnola,

70 95.00.367

a 28003 MADRID (Spagna), Cristóbal Bordiú, 35

Inventori: PLANA DURAN Juan, CASAL ALVAREZ Jose^{Ignacio}, CLIMENT SANCHEZ Isabel

* * *

SCOPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce a proteine virali ricombinanti dell'agente causativo della sindrome porcina riproduttiva e respiratoria (PRRS) prodotta in un sistema di espressione di baculovirus ricombinanti moltiplicati in una coltura di cellule ospite permissive. L'invenzione si riferisce pure a corredi diagnostici ed a vaccini che comprendono, almeno, una di dette proteine ricombinanti.

PRECEDENTI DELL'INVENZIONE

In Spagna, i primi casi di alterazioni respiratorie in maialini sono stati rilevati in un lotto di 300 maialini importati dalla Germania nella metà gennaio 1991 [Plana ed al., "Med. Vet.", 8, 11, (1991)]. Poco dopo, in due branchi di allevamento in due fattorie situate in vicinanza del branco in cui era comparso il problema iniziale, si è individuata una malattia caratterizzata da un numero anormalmente elevato di aborti durante l'ultima fase della gestazione, come pure una mortalità del 70% nei maialini.

La causa di queste esplosioni epizootiche non era nota, ma la loro sintomatologia era simile ai segni clinici che erano stati descritti per una malattia dei

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

maiali individuata la prima volta in Europa in Germania (1990), e alla malattia denominata "Mystery Swine Disease" individuata negli Stati Uniti e in Canada nel 1987 [Hill, "Proceedings of the Mystery Swine Disease Committee Meeting", 6 ottobre 1990, Denver, USA]. Questa malattia attacca le scrofe gravide provocando in queste anoressia, aborti, feti nati morti, feti mummificati, maialini deboli che muoiono dopo poche ore di vita, e problemi respiratori dopo il parto, tra gli altri. Attualmente, la malattia è nota come "Sindrome porcina riproduttiva e respiratoria" (PRRS), sebbene sia stata precedentemente indicata come "Aborto azzurro di maiali", "Sindrome riproduttiva misteriosa" (MRS), "Sindrome di infertilità e respiratoria in maiali" (SIARS) e "Sindrome epidemica di aborto e respiratoria porcina" (PEARS).

Attualmente, è noto che l'agente causativo di questa malattia è un virus denominato virus PRRS (PRRSV). Questo virus è stato isolato per la prima volta in Olanda da un gruppo di ricercatori del CDI/Lelystad, che lo chiamarono virus Lelystad (LV) [Wesvoort G. e al., "Vet. Quarterly", 3, 121-130 (1991)]. Alcuni mesi più tardi, si è ottenuto un altro isolato in Spagna dai Laboratori Sobrino/Cyanamid

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

[Plana ed al., "Vet. Microbiol.", 33, 203-211 (1992)]
che verrà identificato in questa descrizione come
PRRS-Olot. Da questo momento, nuovi isolati del virus
sono stati descritti (Richiesta EP n. 0.529.584 A2,
richieste PCT n. WO 93/06211 e WO 93/07898).

Le caratteristiche strutturali del virus PRRS
sono state descritte in due pubblicazioni recenti:

a) Meulenberg J.J.M. ed al., "Virus Lelystad,
l'agente causativo della sindrome porcina di aborto
epidemico e respiratoria (PEARS) si riferisce a LDV e
EAV". "Virology", 192, 62-72 (1993); e

b) Cozelmann K-K. ed al., "Caratterizzazione
molecolare di virus della sindrome porcina
riproduttiva e respiratoria, un termine del gruppo di
Arterivirus". "Virology", 193, 329-339 (1993).

Il virus PRRS ha una dimensione di 50-60 nm, con
un involucro di approssimativamente 30-35 nm contenuto
nel nucleocapside, e una singola molecola di RNA come
materiale genomico. In base a questi dati morfologici,
PRRSV è stato inizialmente classificato come un
Togavirus, sebbene in base alla sua struttura genomica
e ai meccanismi di trascrizione e di traslazione esso
sia più prossimo alla famiglia dei Coronaviride.
Recentemente, in base a differenze e/oppure a
similitudini in confronto con i gruppi precedenti, è

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

stata proposta la sua classificazione in una nuova famiglia denominata Arteriviridae [Cavanagh D. ed al., "Arch. Virology", (1994)]. Insieme con PRRSV, in questo gruppo sono inclusi i virus della arterite equina (EAV), il virus della deidrogenasi lattica (LDV) e il virus della febbre emorragica di scimmie (SHFV).

Recentemente, tutto il genoma del virus Lelystad (LV) (Meulenberg ed al., citato sopra), un segmento genomico dell'isolato del virus PRRS di Tübingen (Germania) (TV) (Cozelmann ed al., citati sopra), e un segmento del virus PRRS-Olot (Rivendicazione di brevetto spagnolo n. ES P9301973) sono stati clonati e sequenziati. In base a tutti i risultati ottenuti, si può stabilire che il genoma PRRSV è formato da una molecola di RNA a filamento singolo che contiene alla estremità 3' una coda poli-A. La lunghezza del genoma è di approssimativamente 15.000 coppie di basi (bp) e nella sua struttura contiene sette fasi di lettura aperte (ORF) codificanti per le proteine virali. Le ORF sono state denominate come da ORF1 a ORF7 e esse presentano piccoli segmenti sovrapposti tra loro. Si è proposto che la sintesi delle proteine virali sia prodotta da un gruppo di trascritti subgenomici di differente lunghezza (mRNA), ma di simile estremità 3'

PLEDANI Rinaldo
(iscrizione albo nr. 358)

poliadenilata. e di sequenza leader 5' originante dalla sequenza terminale 5' non codificante. Questa forma di espressione di proteina virale è stata denominata mRNA annidati ed è stata descritta precedentemente per i coronavirus [Spaan W.J.M., Cavanagh D., e Horzineck M.C., "J. Gen. Virol.", 69, 2939-2952 (1988)]. In base alla sequenza di nucleotidi di isolato virale di PRRSV di Lelystad (LV) e di Tübingen (TV) e per omologia con quanto è stato osservato con altri arterivirus, si è proposto che nel genoma virale, ORF1 (a e b) codifichi per la polimerasi e replicasi virale. Le ORF da 2 a 6 codificherebbero per le proteine dell'involuppo virale, e la ORF7 codificherebbe per la proteina del nucleocapside. La replicasi e la polimerasi virale sono proteine di grandi dimensioni, 260 e 163 kDa, rispettivamente, ed entrambe contengono tre siti di glicosilazione possibili. Le proteine di involucro (ORF da 2 a 6) disposte alla estremità 3' sono piccole, tra 30 e 19 kDa. Tutte queste contengono più di due siti di glicosilazione possibili, specialmente la ORF3 che contiene 7 siti. Tutte queste proteine contengono sequenze idrofobe alle estremità terminali ammino (N-) e carbossi (C-) che possono funzionare come sequenza leader e ancora della membrana.

PIERANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Generalmente, esse sono proteine idrofobe, in accordo con la loro posizione associata ad una membrana. Dovrebbe essere messo in evidenza la ORF6 con tre segmenti idrofobi disposti entro i 90 residui di amminoacidi alla estremità N-terminale. D'altra parte, la proteina codificata da ORF7, corrispondente possibilmente al nucleocapside virale, è estremamente basica con residui di arginina, lisina e istidina alla estremità N-terminale. Sequenze di amminoacido di polimerasi virali LV e TV, proteine strutturali e nucleocapside presentano una identità tra il 29% e il 67% in confronto con il virus LDV e tra 20% e 36% in confronto con il virus EAV. Ciò fa pensare che l'evoluzione del virus PRRS sia più prossima a LDV che a EAV.

La malattia provocata da PRRSV è responsabile per gravi perdite nell'industria dell'allevamento dei maiali. Per questa ragione, sono stati sviluppati vaccini in grado di prevenire l'infezione provocata da PRRSV.

In generale, i vaccini contro il PRRSV noto, descritto nelle rivendicazioni di brevetto WO 92/21375, WO 93/06211, WO 93/07898 e ES P9301973, sono vaccini ottenuti da virus cresciuti su macrofagi e successivamente inattivati. La domanda di brevetto ES

PLESANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

P9301973 provvede un vaccino in grado di evitare la sindrome riproduttiva e respiratoria porcina (PRRS). Si è dimostrato che il vaccino è efficace nell'evitare alterazioni della riproduzione in scrofe, quali il parto di feti morti, maialini mummificati o viventi ma deboli, ripetizione dell'estro e simili problemi prodotti dal virus causativo della PRRS. Analogamente, si è verificato che il vaccino provoca una immunità cellulare negli animali vaccinati. Detto vaccino contiene una quantità adatta di antigene virale di PRRS, ceppo spagnolo (PRRS-Olot), inattivato, insieme con un coadiuvante ed un preservativo.

La presente invenzione provvede un vaccino della seconda generazione in cui si è impiegata la tecnologia del DNA ricombinante allo scopo di ottenere nuovi vaccini in grado di proteggere efficacemente contro l'infezione provocata da PRRSV. I vaccini secondo la presente invenzione contengono, almeno, una proteina di PRRSV ricombinante. D'altra parte, la presente invenzione provvede nuovi sistemi o corredi diagnostici del PRRSV che comportano l'impiego di tecniche di saggio immunologico enzimatico (ELISA) le quali utilizzano proteine di PRRSV ricombinante. Questi vaccini ricombinanti non richiedono una manipolazione del virus completo, ma viceversa di

PLEGANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

soltanto parte di questo, eliminando il pericolo di un incidente che libererebbe il virus, rappresentando un notevole vantaggio rispetto ai presenti vaccini di PRRSV inattivati. Questi nuovi vaccini ricombinanti non richiedono una manipolazione del virus completo, ma piuttosto di soltanto una parte di questo, eliminando il pericolo di un incidente che libererebbe il virus, il che rappresenta un considerevole vantaggio rispetto ai presenti vaccini di PRRSV inattivati.

La produzione di proteine ricombinanti mediante Ingegneria Genetica è un fatto che è stato descritto precedentemente. Sono noti numerosi sistemi di espressione e di produzione di proteine ricombinanti. Uno dei sistemi più efficaci per la produzione su larga scala di proteine ricombinanti si basa sulla replicazione di baculovirus ricombinanti, derivati dal virus della poliedrosi nucleare di Autographa californica (AcNPV), in cellule d'insetto in coltura. La descrizione della tecnica di espressione del baculovirus viene descritta negli articoli seguenti:

- a) LuKow, V.A. e Summers M.D., "Tendenze nello sviluppo di vettori di espressione di baculovirus", "Bio/Technology", 6, 47-55 (1988); e
- b) Bishop D.H.L., "Vettori di espressione di

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

baculovirus". Seminari in "Virology", 3, 253-264 (1992).

La presente invenzione provvede proteine ricombinanti di PRRSV, in particolare dell'isolato PRRS-Olot, prodotte in un sistema di espressione di baculovirus moltiplicati su una coltura permissiva di cellule ospite. I baculovirus ricombinanti in grado di produrre tali proteine ricombinanti, come pure i vettori di trasferimento utilizzati, costituiscono obiettivi addizionali dell'invenzione. I procedimenti per l'ottenimento di tali baculovirus ricombinanti e proteine è pure uno scopo della presente invenzione.

L'invenzione provvede anche nuovi vaccini per la vaccinazione di maiali per la loro protezione contro infezione provocata da PRRSV, comprendenti, almeno, una proteina ricombinante di quelle provviste dalla presente invenzione e un adeguato veicolo o coadiuvante.

L'invenzione provvede pure un corredo diagnostico per rilevare la presenza di anticorpi che riconoscono specificamente PRRSV in un campione biologico da maiali (ad esempio: sangue, siero, espettorato, saliva o latte). Il corredo comprende almeno una proteina ricombinante di quelle provviste dalla presente invenzione e adeguati metodi di rivelazione.

PLEGANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

L'invenzione provvede pure un corredo diagnostico per la rilevazione della presenza di antigene (PPRSV) in un campione biologico da maiali (ad esempio: sangue, siero, espettorato, saliva, latte o tessuto). Il corredo comprende almeno un anticorpo che riconosce specificamente il PPRSV ottenuto immunizzando animali con, almeno, una proteina ricombinante di quelle provviste dalla presente invenzione e un adeguato mezzo di rivelazione.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La figura 1 illustra la sequenza consecutiva delle 3383 bp clonate dall'isolato di PRRS-Olot;

la figura 2 illustra la sequenza di amminoacidi corrispondente alle proteine codificate da ORF2 (figura 2A), ORF3 (figura 2B), ORF4 (figura 2C), ORF5 (figura 2D), ORF6 (figura 2E) e ORF7 (figura 2F);

la figura 3 illustra la differente estensione dei cloni pPPRS-8, pPPRS-108, pPPRS-121, pPPRS-132, pPPRS-146, pPPRS-147, pPPRS-148, pPPRS-153 e pPPRS-3, in confronto con LV, come pure le ORF contenute in ognuno di questi. In questa figura, si fa riferimento al genoma di PPRSV (a), alla dimensione in Kb (b) e al numero del clone (c);

la figura 4 illustra il clone di pPPRS-3 contenente il gene della proteina codificata da ORF2;

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

la figura 5 illustra il clone pPRRS-121 contenente il gene della proteina codificata da ORF3;

la figura 6 illustra il clone pPRRS-146 contenente il gene della proteina codificata da ORF4;

la figura 7 illustra il clone pPRRS-132 contenente il gene della proteina codificata da ORF5;

la figura 8 illustra il clone pPRRS-8 contenente i geni delle proteine codificate da ORF6 e ORF7;

la figura 9 illustra i risultati dalla titolazione di antigene mediante ELISA (assorbanza monitorata a 405 nm). La figura 9 illustra i risultati della titolazione di antigene mediante ELISA. Nella figura si fa riferimento alla titolazione dell'antigene (a), ai valori di assorbanza letti a 405 nm (b), e alle diluizioni di antigene (in unità di 1/) (c);

la figura 10 illustra i risultati dalla titolazione, mediante ELISA, di un siero di campo di PRRS ottenuto in un animale infetto. La figura fa riferimento alla titolazione del siero (a), ai valori di assorbanza letti a 405 nm (b), e alle diluizioni del siero (in unità di 1/) (c);

la figura 11 illustra i risultati ottenuti da un esperimento di campionamento con parecchie dozzine di sieri di campo. La figura fa riferimento alla

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione albo nr. 358)

titolazione dei sieri (a), ai valori di assorbanza letti a 405 nm (b), e ai sieri (c).

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Il nostro laboratorio ha effettuato una ricerca sull'agente causativo della PRRS negli anni recenti. La conseguenza principale di questa è stato l'isolamento del virus denominato PRRS-CY-JPD-P5-6-91. Questo è stato depositato presso la ECACC (con numero di accessione V93070108) e è stato sviluppato un vaccino contro il PRRSV contenente il virus inattivato (domanda di brevetto ES P9301973).

Successivamente, i nostri sforzi di ricerca si sono rivolti all'isolamento e alla clonazione del genoma di PRRSV (PRRS-CY-JPD-P5-6-91), denominato in questa descrizione PRRS-Olot, allo scopo di permettere lo sviluppo di nuovi vaccini ricombinanti efficaci contro l'infezione provocata dal PRRSV. A tal fine, è stato clonato un segmento di genoma del detto genoma PRRS-Olot. Il frammento clonato corrisponde alla estremità 3' del genoma virale, e rappresenta una sequenza consecutiva di 3338 pb. Questo segmento contiene le sei fasi di lettura aperte corrispondenti a ORF da 2 a 7 descritte per LV e TV. Queste codificano per le proteine strutturali del virus (nucleo capsida e involucro) eventualmente coinvolte

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

nella antigenicita e immunogenicita virale. Le proteine codificate dalle ORF da 2 a 7 del PRRS-Olot sono simili alle corrispondenti proteine dei virus LV e TV. Le loro caratteristiche vengono riassunte nella tabella 1, in cui vengono indicati, in relazione con ogni ORF, le porzioni relative dei nucleotidi, il numero di coppie di basi (bp), il numero di amminoacidi (Aac), il peso molecolare di ogni proteina (in KDa) e i siti di glicosilazione.

Tabella 1

Caratteristiche delle ORF del virus PRRS-Olot

ORF	Nucleotidi (sito)	bp	Aac (n)	Proteina (KDa)	Glicosilazione
2	65-811	747	249	29,4	2
3	673-1467	795	165	30,8	7
4	1215-1763	549	183	20,0	5
5	1763-2362	600	200	22,4	2
6	2353-2871	519	173	19,0	2
7	2864-3247	384	128	13,8	1

La figura 1, che accompagna questa descrizione, illustra la sequenza consecutiva completa delle 3383 bp del frammento clonato corrispondente alla estremità 3' del genoma virale di PRRS-Olot. Questa sequenza di nucleotidi dimostra il 95% di omologia in confronto con le corrispondenti sequenze degli isolati di LV e

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

TV. Questi due ultimi isolati dimostrano, tra loro, una omologia del 99%. I cambiamenti nella sequenza di nucleotidi dell'isolato di PRRS-Olot vengono riscontrati lungo tutta la sequenza, ma risultano concentrati specialmente nella estremità 5'. Si dovrebbe mettere in evidenza, in confronto con LV, la delezione di tre nucleotidi nella posizione 1860 di PRRS-Olot.

La figura 2 (da 2A a 2F) di questa descrizione illustra le sequenze di amminoacidi delle proteine codificate dalle ORF da 2 a 7 del virus PRRS-Olot. A livello della proteina, si osserva una omologia del 99% tra la ORF7 del PRRS-Olot e del LV, come previsto per una proteina virale del nucleocapside e perciò più conservata. La percentuale di omologia per il resto delle proteine varia da 93% per le ORF3, 4 e 5, raggiungendo valori di 96,5% per le ORF2 e 6. Tutte queste presentano siti di glicosilazione simili a quelli descritti per LV eccetto per la ORF4 del virus PRRS-Olot, che ha un sito di glicosilazione extra. Per quanto riguarda i suddetti cambiamenti degli amminoacidi della proteina di PRRS-Olot, il 50% dei cambiamenti sono in amminoacidi chimicamente simili, mentre il resto dei cambiamenti sono in amminoacidi differenti. Come detto per LV, eccettuata la ORF7, il

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

resto delle proteine presentano un elevato grado di idrofobicità, eventualmente in accordo con la loro associazione su membrane, poiché esse sono proteine dell'involuppo virale.

Proteine ricombinanti corrispondenti alla espressione delle ORF da 2 a 7 di PRSS-Olot possono essere prodotte in un sistema di espressione adatto e, vantaggiosamente, in un sistema di espressione di baculovirus ricombinanti moltiplicati in una coltura di cellule ospite permissive. Il procedimento globale per l'ottenimento di queste proteine ricombinanti comprende fondamentalmente le seguenti fasi generali:

- I. Preparazione della sequenza di cDNA da inserire in un baculovirus; e
- II. Ottenimento di baculovirus ricombinanti che esprimono le proteine ricombinanti.

Queste fasi generali sono a loro volta suddivise in altre sottofasi. In questo modo, la preparazione della sequenza di cDNA da inserire comprende le sottofasi di:

- I.a Isolamento e purificazione del virus di PRSS-Olot;
- I.b Isolamento del RNA virale del virus PRSS-Olot; e
- I.c Sintesi del cDNA dal RNA genomico di PRSS-Olot.

D'altra parte, l'ottenimento di baculovirus

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

ricombinanti che esprimono le proteine ricombinanti corrispondenti alle ORF da 2 a 7 di PRRS-Olot, comprende le sottofasi di:

II.a Preparazione del gene della ORF di PRRS-Olot da inserire;

II.b Inserimento del detto gene in un vettore di trasferimento di baculovirus;

II.c Transfezione di cellule ospite permissive con il detto vettore di trasferimento che porta inserito il corrispondente gene della ORF di PRRS-Olot;

II.d Selezione dei baculovirus ricombinanti che esprimono la proteina ricombinante corrispondente alla ORF inserita.

Vengono quindi effettuate la caratterizzazione dei baculovirus ricombinanti e l'analisi e la purificazione delle proteine ricombinanti.

Tutte queste fasi vengono descritte in dettaglio ulteriormente in seguito in questa descrizione.

Il procedimento utilizzato per l'ottenimento delle proteine ricombinanti provviste dalla presente invenzione inizia con l'isolamento e la purificazione del PRRSV, specificamente il PRRS-Olot, in accordo con il protocollo descritto nell'esempio 1. Una volta che il PRRS-Olot è stato isolato e purificato, il RNA virale viene isolato e per tale scopo si utilizza un

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

corredo commerciale (Pharmacia), che utilizza un metodo basato sulla selezione e la purificazione del RNA virale contenente una sequenza poli-(A) all'estremità 3' (esempio 2). Il RNA ottenuto viene analizzato in gel di agarosio neutri a 0,7% mediante colorazione con bromuro di etidio, e si osserva soltanto una banda di materiale con peso molecolare tra 5000 e 23000 bp.

Successivamente, viene sintetizzato il cDNA corrispondente alla estremità 3' del RNA virale (esempio 3), con un corredo commerciale (Boehringer), mediante una strategia che sfrutta la presenza di una coda poli(A) e utilizza un oligo d(T) come primer di estensione capace di essere **esteso** con enzima di transcriptasi inversa e sintetizza molecole di cDNA. Per clonare le regioni del RNA a monte dell'estremità 3', si utilizza un oligonucleotide riassociato ad una sequenza di genoma virale specifico disposto approssimativamente a 2500 bp dall'estremità 3'. Viene effettuata una seconda sintesi utilizzando un oligonucleotide di 20 nucleotidi invece dell'oligo d(T)₁₂ (esempio 3.1). La sintesi di cDNA viene verificata e quantificata mediante conteggio della radioattività incorporata nel materiale sintetizzato e mediante elettroforesi in gel di agarosio alcalini e

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

neutri. Dopo cio, vengono effettuate la clonazione e il sequenziamento del cDNA (esempio 3.2). A tal fine, la prima cosa fatta e una selezione per dimensioni dei frammenti di cDNA sintetizzato tra 1000 e 5000 nt (nucleotidi). Il cDNA purificato viene clonato in estremità smussate nel vettore pMTL25. L'analisi dei cloni PRRSV-positivi viene effettuata mediante preparazioni di DNA del plasmide e mappatura dei siti di restrizione, in base alla sequenza di LV. Soltanto 9 sui 300 plasmidi analizzati risultano positivi e contengono inserti tra 800 e 2600 bp. La verifica definitiva della autenticità di questi cloni di cDNA viene effettuata mediante loro sequenziamento diretto, usando il metodo dideoossi applicato ai plasmidi a doppio filamento.

La maggior parte dei cloni di PRRS positivi ottenuti contiene un'estremità poli(A) comune e differenti estremità 5'. I cloni sono stati denominati pPRRS-8, pPRRS-108, pPRRS-121, pPRRS-132, PRRS-146, pPRRS-147, pPRRS-148 e pPRRS-153. Il clone pPRRS-3 viene estratto dalla seconda sintesi. Per ottenere i baculovirus ricombinanti che esprimono i geni delle proteine codificate dalle ORF da 2 a 7 di PRRSV-Olot, viene seguito in generale e separatamente il seguente procedimento. Dapprima, viene preparato il

PIEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

gene da ogni ORF da inserire, eccettuato il gene della ORF3 che non richiede una preparazione preliminare. Per la preparazione di questi geni e a seconda di ogni caso particolare, vengono impiegati i plasmidi pMTL25, pMTL24 e pMTL22 prima di essere trasferiti nei vettori di trasferimento di baculovirus. I geni corrispondenti alle ORF da 2 a 7 vengono ottenuti dai cloni che sono stati ottenuti precedentemente. Dopo successive manipolazioni, questi originano nuovi plasmidi ricombinanti. I plasmidi ricombinanti, che contengono i geni corrispondenti ad ogni ORF inserita, vengono purificati seguendo la tecnica della lisi alcalina e vengono **caratterizzati** mediante mappatura con endonucleasi di restrizione e sequenziamento delle regioni di inserimento. I nuovi vettori ottenuti vengono denominati pRRS-ORFN, in cui N rappresenta il numero di ogni ORF (N = da 2 a 7).

Successivamente, ogni gene di ogni ORF viene clonato in un adatto vettore di trasferimento. Il vettore di trasferimento impiegato è pAcYM1 [Matsuura ed al., "J. Gen. Virol.", 68, 1233-50). Dopo successive manipolazioni vengono originati nuovi plasmidi ricombinanti, ognuno di questi contenendo il gene di ORF inserita. I plasmidi ricombinanti ottenuti vengono purificati seguendo le tecniche di lisi

PLEBANI Rinaldo
(iscrittione Albo nr. 358)

alcalina e caratterizzati mediante mappatura con endonucleasi di restrizione. Le estremità dell'inserto vengono sequenziate allo scopo di verificare la corretta sequenza della regione di inserimento. I nuovi vettori di trasferimento ottenuti vengono analizzati per verificare che i geni inseriti abbiano il corretto orientamento per la loro espressione mediante il promotore della poliedrina del virus AcNPV. I vettori di trasferimento ottenuti sono:

<u>Denominazione</u>	<u>ORF</u>
pPRRS-Bac8	2
pPRRS-Bac2	3
pPRRS-Bac9	4
pPRRS-Bac3	5
pPRRS-Bac5	6
pPRRS-Bac7	7

Cellule di Spodoptera frugiperda, clone Sf9, vengono quindi transfettate con miscele di DNA infetto purificato del virus parenterale AcRP23-lacZ e il corrispondente vettore di trasferimento. Dopo che è stata fatta questa transfezione, i baculovirus ricombinanti vengono identificati mediante saggio del fenotipo di colore di placca dopo la colorazione della

PLEBANI Rinaldo
(ispezione A/ba nr. 358)

progenie virale con X-gal, e quindi purificati.

I baculovirus ricombinanti ottenuti vengono depositati presso la "European Collection of Animal Cell Culture" (ECACC), Porton Down, Salisbury, Whiltshire SP4 0JG (G.B.).

Gli esempi da 4 a 9 descrivono in dettaglio l'ottenimento di baculovirus ricombinanti che esprimono i geni codificati dalle ORF da 2 a 7, rispettivamente.

Le proteine ricombinanti delle ORF da 2 a 7 di PRRS-Olot possono essere impiegate per scopi di diagnosi allo scopo di rilevare la presenza di anticorpi specifici di PRRSV (esempio 12) e per rilevare la presenza di antigene (PRRSV) mediante anticorpi che identificano specificamente il PRRSV ottenuto mediante immunizzazione di animali con, almeno, una proteina ricombinante corrispondente ad una delle ORF da 2 a 7 di PRRS-Olot. Inoltre, queste proteine possono anche essere impiegate per immunizzare animali contro il PRRSV. Perciò, dette proteine possono essere impiegate per formulare vaccini ricombinanti capaci di proteggere efficacemente i maiali contro infezioni provocate dal PRRSV. Questi vaccini possono essere attivi o passivi. Vaccini attivi possono essere preparati sospendendo

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

almeno una delle proteine ricombinanti provviste dalla presente invenzione in un diluente immunologicamente accettabile e un coadiuvante. Un vaccino passivo può essere ottenuto immunizzando animali con le dette proteine e isolando gli anticorpi policlonali contro dette proteine. Dopo isolamento e purificazione dell'anticorpo, questi possono essere impiegati in applicazioni di vaccino. In una realizzazione specifica della presente invenzione, vaccini ricombinanti vengono ottenuti in grado di proteggere efficacemente dalla infezione provocata dal PRRS, comprendenti l'antigene virale (fase antigenica), insieme con un diluente immunologicamente accettabile e un coadiuvante.

PLERANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Per la preparazione della fase antigenica, cellule di insetti - preferibilmente cellule di Spodoptera frugiperda - vengono infettate con i diversi baculovirus ricombinanti capaci di produrre le proteine ricombinanti corrispondenti alle ORF da 2 a 7 di PRRSV e incubate in condizioni adatte per l'espressione delle dette proteine. Immediatamente dopo, le cellule vengono raccolte, lavate, risospese in un tampone adatto e quindi impiegate nella preparazione dei suddetti vaccini ricombinanti.

In una realizzazione specifica, la base

antigenica è composta da un omogenato di cellule di insetti infettate con baculovirus ricombinanti che esprimono una singola proteina di PRRSV ricombinante, quale, preferibilmente, ORF3, ORF5 e ORF7 (esempio 13). In un'altra realizzazione specifica, la fase antigenica è composta da un omogenato di una miscela di cellule di insetti infettate con differenti baculovirus ricombinanti esprimenti, ognuno di questi, una differente proteina di PRRSV ricombinante, quale una miscela di cellule di insetti infettate con i baculovirus ricombinanti esprimenti, per esempio, le proteine corrispondenti a ORF3, ORF5 e ORF7.

In generale, vengono formulati i vaccini contenenti come fase antigenica una quantità di circa 50×10^6 cellule di insetti infettate con baculovirus esprimenti la proteina ricombinante in questione. Quando il vaccino contiene diverse proteine ricombinanti, la fase antigenica è composta da una quantità di circa 50×10^6 cellule di insetti infettate con baculovirus per la proteina ricombinante in questione, cioè per una formulazione di un vaccino contenente le proteine corrispondenti alle ORF3, 5 e 7, la fase antigenica è composta da circa 50×10^6 cellule di insetti infettate con baculovirus che esprimono la proteina ricombinante di ORF3, 50×10^6

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione A/bn nr. 358)

cellule di insetti infettate con baculovirus che esprimono la proteina ricombinante di ORF5. e 50×10^6 cellule di insetti infettate con baculovirus che esprimono la proteina di ORF7 ricombinante (esempio 13).

Come diluenti immunologicamente accettabili, è possibile impiegare soluzioni saline tamponate con fosfato (PBS) od altre soluzioni saline simili.

Come coadiuvante, in generale si può impiegare uno qualsiasi dei coadiuvanti abitualmente impiegati per formulare vaccini, sia acquosi, quali idrossido di alluminio, sospensione di gel di allumina, Quila od altri, sia coadiuvanti oleosi, basati su olii minerali, gliceridi ed altri derivati di etere-acido. In particolare, è stato confermato che un coadiuvante oleoso composto da una miscela di Macrol^R 52, Simusol^R 5100 e Montanide^R 888, fornisce ottimi risultati. Il Marcol^R 52 è un olio minerale a bassa densità prodotto da Esso Espanola S.A., Simulsol^R 5100 è un polietossi-etere-oleato commercializzato da SEPIC e Montanide^R 888 è un anidromannitolo-ottadecenoato-etere di elevata purezza commercializzato da SEPIUC.

I vaccini della presente invenzione possono anche contenere sostanze potenziatrici di risposta della

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

cellula (CRP), cioè sostanze che potenziano le sub-
popolazioni di cellule helper T (Th_1 e Th_2), quali IL-
1 (interleuchina-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, γ -
IFN (gamma-interferone), fattore di necrosi della
cellula e sostanze simili che potrebbero in teoria
provocare una immunità della cellula negli animali
vaccinati. Queste sostanze CRP potrebbero essere
impiegate in formulazioni di vaccino con coadiuvanti
acquosi come anche oleosi.

Analogamente, si possono impiegare altri tipi di
coadiuvanti che modulano e immunostimolano la cellula,
quali MDP (muramil-dipeptide), ISCOM (complesso
immuno-stimolante) o liposomi.

I vaccini della presente invenzione possono
essere ottenuti sospendendo o mescolando una fase
antigenica con il diluente immunologicamente
accettabile e con il coadiuvante. Quando il
coadiuvante è oleoso, viene formata una emulsione che
- in un caso specifico e preferito - se il coadiuvante
è una miscela di Marcol 52, Simulsol 5100 e Montanide
888, il vaccino sarà un'emulsione doppia acqua/olio/
acqua, tipo acqua/olio/acqua.

Nel caso che il vaccino contenga sostanze CRP,
queste sostanze possono essere aggiunte sia alla fase
antigenica, sia al coadiuvante. In alternativa, se il

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

vaccino non contiene alcuna sostanza CRP. queste possono essere iniettate, se desiderato, simultaneamente in un sito separato differente dal sito di inoculazione.

Inoltre, questi vaccini possono contenere combinazioni di differenti patogeni porcini contenenti, oltre ad una o più proteina di PRRSV ricombinante, uno o più dei patogeni citati in seguito, permettendo la preparazione di vaccini polivalenti. Tra questi patogeni, senza essere esclusivamente limitati a questi, vi sono Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus parasuis, Porcine parvovirus, Leptospira, Escherichia coli, Erysipelothrix rhusiopathiae, Pasteurella multocida, Bordetella bronchiseptica, Porcine respiiratory coronavirus, Rotavirus, o contro patogeni causativi della malattia di Aujeszky, influenza suina e la gastroenterite trasmissibile.

Prove di sicurezza ed efficacia con i vaccini secondo la presente invenzione hanno messo in evidenza che detti vaccini sono sicuri e nello stesso tempo efficaci.

E' stato possibile confermare che una dose di 2 ml di una quantità di antigene virale o di fase antigenica uguale o superiore a 50×10^6 cellule di

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

insetti infette, esprimenti una o più delle proteine di PRRSV ricombinante, somministrati mediante una via intramuscolare profonda seguita da una rivaccinazione con una dose di 2 ml di vaccino, può proteggere efficacemente gli animali vaccinati dalle infezioni provocate dal PRRSV. Analogamente, è stato possibile verificare che alcuni dei vaccini oggetto della prova - qui identificati come rPRRS C e rPRRS D - sono in grado di indurre una immunità cellulare negli animali vaccinati, in base al fatto che scrofe vaccinate e rivaccinate con detti vaccini non presentano risposta sierologica al momento della prova e, tuttavia, risultano protette (esempio 14, tabelle 4 e 10).

Allo scopo di determinare e valutare l'efficacia dei vaccini ricombinanti preparati nella prevenzione della PRRS in scrofe gravide, è stata progettata una prova che consiste nella vaccinazione di scrofe gravide con i differenti vaccini e sottoporre quindi queste ad una prova di scarica con virus virulento. In base ai risultati ottenuti, è stato possibile valutare l'efficacia dei vaccini scopo di questa prova. Allo scopo di valutare l'efficacia di questi vaccini, sono stati presi in considerazione (esempio 14) i risultati di riproduzione, il numero sia di maialini vivi che morti a differenti stadi della vita del maialino, come

PLEBAL e Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

anche l'analisi dei risultati sierologici nelle scrofe e nei maialini (esempio 14).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE (ESEMPI)

Esempio 1. - Ottenimento e purificazione del virus PRRS-Olot

1.1. Ottenimento di macrofagi alveolari di polmone di maiale.

1.1.1. Animali. Vengono impiegati maiali dell'età di 7-8 settimane provenienti da un incrocio tra razze Belgium Landrace e Large White. Gli animali, da nostre proprie fattorie, sono sieronegativi alle seguenti malattie: Aujeszky, parvovirosi porcina, afta epizootica, febbre suina classica, influenza suina (tipi H1N1 e H3N₂) e gastroenterite trasmissibile.

1.1.2. Isolamento di macrofagi. Gli animali vengono anestetizzati iniettando nella vena giugulare 0,1 g di tiopental di sodio per ogni 10 kg di peso corporeo. Quindi, questi vengono uccisi e i polmoni vengono estratti, dopo aver legato la trachea al di sotto della epiglottide e sezionamento al di sopra del legamento. I polmoni estratti vengono lavati esternamente con PBS. Successivi lavaggi interni vengono effettuati (da 4 a 5) con un totale di 500 ml di PBS integrato con antibiotici a 1:500 (soluzione PEG: 1000 IU/ml penicillina, 1 mg/ml streptomina e

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

0,5 mg/ml gentamicina), allo scopo di ottenere macrofagi. Questi lavaggi vengono raccolti insieme e centrifugati a 3000 g per 15 minuti. La fase seguente è di lavare le cellule due volte con PBS mediante centrifugazione/sedimentazione consecutiva, per risospendere infine in mezzo DMEM (DMEM integrato con amminoacidi non essenziali a 100 x, GIBCO), contenente piruvato di sodio 1mM e antibiotici (1:1000 di PEG). Le cellule vengono contate mediante colorazione con blu tripano in camera di Neubauer. 0,1 ml di sospensione di 10^{-1} macrofagi vengono aggiunti a 0,4 ml di DMEM e 0,5 ml di soluzione di blu tripano. Nella maggior parte dei casi il numero di cellule ottenute varia tra 1 e $1,2 \times 10^9$.

Vengono effettuati controlli di sterilità sulle cellule di macrofago per mezzo di insemnamenti in mezzi di coltura adatti per la rivelazione di batteri e di funghi. L'assenza di micoplasma viene verificata mediante rivelazione citochimica con DAPI (4', 6-diammidino-2-fenilindolo) che si fissa selettivamente sul DNA e forma complessi fluorescenti DNA-DAPI di elevata specificità.

1.2. Replicazione del virus in macrofagi alveolari di maiale. Vengono utilizzate fiale di coltura di cellule (150 cm^2) contenenti 100 ml di una sospensione di

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

macrofagi (3×10^6 cellule/ml) nel mezzo DMEM descritto sopra, eccetto che per l'aggiunta di siero bovino fetale (FCS) al 5%. Le cellule vengono infettate con virus PRRS-Olot, isolate dal Laboratorio Sobrino e denominate PRRS-JPD-P5-6-91 (ECACC, numero di accessione V9307C108). L'infezione viene eseguita ad una molteplicità di infezione di 10^{-3} , e le cellule infette vengono incubate a 37°C per 24 ore. Dopo che è trascorso questo periodo, il mezzo viene estratto e sostituito da DMEM fresco contenente 2% di FCS e antibiotici; l'incubazione viene proseguita a 37°C.

Le colture vengono osservate periodicamente con microscopio per determinare l'effetto citopatico (CPE) prodotto dal virus sui macrofagi. In generale, il CPE ai giorni 3-4 di infezione è 70-80%. Compaiono cellule deformate giganti. Normalmente, il titolo di queste preparazioni è $10^{6.55}$ TCID₅₀/ml (dose infettiva di coltura di tessuto 50 per millilitro). I macrofagi infettati a molteplicità di 10^{-4} producono rese virali di un ordine di grandezza inferiore. La presenza di virus in queste cellule è stata determinata mediante il saggio di immunoperossidasi a monostrato su cellule di macrofago di maiale ottenute come descritto nell'esempio 1 (1.1.2). In breve, ciò viene fatto nel modo seguente: in una piastra per titolazione a 96

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

pozzetti, 100 μ l di macrofagi vengono infettati con 50 μ l di virus PRRS-Olot replicato su macrofagi. Le piastre vengono incubate per 48 ore a 37°C. Dopo che è stata completata l'incubazione, il mezzo viene estratto e le piastre vengono lavate due volte con soluzione salina (NaCl 0,1M). Successivamente, queste vengono fissate con formaldeide al 20% dopo incubazioni successive a 37°C, -30°C e formaldeide al 20%. Dopo lavaggio due volte con soluzione salina, si aggiungono 50 μ l di una diluzione 1:50 di un siero anti-PRRS da un animale esposto a stimolo antigenico. Vengono eseguite incubazioni simultanee con un siero negativo da un animale non infetto. L'incubazione è effettuata per 1 ora a 37°C. Dopo estrazione della soluzione precedente, queste vengono lavate due volte con soluzione salina. Immediatamente, si aggiungono 0,1 μ g di proteina A (Sigma) in 50 μ l e si incuba a 37°C per 1 ora. Il saggio viene sviluppato con AEC (3-ammino-9-etil-carbazolo) sciolto in dimetilformammide in presenza di tampone acetato e di acqua ossigenata. Dopo 15-30 minuti a temperatura ambiente al buio, le piastre vengono osservate al microscopio. Le cellule infette appaiono colorate in rosso scuro, in confronto con le cellule non infette che risultano incolori.

PLEBANI Rinaldo
(Iscrizione Albo nr. 358)

1.3. Purificazione del virus PRRS. Il virus viene purificato da colture di cellule infette con PRRSV. La coltura viene chiarificata mediante centrifugazione (20 minuti, 6500 g). Il supernatante viene concentrato 10x impiegando un sistema di ultrafiltrazione Millipore-Minitan (4,5 pSi. filtro con dimensione dei pori di 300 kDa). Successivamente, il virus viene sedimentato mediante centrifugazione (5 ore, 20.000 g). Il supernatante viene scartato e il precipitato viene solubilizzato con PBS contenente fluoruro di fenilmetilsolfonile 1 mM(PMSF) (Sigma) a 4°C, per una notte. Il virus viene purificato in gradiente discontinuo di saccarosio (20-50% peso/volume in PBS) mediante centrifugazione a 95.000 g per 3 ore. Completata la centrifugazione, la banda contenente il virus viene estratta dal gradiente, diluita con tampone Tris-EDTA e infine centrifugata per una notte a 26.000 g per la sedimentazione del virus.

Il virus purificato viene analizzato mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide-SDS al 12% [Laemmli, U.K., "Nature", 227, 680 (1970)]. La proteina totale viene rilevata mediante colorazione con blu coomassie, e immunoblot [Towbin H., Staehlin T., e Gordon J., "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 76, 4350 - 4354 (1979)]. I blot vengono sviluppati con

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione A/bn nr. 358)

coniugato perossidasi-proteina A (Sigma) impiegando un siero coalescente anti-PRRSV. Non risulta possibile osservare alcuna banda specifica correlata con PRRSV nei gel colorati con coomassie a causa della contaminazione con proteine dai macrofagi. Tuttavia, mediante immunoblot sono state identificate parecchie proteine virali con pesi molecolari tra 15,5 e 30 KDa. Con tempi di sviluppo più lunghi, è risultato anche possibile osservare bande con pesi molecolari superiori a 60 KDa, ma poiché queste sono pure state rilevate in macrofagi non infetti, si è concluso che queste non erano proteine correlate con il virus PRRS.

Esempio 2. - Isolamento del RNA virale

Si impiega un corredo commerciale della Pharmacia P-L Biochemical. Il metodo si basa sulla selezione e purificazione del RNA virale contenente una coda poli(A) all'estremità 3'. La rottura del capside virale viene effettuata con purificazione mediante cloruro di guanidinio di TNA-poli(A) con una matrice di oligocellulosa (dT).

In breve, l'isolamento del RNA del virus PRRS-Olot viene effettuata nel modo seguente. Il virus purificato sedimenta mediante centrifugazione per una notte a 40.000 g. Successivamente, il supernatante viene scartato e il precipitato viene solubilizzato

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

con 0,4 ml del tampone di estrazione del corredo. Dopo adsorbimento della matrice di cellulosa-d(1), e successivi lavaggi con i tamponi con concentrazione di sale alta e bassa, il RNA-poli(A) viene eluito con concentrazione elevata di NaCl. Il RNA viene precipitato aggiungendo un volume 1:10 di acetato di potassio 2,5 M, 0,25 mg/ml di glicogeno e 2 volumi di etanolo (>2 ore a -20°C). Trascorso questo periodo, il RNA viene recuperato mediante centrifugazione a 16.000 g per 30 minuti. Dopo lavaggio del precipitato con etanolo al 75%, questo viene risospeso in 20 µl di tampone TE (Tris-HCl 10 mM, pH = 8.0 e EDTA 1 mM).

Il RNA ottenuto viene analizzato in gel di agarosio neutri 0,7% mediante colorazione con bromuro di etidio. Si osserva una singola banda di materiale entro un peso molecolare da 5000 a 23.000 bp. L'assenza di materiale a basso peso molecolare deve essere messa in evidenza e perciò la possibilità di DNA o RNA cellulare. Tuttavia, la quantità di materiale ottenuto è bassa - non superiore a 100 ng di RNA/250 ml di coltura di macrofago infettata con il virus. Questa bassa resa è in accordo con la bassa resa di virus purificato, come dimostrato mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide e microscopia elettronica (dati non illustrati).

Esempio 3. Sintesi di cDNA dal RNA genomico del virus

PRRS-Olot

3.1. Preparazione del cDNA. Viene isolato il cDNA corrispondente al RNA dell'estremità 3' dell'isolato virale PRRS-Olot. La strategia sfrutta la presenza di una coda poli(A) allo scopo di impiegare l'oligo d(T) come primer di estensione che può essere esteso con transcriptasi inversa e può sintetizzare copie di molecole di DNA. Per clonare le regioni di RNA anteriori alla estremità 3', si impiega un oligonucleotide con una sequenza specifica del genoma virale disposto ad approssimativamente 2500 bp dalla estremità 3'. La sintesi di cDNA viene eseguita impiegando un corredo commerciale (Boehringer). Il procedimento in breve, è : 0,1 µg di RNA-poli(A) di PRRS, ottenuto come descritto nell'esempio precedente, viene incubato in presenza di dNTP ognuno 1 mM (dATP, dCTP [5-10 µCi di ^{32}P - α -dCTP], dGTP e dTTP), 25 unità di inibitore di RNase, 0,8 µg di oligo d(T)₁₂, e 40 unità di transcriptasi inversa in un volume finale di 20 µl. La reazione viene incubata a 42°C per 1 ora e quindi viene avviata la sintesi del secondo filamento nella stessa provetta. A tal fine, si aggiungono tampone, TNase, e 25 unità di polimerasi di DNA di E.coli. L'incubazione viene effettuata per 1 ora a

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

22°C e per 10 minuti a 65°C. Infine, per generare estremità smussate, si aggiungono 4 unità di DNA polimerasi T4. Dopo 10 minuti a 36°C, la reazione viene arrestata mediante aggiunta di EDTA e sarcosile. Viene effettuata una seconda sintesi di cDNA nelle stesse condizioni, eccetto per il fatto che si impiega l'oligonucleotide 5'CGGGCTCGAGCCTTTGGCGA3' invece di oligo d(T)₁₂. In entrambi i casi, la miscela viene estratta con fenolo:cloroformio e il materiale viene precipitato con etanolo, come descritto nell'esempio precedente. La sintesi di cDNA viene verificata e quantificata per mezzo del conteggio della radioattività incorporata nel materiale sintetizzato, e elettroforesi in gel di agarosio alcalino e neutro.

3.2 Clonazione e sequenziamento. Dapprima, il cDNA sintetizzato viene selezionato per dimensione allo scopo di evitare la clonazione di segmenti eccessivamente piccoli. Per tale scopo, il materiale dalla sintesi del cDNA viene recuperato mediante centrifugazione (30 minuti, 16.000 g). Il precipitato viene essiccato sotto vuoto, sciolto con tampone Tris/EDTA (TE) pH = 8,0, e caricato in 1% di gel di agarosio. I frammenti di cDNA tra 1000 e 5000 bp vengono recuperati dal gel con DEAE-carta alla cellulosa e da quest'ultimo mediante eluizione con

PLEBANI Rinaldo
(Iscrizione Albo nr. 358)

NaCl e successiva precipitazione. Il cDNA purificato viene clonato in estremità smussate nel vettore pMTL25, un vettore derivato dal pUC18. Per tale scopo, il vettore viene linearizzato con SmaI e trattato con fosfatasi alcalina per ridurre il fondo del vettore. Dopo legamento con DNA ligasi T4, cellule competenti XL-1Blu di *E. coli* vengono trasformate con la miscela di legamento in presenza di X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattopiranoside) (Boehringer) e IPTG (isopropil- β -D-tiogalattopiranoside) (Gold Bioch), che permettono la selezione iniziale di colonie ricombinanti mediante il colore (colonie blu senza inserto in confronto con quelle bianche con inserto).

L'analisi dei cloni di PRRS positivi viene effettuata mediante preparazioni di DNA del plasmide [Birnboim e Doly, "Nucleic Acids Res.", 7, 1513-1523 (1979)], e mappatura dei siti di restrizione in base a sequenze di LV. Soltanto 9 dei 300 plasmidi analizzati risultano positivi e contengono inserti tra 800 e 2600 bp. La verifica definitiva della autenticità di questi cloni di cDNA viene effettuata mediante il loro sequenziamento diretto, impiegando il metodo di terminazione della catena di deossi applicato al DNA a filamento doppio [Sanger F. ed al., "J. Mol. Biol.", 94, 441-448 (1975)]. L'oligonucleotide universale

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

(5'GTAAACGACGGCCAGT3') e l'oligonucleotide inverso (5'AACAGCTATGACCATG3') vengono impiegati per sequenziare tutti i cloni. La maggior parte dei cloni di PRRS ottenuti contiene una coda comune poli(A) e differenti estremità 5'. I cloni vengono denominati pPRRS-8, pPRRS-108, pPRRS-121, pPRRS-132, pPRRS-146, pPRRS-147, pPRRS-148 e pPRRS-153. Dalla seconda sintesi del cDNA, si ottiene il clone PRRS-3. La figura 3 illustra la differente estensione di questi cloni in confronto con LV, come pure le ORF contenute in ognuno. D'altra parte, la figura 1 illustra la sequenza consecutiva delle 3383 bp clonate dall'isolato di PRRS-Olot, e la figura 2 (da 2A a 2F) illustra le sequenze di amminoacidi corrispondenti alle proteine codificate da ogni ORF.

Esempio 4. Ottenimento di baculovirus ricombinanti esprimenti il gene di proteina codificato da ORF2

4.1. Preparazione del gene di ORF2

I geni pMTL25, pMTL24 e pMTL22, derivati dal vettore pUC18 vengono impiegati per la preparazione delle differenti ORF citate in questa descrizione, prima di essere clonati in vettori di trasferimento di baculovirus. Il vettore impiegato viene indicato per ogni caso particolare. Il gene di ORF2 ha una dimensione di 747 bp e viene ottenuto dal clone di

PIRELLI Rinaldo
Biblioteca nr. 358

cDNA pPRRS-3 (figura 4). Il DNA viene digerito con MaeI, e l'inserto di approssimativamente 900 bp viene purificato in gel di agarosio. Le estremità coesive dell'inserto vengono trasformate in estremità smussate mediante trattamento con il frammento Klenow della polimerasi di DNA di *E.coli*. La clonazione viene eseguita nel pMTL25 trattato con SmaI, fosfatasi alcalina e purificato in gel di agarosio all'1% a basso punto di fusione. Dopo legamento con DNA ligasi T4 (Boehringer), cellule XL-1Blu di *E.coli* vengono trasformate con la miscela di legamento e i cloni positivi vengono inizialmente selezionati per colore. I plasmidi ricombinanti contenenti il gene di ORF2 inserito vengono purificati secondo il metodo della lisi alcalina [Birnboim e Doly, "Nucleic Acids Res", 7, 1513-1523 (1979)], e caratterizzati mediante mappatura con endonucleasi di restrizione e sequenziamento delle regioni di inserzione.

Il vettore ora ottenuto viene denominato pPRRS-ORF2. In questo, il codone di iniziazione della ORF2 (ATG) è disposto approssimativamente a 50 bp dall'inizio dell'inserto e del sito BamHI.

4.2. Inserimento del gene della ORF2 in un vettore di trasferimento a baculovirus.

Il vettore di trasferimento a Baculovirus

BANI Rinaldo
Collezione Albo nr. 358)

utilizzato in tutti gli esperimenti, descritti in questa domanda di brevetto, e il vettore pACYM1 [Matasuura ed al., "J. Gen. Virol.", 68, 1233-50], che ha un singolo sito di inserimento BamHI.

Il vettore è stato donato dal prof. D.H.L. Bishop (I.V.E.M. Oxford, Regno Unito). Per l'inserimento, il vettore viene accuratamente digerito con la endonucleasi BamHI e quindi trattato con l'enzima di fosfatasi alcalina per evitare un rilegamento del vettore. La ORF2 codifica per una proteina di 28,4 KDa. In breve, l'inserimento del gene corrispondente nel vettore pACYM1 impiega plasmide pPRRS-ORF2 come materiale di partenza. In questo plasmide il gene della ORF2 è fiancheggiato da due siti BamHI. Così, pPRRS-ORF2 viene digerito con BamHI e caricato in gel di agarosio all'1% a basso punto di fusione allo scopo di ottenere il frammento di 935 bp. Questo frammento viene inserito nel sito BamHI di pACYM1 secondo il metodo di Struhl ["Biotechniques", 6, 452-453 (1985)], impiegando il DNA ligasi T4 (Boehringer) per legare l'inserito al vettore. La miscela di legamento viene impiegata per trasformare cellule DH5 di E.coli. I plasmidi ricombinanti ottenuti contenenti il gene inserito della ORF2 vengono purificati secondo il metodo della lisi alcalina (Birnbain e Doly, sopra).

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

caratterizzato da mappatura con endonucleasi di restrizione e sequenziati i bordi inseriti per confermare la sequenza corretta delle regioni di inserimento. Il vettore di trasferimento ottenuto a nuovo viene denominato pPRRS-Bac8 e viene dimostrato che ha il gene PRRS nell'orientamento corretto per la sua espressione mediante promotore della poliedrina del baculovirus AcNPV.

4.3. - Transfezione e selezione di baculovirus

Cellule di Spodoptera flugiperda, clone Sf 9, vengono cotransfettate con una miscela di DNA infettivo purificato del virus parentale AcRP23-lacZ (500 ng), donato da Dr. Posee (I.V.E.M., Oxford, G.B.) e del vettore di trasferimento di DNA di pPRRS-Bac8 (2 ug). Il DNA del virus parentale viene linearizzato con l'enzima Bsu36I entro il gene lacZ [Kitts ed al., "Nuc. Acids Res.", 18, 5667-72 (1990)] allo scopo di aumentare l'efficienza della ricombinazione. Per la co-transfezione, si utilizza il metodo della lipofectina (Gibco-BRL) [Felgner ed al., "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 84, 7413-7417 (1987)]. Dopo la co-transfezione, le cellule vengono incubate per 5 giorni in mezzo TNMFH completo integrato con 5% di siero bovino fetale (FCS) e antibiotici, sino a che si osserva un effetto citopatico.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Successivamente, il supernatante di transfezione viene recuperato e i virus ricombinanti vengono identificati mediante saggio placca. Il virus parentale AcRP23-lacZ presenta placche di lisi blu in presenza di substrato X-gal poiché viene espresso il gene di β -galattosidasi. I virus ricombinanti vengono inizialmente identificati dalle placche limpide dopo colorazione della progenie virale mediante X-gal. Parecchie placche di ogni virus vengono prelevate e sottoposte a tre cicli di purificazione, prima di preparare una scorta di virus ad elevato titolo. Il baculovirus ricombinante finalmente ottenuto viene denominato AcNPV, PRRS 2. Questo è stato depositato presso la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) con il numero di accessione V94021007.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Esempio 5 - Ottenimento di baculovirus ricombinanti esprimenti il gene della proteina codificato dalla ORF3.

5.1. Inserimento del gene della ORF3 in un vettore di trasferimento di baculovirus.

La ORF3 codifica per una proteina con un peso molecolare valutato di 30,8 KDa. Il DNA del plasmide pPRRS-121 viene impiegato come materiale di partenza per l'inserimento del corrispondente gene nel vettore di trasferimento pACYM1 (figura 5). In questo vettore,

il codone di iniziazione della ORF3 è disposto 10 pb dal sito BamHI. Il gene può essere escisso mediante doppia digestione con gli enzimi BamHI e Sau3A, che generano estremità coesive compatibili con BamHI. Dopo digestione, la miscela viene caricata in gel di agarosio all'1% a basso punto di fusione e viene purificato un frammento di 1009 bp. Questo viene isolato e quindi legato al vettore pAcYM1 trattato con BamHI e fosfatasi alcalina impiegando l'enzima di DNA ligasi T4. Successivamente, cellule DH5 di E.coli vengono trasformate e i plasmidi ricombinanti vengono purificati e caratterizzati secondo i procedimenti descritti sopra. Dopo che sono stati verificati la sequenza e l'orientamento dell'inserito corretti verso il promotore di poliedrina, il nuovo vettore di trasferimento viene denominato pPRRS-Bac2.

5.2- Transfezione e selezione di baculovirus ricombinanti

Il procedimento impiegato per la transfezione e la selezione di baculovirus ricombinanti è simile a quello descritto sopra per la ORF2 (esempio 4.3). Il baculovirus ricombinante ottenuto viene denominato AcNPV, PRRS 3. Questo è stato depositato presso la ECACC con il numero di accessione V94011325.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Esempio 6. - Ottenimento di baculovirus ricombinanti esprimenti il gene della proteina codificata dalla ORF4.

6.1 - Preparazione del gene della ORF4

La dimensione del gene della ORF4 è 549 bp. Questo viene ottenuto dal clone pPRRS-146 (figura 6) digerito con gli enzimi BamHI, AflIII e PstI. I primi due enzimi fiancheggiano l'inserto e si impiega PstI per scindere un frammento del DNA del vettore, di dimensione simile al gene della ORF4 che avrebbe reso difficile l'isolamento del gene. Un frammento di 112 bp viene purificato in gel di agarosio a basso punto di fusione e clonato in vettore pMTL22 digerito con BamHI e NcoI (compatibile con AflIII). Dopo legame con DNA ligasi T4 e trasformazione di cellule DH5 di E.coli, i plasmidi ricombinanti vengono purificati secondo il metodo della lisi alcalina (Birmboin e Doly, sopra), e caratterizzati mediante mappatura di endonucleasi di restrizione. Il vettore ottenuto di fresco viene denominato pPRRS-ORF4. Esso contiene il codone ATG di iniziazione della ORF4 disposto a 5 bp dal sito BamHI.

6.2. Inserimento del gene della ORF4 in un vettore di trasferimento di baculovirus

La ORF4 codifica per una proteina di 20,0 KDa. Il

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

corrispondente gene viene ottenuto dal plasmide pRRS-ORF4 mediante digestione con BamHI piu BglII. Il frammento di 1112 bp viene purificato in gel di agarosio a basso punto di fusione all'1% e clonato direttamente in pAcYM1-BamHI. I procedimenti per la identificazione e la caratterizzazione dei cloni ricombinanti sono identici a quelli descritti sopra (esempio 4.2). Una volta che sono stati verificati il corretto orientamento e la sequenza di inserto, il plasmide nuovo viene denominato pRRS-Bac9. Questo plasmide viene impiegato per esperimenti di transfezione successivi e per la preparazione di baculovirus ricombinanti.

6.3 - Transfezione e selezione di baculovirus ricombinanti

Il procedimento seguito per la transfezione e la selezione di baculovirus ricombinanti è simile al procedimento descritto sopra per la ORF2 (esempio 4.3). Il baculovirus ricombinante viene denominato AcNPV, PRRS4. Questo è stato depositato presso la ECACC con il numero di accessione V94021008.

Esempio 7. - Ottenimento di baculovirus ricombinanti esprimenti il gene della proteina codificato dalla ORF5.

7.1. - Preparazione del gene della ORF5.

La dimensione della ORF5 è 600 bp. Questa viene ottenuta dal clone pRRS-132 (figura 7). Il DNA viene digerito con gli enzimi BstXI e BfrI, e un frammento di 700 bp contenente la ORF5 viene purificato in gel di agarosio all'1% a basso punto di fusione. Dopo conversione delle estremità del frammento da coesive a smussate mediante trattamento con DNA polimerasi T4, il frammento viene clonato nel vettore pMTL25/SmaI. Il metodo impiegato è simile ai procedimenti descritti nell'esempio 4.1. Il vettore ottenuto ora viene denominato pRRS-ORF5. Essa contiene il codone ATG di iniziazione della ORF5, disposto a 15 bp dall'inizio del gene.

7.2. Inserimento del gene della ORF5 in un vettore di trasferimento di baculovirus

La ORF5 codifica per una proteina di 22,4 KDa. Per inserire il corrispondente gene nel vettore di trasferimento, il vettore pRRS-ORF5 viene digerito con l'enzima BamHI. Il frammento di 706 bp viene purificato in gel di agarosio a basso punto di fusione all'1% e legato direttamente al vettore di trasferimento pACYM1-BamHI. I plasmidi ricombinanti vengono caratterizzati come descritto sopra. Il nuovo vettore di trasferimento viene denominato pRRS-Bac3.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Questo viene impiegato nei successivi esperimenti di transfezione.

7.3. - Transfezione e selezione di baculovirus ricombinante

Il procedimento seguito per la transfezione e la selezione di baculovirus ricombinanti è simile al procedimento descritto sopra per la ORF2 (esempio 4.3). Il baculovirus ricombinante ottenuto viene denominato AcNPV, PRRS5 ed è stato depositato presso la ECACC con il numero di accessione V94011326.

Esempio 8 - Ottenimento di baculovirus ricombinanti esprimenti il gene di proteina codificato dalla ORF6

8.1. - Preparazione del gene della ORF6.

La dimensione del gene della ORF6 è 519 bp. Questo viene preparato dal clone del gene pPRRS-8 (figura 8). Dapprima, il DNA viene digerito con l'enzima AflIII, il che permette la eliminazione di bande che si avvicinano come dimensioni al gene della ORF6. Un frammento di 990 bp di AflIII-AflIII viene purificato in gel di agarosio a basso punto di fusione all'1% e digerito con TagI. Il nuovo frammento di 790 bp viene purificato in gel di agarosio a basso punto di fusione e clonato nel vettore pMTL24 trattato con AccI e con fosfatasi alcalina. Successivamente vengono effettuate le fasi descritte nell'esempio 4.1.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Il nuovo vettore viene denominato pPRRS-ORF6. Esso contiene il codone di iniziazione della ORF6 disposto a 46 bp dall'inizio del gene.

8.2. Inserimento del gene della ORF6 in un vettore di trasferimento di baculovirus

La ORF6 codifica per una proteina di 19,0 KDa. Questa si suppone che sia la proteina di inviluppo, e a causa della sua natura idrofoba, viene considerata essere una proteina che abbraccia la membrana. Per l'inserimento del corrispondente gene nel vettore di trasferimento, il vettore pPRRS-ORF6, contenente il gene della ORF6 clonato al sito pMTL24 di AccI, viene digerito con l'enzima BamHI. Il frammento di 790 bp viene purificato da gel di agarosio all'1% e legato direttamente al vettore pAcYM1-BamHI. Il nuovo vettore di trasferimento viene denominato pPRRS-Bac5. Questo viene impiegato nei successivi esperimenti di transfezione.

8.3. Transfezione e selezione di baculovirus ricombinanti.

Il metodo impiegato per la transfezione e la selezione di virus ricombinanti è simile al procedimento descritto sopra per la ORF2 (esempio 4.3). Il baculovirus ricombinante ottenuto viene denominato AcNPV, PRRS6. Questo è stato depositato

PLEGANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

presso la ECACC con il numero di accessione V94011327.

Esempio 9. - Ottenimento di baculovirus ricombinanti che esprimono il gene della proteina codificata dalla ORF7.

9.1. Preparazione del gene della ORF7.

La dimensione del gene della ORF7 è 384 bp. Questo viene preparato dal clone del gene pPRRS-8 (figura 8). Il frammento AflIII-AflIII descritto nell'esempio 8.1 viene digerito con l'enzima HpaI. Il frammento AflIII-HpaI di 430 bp contenente il gene della ORF7 viene purificato in gel di agarosio a basso punto di fusione e successivamente clonato nel vettore pPMTL25 digerito con NcoI-SamI. L'analisi e la caratterizzazione delle colonie ricombinanti vengono effettuate come descritto nell'esempio 4.1. Il nuovo vettore viene denominato pPRRS-ORF7. Essa contiene il codone di iniziazione della ORF7 disposto a 16 bp dall'inizio del gene.

9.2. Inserimento del gene della ORF7 in un vettore di trasferimento di baculovirus.

La ORF7 codifica per una proteina di 13,8 KDa. Si suppone che questa sia la nucleoproteina virale. Per l'inserimento del gene corrispondente nel vettore di trasferimento, il plasmide pPRRS-ORF7 viene digerito

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

con gli enzimi BglII e BamHI. Il risultante frammento di 430 bp viene isolato da un gel di agarosio a basso punto di fusione e legato direttamente entro il vettore pAcYM1-BamHI. Dopo l'adatta caratterizzazione, si ottiene il nuovo vettore di trasferimento pPRRS-Bac7. Questo viene impiegato per i successivi esperimenti di transfezione.

9.3. Transfezione e selezione di baculovirus ricombinanti

Il metodo impiegato per la transfezione e la selezione di baculovirus ricombinanti è simile al procedimento descritto per la ORF2 (esempio 4.3). Il baculovirus ricombinante ottenuto viene denominato AcNPV, PRRS7. Questo è stato depositato presso la ECACC con il numero di accessione V94011328.

Esempio 10. Analisi di proteine ricombinanti e immunorivelazione

Cellule Sf9 vengono infettate con differenti baculovirus ricombinanti ad una molteplicità di infezione di 1 PFU/cellula e incubate a 27°C sino a che vengono raccolte le colture. Differenti colture di cellule vengono eseguite in monostrato e in sospensione. In tutti i casi i risultati sono simili. Le colture vengono raccolte a differenti tempi dopo l'infezione. Viene determinato per ogni virus

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

ricombinante il tempo di raccolta ottimo. Questo varia tra 48 e 96 p.i.h. (ore dopo infezione). Le cellule vengono raccolte mediante centrifugazione a 1500 giri/minuto per 10 minuti, lavate due volte con PBS, pH 7,4 e successivamente risospese e sottoposte a lisi con soluzione di bicarbonato a 25 mM. Queste vengono centrifugate a 10.000 giri/minuto per 10 minuti e la frazione citoplasmica solubile viene separata dai detriti di cellule insolubili residui. Gli estratti di cellule totali, come pure le differenti frazioni vengono analizzati mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide all'11% e colorati con blu coomassie oppure trasferiti su membrane di nitrocellulosa per la rivelazione immunologica. Si osservano bande mediante colorazione con blu coomassie, aventi pesi molecolari di 28,4, 30,8, 20,0, 22,4 e 19,0 e 13,8 KDa. Queste dimensioni corrispondono rispettivamente alle dimensioni previste per i geni codificati dalle ORF2, 3, 4, 5, 6 e 7. Vi è una variazione rilevante nei livelli di espressione dei differenti geni: ORF 3, 5 e 7 ad un livello considerevole, ORF2 e 4 ad un livello apprezzabile e ORF6 ad un livello basso. I geni con livelli di espressione inferiori, corrispondenti alle ORF2 e 6, possono essere dovuti alla maggiore distanza, 42 e 39 nucleotidi

PLERANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

rispettivamente, tra il codone ATG di inizio della proteina e il promotore del baculovirus di poliedrina. In parecchie occasioni, è stato dimostrato che questa distanza dovrebbe essenzialmente essere mantenuta ad un minimo allo scopo di ottenere una buona espressione. Un altro fattore, responsabile per una bassa espressione, potrebbe essere l'elevata natura idrofoba di queste proteine.

Quando si analizzano separatamente le frazioni solubili ed insolubili delle cellule infette, si è osservato che, eccetto che per la ORF7, la maggior parte delle proteine PRRS espresse sono insolubili e rimangono associate con i detriti della membrana. Ciò può essere dovuto alla natura idrofoba e glicosilata di queste proteine. La maggior parte di queste proteine contiene zone transmembrana che le ancorano alle membrane. Tali caratteristiche rendono difficile la purificazione di queste proteine da estratti di cellule.

Per la immunorivelazione, le proteine vengono trasferite su membrane di nitrocellulosa, secondo metodi standard [Burnette, "Anal. Biochem.", 112, 195-293 (1981); Towbin ed al., "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 77, 4350-4354 (1969)]. Il trasferimento delle proteine viene effettuato in un dispositivo semisecco

PLERANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

(Bio-Rad) a 22V per 30 minuti. Quindi, le strisce di nitrocellulosa vengono bloccate con 3% di latte scremato in polvere in Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM (TBS) per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente, le strisce vengono incubate dapprima per 2 ore a temperatura ambiente con un antisiero di maiale anti-PRRS (C-45) diluito 1/100 in TBS-0,05% Tween 20, lavate con TBS-0,05% Tween 20 per 30 minuti a temperatura ambiente e quindi incubate con IgG anti-maiale coniugata con fosfatasi alcalina (diluizione 1/1000) (Sigma) per 1 ora. Le strisce vengono lavate un'altra volta e, infine, sviluppate con un NBT (nitro blu tetrazolio) (Sigma) e in soluzione di BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (Sigma) in NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, dietanolammina 100 mM, pH 9,5, sino alla comparsa di bande visibili. La reazione viene arrestata con acqua distillata. In tutti i casi in cui si osservano reazioni mediante immunoblot, si ottengono proteine con peso molecolare equivalente alle dimensioni valutate della ORF. In alcuni casi, specificamente nelle ORF3 e 5, si osserva la presenza di altre bande di dimensioni maggiori, sino a 45 KDa. Queste bande rappresenterebbero differenti forme di glicosilazione delle proteine, in accordo con i siti potenziali previsti.

PLEBANI Rinaldo
(iscritt. n. 358)

10.1. Caratterizzazione antigenica delle proteine ricombinanti

La antigenicità corretta delle proteine ricombinanti espresse in baculovirus viene verificata mediante la loro reazione a differenti sieri animali in un saggio di immunoblotting. Le proteine ricombinanti espresse e trasferite in nitrocellulosa secondo il precedente metodo, vengono fatte reagire con una raccolta di sieri suini precedentemente caratterizzati contenenti anticorpi anti-PRRSV. I sieri sono stati ottenuti in animali infettati sperimentalmente (n. 1-4) o naturalmente (n. 5-8).

Le proteine corrispondenti alle ORF 3, 5 e 7 sono state le prime da verificare. I risultati sono illustrati nella tabella 2.

Tabella 2

Reattività di sieri da animali infetti contro proteine ricombinanti di ORF3, ORF5 e ORF7

Siero n.	ORF3	ORF5	ORF7
1	+	+	-
2	+	+	-
3	+	+	+
4	ND	+	+
5	ND	+	+
6	+	+	+
7	ND	+	+
8	ND	+	+

+: Positivo

-: Negativo

ND: non determinato.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Questo saggio dimostra che le proteine ricombinanti 3, 5 e 7 sono antigenicamente simili alle proteine virali inattive 3, 5 e 7, rispettivamente.

Quando il saggio viene eseguito con proteine ricombinanti 2, 4 e 6, i risultati sono di una maggiore variabilità in quanto si riferisce al riconoscimento da parte di sieri di campo. Le ragioni per questa variabilità possono essere sia il loro basso livello di espressione, sia /oppure la loro elevata idrofobilità.

Questi saggi dimostrano che le proteine ricombinanti PRRSV espresse nel sistema di baculovirus non sono antigenicamente distinguibili dalle proteine virali inattive.

Esempio 11. - Purificazione delle proteine ricombinanti

La strategia ideata per la purificazione delle proteine ricombinanti dovrebbe prendere in considerazione le caratteristiche strutturali delle proteine. Dovrebbero essere messe in evidenza due di queste caratteristiche:

(1) La natura idrofoba che le rende insolubili, e (2) la presenza di un grande numero di regioni transmembrana che impartisce loro una grande affinità per le membrane. Nella maggior parte dei casi, queste

PLERANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

caratteristiche non rendono conveniente l'estrazione e la purificazione delle proteine, ad esempio per il loro impiego come vaccino, quando si possono impiegare cellule complete infettate, come descritto da differenti autori [Hall S.L., ed al., "Vaccine", 9, 659-667 (1991); Tordo N., ed al., "Virology", 194, 5269 (1993)]. Nonostante ciò, sono stati fatti alcuni tentativi per purificare queste proteine impiegando come modello la proteina della ORF3.

11.1. Purificazione della proteina derivata dalla ORF3

Cellule Sf9 vengono infettate con il virus ricombinante AcNPV, PRRS3 secondo il metodo descritto nel precedente esempio. Le cellule infette vengono raccolte mediante centrifugazione a 400 g per 10 minuti, lavate con PBS e risospese a 20×10^6 cellule/ml in PBS. Le cellule vengono demolite mediante congelamento/scongelo e la frazione solubile viene separata dalla frazione insolubile mediante centrifugazione. In tutti i casi, la frazione insolubile viene utilizzata per i successivi trattamenti.

In seguito vi è una descrizione di alcuni dei metodi impiegati.

Trattamento con agenti caotropici

La frazione insolubile viene dapprima lavata con

PLEGANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

NaCl 1M e quindi con cloruro di guanidinio 2M o 4M. Le pastiglie di cellule vengono risospese nei differenti tamponi e mantenute a temperatura ambiente per 1 ora. Quindi, la preparazione viene centrifugata a 15.000 giri/minuto per 5 minuti. La presenza della proteina ricombinante nelle differenti frazioni viene analizzata mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide-SDS al 15% (dodecilsolfato di sodio).

I risultati ottenuti indicano che il trattamento sequenziale con questi sali fornisce una proteina con una purezza dal 30% al 50%. E' stato dimostrato che questa proteina purificata è antigenicamente analoga alla proteina naturale, poichè è riconoscibile mediante sieri d'animali infetti, determinati sia mediante immunoblotting, sia mediante ELISA indiretta.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Trattamento con detergenti

Vengono impiegati detergenti alle seguenti concentrazioni:

- NP40 0,5%
- ottilglucoside 2%
- SDS 0,5%, 1% e 2%
- deossicolato di sodio 0,5%, 1% e 2%.

In tutti i casi le preparazioni di cellule vengono rese analoghe a quella descritta sopra. I detriti di cellule contenenti proteina ricombinante

vengono trattati con le suddette concentrazioni di detergente e nelle condizioni descritte. In generale, si può stabilire che in queste condizioni, il trattamento con i differenti detergenti non permette la solubilizzazione di una quantità rilevante di proteina ricombinante. Soltanto SDS allo 0,5% fornisce proteina con una purezza valutata del 50%, sebbene con una resa molto bassa. Antigenicamente, questa proteina reagisce con sieri di animali infetti mediante ELISA diretta, sebbene l'efficacia sia inferiore di quella che si ottiene con la proteina purificata mediante agenti caotropici.

Riassumendo, queste proteine parzialmente purificate potrebbero essere impiegate in vaccini anti-PRRSV.

Esempio 12. - Impiego diagnostico

Una delle applicazioni principali delle proteine ricombinanti provviste dalla presente invenzione è il loro impiego nella preparazione di corredi per la diagnosi di infezioni in campo da PRRSV.

12.1 - Preparazione di antigene espresso in Sf9 per applicazioni nella diagnosi

Cellule Sf9 cresciute in monostrato o in sospensione vengono infettate a una molteplicità di infezione da 0,5 a 1 con i rispettivi baculovirus

ricombinanti. A seconda di quale virus ricombinante sia impiegato, le colture vengono raccolte tra 48 e 72 ore dopo l'infezione. Queste vengono centrifugate a 400 g a 15°C per 10 minuti e lavate con PBS.

Infine, le pastiglie di cellule contenenti le proteine ricombinanti vengono risospese in PBS con 2% di ottilglucoside (Sigma) e vengono lasciate in riposo su ghiaccio per 1 ora. Queste vengono quindi centrifugate a 1000 g per 10 minuti per eliminare i detriti delle cellule. I supernatanti vengono dializzati a fondo contro PBS per rimuovere il detergente, centrifugati a 10.000 g per 30 minuti per rimuovere i precipitati e conservate a -70°C sino all'impiego successivo.

12.2 ELISA per la diagnosi

Immunoplastre ELISA a 96 pozzetti in polistirene (Polisorb, NUNC) vengono rivestite con differenti diluizioni della miscela di estratti ricombinanti (ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 e ORF7), preparate in tampone carbonato 50 mM, pH 9,6 (100 µl/pozzetto) mediante incubazione di una notte a 4°C. Come illustrato nella figura 9, la diluizione ottima scelta per il rivestimento della piastra è 1/100. Le piastre vengono saturate con tampone bloccante (latte scremato 1% in PBS) per 30 minuti a temperatura

PLEBAI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

ambiente. Successivamente, si aggiungono diluizioni differenti degli antisieri anti-PRRSV preparati in tampone bloccante. L'incubazione viene proseguita per 1 ora a 37°C. Dopo lavaggio con PBS contenente 0,5% di Tween 20, si aggiunge proteina A marcata con perossidasi (diluizione 1/5000), incubando a 37°C per 1 ora. Viene effettuato un lavaggio come il precedente e la reazione viene sviluppata a temperatura ambiente per 10 minuti impiegando come substrato ABTS [acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico)]. La reazione viene arrestata con SDS 1% e l'assorbanza viene monitorata a 405 nm. I risultati di titolazioni usuali con ELISA da un siero di campo di animale infetto sono indicati nella figura 10. Le titolazioni su sieri di campo normalmente variano da diluizioni 1/100 a 1/800. I risultati ottenuti in un esperimento di campionamento con parecchie dozzine di sieri di campo sono riportati nella figura 11. Si può vedere che i titoli ottenuti per sieri chiaramente positivi variano da 0,4 a 1,7. I titoli da sieri incerti variano da 0,2 a 0,3. I sieri negativi forniscono titoli inferiori a 0,1. Così, la conclusione cui si arriva è : l'impiego di queste proteine ricombinanti espresse in baculovirus è un metodo sicuro, affidabile e riproducibile, che permette di differenziare in modo

PLEBAT Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

conclusivo animali infetti da animali non infetti.

Esempio 13. Formulazione dei vaccini ricombinanti

Vengono preparati diversi vaccini contenenti differenti proteine di PRRSV ricombinante, specificamente PRRS-Olot (ECACC V93070108) in forma di emulsione, secondo il metodo descritto in seguito.

Cellule di Spodoptera frugiperda, clone Sf9 - in seguito Sf9 - vengono infettate nella quantità di 1×10^6 cellule/ml con i baculovirus ricombinanti:

- AcNPV, PRRS3, [ECACC V94011325];
- AcNPV, PRRS5, [ECACC V94011326];
- AcNPV, PRRS7, [ECACC V94011328];

PLEBAN... Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

capaci di produrre, rispettivamente, le proteine ricombinanti corrispondenti alle ORF3, ORF5 e ORF7 del suddetto PRRSV (figure 2, 4 e 6), a un molteplicità di infezione di 0,1 unità formanti placca (PFU)/cellula. Queste vengono incubate a 27°C con agitazione a 100 giri/minuto e 30% di pO_2 per 72 ore, in un fermentatore Braun-MD da 2 litri. Quindi cellule di insetti infetti vengono raccolte mediante centrifugazione a 1000 giri/minuto per 10 minuti, lavate con soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) pH : 7,4 e sospese a 5×10^7 cellule /ml nello stesso tampone PBS.

I vaccini vengono formulati mescolando un omogenato di cellule Sf9 infette contenenti 50×10^6 cellule Sf9 che esprimono ognuna una delle proteine ricombinanti ORF3, ORF5 e ORF7, con un coadiuvante oleoso, o fase oleosa, composta da una miscela di:

Marcol ^R 52.....	790,9 mg
Simulsol ^R 5100	70,0 mg
Montanide ^R 888	80,0 mg.

In queste condizioni, vengono preparati quattro vaccini ricombinanti in dosi di 2 ml, composti da 53% di fase antigenica e 47% della fase oleosa descritta sopra, in cui la relazione fase oleosa/fase antigenica è una relazione di peso/volume. I vaccini preparati presentano le formulazioni seguenti.

1. Vaccino identificato come rPRRS C:

53% in volume di fase antigenica composta da 50×10^6 cellule Sf9 esprimenti la ORF3; e

47% in peso della fase oleosa come descritta sopra.

2. Vaccino identificato come rPRRS D:

53% in volume di una fase antigenica composta da 50×10^6 cellule Sf9 esprimenti la ORF5; e

47% in peso della fase oleosa come descritta sopra.

PLER... Sindaco
(iscrizione Albo nr. 358)

3. Vaccino identificato come rPRRS E:

53% in volume di fase antigenica composta da 50×10^6 cellule Sf9 esprimenti la ORF7; e

47% in peso della fase oleosa quale descritta sopra.

4. Vaccino identificato come rPRRS F:

53% in volume di fase antigenica composta da 50×10^6 cellule Sf9 esprimenti la ORF3; 50×10^6 cellule Sf9 esprimenti la ORF5 e 50×10^6 cellule Sf9 esprimenti la ORF7 (totale 150×10^6 cellule Sf9); e

47% in peso della fase oleosa quale descritta sopra.

Esempio 14. - Efficacia in scrofe gravide

Questa prova viene eseguita per valutare l'efficacia dei vaccini ricombinanti preparati come descritto nell'esempio 13. A tal fine, si utilizza un totale di 12 scrofe - un incrocio Landrace X Large White. Gli animali vengono trasferiti in stalle di sicurezza del Centro Ricerche.

Due scrofe vengono scelte a caso (scrofe n. 400398 e 400298) e vengono vaccinate con il vaccino identificato come rPRRS C. Due scrofe (scrofe n. 400118 e 400307) vengono vaccinate con il vaccino identificato come rPRRS D. Con il vaccino identificato come rPRRS E vengono vaccinate tre scrofe (scrofe n.

PLF...
(iscrizione Albo nr. 358)

314010, 313426 e 400059), e con il vaccino identificato come rPRRS F vengono vaccinate tre scrofe (scrofe n. 313524, 401236 e 401426). Le due scrofe rimanenti (scrofe n. 1 e 20) non vengono vaccinate e vengono impiegate come animali di controllo.

Le scrofe vengono vaccinate tramite una via intramuscolare profonda (IM) nel collo, in vicinanza dell'orecchio, con una dose di 2 ml di vaccino, e rivaccinate 21 giorni dopo con la stessa dose.

Si osservano le reazioni locali e generali, quali: temperatura rettale, assunzione di cibo e segni clinici sia post-vaccinazione sia post-esposizione a stimolo antigenico. Inoltre, vengono monitorati i risultati riproduttivi post-esposizione a stimolo antigenico per le scrofe, come pure i risultati sierologici sia nelle scrofe che nei porcellini. L'analisi dei risultati viene utilizzata nella valutazione dell'efficienza del vaccino (tabella 1).

L'esposizione a stimolo antigenico viene effettuata nelle stalle di sicurezza del Centro Ricerche. Tutti gli animali vengono infettati nella quantità di 5 ml di PRRSV-218-P6-Mo-F22955-29/10/94, un ceppo isolato e mantenuto in deposito presso il centro di ricerche, con un titolo di $10^{6,1}$ TCID₅₀/ml (dose infettiva di coltura di tessuto 50%) tramite la

PLEBANI Rinaldo
(Iscrizione Albo nr. 358)

via intranasale (IN).

Per la valutazione dei risultati riproduttivi delle scrofe nel giorno del parto, vengono annotati i dati seguenti (tabella 3):

- numero di maialini nati vivi e in buona salute
- numero di maialini nati vivi ma deboli
- numero di maialini nati morti
- numero di maialini con autolisi parziale (edematosa)
- numero di maialini mummificati
- maialini vivi dopo la prima settimana di vita,
- maialini vivi al tempo di slattamento (25-30 giorni di età).

PIEBARTI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

TABELLA 3

Risultati riproduttivi

Scrofa n.	Vaccino	Totale	Numero di maialini					Maial. vivi l settim.	Maialini slattati
			Nati vivi sani	Nati vivi deboli	Nati morti	Autolisi parziale	Mummi-ficati		
1	CONTROL	17	-	4	9	4	-	-	-
20	CONTROL	14	9	-	2	3	-	7	4
400390	EPARS C	8	8	-	-	-	-	7	6
400280	EPARS C	11	10	1	-	-	-	8	7
400113	EPARS C	12	4	1	2	2	-	5	6
400327	EPARS C	10	3	-	3	-	-	9	7
316010	EPARS E	12	-	10	1	1	-	3	2
213426	EPARS E	6	3	-	-	1	2	3	3
400038	EPARS E	12	4	2	2	2	-	1	0
313524	EPARS F	11	10	-	1	-	-	10	8
401216	EPARS F	2	-	-	-	-	-	2	2
401426	EPARS F	13	12	3	-	-	-	10	10

Quindi, la risposta sierologica viene analizzataa nelle scrofe (tabella 4) e nei maialini (tabelle 5, 6, 7, 8 e 9) mediante un saggio a monostrato di perossidasi (IPMA) [Saggio monostrato di immunoperossidasi, Wensvoort ed al., "Vet. Quarterly", 13, n. 3, (luglio 1991)] in accordo con il programma seguente:

- D 0 (giorno 0): salasso e vaccinazione
- D - 14: salasso (14 giorni dopo vaccinazione)
- D + 21: salasso e rivaccinazione (21 giorni dopo vaccinazione)
- D + 28: salasso (28 giorni dopo vaccinazione)
- D + 35: salasso (35 giorni dopo vaccinazione)
- D I : salasso e esposizione a stimolo antigenico
- D I + 7: salasso (a 7 giorni dopo infezione)

I risultati sierologici nelle scrofe (anticorpi anti-PRRSV) sono illustrati nella tabella 4).

PLES
Rinaldo
Riferimento Albo nr. 358

TABELLA 4

Risultati sierologici (anticorpi anti-PRRSV)

Vaccino	Scrofa	D.0	D+14	D+21	D+28	D+35	D.1	D.1+7
PRRS D	400288	-	320	320	NT	160	320	≥ 640
PRRS D	400398	-	-	-	NT	-	-	≥ 640
PRRS D	400307	-	-	-	-	-	-	≥ 640
PRRS D	400118	-	-	-	-	-	-	≥ 640
PRRS E	314010	-	≥ 640	≥ 640	≥ 640	≥ 640	160	320-640
PRRS E	313426	-	≥ 640	≥ 640	≥ 640	≥ 640	320	≥ 640
PRRS E	400059	-	≥ 640	320	NT	≥ 640	≥ 640	≥ 640
PRRS F	313524	-	320-640	320	≥ 640	≥ 640	320-640	≥ 640
PRRS F	401238	-	≥ 640	≥ 640	≥ 640	≥ 640	≥ 640	320
PRRS F	401428	-	320	NT	NT	320	160	≥ 640
CONTROLlo 1	-	-	NT	NT	NT	NT	-	160
CONTROLlo 20	-	-	NT	NT	NT	NT	-	60

N.T.: non provato; -:Negativo)

PLESANO Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

TABELLA 5

Risultati sierologici ottenuti in maialini nati ad
animali di controllo (non vaccinati)

Scrofa n.	Prima di slattamento				Slattamento		Post-slattamento			
	No.	Età giorni	REF	Ab	No.	Età giorni	No.	Età giorni	REF	Ab
1	2	2	1	≥640	0	-	0	-		
			2	≥640						
22	7	12	436	320	4	33	3	39		
			437	320					437	320
			438	320					438	320-640
			439	≥640						
			440	160						
			441	320-640					441	≥640
			442	≥640						

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Scrofa n.: riferimento della scrofa

No: numero di maialini; Ab: anticorpi; " negativo

Ref: riferimento del maialino.

TABELLA 6

Risultati sierologici ottenuti in maialini nati da
animali vaccinati con rPRRS C (ORF3)

Scrofa n.	Prima di slattamento				Slattamento		Post-slattamento			
	No.	Età giorni	RST	Ab	No.	Età giorni	No.	Età giorni	RST	Ab
400398	8			N.T.	7		8			N.T.
400399	9	7	482	160	7	18	8	42	482	-
			483	160					483	-
			484	≥440					484	N.T.
			485	320-440					485	-
			486	≥440					486	-
			487	320					487	-
			488	80						
			489	160						

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Scrofa n.: riferimento della scrofa

No: numero di maialini; Ab: anticorpi; NT: non
provato; - negativo

Ref: riferimento del maialino.

TABELLA 7

Risultati sierologici ottenuti in maialini nati da animali vaccinati con rPRRS D (ORF5)

Scrofa n.	Prima di slattamento				Slattamento		Post-slattamento			
	No.	età giorni	Ref	Ab	No.	età giorni	No.	età giorni	Ref	Ab
400128	1	-	415	≥640	4	30	3	64		
			416	80						
			417	320					427	-
			418	80-160					428	-
			419	160					429	-
400307	1	1	424	160	7	28	7	30	424	-
			425	≥640					425	-
			426	≥640					426	-
			427	-					427	N.T.
			428	160					428	-
			429	320-640					429	80-160
			430	-						
			431	160						
			432	≥640					432	-

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Scrofa n.: riferimento della scrofa

No: numero di maialini; Ab: anticorpi; NT: non provato; - negativo

Ref: riferimento del maialino.

TABELLA 8

Risultati sierologici ottenuti in maialini nati da animali vaccinati con rPRRS E (ORF7)

Scrofa n.	Prima di slattamento				Slattamento		Post-slattamento			
	No.	età giorni	Ref	Ab	No.	età giorni	No.	età giorni	Ref	Ab
314010	2	10	411	80	2	31	1	48		
			412	120					412	180
313420	3	2	421	≥640	3	30	3	37	421	-
			422	≥640					422	320
			423	≥640					423	160
600059	6	3	1	N.T.	0					
			2	N.T.						
			3	N.T.						
			6	N.T.						

PLEBANI Ringido
(iscrizione Albo nr. 358)

Scrofa n.: riferimento della scrofa

No: numero di maialini; Ab: anticorpi; NT : non provato; - negativo

Ref: riferimento del maialino.

TABELLA 9

Risultati sierologici ottenuti in maialini nati da
animali vaccinati con rPRRS F (ORF3+5+7)

Scrofa N.	Prima di slattamento				Slattamento		Post-slattamento			
	No.	età giorni	Ref	Ab	No.	età giorni	No.	età giorni	Ref	Ab
313524	10	10	401	≥640	8	10	8	48	401	≥640
			402	≥640					402	≥640
			403	60-160						
			404	≥640					404	≥640
			405	≥640					405	≥640
			406	≥640					406	≥640
			407	≥640					407	320
			408	≥640					408	≥640
			409	≥640					409	≥640
			410	≥640						
402238	2	7	413	≥640	2	27	2	42	413	80
			414	≥640					414	80

PLEBACCI Rinaldo
(Iscrizione Albo nr. 358)

Scrofa n.: riferimento della scrofa

No: numero di maialini; Ab: anticorpi

Ref: riferimento del maialino.

TABELLA 7 (continua)

Risultati sierologici ottenuti in maialini nati da
animali vaccinati con rPRRS F (ORF3+5+7)

Scrofa N.	Prima di slattamento				Slattamento		Post-slattamento			
	No.	età giorni	Ref	Ab	No.	età giorni	No.	età giorni	Ref	Ab
401428	10	11	443	≥640	10	32	10	30	443	-
			444	-					444	-
			445	≥640					445	160
			446	≥640					446	160
			447	≥640					447	80
			448	≥640					448	-
			449	≥640					449	160
			450	320					450	-
			451	160					451	80
			452	320					452	-

PLEBANI Rinaldo
(Istruzione Albo nr. 358)

Scrofa n.: riferimento della scrofa

No: numero di maialini; Ab: anticorpi

Ref: riferimento del maialino.

Allo scopo di valutare i vaccini oggetto della prova, sono stati valutati i risultati sierologici come anche i risultati di riproduzione. La tabella 8 illustra alcuni dati sierologici, mentre la tabella 9 riassume i dati di riproduzione delle scrofe utilizzate nelle prove, compresa un'informazione sul numero totale di maialini nati, sul numero di maialini vivi dopo la prima settimana, sul numero di maialini slattati e sul numero di maialini con oltre 40 giorni di età.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

TABELLA 11

Sommario dei dati riproduttivi

VACCINO	SCROFA No.	NUMERO DI MAIALINI			
		NATI	I SETTIMANA	SLATTAMENTO	> 40 giorni
CONTROLLO	1	17	0	0	0
	20	14	7	4	3
TOTALE		31	7	4	3
rPRRS C ORF3	400398	8	7	6	6
	400298	11	8	7	6
TOTALE		19	15	13	12
rPRRS D ORF5	400118	12	5	4	3
	400307	10	9	7	7
TOTALE		22	14	11	10
rPRRS E ORF 7	314010	12	3	2	1
	313426	6	3	3	3
	400059	12	1	0	0
TOTALE		30	7	5	4
rPRRS F ORF 3+5+7	313524	11	10	8	8
	401236	2	2	2	2
	401426	15	10	10	9
TOTALE		28	22	20	19

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

TABELLA 10

Sommario dei dati sierologici e riproduttivi

<u>VACCINO</u>	<u>SCROFA</u>	<u>SIEROCONVERSIONE</u>		<u>[IPMA]</u>
	<u>No.</u>	<u>D O</u>	<u>POST</u> <u>VACCINO</u>	<u>POST</u> <u>INFEZIONE</u> (7 giorni)
rPRRS C	400398	-	-	+
rPRRS C	400298	-	+	+
rPRRS D	400118	-	-	+
rPRRS D	400307	-	-	+
rPRRS E	314010	-	+	+
rPRRS E	313426	-	+	+
rPRRS E	400059	-	+	+
rPRRS F	313524	-	+	+
rPRRS F	401236	-	+	+
rPRRS F	401426	-	+	+
CONTROLLO	1	-	-	+
CONTROLLO	20	-	-	+

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

(-: negativo; +: positivo)

D O : tempo di vaccinazione

I risultati, nella loro totalità, rendono evidente che, nel caso del vaccino RPRRS C, una scrofa è sieroconvertita (400298) e l'altra non lo è (400398); nel caso del vaccino D, nessuna delle scrofe è sieroconvertita; per i vaccini E e F vi è una forte sieroconversione dovuta, essenzialmente, alla proteina codificata per la ORF7.

Vi è un comportamento favorevole di fronte alla esposizione allo stimolo antigenico, quando gli animali vaccinati vengono confrontati con quelli non vaccinati, permettendo di definire positivamente che i vaccini ricombinanti oggetto di questa prova, costituiscono un mezzo efficace per la prevenzione della PRRS.

Si è verificato che le scrofe vaccinate prive di anticorpi titolati con la tecnica IPMA sono protette, il che mette in evidenza che detti vaccini (PRRS C e PRRS S) sono in grado di indurre una immunità cellulare.

L'efficacia del vaccino viene valutata confrontando:

a) la percentuale di maialini vivi dopo la prima settimana in contrasto con il numero totale di maialini nati,

b) la percentuale di maialini slattati in

Protocollo di sperimentazione
(iscrizione Albo nr. 358)

contrasto con il numero totale di maialini nati, e

c) la percentuale di maialini con un'età superiore a 40 giorni in contrasto con il numero totale di maialini nati.

La tabella 12 illustra il dato relativo alla percentuale di maialini vivi dopo la prima settimana, la percentuale di maialini slattati e la percentuale di maialini con oltre 40 giorni di età in contrasto con il numero totale di maialini nati.

Si è verificato che gli animali privi di anticorpi, valutati con la tecnica IPMA, sono protetti.

TABELLA 12

Percentuale di maialini vivi dopo la prima settimana, slattati e con oltre 40 giorni di età in contrasto con il numero totale di maialini nati

VACCINO	% MAIALINI VIVI DOPO I SETTIMANA	% MAIALINI SLATTATI	% MAIALINI > 40 GIORNI
rPRRS C- ORF 3	79%	68.5%	63%
rPRRS D - ORF 5	63.6%	50%	45.5%
rPRRS E - ORF 7	23%	16.6%	13.3%
rPRRS F - ORF 3+5+7	78.6%	71.4%	67.8%
CONTROLLO	22.5%	12.9%	9.6%

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 359)

DEPOSITO DI MICROORGANISMI

I baculovirus ricombinanti ottenuti sono stati depositati presso la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Regno Unito. La denominazione e i numeri di accessione dei baculovirus ricombinanti sono:

<u>Denominazione</u>	<u>Numero di accessione ECACC</u>
----------------------	-----------------------------------

AcNPV, PRRS2	V94021007
AcNPV, PRRS3	V94011325
AcNPV, PRRS4	V94021008
AcNPV, PRRS5	V94011326
AcNPV, PRRS6	V94011327
AcNPV, PRRS7	V94011328

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Tutti questi baculovirus sono stati depositati il 14 gennaio 1994, eccettuati AcNPV, PRRS2 (V94021007) e AcNPV, PRRS4 (V94021008) che sono stati depositati il 10 febbraio 1994.

LEGENDA DELLE FIGURE

Figura 3:

- a) Genoma di PRRSV
- b) Dimensione (Kb)
- c) Numero del clone

Figura 9

- a) Titolazione dell'antigene mediante ELISA
- b) Assorbanza a 405 nm
- c) Diluzione di antigene (1/)
- d) Siero a 1/200

---.---.---	Campo
---+---+---	Sperimentale
---*---*---	Negativo

Figura 10

- a) Titolazione del siero mediante ELISA
- b) Assorbanza a 405 nm
- c) Diluizione del siero (1/)
- d) Positivo ---.---.---

Negativo ---+---+---

Figura 11

- a) Titolazione di sieri di campo
- b) Assorbanza a 405 nm
- c) Sieri di scrofe.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

RIVENDICAZIONI

1. - Proteine ricombinanti del virus causativo della sindrome riproduttiva e respiratoria porcina (PRRS), caratterizzate dal fatto che vengono scelte da una qualsiasi delle proteine codificate dalle ORF da 2 a 7 del virus PRRS-Olot.

2. - Proteine secondo la rivendicazione 1, caratterizzate dal fatto che esse comprendono le sequenze di amminoacidi illustrate nella figura 2.

3. - Proteine secondo la rivendicazione 1, caratterizzate dal fatto che sono ottenibili mediante Ingegneria Genetica in un sistema di espressione di baculovirus ricombinante moltiplicato in una coltura di cellule ospite permissive.

4. - Proteine secondo la rivendicazione 3, caratterizzate dal fatto che tali baculovirus ricombinanti contengono debitamente inserito ed esprimono, almeno, il gene di una proteina codificata dalle ORF da 2 a 7 del virus PRRS-Olot.

5. - Proteine secondo la rivendicazione 3, caratterizzate dal fatto che tale coltura di cellule ospiti permissive e una coltura di cellule di insetti permissive.

6. - Proteine secondo la rivendicazione 3, caratterizzate dal fatto che sono ottenibili mediante

PLEDANI Rinaldo
(Prodotto Albo nr. 358)

l'espressione di baculovirus ricombinanti scelti tra:

Denominazione Numero di accessione ECACC

AcNPV, PRRS2	V94021007
AcNPV, PRRS3	V94011325
AcNPV, PRRS4	V94021008
AcNPV, PRRS5	V94011326
AcNPV, PRRS6	V94011327
AcNPV, PRRS7	V94011328

7. - Procedimento per l'ottenimento di proteine di PRRS-Olot ricombinanti, codificate dei geni contenuti in una qualsiasi delle ORF da 2 a 7 del detto virus, che comprende le fasi di:

a) preparazione della sequenza di cDNA, sintetizzata dal RNA genomico di PRRS-Olot da inserire in un baculovirus; e

b) ottenimento di baculovirus ricombinanti che esprimono le proteine ricombinanti corrispondenti alle ORF inserite.

8. - Procedimento secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che la preparazione della sequenza di cDNA da inserire comprende le fasi di:

- a.1 Isolamento e purificazione del virus PRRS-Olot;
- a.2 Isolamento del RNA virale di PRRS-Olot; e
- a.3 Sintesi di cDNA dal RNA genomico di PRRS-Olot.

9. - Procedimento secondo la rivendicazione 8.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

caratterizzato dal fatto che l'isolamento del virus PRRS-Olot viene effettuato mediante replicazione del detto virus su colture di cellule permissive.

10. - Procedimento secondo la rivendicazione 8, caratterizzato dal fatto che l'isolamento del RNA virale di PRRS-Olot viene effettuato mediante adsorbimento su una oligo d(T)₁₂-cellulosa.

11. - Procedimento secondo la rivendicazione 8, caratterizzato dal fatto che la sintesi di cDNA, dal RNA genomico di PRRS-Olot, viene effettuata incubando il detto RNA con i corrispondenti dNTP, transcriptasi inversa e sia un oligo d(T)₁₂ sia, in alternativa, un oligonucleotide con la formula 5'CGGGCTCGAGCCTTTGGCGA3'.

12. - Procedimento secondo la rivendicazione 8, caratterizzato dal fatto che l'ottenimento di baculovirus ricombinanti che esprimono proteine ricombinanti che corrispondono alle ORF da 2 a 7 di PRRS-Olot, comprendono le fasi di:

b.1 Inserimento dei corrispondenti geni della ORF in vettori di trasferimento del baculovirus;

b.2 Trasfezione di cellule ospiti permissive con i detti vettori di trasferimento che portano inseriti i geni della ORF corrispondente; e

b.3 Selezione dei baculovirus ricombinanti che

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

esprimono le corrispondenti proteine ricombinanti della ORF inserita.

13. - Procedimento secondo la rivendicazione 12, caratterizzato dal fatto che detto vettore di trasferimento del baculovirus è il vettore pACYM1.

14. - Procedimento secondo la rivendicazione 12, caratterizzato dal fatto che la transfezione delle dette cellule ospite permissive per la replicazione di baculovirus ricombinanti viene effettuata con una miscela di DNA del vettore di trasferimento che porta inserito il corrispondente gene della ORF e DNA del baculovirus di tipo selvatico.

15. - Procedimento secondo la rivendicazione 12, caratterizzato dal fatto che le dette cellule ospiti permissive sono una coltura di cellule di insetto.

16. - Procedimento secondo la rivendicazione 12, caratterizzato dal fatto che il baculovirus ricombinante ottenuto esprime una singola proteina ricombinante di PRRS-Olot, scelta da una qualsiasi delle proteine codificate dalle ORF da 2 a 7 del detto virus.

17. - Procedimento secondo la rivendicazione 12, caratterizzato dal fatto che i baculovirus ricombinanti ottenuti vengono scelti tra:

PLESANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Denominazione _____ Numero di accessione ECACC _____

AcNPV, PRRS2	V94021007
AcNPV, PRRS3	V94011325
AcNPV, PRRS4	V94021008
AcNPV, PRRS5	V94011326
AcNPV, PRRS6	V94011327
AcNPV, PRRS7	V94011328

18. - Baculovirus ricombinanti, caratterizzati dal fatto che essi esprimono, almeno, una proteina ricombinante corrispondente ad una delle ORF da 2 a 7 di PRRS-Olot.

19. - Baculovirus ricombinanti secondo la rivendicazione 18, caratterizzati dal fatto che essi esprimono una singola proteina ricombinante di PRRS-Olot, scelta fra una qualsiasi delle proteine codificate dalle ORF da 2 a 7 del detto virus.

20. - Baculovirus ricombinanti secondo la rivendicazione 18, caratterizzati dal fatto che essi vengono scelti tra:

Denominazione _____ Numero di accessione ECACC _____

AcNPV, PRRS2	V94021007
AcNPV, PRRS3	V94011325
AcNPV, PRRS4	V94021008
AcNPV, PRRS5	V94011326
AcNPV, PRRS6	V94011327
AcNPV, PRRS7	V94011328

PLEBANI Sinaldo
(Iscrizione Albo nr. 358)

21. - Vaccino adatto per la vaccinazione e la protezione di maiali contro la sindrome riproduttiva e respiratoria porcina (PRRS), che comprende, almeno, una proteina ricombinante corrispondente ad una qualsiasi delle proteine codificate dalle ORF da 2 a 7 di PRRS-Olot e un adatto veicolo o coadiuvante.

22. - Vaccino secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che dette proteine ricombinanti sono ottenibili mediante tecniche di Ingegneria Genetica in un sistema di espressione di baculovirus ricombinanti moltiplicati in coltura di cellule ospiti permissive.

23. - Vaccino secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che i baculovirus ricombinanti che esprimono dette proteine ricombinanti sono scelti tra:

Denominazione Numero di accessione ECACC

AcNPV, PRRS2	V94021007
AcNPV, PRRS3	V94011325
AcNPV, PRRS4	V94021008
AcNPV, PRRS5	V94011326
AcNPV, PRRS6	V94011327
AcNPV, PRRS7	V94011328

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

24. - Vaccino secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che dette proteine ricombinanti vengono impiegate parzialmente purificate.

25. - Vaccino secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che detta fase antigenica contiene una singola proteina di PRRSV ricombinante, scelta dal gruppo formato dalle proteine ricombinanti codificate dalle ORF 3, 5 e 7 di PRRS-Olot.

26. - Vaccino secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che detta fase antigenica è composta da cellule di insetti infettate con lo stesso baculovirus ricombinante che esprime soltanto una delle proteine ricombinanti codificate dalle ORF da 2 a 7 di PRRS-Olot.

27. - Vaccino secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che detta fase antigenica è composta da cellule di insetti infettate con differenti baculovirus ricombinanti che esprimono, ognuno di questi, soltanto una delle differenti proteine ricombinanti codificate dalle ORF da 2 a 7 di PRRS-Olot.

28. - vaccino secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che contiene un coadiuvante oleoso.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

29. - Vaccino secondo la rivendicazione 28, caratterizzato dal fatto che detto coadiuvante oleoso è composto da una miscela di Marcol 52, Simulsol 5100 e Montanide 888.

30. - Vaccino secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che contiene un coadiuvante acquoso.

31. - Vaccino secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che contiene inoltre sostanze potenziatrici della risposta della cellula (CRP) quali IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, γ -IFN, fattore di necrosi della cellula e sostanze simili.

32.- Vaccino secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che il coadiuvante è un coadiuvante capace di modulare e immunostimolare la risposta della cellula, quale MDP, ISCOM o liposomi.

33. - Vaccino secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che è in grado di indurre una immunità cellulare in animali vaccinati.

34. - Vaccino bi- o multivalente capace di prevenire la sindrome riproduttiva e respiratoria porcina e un'altra o altre infezioni porcine, caratterizzato dal fatto che comprende, almeno, una proteina ricombinante corrispondente ad una delle proteine codificate da uno qualsiasi dei geni

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione A/bn nr. 358)

contenuti in una qualsiasi delle ORF da 2 a 7 del PRRS-Olot, insieme con uno o più patogeni porcini e un adatto veicolo o un coadiuvante.

35. - Vaccino secondo la rivendicazione 34, caratterizzato dal fatto che comprende, almeno, un patogeno porcino scelto tra il gruppo formato da Actinobacillus Pleuropneumoniae, Haemophilus parasuis, Porcine parvovirus, Leptospira, Escherichia coli, Erysipelothrix rhusiopathiae, Pasteurella multocida, Bordetella bronchiseptica, Porcine respiratory coronavirus, Rotavirus o contro patogeni causativi di malattia di Aujeszky, influenza suina o gastroenterite trasmissibile.

36. - Vaccino passivo adatto per la vaccinazione e la protezione di maiali contro la sindrome riproduttiva e respiratoria porcina (PRRS), caratterizzato dal fatto che contiene anticorpi ottenuti mediante immunizzazione di animali con, almeno, una proteina ricombinante corrispondente ad una delle proteine codificate da una qualsiasi dei geni contenuti in una qualsiasi delle ORF da 2 a 7 di PRRS-Olot e un adatto coadiuvante o veicolo.

37. - Corredo diagnostico per la rivelazione della presenza di anticorpi che identificano specificamente PRRSV in un campione biologico, quale

PLEDANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

sangue, siero, espettorato, saliva o latte da maiali, comprendente, almeno, una proteina ricombinante corrispondente ad una delle ORF da 2 a 7 di PRRS-Olot e adatti mezzi di rivelazione.

38. - Corredo diagnostico secondo la rivendicazione 37, caratterizzato dal fatto che dette proteine ricombinanti sono ottenibili mediante Ingegneria Genetica in un sistema di espressione di baculovirus ricombinanti moltiplicato in colture di cellule ospite permissive.

39. - Corredo diagnostico secondo la rivendicazione 38, caratterizzato dal fatto che i baculovirus ricombinanti che esprimono dette proteine ricombinanti sono scelti da:

Denominazione Numero di accessione ECACC

AcNPV, PRRS2	V94021007
AcNPV, PRRS3	V94011325
AcNPV, PRRS4	V94021008
AcNPV, PRRS5	V94011326
AcNPV, PRRS6	V94011327
AcNPV, PRRS7	V94011328

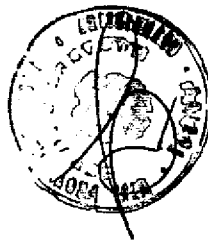
40. - Corredo diagnostico per la rivelazione della presenza di PRRSV in un campione biologico, quale sangue, siero, espettorato, saliva, tessuto o

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

latte, da animali, comprendente anticorpi che identificano specificamente il PRRSV ottenuto immunizzando animali con, almeno, una proteina ricombinante corrispondente ad una delle ORF da 2 a 7 di PRRS-Olot e adatti mezzi di rivelazione.

p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)



PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

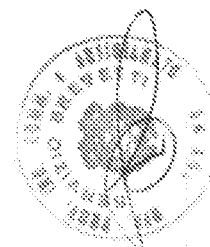
76 950600007

FIGURA 1

10	20	30	40	50	60
GAATTGCAGG	TAGAGCTAGG	TAAACCCCGG	CTGCCGCGCTG	AGCAAGTGCC	GTGAATCCGA
70	80	90	100	110	120
AGTGATGCAA	TGGGCTCACT	GTGGAGCAAA	ATCAGCCAGC	TGTTCGTGGA	CGCCTTCACT
130	140	150	160	170	180
GAGTTCCTTG	TTAGTGTGGT	TGACATTGTC	ATTTTCCTTG	CCATACTGTT	TGGGTTCACT
190	200	210	220	230	240
GTTGCCGGCT	GCTTACTGGT	CTTTCTTCTC	AGAGTGGTTT	GCTCCGCGCT	TCTCCGTTCC
250	260	270	280	290	300
CGCTCTGCCA	TTCACCTCTCC	CGAACTATCG	AAGGTCCTAT	GAAGGCTTGT	TACCCAATTG
310	320	330	340	350	360
CAGACCGGAT	GTCCCACAAT	TCGCTGTCAA	GCACCCATTG	GGTATGTTTT	GGCACATGCG
370	380	390	400	410	420
AGTCTECCAC	CTAATTGATG	AAATGGTCTC	TCGTGCGATT	TACCAGACCA	TGGAACATTG
430	440	450	460	470	480
AGGTCAAGCG	GCCTGGAAGC	AGGTGGTTAG	TGAGGCCACT	CTTACAAAGC	TGTCAGGACT
490	500	510	520	530	540
TGATATAGTT	ACTCATTTC	AACACCTGGC	CGCAGTGGAG	GCGGATTCTT	GCCGCTTTCT
550	560	570	580	590	600
CAGCTCACGA	CTTGTGATGC	TAAAAAATCT	TGCCGTTGGC	AATGTGAGCC	TACAGTACAA
610	620	630	640	650	660
CACCACGTTA	GACCGCGTTG	AGCTCATCTT	CCCTACGCCC	GGTACGAGGC	CCAAGTTGAC
670	680	690	700	710	720
CGATTTTACA	CAATGGCTCA	TCAGTGTGCA	CGCTTCCATT	TTTTCCTCTG	TAGCTTCATC
730	740	750	760	770	780
TGTTACCTTG	TTCATAGTGC	TTTCTCTTCG	AATTCCAATT	CTACGCTATG	TTTTTGGTTT

p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PLEBANI Finaldo
(legitimación Albo nº 358)

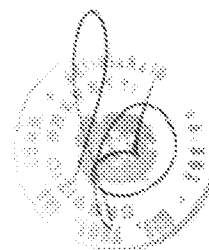


790	800	810	820	830	840
CCATTGGCCC	ACGGCAACAC	ATCATTCGAG	CTAACCATCA	ACTACACCAT	ATGTATGCCC
850	860	870	880	890	900
TGCTCTACCA	GTCAAGCGGC	TCACCAAAGA	CTCGAGCCCC	GTCGTAACAT	GTGGTGCAGA
910	920	930	940	950	960
ATAGGGCACC	ACAGGTGTGA	GGAACGTGAC	CATGATGAGT	TGTCAATGTC	CATTCCGTCT
970	980	990	1000	1010	1020
GGGTACGATA	ACCTCAAAC	TGAGGGTTAT	TATGCTTGGC	TGGCCTTTTT	GTCCTTTTCC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TACGCGGCCC	AATTCCATCC	GGAGTTGTTC	GGAATAGGAA	ACGTGTCGCG	CGTCTTCGTG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GACAAGCAAC	ACCAGTTCAT	TTGCGCCGAG	CATGATGGAC	GAAATTCAAC	CATATCTACC
1150	1160	1170	1180	1190	1200
GAATATAACA	TCTCCGCATT	ATATGCGTCG	TACTACCATC	ACCAAATAGA	CGGGGGCAAC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TGGTTCCATT	TGGAATGGCT	GCGGCCATTC	TTTTCTCCT	GGCTGGTGCT	CAACATTTCA
1270	1280	1290	1300	1310	1320
TGGTTTCTGA	GCGGTTCCGC	TGTAAGCCCT	GTTTCTCGAC	GCATCTATCA	GATATTAAGA
1330	1340	1350	1360	1370	1380
CCAACACGAC	CGCGGCTGCC	GGTTTCATGG	TCCTTCAGAA	CATCAATTGT	CTCCGACCTC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
ACGGGGTCTC	AACAGCGCAA	GAGAACATTT	CCTTCGGGAA	GCCGTCTCAA	TGTCGTGAAG
1450	1460	1470	1480	1490	1500
CCGTCGGTAT	TCCCCAGTAC	ATTACGATAA	CGGCTAATGT	GACCGATGAA	TCGTATTTGT
1510	1520	1530	1540	1550	1560
ACAACGCGGA	CTTGCTGATG	CTTTCTGCGT	GCCTTTTCTA	CGCTTCAGAA	ATGAGCGAAA

FIGURA 1 CONT.

p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PIERRE Pinaldo
(iscr. n. 358)

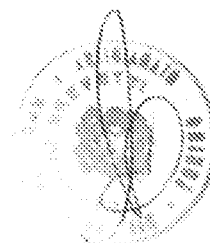


1570	1580	1590	1600	1610	1620
AAGGCTTCAA	AGTTATCTTT	GGGAACGTCT	CTGGCGTTGT	TTCTGCTTGT	GTCAATTTTA
1630	1640	1650	1660	1670	1680
CAGATTATGT	GGCCCATGTG	ACCCAACATA	CCCAGCAGCA	TCATCTGGTA	ATTGATCACA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
TTCCGGTTGCT	GCATTTCTTG	ACACCATCTA	CAATGAGGTG	GGCTACAACC	ATTGCTTGTT
1750	1760	1770	1780	1790	1800
TGTTCCGCAT	TCTCTTGGCG	ATATGAGATG	TTCTCACAAA	TTGGGGCGTT	TCTTGACTCC
1810	1820	1830	1840	1850	1860
TCACTCTTGC	TTCTGGTGGC	TTTTTTTGCT	GTGTACCGGC	TTGTCTGGT	CCTTTGTCCG
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TGGCGGCAGC	AGCTCGACAT	ACCAATACAT	ATATAACTTA	ACGATATGCG	AGCTGAATGG
1930	1940	1950	1960	1970	1980
GACCGACTGG	TTGTCCAACC	ATTTTGATTG	GGCAGTCGAG	ACCTTTGTGC	TTTACCCGGT
1990	2000	2010	2020	2030	2040
TGCCACTCAT	ATCCTCTCAC	TGGGTTTTCT	CACAACAAGC	CATTTTTTTG	ACGCGCTCGG
2050	2060	2070	2080	2090	2100
TCTCGGCGCT	GTGTCCACTA	TAGGATTTGT	TGGCGGGCGG	TATGTACTCA	GCAGCGTGTA
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CGGCGCTTGT	GCTTTCGCAG	CGTTCGTATG	TTTTGTCATC	CGTGCTGTTA	AAAATTGCAT
2170	2180	2190	2200	2210	2220
GGCTTTCCGC	TATGCCCACA	CCCGGTTTAC	CAACTTCATT	GTGGACGACC	GGGGGAGAAT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
CCATCGGTGG	AAGTCTCCAA	TAGTGGTAGA	GAAATTGGGC	AAAGCTGAAG	TCGGTGGCGA
2290	2300	2310	2320	2330	2340
CCTTGTCACC	ATCAAACATG	TCGTCTCTGA	AGGGGTAA	GCTCAACCCT	TGACGAGGAC

FIGURA 1 CONT.

P.I.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PLED *[Signature]*
 (licenzia) *[Signature]*
 (libro nr 358)



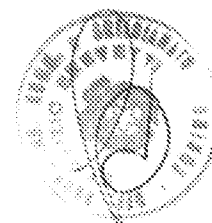
36 852000307

2350	2360	2370	2380	2390	2400
TTCGGCTGAG	CAATGGGAAG	CCTAGACCAT	TTTTGCAATG	ATTCTACCGC	CGCACAAAAG
2410	2420	2430	2440	2450	2460
CTTGTGCTAG	CCTTTAGCAT	TACATATACA	CCTATAATGA	TATACGCCCT	TAAGGTGTCA
2470	2480	2490	2500	2510	2520
CGCGGCCGAC	TCCTGGGGCT	GTTGCACATC	CTAATATTCC	TGAATTGTTC	TTTCACATTC
2530	2540	2550	2560	2570	2580
GGATACATGA	CATATGTGCG	TTTTCAATCC	ACCAACCGTG	TCGCACTTAC	TCTGGGGGCT
2590	2600	2610	2620	2630	2640
GTTGTGCCCC	TTCTGTGGGG	TGTTTACAGC	TTCACAGAGT	CATGGAAGTT	TGTTACTTCC
2650	2660	2670	2680	2690	2700
AGATGCAGAT	TGTGTTGCCT	AGGCCGGCGA	TACATTCTGG	CCCCTGCCCA	TCACGTAGAA
2710	2720	2730	2740	2750	2760
AGTGCTGCAG	GTCTCCATTC	AATCCCAGCG	TCTGGTAACC	GAGCATAACG	TGTGAGAAAG
2770	2780	2790	2800	2810	2820
CCCGGACTAA	CATCAGTGAA	CGGCACTCTA	GTTCCAGGAC	TTCGGAGCCT	CGTGCTGGGC
2830	2840	2850	2860	2870	2880
GGCAAACGAG	CTGTTAAACG	AGGAGTGGTT	AACCTCGTCA	AGTATGGCCG	GTAAAAACCA
2890	2900	2910	2920	2930	2940
GAGCCAGAAG	AAAAAGAAAA	GTGCAGCTCC	GATGGGGAAT	GGCCAGCCAG	TCAATCAACT
2950	2960	2970	2980	2990	3000
GTGCCAGTTG	CTGGGTGCAA	TGATAAAGTC	CCAGCGCCAG	CAACCTAGGG	GAGGACAGGC
3010	3020	3030	3040	3050	3060
CAAAAAGAAA	AAGCCTGAGA	AGCCACATTT	TCCCTTAGCT	GCTGAAGATG	ACATCCGGCA
3070	3080	3090	3100	3110	3120
CCACCTCACC	CAGACCGAAC	GTTCCCTCTG	CTTGCAATCG	ATCCAGACGG	CTTTTAATCA

FIGURA 1 CONT.

p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

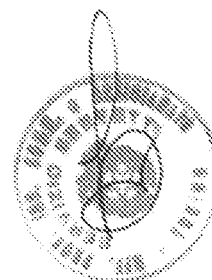
PLEBANI Rinaldo
(iscrittione Albo nr. 358)



3130 3140 3150 3160 3170 3180
 AGGCGCAGGA ACTGCGTCGC TTTCATCCAG CGGGAAGGTC AGTTTTTCAGG TTGAGTTCAT
 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 GCTGCCCGGTT GCTCATACGG TGCGCCTGAT TCGCGTGA CTCTACATCCG CCAGTCAGGG
 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 TGCAAGCTAA TTTGACAGTC AGGTGAATGG CCGCGATTGA CGTGTGGCCT CTAAGTCACC
 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 TATTCAATTA GGGCGATCAC ATGGGGGTCA AACTTAATCA GGCAGGAACC ATGTGACCGA
 3370 3380
 AATTAAAAAA AAAAAAAAAA AAA

FIGURA 1 CONT.

p.l.: CYANAMID IBERICA, S. A. *Alfredo*
 (Iniziativa Albo nr. 358)



70 93A0003807

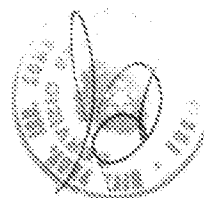
ORF2

Met	Gln	Trp	Gly	His	Cys	Gly	Ala	Lys	Ser	Ala	Ser	Cys	Ser	Trp	Thr
1				5					10					15	
Pro	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Val	Trp	Leu	Thr	Leu	Ser	Phe	Ser	Leu
			20					25					30		
Pro	Tyr	Cys	Leu	Gly	Ser	Pro	Leu	Pro	Ala	Gly	Tyr	Trp	Ser	Phe	Phe
		35					40					45			
Ser	Glu	Trp	Phe	Ala	Pro	Arg	Phe	Ser	Val	Arg	Ala	Leu	Pro	Phe	Thr
	50					55					60				
Leu	Pro	Asn	Tyr	Arg	Arg	Ser	Tyr	Glu	Gly	Leu	Leu	Pro	Asn	Cys	Arg
65					70					75					80
Pro	Asp	Val	Pro	Gln	Phe	Ala	Val	Lys	His	Pro	Leu	Gly	Met	Phe	Trp
				85					90					95	
His	Met	Arg	Val	Ser	His	Leu	Ile	Asp	Glu	Met	Val	Ser	Arg	Arg	Ile
			100					105					110		
Tyr	Gln	Thr	Met	Glu	His	Ser	Gly	Gln	Ala	Ala	Trp	Lys	Gln	Val	Val
	115						120					125			
Ser	Glu	Ala	Thr	Leu	Thr	Lys	Leu	Ser	Gly	Leu	Asp	Ile	Val	Thr	His
	130					135					140				
Phe	Gln	His	Leu	Ala	Ala	Val	Glu	Ala	Asp	Ser	Cys	Arg	Phe	Leu	Ser
145					150					155					160
Ser	Arg	Leu	Val	Met	Leu	Lys	Asn	Leu	Ala	Val	Gly	Asn	Val	Ser	Leu
				165					170					175	
Gln	Tyr	Asn	Thr	Thr	Leu	Asp	Arg	Val	Glu	Leu	Ile	Phe	Pro	Thr	Pro
			180					185					190		
Gly	Thr	Arg	Pro	Lys	Leu	Thr	Asp	Phe	Arg	Gln	Trp	Leu	Ile	Ser	Val
	195						200					205			
His	Ala	Ser	Ile	Phe	Ser	Ser	Val	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Ile
	210					215					220				
Val	Leu	Trp	Leu	Arg	Ile	Pro	Ile	Leu	Arg	Tyr	Val	Phe	Gly	Phe	His
225					230					235					240
Trp	Pro	Thr	Ala	Thr	His	His	Ser	Ser							
				245											

FIGURA 2A

p.l.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PLESAN, Ricardo
(inscripción pr. 358)



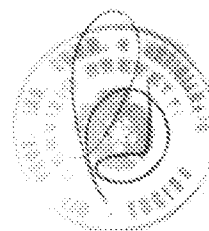
ORF3

Met	Ala	His	Gln	Cys	Ala	Arg	Phe	His	Phe	Phe	Leu	Cys	Ser	Phe	Ile
1				5					10					15	
Cys	Tyr	Leu	Val	His	Ser	Ala	Leu	Ala	Ser	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Leu
			20					25					30		
Cys	Phe	Trp	Phe	Pro	Leu	Ala	His	Gly	Asn	Thr	Ser	Phe	Glu	Leu	Thr
		35					40					45			
Ile	Asn	Tyr	Thr	Ile	Cys	Met	Pro	Cys	Ser	Thr	Ser	Gln	Ala	Ala	His
	50					55					60				
Gln	Arg	Leu	Glu	Pro	Gly	Arg	Asn	Met	Trp	Cys	Arg	Ile	Gly	His	Asp
65					70					75					80
Arg	Cys	Glu	Glu	Arg	Asp	His	Asp	Glu	Leu	Ser	Met	Ser	Ile	Pro	Ser
				85					90					95	
Gly	Tyr	Asp	Asn	Leu	Lys	Leu	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Trp	Leu	Ala	Phe
			100					105					110		
Leu	Ser	Phe	Ser	Tyr	Ala	Ala	Gln	Phe	His	Phe	Glu	Leu	Phe	Gly	Ile
		115					120					125			
Gly	Asn	Val	Ser	Arg	Val	Phe	Val	Asp	Lys	Gln	His	Gln	Phe	Ile	Cys
	130					135					140				
Ala	Glu	His	Asp	Gly	Arg	Asn	Ser	Thr	Ile	Ser	Thr	Glu	Tyr	Asn	Ile
145					150					155					160
Ser	Ala	Leu	Tyr	Ala	Ser	Tyr	Tyr	His	His	Gln	Ile	Asp	Gly	Gly	Asn
				165				170						175	
Trp	Phe	His	Leu	Glu	Trp	Leu	Arg	Pro	Phe	Phe	Ser	Ser	Trp	Leu	Val
			180					185					190		
Leu	Asn	Ile	Ser	Trp	Phe	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Val	Ser	Pro	Val	Ser
		195					200					205			
Arg	Arg	Ile	Tyr	Gln	Ile	Leu	Arg	Pro	Thr	Arg	Pro	Arg	Leu	Pro	Val
	210					215					220				
Ser	Trp	Ser	Phe	Arg	Thr	Ser	Ile	Val	Ser	Asp	Leu	Thr	Gly	Ser	Gln
225					230					235					240
Gln	Arg	Lys	Arg	Thr	Phe	Pro	Ser	Gly	Ser	Arg	Leu	Asn	Val	Val	Lys
				245					250					255	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Ser	Thr	Leu	Arg							
			260					265							

FIGURA 2B

p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PIZZA V. Skalda
 Trazadora Albo nr. 358]



70 92A00-367

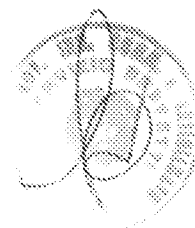
ORF4

Met	Ala	Ala	Ala	Ile	Leu	Phe	Leu	Leu	Ala	Gly	Ala	Gln	His	Phe	Met	1	5	10	15
Val	Ser	Glu	Ala	Phe	Ala	Cys	Lys	Pro	Cys	Phe	Ser	Thr	His	Leu	Ser	20	25	30	
Asp	Ile	Lys	Thr	Asn	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Phe	Met	Val	Leu	Gln	35	40	45	
Asn	Ile	Asn	Cys	Leu	Arg	Pro	His	Gly	Val	Ser	Thr	Ala	Gln	Glu	Asn	50	55	60	
Ile	Ser	Phe	Gly	Lys	Pro	Ser	Gln	Cys	Arg	Glu	Ala	Val	Gly	Ile	Pro	65	70	75	80
Gln	Tyr	Ile	Thr	Ile	Thr	Ala	Asn	Val	Thr	Asp	Glu	Ser	Tyr	Leu	Tyr	85	90	95	
Asn	Ala	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	Ser	Ala	Cys	Leu	Phe	Tyr	Ala	Ser	Glu	100	105	110	
Met	Ser	Glu	Lys	Gly	Phe	Lys	Val	Ile	Phe	Gly	Asn	Val	Ser	Gly	Val	115	120	125	
Val	Ser	Ala	Cys	Val	Asn	Phe	Thr	Asp	Tyr	Val	Ala	His	Val	Thr	Gln	130	135	140	
His	Thr	Gln	Gln	His	His	Leu	Val	Ile	Asp	His	Ile	Arg	Leu	Leu	His	145	150	155	160
Phe	Leu	Thr	Pro	Ser	Thr	Met	Arg	Trp	Ala	Thr	Thr	Ile	Ala	Cys	Leu	165	170	175	
Phe	Ala	Ile	Leu	Leu	Ala	Ile										180			

FIGURA 2C

p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PIERANI Eraldo
 (Código de Barras 358)

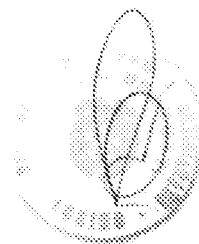


ORF5

Met Arg Cys Ser His Lys Leu Gly Arg Phe Leu Thr Pro His Ser Cys
 1 5 10 15
 Phe Trp Trp Leu Phe Leu Leu Cys Thr Gly Leu Ser Trp Ser Phe Val
 20 25 30
 Ala Gly Gly Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Tyr Ile Tyr Asn Leu Thr Ile
 35 40 45
 Cys Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ser Asn His Phe Asp Trp Ala
 50 55 60
 Val Glu Thr Phe Val Leu Tyr Pro Val Ala Thr His Ile Leu Ser Leu
 65 70 75 80
 Gly Phe Leu Thr Thr Ser His Phe Phe Asp Ala Leu Gly Leu Gly Ala
 85 90 95
 Val Ser Thr Ile Gly Phe Val Gly Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Val
 100 105 110
 Tyr Gly Ala Cys Ala Phe Ala Ala Phe Val Cys Phe Val Ile Arg Ala
 115 120 125
 Val Lys Asn Cys Met Ala Cys Arg Tyr Ala His Thr Arg Phe Thr Asn
 130 135 140
 Phe Ile Val Asp Asp Arg Gly Arg Ile His Arg Trp Lys Ser Pro Ile
 145 150 155 160
 Val Val Glu Lys Leu Gly Lys Ala Glu Val Gly Gly Asp Leu Val Thr
 165 170 175
 Ile Lys His Val Val Leu Glu Gly Val Lys Ala Gln Pro Leu Thr Arg
 180 185 190
 Thr Ser Ala Glu Gln Trp Glu Ala
 195 200

FIGURA 2D

p.1.: CYANAMID IBERICA, S.A.

 PLEBAN, Ricardo
 (acreditado con nr. 358)


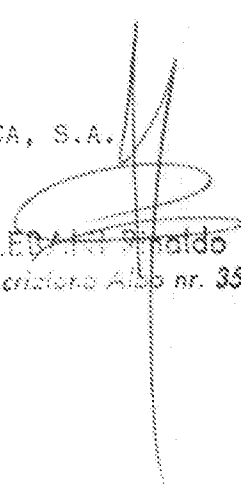
70 933001367

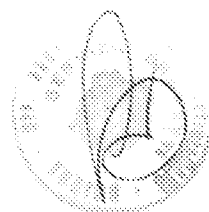
ORF6

Met	Gly	Ser	Leu	Asp	Asp	Phe	Cys	Asn	Asp	Ser	Thr	Ala	Ala	Gln	Lys
1				5					10					15	
Leu	Val	Leu	Ala	Phe	Ser	Ile	Thr	Tyr	Thr	Pro	Ile	Met	Ile	Tyr	Ala
			20					25					30		
Leu	Lys	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	His	Ile	Leu	Ile
		35					40					45			
Phe	Leu	Asn	Cys	Ser	Phe	Thr	Phe	Gly	Tyr	Met	Thr	Tyr	Val	Arg	Phe
	50					55					60				
Gln	Ser	Thr	Asn	Arg	Val	Ala	Leu	Thr	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Leu
65					70					75					80
Leu	Trp	Gly	Val	Tyr	Ser	Phe	Thr	Glu	Ser	Trp	Lys	Phe	Val	Thr	Ser
				85					90					95	
Arg	Cys	Arg	Leu	Cys	Cys	Leu	Gly	Arg	Arg	Tyr	Ile	Leu	Ala	Pro	Ala
			100					105					110		
His	His	Val	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	His	Ser	Ile	Pro	Ala	Ser	Gly
		115					120					125			
Asn	Arg	Ala	Tyr	Ala	Val	Arg	Lys	Pro	Gly	Leu	Thr	Ser	Val	Asn	Gly
	130					135					140				
Thr	Leu	Val	Pro	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Val	Leu	Gly	Gly	Lys	Arg	Ala
145					150					155					160
Val	Lys	Arg	Gly	Val	Val	Asn	Leu	Val	Lys	Tyr	Gly	Arg			
				165					170						

FIGURA 2E

p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.


 PLEBANK Souto
 (Inscripción Año nr. 358)



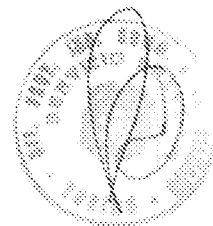
ORF7

Met	Ala	Gly	Lys	Asn	Gln	Ser	Gln	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Ala	Ala	Pro
1				5				10						15	
Met	Gly	Asn	Gly	Gln	Pro	Val	Asn	Gln	Leu	Cys	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala
			20					25					30		
Met	Ile	Lys	Ser	Gln	Arg	Gln	Gln	Pro	Arg	Gly	Gly	Gln	Ala	Lys	Lys
		35					40					45			
Lys	Lys	Pro	Glu	Lys	Pro	His	Phe	Pro	Leu	Ala	Ala	Glu	Asp	Asp	Ile
	50					55					60				
Arg	His	His	Leu	Thr	Gln	Thr	Glu	Arg	Ser	Leu	Cys	Leu	Gln	Ser	Ile
65					70					75					80
Gln	Thr	Ala	Phe	Asn	Gln	Gly	Ala	Gly	Thr	Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Ser
				85					90					95	
Gly	Lys	Val	Ser	Phe	Gln	Val	Glu	Phe	Met	Leu	Pro	Val	Ala	His	Thr
			100					105					110		
Val	Arg	Leu	Ile	Arg	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Ala	Ser
		115					120					125			

FIGURA 2F

p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PLEPANI Rinaldo
 (no nr. 358)



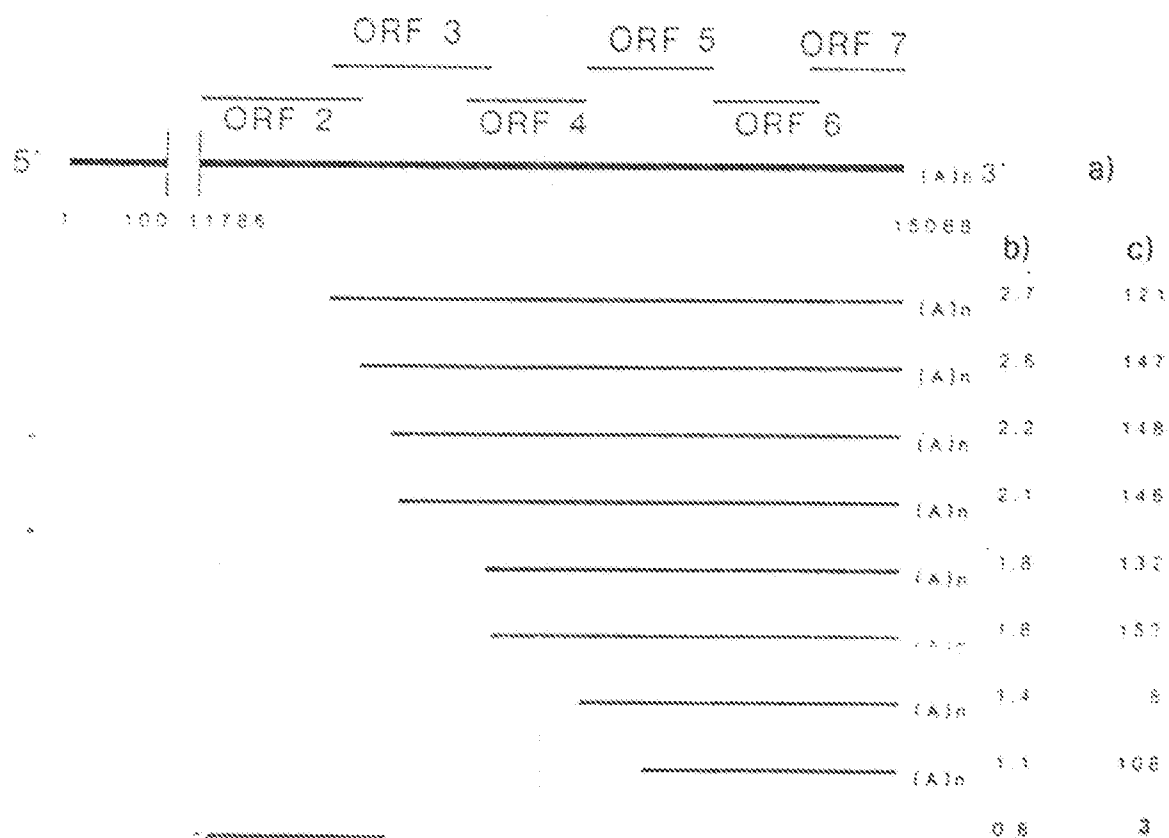
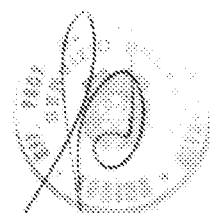


FIGURA 3

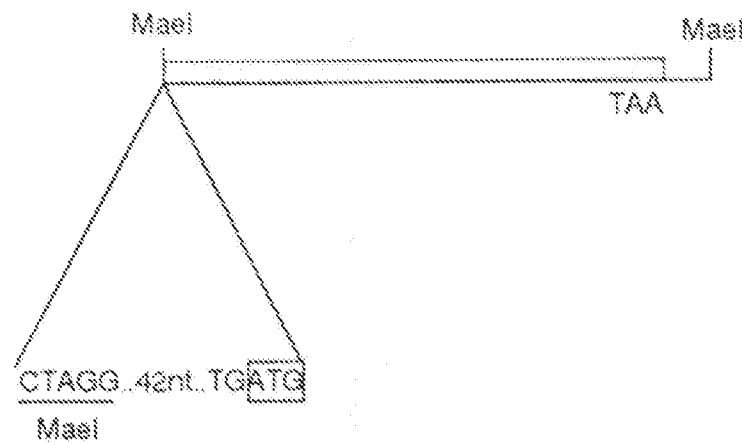
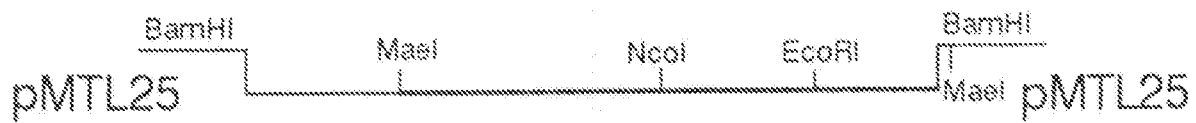
p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

Pierrada Pierrada
Inscripción Albo nr. 350



70 950000005

pPRRS-3



ORF 2

FIGURA 4

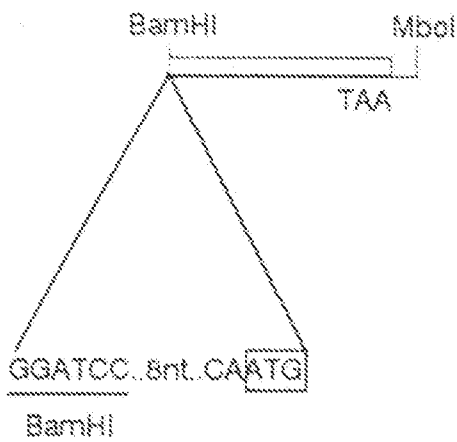
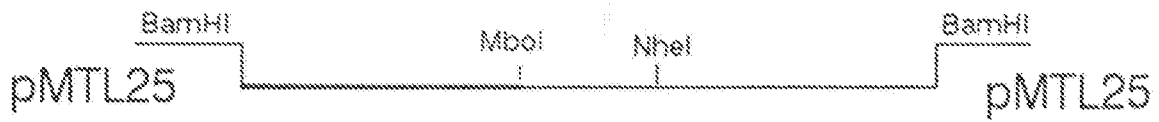
p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)



70 95105307

pPRRS-121

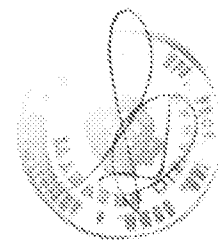


ORF 3

FIGURA 5

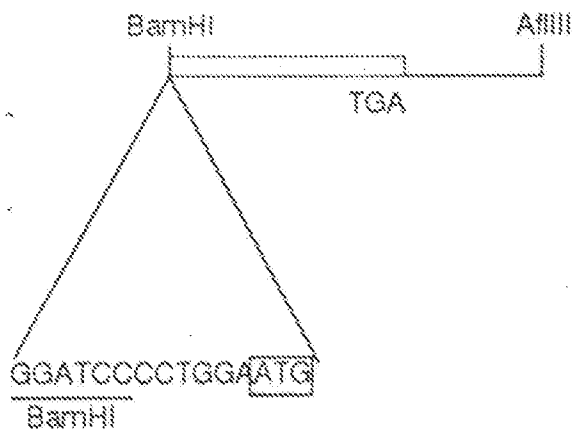
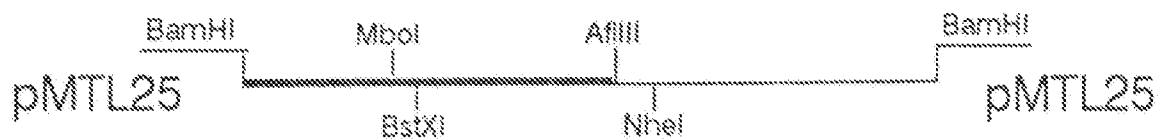
p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PLEBATO, Rinaldo
(Licenciado en Abogado nr. 358)



18 95A00.367

pPRRS-146

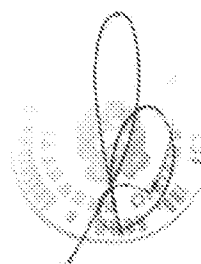


ORF 4

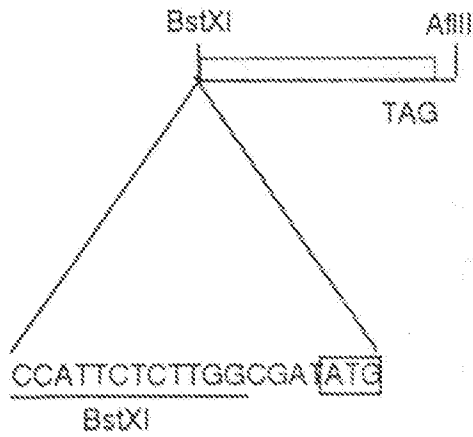
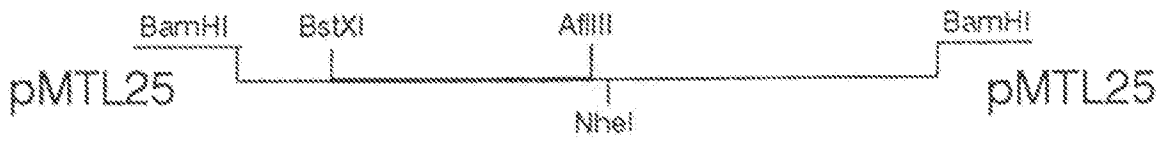
FIGURA 6

p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PLERANO, Amalio
(artículo 12º nº. 358)



pPRRS-132

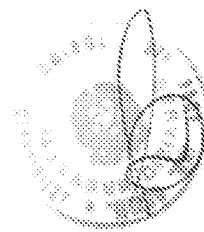


ORF 5

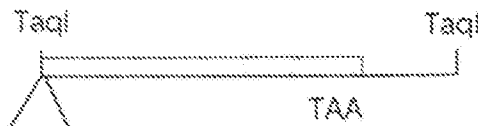
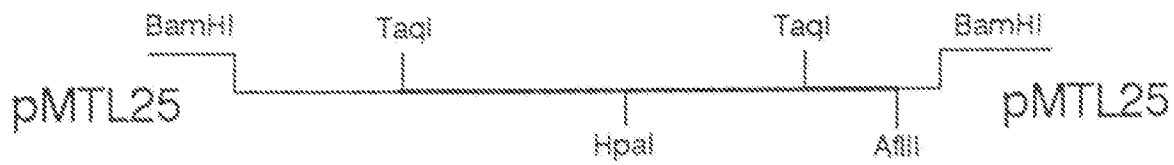
FIGURA 7

p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

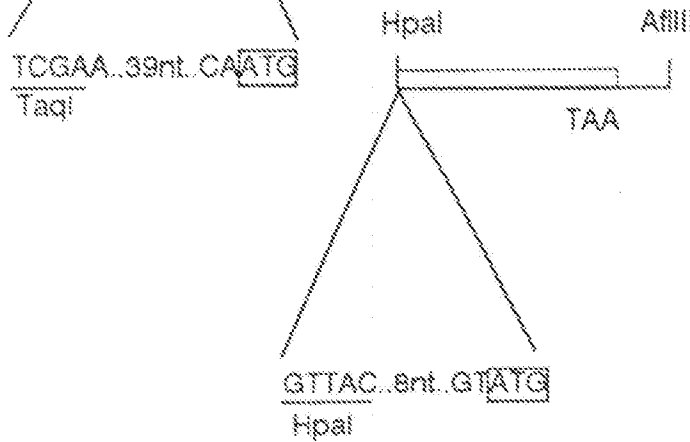
PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)



p^{PRRS-8}



ORF 6

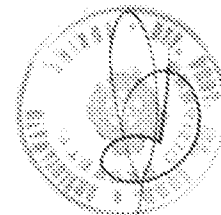


ORF 7

FIGURA 8

p.i.: CYANAMID IBERICA S.A.

[Signature]
 RINALDO
 Albo nr. 358)



10 93200 1367

a)

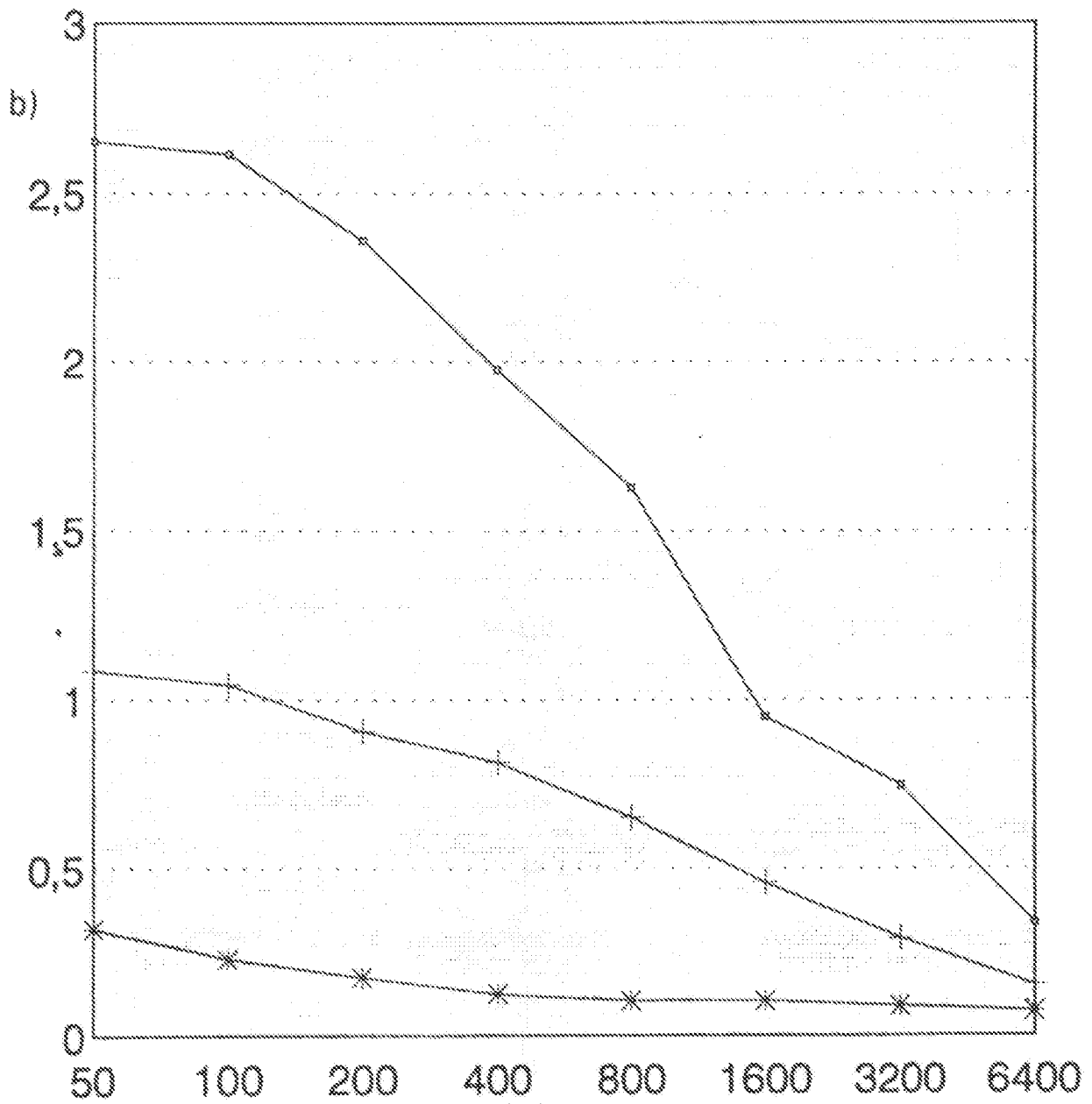


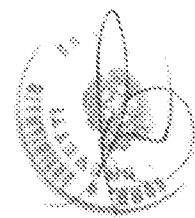
FIGURA 9

c)

p.i.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PLEBATO Rmoldo
C/201/2000/2110 nr. 3501

d)



552003367

a)

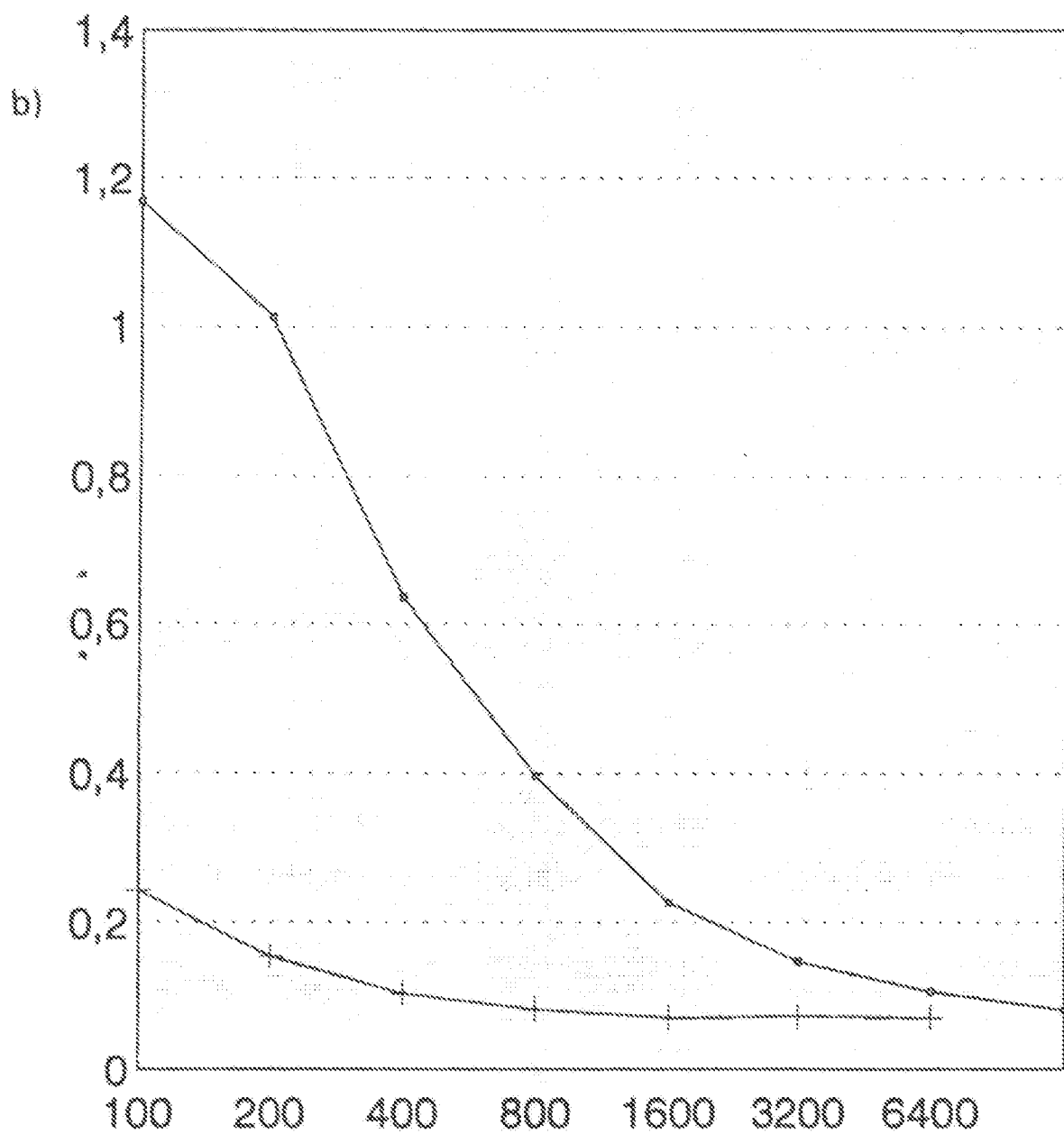


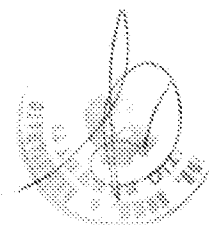
FIGURA 10

c)

p.l.: CYANAMID IBERICA S.A.

PLEDANTE Rinaldo
(Resolución No. 358)

d)



70 552001805

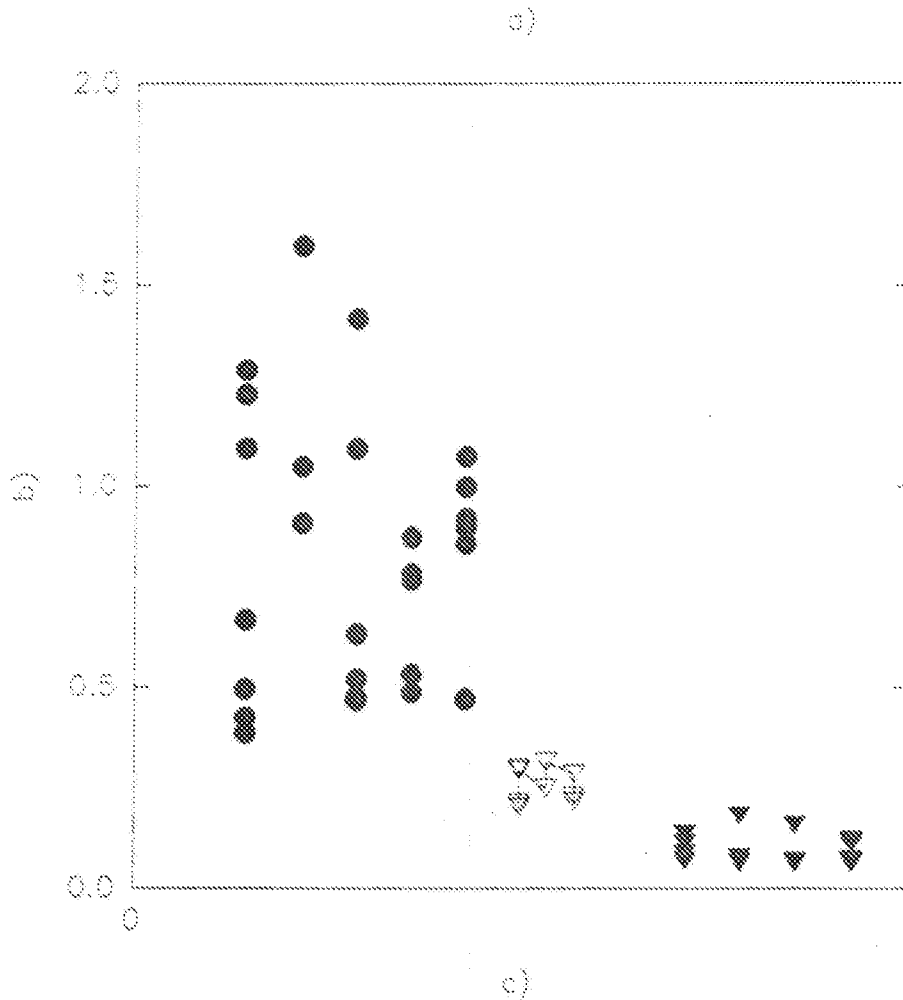


FIGURA 11

p.l.: CYANAMID IBERICA, S.A.

PLED. J. Rinaldo
(letrado) Albo nr. 358)

