



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 339 728**

② Número de solicitud: 200702776

⑤ Int. Cl.:
C07K 14/165 (2006.01)
C12N 15/50 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **23.10.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2010**

Fecha de la concesión: **25.03.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **06.04.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
06.04.2011

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Rodríguez Aguirre, Dolores y
Pignatelli Garrigós, Jaime**

⑳ Agente: **Ungría López, Javier**

⑳ Título: **Proteínas N, M y HE de torovirus porcino, procedimiento de obtención y sus aplicaciones en diagnóstico y tratamiento de torovirus porcino.**

㉑ Resumen:

Proteínas N, M y HE de torovirus porcino, procedimiento de obtención y sus aplicaciones en diagnóstico y tratamiento de torovirus porcino.

La presente invención describe la capacidad inmunogénica de las proteínas N, M y HE de torovirus porcino, y el empleo de las mismas para el desarrollo de procedimientos de diagnóstico inmunológico de torovirus porcino así como para la elaboración de anticuerpos específicos. Por otro lado, estas proteínas pueden utilizarse para la elaboración de vacunas dirigidas a la prevención de esta enfermedad en cerdos.

ES 2 339 728 B1

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas N, M y HE de torovirus porcino, procedimiento de obtención y sus aplicaciones en diagnóstico y tratamiento de torovirus porcino.

5 **Sector de la técnica**

Este invento podría tener aplicación en el sector ganadero y en particular, con utilidad para el diagnóstico y tratamiento veterinario, mediante herramientas biotecnológicas de tipo inmunológico y vacunas, respectivamente, especialmente para el diagnóstico y tratamiento de torovirus porcino.

Estado de la técnica

Los torovirus pertenecen a la familia *Coronaviridae*, del orden Nidovirales. Son virus emergentes causantes de gastroenteritis en caballos, terneras, cerdos y humanos, de los que apenas se tiene información. Esta situación es debida a que los torovirus a excepción del aislado equino BEV, no han sido adaptados al cultivo *in vitro*, lo que ha retrasado el desarrollo de herramientas para su diagnóstico y para su estudio. Los estudios iniciales sobre torovirus se llevaron a cabo mediante microscopía electrónica y mediante esta técnica se describió la existencia de torovirus equino (BEV), bovino (BToV) (Woode y col., 1982), humano (HToV) (Beards y col., 1984) y porcino (PToV) (Scott y col., 1987). Sin embargo, fue a partir de la adaptación al cultivo *in vitro* de BEV (Weiss y col., 1983), y el desarrollo de infecciones experimentales con BToV en terneras (Woode y col., 1982), cuando se inició el desarrollo de herramientas para el estudio de los torovirus. Así, basándose en el genoma de BEV, pues era el único del que se disponía de información, se han utilizado para la detección de torovirus sistemas de RT-PCR (Koopmans y col., 1991; Duckmanton y col., 1998) así como hibridación con sondas basadas en la secuencia de BEV (Koopmans y col., 1991). También se han utilizado para diagnóstico métodos de ELISA, especialmente para BToV (Brown y col., 1987; Woode, 1987; Durham y col., 1989; Koopmans y col., 1989; Koopmans y col., 1991; Liebler y col., 1992) y HToV (Koopmans y col., 1993; Koopmans y col., 1997). Los escasos trabajos realizados sobre PToV corresponden a estudios llevados a cabo mediante microscopía electrónica (Scott y col., 1987; Durham y col., 1989; Penrith y Gerdes, 1992) o mediante estudios serológicos utilizando BEV como antígeno. Hasta la fecha, la detección de anticuerpos frente a torovirus porcino se ha llevado a cabo mediante ensayos de neutralización de la infectividad de BEV y mediante ELISA frente a BEV (Brown y col., 1988; Liebermann, 1990). Estos métodos presentan varios inconvenientes, uno de ellos relacionado con la dificultad de la obtención de virus, que requiere un gran esfuerzo tanto económico como del personal de laboratorio. Por otra parte, para el ensayo de neutralización es necesaria además la utilización de cultivos celulares, algo que habitualmente no se lleva a cabo en el diagnóstico veterinario y que está reservado al diagnóstico en humanos. Además, este ensayo es laborioso y lento ya que se requieren varios días para obtener el resultado. Por otra parte, a pesar de que las distintas especies de torovirus están serológicamente relacionadas esta reactividad cruzada no es total, por lo que sistemas de diagnóstico basados en esta reactividad pueden producir un mayor porcentaje de falsos negativos.

La evidencia molecular de la existencia de PToV no se obtuvo hasta 1998 (Kroneman y col., 1998). En ese mismo trabajo se observó una elevada prevalencia de anticuerpos frente al virus mediante ensayos de neutralización del virus BEV. Hasta la fecha los únicos métodos de diagnóstico de torovirus que se utilizan (en investigación y/o comercializados) son específicos para las formas del virus que afectan al ganado equino y bovino:

- 45 - ELISA para la detección de anticuerpos frente a torovirus usando el virus equino BEV como antígeno
- ELISA para la detección de anticuerpos frente a torovirus usando el virus bovino BRV como antígeno
- Ensayo de neutralización de la infectividad de BEV para la detección de anticuerpos frente a torovirus
- 50 - Proteína N del torovirus bovino BRV expresada en *E. coli* en westernblot para detectar anticuerpos frente a torovirus en sueros de terneras infectadas con BRV.
- Se ha generado un suero policlonal en cobayas frente a la proteína HE del torovirus bovino BRV expresada en células de insecto mediante un baculovirus recombinante
- 55 - Se ha generado un suero policlonal en cobayas frente a la proteína N del torovirus bovino BRV expresada en *E. coli*, y
- 60 - Se ha generado un suero policlonal en conejo frente a un fragmento de la proteína HE de torovirus bovino BRV (aa 35-391).

Sin embargo, y pasado todo este tiempo, no se ha desarrollado y comercializado un sistema de diagnóstico específico de torovirus porcino siendo las únicas alternativas los sistemas anteriormente descritos. Por tanto, la toma de decisiones basada en el diagnóstico con los sistemas descritos puede ser incorrecta, lo que al mismo tiempo provoca que el peligro de infecciones de torovirus porcino no se valore adecuadamente o se infravalore en el sector veterinario y no se promueva una política de control en un sector, el porcino, de gran valor económico. Únicamente, en relación con el torovirus porcino se ha expresado de forma transitoria (pero no se ha purificado) la proteína HE de tres aislados

ES 2 339 728 B1

de torovirus porcino, pero en ningún caso se ha demostrado la capacidad antigénica o inmunogénica de estas proteínas (Smits, SL *et al.* 2003).

Bibliografía

- 5
- **Beards, G. M., C. Hall, J. Green, T. H. Flewett, F. Lamouliatte y P. Du Pasquier (1984)**. “An enveloped virus in stools of children and adults with gastroenteritis that resembles the Breda virus of calves”. *Lancet* 1 (8385): 1050-2.
- 10
- **Brown, D. W., G. M. Beards y T. H. Flewett (1987)**. “Detection of Breda virus antigen and antibody in humans and animals by enzyme immunoassay”. *J Clin Microbiol* 25(4): 637-40.
- **Brown, D. W., R. Selvakumar, D. J. Daniel y V. I. Mathan (1988)**. “Prevalence of neutralising antibodies to Berne virus in animals and humans in Vellore, South India. Brief report”. *Arch Virol* 98(3-4): 267-9.
- 15
- **Carroll, M. W. y B. Moss (1995)**. “*E. coli* beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses”. *Biotechniques* 19(3): 352-4, 356.
- **Cornelissen, L. A., C. M. Wierda, F. J. van der Meer, A. A. Herrewegh, M. C. Horzinek, H. F. Egberink y R. J. de Groot (1997)**. “Hemagglutinin-esterase, a novel structural protein of torovirus”. *J Virol* 71(7): 5277-86.
- 20
- **Den Boon, J. A., E. J. Snijder, J. K. Locker, M. C. Horzinek y P. J. Rottier (1991)**. “Another triple-spanning envelope protein among intracellularly budding RNA viruses: the torovirus E protein”. *Virology* 182(2): 655-63.
- 25
- **Duckmanton, L., S. Carman, E. Nagy y M. Petric (1998)**. “Detection of bovine torovirus in fecal specimens of calves with diarrhea from Ontario farms”. *J Clin Microbiol* 36(5): 1266-70.
- **Durham, P. J., L. E. Hassard, G. R. Norman y R. L. Yemen (1989)**. “Viruses and virus-like particles detected during examination of feces from calves and piglets with diarrhea”. *Can Vet J* 30(11): 876-881.
- 30
- **Gherardi, M. M., J. C. Ramirez, D. Rodríguez, J. R. Rodríguez, G. Sano, F. Zavala y M. Esteban (1999)**. “IL-12 delivery from recombinant vaccinia virus attenuates the vector and enhances the cellular immune response against HIV-1 Env in a dose-dependent manner”. *J Immunol* 162(11): 6724-33.
- 35
- **Ikonomou, L., Y. J. Schneider y S. N. Agathos (2003)**. “Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins”. *Appl Microbiol Biotechnol* 62(1): 1-20.
- **Isaacs, S. N. (2004)**. “Working safely with vaccinia virus: laboratory technique and the role of vaccinia vaccination”. *Methods Mol Biol* 269: 1-14.
- 40
- **Koopmans, M., M. Petric, R. I. Glass y S. S. Monroe (1993)**. “Enzyme-linked immunosorbent assay reactivity of torovirus-like particles in fecal specimens from humans with diarrhea”. *J Clin Microbiol* 31(10): 2738-44.
- **Koopmans, M., E. J. Snijder y M. C. Horzinek (1991)**. “cDNA probes for the diagnosis of bovine torovirus (Breda virus) infection”. *J Clin Microbiol* 29(3): 493-7.
- 45
- **Koopmans, M., U. van den Boom, G. Woode y M. C. Horzinek (1989)**. “Seroepidemiology of Breda virus in cattle using ELISA”. *Vet Microbiol* 19(3): 233-43.
- 50
- **Koopmans, M., L. van Wuijckhuise-Sjouke, Y. H. Schukken, H. Cremers y M. C. Horzinek (1991)**. “Association of diarrhea in cattle with torovirus infections on f antis”. *Am J Vet Res* 52(11): 1769-73.
- **Koopmans, M. P., E. S. Goosen, A. A. Lima, I. T. McAuliffe, J. P. Nataro, L. J. Barrett, R. I. Glass y R. L. Guerrant (1997)**. “Association of torovirus with acute and persistent diarrhea in children”. *Pediatr Infect Dis J* 16(5): 504-7.
- 55
- **Kroneman, A., L. A. Cornelissen, M. C. Horzinek, R. J. de Groot y H. F. Egberink (1998)**. “Identification and characterization of a porcine torovirus”. *J Virol* 72(5): 3507-11.
- 60
- **Laemmli, U. K. (1970)**. “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”. *Nature* 227(5259): 680-5.
- **Liebermann, H. (1990)**. “[New types of virus infections of domestic animals in the Germán Democratic Republic. 1. Serologic survey studies of the distribution of equine torovirus infections in the GDR]”. *Arch Exp Veterinarmed* 44(2): 251-3.
- 65
- **Liebler, E. M., S. Kluver, J. Pohlenz y M. Koopmans (1992)**. “[The significance of bredavirus as a diarrhea agent in calf herds in Lower Saxony]”. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 99(5): 195-200.

ES 2 339 728 B1

- **Penrith, M. L. y G. H. Gerdes** (1992). "Breda virus-like particles in pigs in South Africa". *J S Afr Vet Assoc* 63 (3): 102.

5 - **Sambroock, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis** (2001). "Molecular Cloning. A laboratory manual". *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

- **Scott, A. C., M. J. Chaplin, M. J. Stack y L. J. Lund** (1987). "Porcine torovirus?" *Vet Rec* 120(24): 583.

10 - **Smits SL, Gerwig GJ, van Vliet AL, Lissenberg A, Briza P, Kamerling JP, Vlasak R, de Groot RJ.** (2005). "Nidovirus sialate-O-acetylsterases: evolution and substrate specificity of coronaviral and toroviral receptor-destroying enzymes". *J Biol Chem.* 25, 6933-41.

15 - **Smits, S.L., A. Lavazza, K. Matiz, M. C. Horzinek, M. P. Koopmans, and R. J. de Groot** (2003). "Phylogenetic and Evolutionary Relationships among Torovirus Field Variants: Evidence for Multiple Intertypic Recombination Events". *J. Virol.*, 77: 9567-9577.

- **Weiss, M., F. Steck y M. C. Horzinek** (1983). "Purification and partial characterization of a new enveloped RNA virus (Berne virus)". *J Gen Virol* 64 (Pt 9): 1849-58.

20 - **Woode, G. N.** (1987). "Breda and Breda-like viruses: diagnosis, pathology and epidemiology". *Ciba Found Symp* 128: 175-91.

- **Woode, G. N., D. E. Reed, P. L. Runnels, M. A. Herrig y H. T. Hill** (1982). "Studies with an unclassified virus isolated from diarrheic calves". *Vet Microbiol* 7(3): 221-40.

25 - **Zhang, X., M. Hasoksuz, D. Spiro, R. Halpin, S. Wang, S. Stollar, D. Janies, N. Hadya, Y. Tang, E. Ghedin y L. Saif** (2007). "Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in nonstructural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus". *Virology* 358(2): 424-35.

30 Descripción de la invención

Descripción breve

35 En un aspecto, la invención se relaciona con un complejo proteico útil para el diagnóstico y el desarrollo de vacunas frente a torovirus porcino, en adelante complejo proteico de la invención, que comprende, al menos, una proteína y/o, un fragmento o péptido de la misma, del siguiente grupo:

i) proteína N de SEQ ID NO: 9,

40 ii) proteína M de SEQ ID NO: 11, y

iii) proteína HE de SEQ ID NO: 13.

45 En otra realización particular, el complejo proteico de la invención está constituido por una mezcla de fragmentos o péptidos de las, mismas o distintas, proteínas pertenecientes al siguiente grupo: proteína de SEQ ID NO: 9, proteína de SEQ ID NO: 11 y proteína de SEQ ID NO: 13; preferentemente, un complejo formado por fragmentos de la proteína N o de la proteína HE, preferentemente los péptidos 286E1-HE (SEQ ID NO: 14) y/o 286F1-HE (SEQ ID NO: 16) (Ejemplo 4).

50 En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de las proteínas de torovirus porcino de la invención, en adelante procedimiento de la invención, que comprende cultivar un microorganismo que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para una o varias proteínas de torovirus porcino de la invención y que expresa dichas proteínas, y, si se desea, recuperar dichas proteínas de la invención.

55 En una realización más particular, el procedimiento de expresión de la invención comprende la infección de una célula de insecto con un baculovirus que comprende la secuencia de nucleótidos del gen N (SEQ ID NO: 8).

En otra realización más particular, el procedimiento de expresión de la invención comprende la infección de una célula de mamífero con un virus vaccina que comprende la secuencia de nucleótidos del gen HE (SEQ ID NO: 12).

60 Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una secuencia de nucleótidos codificante de las proteínas N, M y HE de la invención, en adelante secuencia de nucleótidos de la invención útil para la construcción de un vector de expresión que comprende, al menos, una secuencia y/o, un fragmento de la misma, del siguiente grupo:

65 i) secuencia de nucleótidos N de SEQ ID NO: 8,

ii) secuencia de nucleótidos M de SEQ ID NO: 10, y

iii) secuencia de nucleótidos HE de SEQ ID NO: 12.

ES 2 339 728 B1

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema o vector de expresión útil para transformar (o infectar cuando el sistema de expresión esté basado en un virus recombinante derivado de baculovirus o del virus vaccinia) células, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína de la invención, en donde dicha proteína de la invención es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por, al menos, una secuencia de aminoácidos perteneciente al siguiente grupo: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13, estando dicha secuencia de nucleótidos codificante para dicha proteína de la invención operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para las proteínas de la invención. En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula de insecto, de mamífero o levadura transformada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína de la invención. Prácticamente cualquier tipo de célula eucariota puede ser utilizada para la puesta en práctica del procedimiento de la invención; no obstante, en una realización particular, dicha célula es de insecto para expresar la proteína N o de mamífero para expresar la proteína HE. En el caso de usar una levadura, se puede seleccionar una levadura del género *Saccharomyces*, por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, etc., o una levadura del género *Pichia*, por ejemplo, *P. pastoris*, etc.

Dichas proteínas de la invención pueden ser utilizadas para desarrollar anticuerpos específicos, para identificar sueros de animales infectados y para inmunizar animales, en particular, cerdos, por lo que pueden ser utilizadas con fines de diagnóstico o terapéuticos.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo específico de la proteína de la invención, en adelante anticuerpo de la invención, ya sea monoclonal o policlonal, o específico de un fragmento o péptido de la misma.

Otra realización particular lo constituye el anticuerpo de la invención que es específico de una proteína de la invención perteneciente al siguiente grupo: proteína N de SEQ ID NO: 9 (ver Ejemplo 4), proteína M de SEQ ID NO: 11 y proteína HE de SEQ ID NO: 13.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichos anticuerpos de la invención en la elaboración de sistema de diagnóstico inmunológico de torovirus porcino, tales como, sistema de ELISA, tira de inmunocromatografía o de Western blot, que permita la identificación de dichos virus en una muestra biológica, por ejemplo heces de un animal sospechoso de padecer o haber padecido una infección por torovirus porcino, preferentemente un cerdo.

Además, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas proteínas de la invención en la elaboración de medicamentos tales como, vacunas. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, cerdos, frente a infecciones de torovirus porcino.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas proteínas de la invención en la elaboración de sistema de diagnóstico inmunológico de torovirus porcino, tales como, sistema de ELISA, tira de inmunocromatografía o de Western blot (immunoblot), que permita la identificación conjunta y simultánea de anticuerpos frente a las proteínas de la invención presentes en una muestra biológica de cerdos.

Además, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas proteínas de la invención en la elaboración de medicamentos tales como, vacunas. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, cerdos, frente a infecciones de torovirus porcino.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una o varias proteínas de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil para proteger animales, en particular, cerdos, frente a torovirus porcino.

Así, en otro aspecto la invención se relaciona con un sistema de diagnóstico de torovirus porcino a partir de una muestra biológica mediante la identificación de material genómico, en adelante procedimiento de identificación genómica de la invención, específico de torovirus porcino, basado en la identificación de los genes N, M y HE, de secuencias SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, respectivamente.

Otro aspecto particular, lo constituye un procedimiento de identificación genómica de la invención basado en la amplificación de DNA y que comprende las siguientes etapas:

- i) aislamiento de material génico de una muestra biológica sospechosa de contener torovirus porcino y obtención del cDNA correspondiente,
- ii) amplificación por PCR de dicho cDNA mediante oligonucleótidos específicos para, al menos, uno de los genes de la invención, gen N, M y HE que se corresponden, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, respectivamente, con los siguientes:
 - pareja de oligos PToV-N5' y PToV-N3' para el gen N (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2),

ES 2 339 728 B1

- pareja de oligos PToV-M5' y PToV-M3' para el gen M (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4), Y
 - pareja de oligos PToV-HE5' y PToV-HE3' para el gen HE (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6), y
- 5 iii) diagnóstico de un torovirus porcino si alguno de los genes de la invención es amplificado en ii).

Otro aspecto adicional lo constituyen oligonucleótidos o cebadores utilizados en la identificación genómica de la invención basado en la amplificación de DNA, preferentemente las parejas de oligonucleótidos siguientes:

- 10 - pareja de oligos PToV-N5' y PToV-N3' para el gen N (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2),
- pareja de oligos PToV-M5' y PToV-M3' para el gen M (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4), Y
- 15 - pareja de oligos PToV-HE5' y PToV-HE3' para el gen HE (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6).

Descripción detallada

20 La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevas herramientas para el diagnóstico y el desarrollo de vacunas frente a infecciones provocadas por torovirus en mamíferos, preferentemente en animales, y más preferentemente en cerdos.

25 La presente invención describe la identificación y caracterización de las proteínas de un aislado de torovirus porcino a partir de una muestra de heces en la que se había observado la presencia de partículas de torovirus mediante microscopía electrónica, y al que se le ha dado el nombre de PToV-BRES2.

30 Así, las investigaciones se dirigieron a la caracterización filogenética de este aislado PToV-BRES2 mediante la amplificación de las fases de lectura abierta (ORFs) correspondientes a los genes que codifican tres de las proteínas estructurales de PToV: proteína de la nucleocápsida (N) correspondiente a la ORF5, proteína de membrana (M) correspondiente a la ORF3, y la proteína hemaglutinina esterasa (HE) correspondiente a la ORF4, presente en la superficie de la partícula viral (Ejemplo 1, SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3, respectivamente), para a continuación poder desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico serológico para la detección de anticuerpos en animales frente a torovirus porcino, diagnóstico del propio virus y vacunas frente a dicha enfermedad.

35 Para producir la proteína N de este torovirus porcino (PToV-BRES2) se ha utilizado un sistema heterólogo basado en baculovirus que permite expresar dicha proteína en grandes cantidades (Ejemplo 2, SEQ ID NO: 9). Mediante el sistema utilizado la proteína se expresa como un producto de fusión que tiene una cola de seis histidinas en su extremo amino-terminal, lo que facilita su purificación mediante métodos convencionales de cromatografía.

40 Las proteínas M y HE también han sido expresadas y purificadas siguiendo el mismo procedimiento (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13, respectivamente), aunque los rendimientos de cantidad de proteína purificada fueron significativamente menores que los obtenidos con la proteína N, especialmente en el caso de la proteína M. Además, como ejemplo ilustrativo de las distintas alternativas para producir estas proteínas y de cara a obtener mejores rendimientos a su producción industrial para la proteína HE se ha generado también un virus vaccinia recombinante que expresa dicha proteína, en este caso desprovista de la cola de histidinas (Ejemplo 3). Mediante este sistema la proteína se expresa en células de mamífero, y por tanto, su procesamiento post-traducciona es más similar al que experimenta durante la infección por torovirus que cuando se expresa mediante el recombinante de baculovirus, por lo que su capacidad de inducir una respuesta inmune puede mejorar ostensiblemente con respecto a la proteína producida inicialmente con baculovirus. Su purificación se realizó mediante cromatografía de inmunoafinidad para lo cual se generó un suero policlonal en conejo (anti-HEpept) mediante la inmunización con una mezcla de los péptidos sintéticos 286E1 (SEQ ID NO: 14) y 286F1 (SEQ ID NO: 16) correspondientes, respectivamente, a los aminoácidos 50-60 y 150-160 de la proteína HE de PToV de la invención, acoplados a KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*). Asimismo, mediante la inmunización con estos péptidos se han generado sueros policlonales frente a la proteína HE en ratas (Ejemplo 4).

Definiciones

55 El término “complejo proteico de torovirus porcino”, tal como se utiliza en esta descripción, se refiere a un conjunto de, al menos, una proteína de un torovirus porcino y/o fragmento o péptido de la misma, con actividad antigénica o inmunogénica, perteneciente al grupo de proteína N, M y HE.

60 Los términos “proteína N”, “proteína M”, “proteína HE” y “proteínas de la invención/proteínas de torovirus porcino de la invención” se refieren, en general, a una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 y al grupo formado por todas ellas, respectivamente, e incluye a cualquiera de las diferentes formas de dichas proteínas N, M y HE representativas de cualquiera de las cepas existentes de torovirus porcino así como a proteínas sustancialmente homologas a dichas proteínas N, M y HE de torovirus porcino, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dichas proteínas, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

ES 2 339 728 B1

El término “análoga”, tal como aquí se utiliza, pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que puede ser aislada o construida sobre la base de la secuencia de nucleótidos codificantes de las proteínas N, M y HE de torovirus porcino, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una secuencia de nucleótidos análoga a otra secuencia de nucleótidos es sustancialmente homologa a dicha secuencia de nucleótidos. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homologa” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 80%, preferentemente de, al menos, un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95% y, aún más preferentemente de, al menos, un 97%.

Así, en un aspecto, la invención se relaciona con un complejo proteico útil para el diagnóstico y el desarrollo de vacunas frente a torovirus porcino, en adelante complejo proteico de la invención, que comprende, al menos, una proteína y/o, un fragmento o péptido de la misma, del siguiente grupo:

- i) proteína N de SEQ ID NO: 9,
- ii) proteína M de SEQ ID NO: 11, y
- iii) proteína HE de SEQ ID NO: 13.

En una realización particular, el complejo proteico de la invención está constituido por una única proteína de las pertenecientes al siguiente grupo: proteína de SEQ ID NO: 9, proteína de SEQ ID NO: 11 y proteína de SEQ ID NO: 13 (Ejemplo 1).

En otra realización particular, el complejo proteico de la invención está constituido por una mezcla de las proteínas pertenecientes al siguiente grupo: proteína de SEQ ID NO: 9, proteína de SEQ ID NO: 11 y proteína de SEQ ID NO: 13; preferentemente, un complejo proteico formado por la proteína N y M, o un complejo proteico formado por la proteína N y HE.

En otra realización particular, el complejo proteico de la invención está constituido por una mezcla de fragmentos o péptidos de las, mismas o distintas, proteínas pertenecientes al siguiente grupo: proteína de SEQ ID NO: 9, proteína de SEQ ID NO: 11 y proteína de SEQ ID NO: 13; preferentemente, un complejo formado por fragmentos de la proteína N o de la proteína HE, preferentemente los péptidos 286E1-HE (SEQ ID NO: 14) y/o 286F1-HE (SEQ ID NO: 16) (Ejemplo 4).

Las proteínas proporcionadas por esta invención pueden obtenerse mediante la expresión de cada proteína de forma separada o conjunta, en células hospedadoras apropiadas, por ejemplo, bacterias, células de insecto, levaduras, o preferentemente, en virus vaccinia para el caso de la proteína HE, las cuales contienen la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha/s proteína/s de torovirus porcino en una construcción génica. En una realización particular, dichas células hospedadoras apropiadas son células de insecto o de mamífero o levaduras transformadas (infectadas cuando el sistema de expresión esté basado en un virus recombinante derivado de baculovirus o del virus vaccinia) con un sistema de expresión adecuado que incluye una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos codificante para una o varias de las proteínas de torovirus porcino de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de las proteínas de torovirus porcino de la invención, en adelante procedimiento de la invención, que comprende cultivar un microorganismo que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para una o varias proteínas de torovirus porcino de la invención y que expresa dichas proteínas, y, si se desea, recuperar dichas proteínas de la invención.

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende las etapas de:

a) cultivar células, preferentemente de insecto o de mamífero, transformadas con un sistema de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para, al menos, una proteína de la invención, en donde dicha proteína es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 Y SEQ ID NO: 13.

b) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas proteínas.

Para ello, el procedimiento de la invención comprende, como paso previo, la obtención de un sistema de expresión génica, tal como un sistema constituido por un plásmido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de la invención, seguido de la transformación de una célula con dicho sistema de expresión, la expresión de las proteínas recombinantes, y, si se desea, el aislamiento de las proteínas, y, opcionalmente, la purificación de dichas proteínas.

La obtención de células transformadas con un sistema o vector de expresión que permite la expresión de las proteínas de la invención puede ser realizada por un experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (Ikonomou y col., 2003; Isaacs, 2004). Los microorganismos o células transformadas

ES 2 339 728 B1

se cultivan bajo condiciones, conocidas por los expertos en la materia, que permiten la expresión de las proteínas recombinantes de forma aislada o conjuntamente en una misma construcción. El aislamiento y purificación de dichas proteínas de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante fraccionamiento en gradientes de sacarosa y cromatografía de afinidad.

En una realización más particular, el procedimiento de expresión la invención comprende la infección de una célula de insecto con un baculovirus que comprende la secuencia de nucleótidos del gen N (SEQ ID NO: 8).

En otra realización más particular, el procedimiento de expresión la invención comprende la infección de una célula de mamífero con un virus vaccina que comprende la secuencia de nucleótidos del gen HE (SEQ ID NO: 12).

El sistema o vector de expresión utilizado para transfectar las células huésped comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína de la invención operativamente unida a unos elementos de control de transcripción, y, opcionalmente, de traducción, e incluso de purificación y constituye un aspecto adicional de esta invención.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una secuencia de nucleótidos codificante de las proteínas N, M y HE de la invención, en adelante secuencia de nucleótidos de la invención útil para la construcción de un vector de expresión que comprende, al menos, una secuencia y/o, un fragmento de la misma, del siguiente grupo:

- i) secuencia de nucleótidos N de SEQ ID NO: 8,
- ii) secuencia de nucleótidos M de SEQ ID NO: 10, y
- iii) secuencia de nucleótidos HE de SEQ ID NO: 12.

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención está constituida por una única secuencia de las pertenecientes al siguiente grupo: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12 (Ejemplo 1).

Los vectores de expresión que contienen la secuencia de nucleótidos de la invención pueden contener varias de las secuencias de la invención, en distintas combinaciones, o utilizarse vectores de expresión distintos para las distintas secuencias en función de los sistemas utilizados o de las aplicaciones a desarrollar.

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención está constituida por una mezcla de las secuencias pertenecientes al siguiente grupo: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12; preferentemente, una mezcla de secuencias formada por la secuencia de nucleótidos N y M (SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10), o más preferentemente, un complejo proteico formando por la secuencia de nucleótidos N y HE (SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 12).

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención está constituida por una mezcla de las secuencias codificantes de fragmentos de la proteína N o de la proteína HE, preferentemente, los péptidos 286E1-HE (SEQ ID NO: 14) y/o 286F1-HE (SEQ ID NO: 16).

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema o vector de expresión útil para transformar células, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína de la invención, en donde dicha proteína de la invención es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por, al menos, una secuencia de aminoácidos perteneciente al siguiente grupo: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13, estando dicha secuencia de nucleótidos codificante para dicha proteína de la invención operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En una realización particular, dicho sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a una proteína seleccionada entre el siguiente grupo: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 Y SEQ ID NO: 13.

Los elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, presentes en dicho sistema de expresión incluyen promotores, que dirigen la transcripción de la secuencia de la proteína de la invención (a la que está operativamente unido), y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc., todas ellas útiles en distintos tipos de células. Por otro lado, puede utilizarse cualquier secuencia de ADN codificante de un péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento o la detección de las proteína recombinante de interés, por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, una secuencia de polihistidina (6xHis), una secuencia peptídica reconocible por un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, E-tag para su identificación, o cualquier otra que sirva para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmutafinidad: péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, FLAG) (Using antibodies: a laboratory manual. Ed. Harlow and David Lañe (1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Capítulo: Tagging proteins. Pp. 347-377).

El empleo del sistema de expresión génica proporcionado por esta invención para la producción y obtención de las proteínas de la invención constituye un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para las proteínas de la invención. En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula de insecto, de mamífero o levadura transformada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína de la invención. Prácticamente cualquier tipo de célula eucariota puede ser utilizada para la puesta en práctica del procedimiento de la invención; no obstante, en una realización particular, dicha célula es de insecto para expresar la proteína N o de mamífero para expresar la proteína HE. En el caso de usar una levadura, se puede seleccionar una levadura del género *Saccharomyces*, por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, etc., o una levadura del género *Pichia*, por ejemplo, *P. pastoris*, etc.

Dichas proteínas de la invención pueden ser utilizadas para desarrollar anticuerpos específicos, para identificar sueros de animales infectados y para inmunizar animales, en particular, cerdos, por lo que pueden ser utilizadas con fines de diagnóstico o terapéuticos.

En primer lugar, las proteínas de la invención, preferentemente la proteína N purificada y fragmentos o péptidos de la proteína HE de la invención se han utilizado para la obtención de anticuerpos funcionalmente activos.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “anticuerpo funcionalmente activo” se refiere a un anticuerpo recombinante que mantiene su capacidad de unión a antígeno perteneciente, incluyendo minianticuerpos, que se definen como fragmentos derivados de anticuerpos construidos por tecnología de ADN recombinante, que, pese a su menor tamaño, conservan la capacidad de unión al antígeno ya que mantienen al menos un dominio variable de inmunoglobulina donde residen las zonas de unión a antígenos, y que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: Fab, F(ab')₂, scFv, y anticuerpos recombinantes monodominio (dAbs). En el marco de la presente invención, se entiende por anticuerpos recombinantes monodominio y/o dominios tipo inmunoglobulina con capacidad de unión y reconocimiento independiente, tanto a los dominios variables de cadena pesada (VH), a los dominios variables de cadena ligera (VL), a los anticuerpos recombinantes de camélidos (VHH), los anticuerpos recombinantes de camélidos humanizados, los anticuerpos recombinantes de otras especies camelizadas, los anticuerpos monodominio IgNAR de peces cartilaginosos; es decir, que se incluyen tanto dominios que de forma natural son monodominio (caso de VHH e IgNAR), como anticuerpos que por ingeniería se han alterado para que por sí solos sean capaces de interactuar con el antígeno y mejorar sus propiedades de estabilidad y solubilidad. Se incluye en esta definición cualquier modificación de los anticuerpos recombinantes como su multimerización o la fusión a cualquier molécula (p.ej. toxinas, enzimas, antígenos, otros fragmentos de anticuerpos, etc.).

El anticuerpo funcionalmente activo puede ser obtenido de un ser humano o un animal (p.ej. camellos, llamas, vicuñas, ratones, ratas, conejos, caballos, tiburones nodriza, etc.) o mediante técnicas de DNA recombinante o síntesis química de genes, y por otro lado, incluye tanto a anticuerpos monoclonales como a anticuerpos policlonales.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo específico de la proteína de la invención, en adelante anticuerpo de la invención, ya sea monoclonal o policlonal, o específico de un fragmento o péptido de la misma.

Otra realización particular lo constituye el anticuerpo de la invención que es específico de una proteína de la invención perteneciente al siguiente grupo: proteína N de SEQ ID NO: 9 (ver Ejemplo 4), proteína M de SEQ ID NO: 11 y proteína HE de SEQ ID NO: 13.

Otra realización particular lo constituye el anticuerpo de la invención que es específico de un fragmento de una proteína de la invención perteneciente al siguiente grupo: proteína N de SEQ ID NO: 9, proteína M de SEQ ID NO: 11 y proteína HE de SEQ ID NO: 13, preferentemente un fragmento de la proteína HE (ver Ejemplo 4), y más preferentemente de los péptidos 286E1 (SEQ ID NO: 14) y 286F1 (SEQ ID NO: 16) correspondientes, respectivamente, a los aminoácidos 50-60 y 150-160 de la proteína HE de la invención. Estos anticuerpos policlonales se han obtenido en conejo y rata (Ejemplo 4.2).

Los anticuerpos anteriores pueden ser utilizados en procedimientos inmunológicos de diagnóstico de torovirus porcino, a partir de muestras de heces de cerdos o de restos de granjas para el control de infecciones o estudios epidemiológicos de torovirus, formando parte de un sistema de diagnóstico inmunológico de torovirus porcino.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichos anticuerpos de la invención en la elaboración de sistema de diagnóstico inmunológico de torovirus porcino, tales como, sistema de ELISA, tira de inmunocromatografía o de Western blot, que permita la identificación de dichos virus en una muestra biológica, por ejemplo heces de un animal sospechoso de padecer o haber padecido una infección por torovirus porcino, preferentemente un cerdo.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema de diagnóstico inmunológico de torovirus porcino que comprende una cantidad efectiva de uno o varios anticuerpos de la invención, capaces de interactuar con una proteína de un torovirus porcino.

En otra realización particular, dicho sistema de diagnóstico inmunológico es un ELISA que comprende uno de los anticuerpos de la invención frente a las proteínas N, M y HE, o una mezcla de varios de ellos, preferentemente una mezcla de anticuerpos que reconocen las proteínas N y HE.

ES 2 339 728 B1

En otra realización particular, dicho sistema de diagnóstico es una tira inmunocromatográfica que comprende uno de los anticuerpos de la invención frente a las proteínas N, M y HE, o una mezcla de varios de ellos, preferentemente una mezcla de anticuerpos que reconocen las proteínas N y HE.

5 En otra realización particular, dicho sistema de diagnóstico es un sistema inmunoblot que comprende uno de los anticuerpos de la invención frente a las proteínas N, M y HE, o una mezcla de varios de ellos, preferentemente una mezcla de anticuerpos que reconocen las proteínas N y HE.

Además, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas proteínas de la invención en la elaboración de medicamentos tales como, vacunas. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, cerdos, frente a infecciones de torovirus porcino.

Los anticuerpos generados durante la respuesta inmune desarrollada frente a un patógeno, por ejemplo, por un cerdo, permanecen en el suero del individuo durante varias semanas, por lo que la detección de estos anticuerpos en los sueros de los cerdos permite obtener información acerca de la presencia de un patógeno en el ambiente de la población y en dichos individuos. Así, en esta invención se describe la utilización como antígeno de varias de las proteínas o fragmentos de las mismas (péptidos) de esta cepa aislada de torovirus porcino PToV-BRES2, preferentemente la proteína N, M o HE, y especialmente de la proteína de la nucleocápsida, N, para la detección por técnicas inmunológicas, preferentemente por ELISA y por inmunoblot de anticuerpos frente a PToV en muestras de sueros de mamíferos, preferentemente animales, y más preferentemente de cerdo. La proteína N de PToV reúne varias características por las que es un candidato idóneo para desarrollar un sistema de diagnóstico y una vacuna, como es el presentar un alto grado de conservación en torovirus, ser una proteína abundante en la partícula viral, y ser muy inmunogénica (Ejemplo 5).

Frente a la alta inmunogenicidad de la proteína N, la proteína M es menos inmunogénica, por lo que su utilidad como antígeno para diagnóstico serológico es reducida, aunque puede utilizarse conjuntamente con la proteína N y/o la proteína HE para la identificación de anticuerpos en sueros de animales. En cuanto a la proteína HE, se ha comprobado que induce la producción de anticuerpos en animales infectados con el virus bovino BToV (Cornelissen y col., 1997). Además, utilizando la proteína HE de PToV como antígeno en ELISA en la presente invención se ha comprobado que la proteína es reconocida por sueros porcinos positivos para torovirus, aunque la reactividad frente a esta proteína es menor que frente a la proteína N (Ejemplo 5a). Por tanto, ambas proteínas M y HE pueden utilizarse como un segundo y/o tercero antígeno de confirmación en ensayos serológicos, conjuntamente con la proteína N.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas proteínas de la invención en la elaboración de sistema de diagnóstico inmunológico de torovirus porcino, tales como, sistema de ELISA, tira de inmunocromatografía o de Western blot, que permita la identificación conjunta y simultánea de anticuerpos frente a las proteínas de la invención presentes en una muestra biológica de cerdos.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “muestra biológica” se refiere a una muestra biológica tipo suero, plasma o sangre de un animal sospechoso de padecer o haber padecido una infección por torovirus porcino, preferentemente un cerdo.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema de diagnóstico inmunológico torovirus porcino que comprende una cantidad efectiva de una o varias proteínas de la invención, capaces de interactuar con anticuerpos anti-torovirus porcino.

En otra realización particular, dicho sistema de diagnóstico inmunológico es un ELISA que comprende una de las proteínas de la invención N, M y HE, o una mezcla de varias de ellas, preferentemente una mezcla de N y HE (Ejemplo 5).

En otra realización particular, dicho sistema de diagnóstico es una tira inmunocromatográfica que comprende una de las proteínas de la invención N, M y HE, o una mezcla de varias de ellas, preferentemente una mezcla de N y HE (Ejemplo 5).

La realización de una tira inmunocromatográfica que comprenda un sistema de visualización de la reacción antígeno-anticuerpo (p.ej. partículas coloidales o microesferas coloreadas recubiertas por un anticuerpo), la inmovilización de las proteínas de la invención, un soporte inerte que permita el flujo de dichos elementos reconstituidos al añadir el suero o plasma, y un sistema control de las condiciones de la propia reacción inmunocromatográfica, puede ser desarrollado fácilmente por un experto en la materia y con la información suministrada por la invención.

En otra realización particular, dicho sistema de diagnóstico es un sistema inmunoblot que comprende una de las proteínas de la invención N, M y HE, o una mezcla de varias de ellas, preferentemente una mezcla de N y HE (Ejemplo 5).

Además, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dichas proteínas de la invención en la elaboración de medicamentos tales como, vacunas. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, cerdos, frente a infecciones de torovirus porcino.

ES 2 339 728 B1

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una o varias proteínas del complejo de la invención (proteínas N, M y HE), junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil para proteger animales, en particular, cerdos, frente a torovirus porcino. En una realización preferida, la vacuna proporcionada por esta invención es una vacuna útil para proteger cerdos lactantes de la infección causada por torovirus, aunque también puede tener utilidad para prevenir reinfecciones en individuos adultos.

En este sentido, además los virus, por ejemplo virus vaccinia, pueden utilizarse para la elaboración de vacunas de DNA de forma alternativa a la descrita anteriormente, pudiéndose tomar como ejemplo, a título ilustrativo, el propio virus vaccinia desarrollado para la expresión de la proteína HE de esta invención para elaborar una vacuna. Así, otro objeto particular de la invención lo constituye una vacuna frente torovirus porcino útil para proteger animales, en particular, cerdos, caracterizada porque comprende un virus vaccinia que comprende a su vez, al menos una, las secuencias de nucleótidos de los genes N, M y HE (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12). La elaboración de este tipo de vacunas, preferentemente atenuadas puede ser llevada a cabo fácilmente por un experto en la materia (Sutter G, Staib C. 2003. "Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery". *Curr Drug Targets Infect Disord.*, 3:263-71; Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F, Tashiro M, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y. 2006. "Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs". *Virology*, 351: 368-80).

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de las proteínas de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichas proteínas de la invención y el efecto de inmunización a conseguir.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas vacunas son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de vacunas.

En una realización particular, dicha vacuna se prepara en forma de una solución o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro diluyente aceptable farmacéuticamente.

La vacuna proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente a la secuencia heteróloga o epítipo utilizado, para lo cual dicha vacuna se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la vacuna proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

Finalmente, la caracterización de los genes que expresan las proteínas N, M y HE de la invención (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 Y SEQ ID NO: 12) ha permitido el desarrollo de técnicas específicas de detección viral mediante amplificación por PCR del DNA obtenido por RT-PCR a partir del RNA de este torovirus porcino (más concretamente de cDNA obtenido a partir de su RNA) o mediante Northern blot que pueden ser utilizadas en procedimientos de diagnóstico de torovirus porcino (ver Ejemplo 1), a partir de muestras de heces de cerdos o de restos de granjas para el control de infecciones o estudios epidemiológicos de torovirus.

Así, en otro aspecto la invención se relaciona con un sistema de diagnóstico de torovirus porcino a partir de una muestra biológica mediante la identificación de material genómico, en adelante procedimiento de identificación genómica de la invención, específico de torovirus porcino, basado en la identificación de los genes N, M y HE, de secuencias SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, respectivamente.

Otro aspecto particular, lo constituye un procedimiento de identificación genómica de la invención basado en la amplificación de DNA y que comprende las siguientes etapas:

- iv) aislamiento de material génico de una muestra biológica sospechosa de contener torovirus porcino y obtención del cDNA correspondiente,
- v) amplificación por PCR de dicho cDNA mediante oligonucleótidos específicos para, al menos, uno de los genes de la invención, gen N, M y HE que se corresponden, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, respectivamente, con los siguientes:
 - pareja de oligos PToV-N5' y PToV-N3' para el gen N (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2),
 - pareja de oligos PToV-M5' y PToV-M3' para el gen M (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4), Y
 - pareja de oligos PToV-HE5' y PToV-HE3' para el gen HE (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6), y
- vi) diagnóstico de un torovirus porcino si alguno de los genes de la invención es amplificado en ii).

ES 2 339 728 B1

Otro aspecto adicional lo constituyen oligonucleótidos o cebadores utilizados en la identificación genómica de la invención basado en la amplificación de DNA, preferentemente las parejas de oligonucleótidos siguientes:

- pareja de oligos PToV-N5' y PToV-N3' para el gen N (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2),
- pareja de oligos PToV-M5' y PToV-M3' para el gen M (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4), Y
- pareja de oligos PToV-HE5' y PToV-HE3' para el gen HE (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6).

Otro aspecto particular, lo constituye un procedimiento de identificación genómica de la invención basado en la técnica de Northern blot con sondas de polinucleótidos específicas de los genes N, M y HE, de secuencias SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, respectivamente.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los tamaños de los fragmentos amplificados a partir del cDNA de PToV-BRES2 utilizando como cebadores los oligonucleótidos descritos en la Tabla 1, analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Como marcadores de peso molecular se utilizaron una escalera de DNA de 100 pb (a la izquierda) y otra de 1000 pb (a la derecha). Los pesos moleculares de cada marcador se indican en pb.

La Figura 2 muestra las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados a partir del cDNA de PToV-BRES2, correspondientes a la ORF5 (Figura 2A), ORF3 (Figura 2B) y ORF4 (Figura 2C), que codifican las proteínas N, M y HE, respectivamente.

La Figura 3 muestra el análisis de la expresión de la proteína N de PToV-BRES2 en células de insecto a diferentes tiempos postinfección (24, 48 y 72 hpi) con el virus rBac-PToVBRES2-N mediante SDS-PAGE y tinción con azul coomassie (A) e inmunoblot con un suero comercial anti-his y con el suero anti-BRES que corresponde al animal infectado con el aislado de torovirus porcino PToV-BRES2 (B). La posición de la proteína N se indica con una punta de flecha. Los tamaños de los marcadores de peso molecular en kilodaltons se indican a la izquierda o a la derecha de cada panel.

La Figura 4 muestra el análisis de la expresión de la proteína M de PToV-BRES2 en células de insecto a diferentes tiempos postinfección (24, 48 y 72 hpi) con el virus rBac-PToVBRES2-M mediante SDS-PAGE y tinción con azul coomassie (A) e inmunoblot con los sueros anti-his y anti-BEV-M_{Nt} (B). La posición de la proteína M se indica con una punta de flecha. Los tamaños de los marcadores de peso molecular en kilodaltons se indican a la izquierda de cada panel.

La Figura 5 muestra el análisis de la expresión de la proteína HE de PToV-BRES2 en células de insecto a diferentes tiempos postinfección (24, 48 y 72 hpi) con el virus rBac-PToVBRES2-HE mediante SDS-PAGE y tinción con azul coomassie (A) e inmunoblot con los sueros anti-his y anti-BRES (B). La posición de la proteína HE se indica con una punta de flecha. Los tamaños de los marcadores de peso molecular en kilodaltons se indican a la izquierda o a la derecha de cada panel.

La Figura 6 muestra los distintos pasos del proceso de purificación de la proteína recombinante N de PToV-BRES2. Las muestras de proteína correspondientes al extracto celular inicial (Fo), fracción insoluble (Fi), la resina antes (Ro) y después de las eluciones (Rf) y las eluciones de la proteína (E1, E2, y E3) fueron analizadas mediante inmunoblot con el suero anti-his. La posición de la proteína N recombinante se indica con una punta de flecha. Los tamaños de los marcadores de peso molecular en kilodaltons se indican a la izquierda de la figura.

La Figura 7 muestra el análisis de la proteína HE expresada en células de mamífero por el virus recombinante rVV-HE analizada mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras, y observada tras la inmunodetección con los sueros porcinos anti-BRES (A) y Serotec (suero porcino comercial de la casa Serotec Ltd. en el que se ha comprobado la presencia de anticuerpos frente a torovirus) (B). La posición de la proteína N recombinante se indica con una punta de flecha. Los tamaños de los marcadores de peso molecular en kilodaltons se indican a la izquierda de cada panel.

La Figura 8 muestra la reactividad del suero policlonal generado en conejo frente a la proteína HE de PToV mediante la inmunización con dos péptidos sintéticos (286E1 y 286F1). (A) Análisis mediante inmunoblot de la reactividad del suero con la proteína expresada en células de mamífero por el virus recombinante rVV-HE. Las diluciones del suero se indican en la parte superior del gel. La posición de la proteína HE recombinante se indica con una punta de flecha. (B) Análisis por inmunomicroscopía electrónica de la reactividad del suero anti-HE con la proteína HE presente en la superficie de una partícula de PToV.

La Figura 9 muestra la reactividad del suero policlonal generado en conejo frente a la proteína N de PToV mediante la inmunización con la proteína recombinante purificada a partir de células de insecto infectadas con el virus recombinante rBac-PToVBRES2-N. Extractos de células de insecto no infectadas (Mock) o infectadas durante 24, 48 y 72 horas se separaron mediante SDS-PAGE y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se

hicieron reaccionar con el suero policlonal diluido 1:1000. La posición de la proteína N recombinante se indica con una punta de flecha. Los tamaños de los marcadores de peso molecular en kilodaltons se indican a la izquierda de la figura.

5 La Figura 10 muestra la reactividad en ELISA frente a las proteínas N y HE de PToV-BRES2 recombinantes de la invención de diferentes sueros porcinos. Las proteínas purificadas a partir de células de insecto infectadas con el virus rBac-PToVBRES-N o a partir de células de mamífero infectadas con el virus rVV-HE se utilizaron para tapizar los pocillos de una placa de ELISA, utilizando 400 ng de cada proteína por pocillo. Los pocillos se incubaron por duplicado con los sueros Serotec y anti-Bres así como con otras muestras de sueros porcinos procedentes de distintas granjas (ZAR 410, ZAR 1301, JA2, JA6 y EST512) y con los sueros control de conejo con anticuerpos anti-N y anti-HEpept. En la figura se muestran las medias de los valores de densidad óptica obtenidos para cada suero frente a las proteínas N y HE.

15 La Figura 11 muestra los resultados de la titulación del antígeno con el suero policlonal de conejo anti-N para la optimización de las condiciones del ELISA frente a la proteína N. En la figura se muestran las curvas obtenidas para cada cantidad (400, 200, 100 y 50 ng) de proteína N purificada con las distintas diluciones del suero.

20 La Figura 12 muestra los resultados de la titulación de los sueros porcinos Serotec y anti-Bres frente a 400 ng de la proteína N para la elección de la dilución óptima de los sueros porcinos a analizar en el ELISA.

25 La Figura 13 muestra la ausencia de reactividad cruzada entre los anticuerpos frente a los virus de cerdo TGEV y PRRSV y la proteína N de PToV. Se analizó la reactividad en ELISA de sueros de animales libres de patógenos no inmunizados (spf), o inoculados con los virus PRCV (anti-PRCV) y PRRSV (anti-PRRSV), y de los sueros porcinos positivos para PToV anti-BRES y Serotec, frente a la proteína N de PToV purificada, y frente a partículas virales purificadas de PRRSV y TGEV. En la figura se muestran las medias de los valores de densidad óptica obtenidos para cada suero diluido 1:100.

30 La Figura 14 muestra la ausencia de reactividad en inmunoblot de los sueros anti-PRCV y anti-PRRSV frente a la proteína N de PToV purificada y frente a partículas virales purificadas de BEV. El suero porcino Serotec reconoce la proteína N de PToV, y en menor medida la proteína N presente en las partículas virales del torovirus equino BEV, pero también presenta anticuerpos que reconocen la proteína M de PRRSV y la proteína N de PRCV. Este resultado es improbable que se deba a una reactividad cruzada ya que un suero policlonal producido frente al virus equino (anti-BEV), que reconoce específicamente las proteínas N tanto del virus homólogo BEV como de PToV, no reacciona con las proteínas de PRRSV o PRCV. Además los sueros anti-PRCV y anti-PRRSV reaccionan específicamente con las proteínas del virus homólogo, pero no reconocen la proteína N de PToV ni las proteínas de BEV.

40 La Figura 15 muestra los resultados obtenidos del análisis por ELISA frente a la proteína N de PToV en un muestreo con sueros de campo procedentes de diferentes granjas de cerdos de Navarra (A), Aragón (B) y Galicia (C). En los tres casos se incluyó el suero Serotec como control positivo y suero de animales spf como control negativo.

La Figura 16 muestra los resultados obtenidos del análisis por inmunoblot frente a la proteína N de PToV de los mismos sueros de campo utilizados en la Figura 15, que proceden de diferentes granjas de Navarra (A), Aragón (B) y Galicia (C). En los tres casos se incluyó el suero Serotec como control positivo.

45 Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

Amplificación y clonaje de las ORFs correspondientes a las proteínas N, M y HE del aislado PToV-BRES2

50 a.- *Extracción de RNA viral a partir de la muestra de heces*

Se utilizó el kit comercial *High pure RNA isolation kit* (Roche Applied Science). Brevemente, se utilizaron 200 μ l de material de partida y el RNA se recuperó en 60 μ l de tampón de elución (agua libre de RNasas y DNasas) provisto por el fabricante. El RNA obtenido se conservó a -80°C.

La extracción y manipulación de RNA se llevó a cabo utilizando materiales y reactivos libres de RNasas y dedicados exclusivamente a estos procedimientos, y en un ambiente aislado del resto del laboratorio.

60 b.- *Obtención de cDNA viral*

A partir de este RNA, se obtuvo su cadena de DNA complementaria (cDNA) utilizando hexámeros aleatorios como cebadores a fin de conseguir cadenas de cDNA representativas de todo el genoma del virus. Más concretamente, las reacciones de la transcriptasa reversa (RT) para la síntesis de las cadenas de cDNA se llevaron a cabo utilizando el sistema SuperScript II (Invitrogen, Corp) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 8 μ l de RNA a una mezcla de 10 pmoles de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) (Roche Applied Science) y 200 ng de hexámeros aleatorios (Roche Applied Science). La mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C y 1 minuto en hielo. A continuación se añadieron 9 μ l de una mezcla de reacción RT que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; KCl 75 mM,

ES 2 339 728 B1

MgCl₂ 7,5 mM; dithiotreitol (DTT) 10 mM y 40 U de inhibidor de ribonucleasas (Fermentas). Se incubó esta mezcla 2 minutos a 42°C y se añadieron 200 U (1 µl) de transcriptasa reversa SuperScriptII (Invitrogen, Corp) y se incubó de nuevo 50 minutos a 42°C. Transcurrido este tiempo la enzima se inactivo mediante una incubación a 75°C, 15 minutos. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

Todo el proceso se llevó a cabo en instalaciones separadas de la extracción de RNA, con pipetas y puntas con filtro dedicadas exclusivamente a este procedimiento.

c.- Obtención de las ORFs correspondientes a las proteínas N, M y HE de PToV mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del cDNA

A continuación, para obtener por separado las ORFs 5, 3 y 4 correspondientes a las proteínas N, M y HE de torovirus porcino, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para ello los oligonucleótidos descritos en la Tabla 1.

TABLA 1

Oligonucleótidos utilizados para el clonaje de los genes de PToV

Oligonucleótido	SEQ ID NO#	Secuencia (5' → 3')
PToV-N5'	1	<u>GGATCCATGAATTCTATGCTTA</u>
PToV-N3'	2	<u>TCTAGATTAATTCAAAGCCACTT</u>
PToV-M5'	3	<u>GGATCCATGTTTGATACAAA</u>
PToV-M3'	4	<u>TCTAGACTACTCAAAC^TTTACACTTG</u>
PToV-HE5'	5	<u>GGATCCATGTTGAGGATGAT</u>
PToV-HE3'	6	<u>CGTCTAGAGCCTAATAACTACTTAAACA</u>
ToV-M 5'	7	AGTATGACCTTTACTGGCTA

Las secuencias para el reconocimiento de enzimas de restricción se indican subrayadas. Los codones de inicio y de parada de la traducción se indican en negrita.

El gen N de PToV-BRES2 (ORF5) que codifica la proteína de la nucleocápsida N se amplificó por RT-PCR a partir de una muestra de heces de cerdo que contiene el aislado de torovirus porcino PToV-BRES2. Para amplificar la secuencia de la ORF5 se utilizaron los oligonucleótidos PToV-N5' (SEQ ID NO: 1) y PToV-N3' (SEQ ID NO: 2) y el resultado se visualizó en un gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio. Se obtuvo un único producto de RT-PCR. Este producto tiene una longitud de 500 pb similar al descrito para la ORF5 de los torovirus (Figura 1). De forma similar y utilizando las parejas de oligonucleótidos SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 se amplificaron los genes correspondientes a proteínas M y HE, respectivamente, obteniéndose fragmentos con los tamaños esperados de 700 y 1200 pares de bases (pb) descritos para las ORFs 3 y 4, respectivamente (Figura 1).

Más en detalle, para la amplificación de los genes N, M y HE se llevaron a cabo las siguientes reacciones de PCR:

• PToV-BRES2-N:

La amplificación de la secuencia codificante de la proteína N se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos PToV-N5' (SEQ ID NO: 1) y PToV-N3' (SEQ ID NO: 2), en una reacción de PCR que contenía 2 µl de cDNA, 2,5 µl de tampón de PCR 10X (20 mM de Tris-HCl, pH 8,0; KCl 50 mM), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada oligonucleótido, 0,2 µM de dNTPs; 1 U de la DNA polimerasa Taq platinum (Invitrogen Corp.) y 18 µl de agua libre de DNAsas. El programa de amplificación consistió en 2 minutos a 92°C; 30 ciclos de 40 segundos a 92°C, 40 segundos a 50°C, 40 segundos a 72°C; y un ciclo de 5 minutos a 72°C.

• PToV-BRES2-M:

La secuencia codificante de la proteína M se amplificó utilizando los oligonucleótidos PToV-M5' (SEQ ID NO: 3) y PToV-M3' (SEQ ID NO: 4). El resto de los componentes de la mezcla de reacción fueron los mismos que en el caso anterior. El programa de amplificación fue: 2 minutos a 92°C; 20 ciclos de 40 segundos a 92°C, 40 segundos a 50°C, 40 segundos a 72°C; y 10 ciclos en los que a cada ciclo se añadía 20 segundos más al tiempo de extensión, y finalmente un paso de 5 minutos a 72°C.

ES 2 339 728 B1

• PToV-BRES2-HE:

En primer lugar, a partir del cDNA obtenido por RT y utilizando los oligonucleótidos PToV-HE3' (SEQ ID NO: 6) y ToV-M5' (SEQ ID NO: 7) se amplificó la secuencia codificante de la proteína HE junto con parte del gen M y la región intergénica entre ambos genes. El producto de esta reacción se secuenció, y en base a esta secuencia se diseñó el oligonucleótido PToV-BRES2-HE5' (SEQ ID NO: 5) en la región 5' del gen HE. Los oligonucleótidos PToV-BRES2-HE5' y PToV-HE3' se utilizaron para amplificar el gen HE a partir del cDNA. La reacción se llevó a cabo utilizando el sistema High Fidelity System (Eppendorf) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 2 μ l de cDNA a una mezcla de reacción que contenía IX high fidelity buffer (Eppendorf), 200 μ M dNTPs, 200 nM de cada oligonucleótido y 0.71 U/ μ l de la mezcla de enzimas TripleMaster polymerase mix. La mezcla de reacción se incubó a 93°C 3 minutos, seguido de 10 ciclos de 1 minuto a 93°C, 40 segundos a 50°C y 5 minutos a 68°C, y 25 ciclos en los que el tiempo de extensión se aumentaba 20 segundos en cada ciclo. Por último, se añadió un paso de 10 minutos a 68°C.

15 d.- Clonaje y secuenciación de las ORFs correspondientes a las proteínas N, M y HE de PToV-BRES2

El fragmento de 500 pares de bases correspondiente al gen N de PToV-BRES2 (SEQ ID NO: 8) que se obtuvo mediante PCR se clonó en el vector comercial pGemT-Easy (Promega Corp.). Después de la ligación con DNA T4 Ligasa (New England Biolabs) la mezcla de reacción se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α por choque térmico. Las bacterias se sembraron en placas de agar en presencia de ampicilina y X-Gal. Las colonias positivas se seleccionaron por blanco/azul y la presencia del inserto se comprobó por PCR.

Los clones positivos se crecieron en medio LB y en presencia de ampicilina. A partir de estos cultivos se obtuvieron preparaciones de los DNA plasmídicos de los distintos clones seleccionados mediante la utilización del *kit* comercial Quiaprep[®] miniprep kit (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La correcta inserción del fragmento correspondiente al gen N en los distintos clones se confirmó mediante digestión enzimática con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I y mediante secuenciación a partir de los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias de los promotores T7 y Sp6 presentes en el vector.

En total se secuenciaron 4 clones independientes. La secuencia consenso de estos 4 clones (Figura 2A) queda agrupada con el resto de las secuencias del gen N de los aislados porcinos con las que presenta un 91-93% de homología. La homología respecto a las cepas de BToV B145, B150, B155 y B156 y B1314 fue de un 91-93%, mientras que respecto al aislado bovino BRV fue solo de un 69%. Finalmente la homología frente a BEV, fue del 70%.

A continuación, y de forma similar las ORFs 3 y 4 (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12) correspondientes a las proteínas M (Figura 2B) y HE (Figura 2C) se insertaron en el mismo vector comercial pGemT-Easy (Promega Corp.) y se secuenciaron, a partir de distintos clones independientes. Las secuencias de los distintos clones demostraron que los productos obtenidos correspondían a los genes M y HE torovirus porcino, mostrando una homología del 98% en el caso del gen M, y del 92-80% en el caso del gen HE, frente al resto de aislados porcinos descritos en la bibliografía.

Ejemplo 2

45 Generación de baculovirus recombinantes que expresen las proteínas N, M y HE de PToV-BRES2 codificadas por las ORFs 5, 3 y 4, respectivamente

a.- Construcción de vectores de transferencia y de bácmidos para baculovirus que contengan las ORFs 5, 3 y 4 de PToV que codifican las proteínas N, M y HE, respectivamente

Para la generación del baculovirus recombinante que exprese la ORF5 de PToV-BRES2, el gen completo se clonó en el vector comercial de transferencia para baculovirus pFastBac-HTc (Invitrogen Corp.), mediante digestión enzimática del plásmido pGT-PToVBRES2-N con las endonucleasas *Bam*HI y *Xba*I y ligación en los mismos lugares de restricción en el plásmido pFastBac-HTc, obteniéndose la construcción pFB-PToVBRES2-N, en la que el gen de la proteína N de PToV, queda bajo el control del promotor temprano/tardío de la polihedrina de baculovirus y en fase en su extremo 5' con la secuencia que codifica una cola de histidinas (His-tag) presente en el plásmido.

A continuación, el plásmido generado pFB-PToVBRES2-N, se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH10Bac, que contienen un bácmido *lacZ*-mini-*att*Tn7, para la generación de baculovirus recombinantes por recombinación homóloga, y un plásmido en el que están codificadas las proteínas mediadoras de la recombinación. Las bacterias transformadas se crecieron durante 3 días hasta observarse actividad β -galactosidasa en las colonias que portan los bácmidos no recombinantes. Se seleccionaron dos clones independientes de cada transformación, se crecieron y los bácmidos recombinantes se purificaron mediante lisis alcalina (Sambrook y col., 2001).

Siguiendo la misma estrategia se introdujeron los genes que codifican las proteínas M y HE de PToV-BRES2 en el vector de transferencia para baculovirus pFastBac-HTc, dando lugar a las construcciones pFB-PToVBRES2-M y pFB-PToVBRES2-HE. Con estos plásmidos se transformaron bacterias *E. coli* DH10Bac, y se obtuvieron los correspondientes bácmidos recombinantes conteniendo los genes correspondientes a las proteínas M y HE, los cuales fueron seleccionados y purificados según se ha descrito anteriormente.

ES 2 339 728 B1

b.- *Obtención de baculovirus recombinantes que contengan las ORFs 5, 3 y 4 de PToV que codifican las proteínas N, M y HE, respectivamente*

Los bácmidos recombinantes conteniendo el gen N de PToV-BRES2 se utilizaron para transfectar células *High Five* mediante el uso de lipofectina (Invitrogen Corp.), siguiendo las instrucciones de la casa comercial suministradora. Los cultivos transfectados se mantuvieron a 28°C hasta observar un extenso efecto citopático, aproximadamente 3 días, momento en que se recogieron los sobrenadantes de los cultivos que contienen el virus recombinante, rBac-PToVBRES2-N y se guardaron a 4°C como stock primario.

El baculovirus recombinante rBac-PToVBRES2-N se amplificó a partir del *stock* primario mediante infección de células de insecto *High Five*, y el sobrenadante de los cultivos se recogió cuando el efecto citopático era mayor, y se guardó igualmente a 4°C como *stock* secundario.

Siguiendo el mismo procedimiento se generaron los baculovirus recombinantes que contienen los genes que codifican las proteínas M y HE de PToV-BRES2, rBac-PToVBRES2-M y rBac-PToVBRES2-HE, respectivamente.

c.- *Análisis de las proteínas recombinantes*

Los baculovirus recombinantes generados se utilizaron para infectar células *High Five*, y analizar la expresión de las proteínas recombinantes N, M y HE (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13) de PToV mediante inmunodetección con un suero que reconoce la cola de histidinas (anti-his) así como con un suero de cerdo con anticuerpos frente a PToV (anti-BRES). Para ello, cultivos de células *High Five* fueron infectados a alta multiplicidad con los diferentes virus recombinantes y fueron recogidos a diferentes tiempos post-infección para determinar en cada caso el momento óptimo de expresión de la correspondiente proteína recombinante. Una vez recogidas las células se lavaron dos veces con PBS mediante centrifugación a 1500 rpm 5 minutos y se resuspendieron en tampón de muestra (Laemmli, 1970) y los extractos celulares se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Los geles se tiñeron con azul de coomassie o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon mediante incubación durante 1 hora con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS, y posteriormente se incubaron con el suero que reconoce las histidinas o con sueros de cerdos que presentan anticuerpos frente al virus PToV durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Tras la incubación se lavaron las membranas y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 en la solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con PBS y el inmunoblot se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema comercial ECL (Amersham Biosciences), seguido de la exposición a una película de autorradiografía de alta sensibilidad (Biomax XAR film, Kodak).

En los extractos de células infectadas con el virus rBac-PToVBRES2-N analizados por SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie se observó la aparición de una proteína de 20 kDa a las 48 hpi, cuya cantidad aumenta a las 72 hpi. Además, tanto el suero anti-his como el suero de cerdo anti-BRES reconocen una proteína mayoritaria de 20 kDa, que se acumula en las células y se observa desde las 24 hpi. La proteína N de PToV tiene peso molecular teórico de 16 kDa, por lo que el tamaño esperado de la proteína final una vez fusionada a la cola de histidinas (3 kDa) sería de 20 kDa, que coincide con el tamaño observado en los inmunoblots (Figura 3).

En los extractos de células infectadas con el virus rBac-PToVBRES2-M tanto el suero anti-his como un suero policlonal dirigido contra el extremo amino terminal de la proteína (anti-M_{Nt}) reconocen una proteína de 23 kDa detectable a partir de las 48 hpi (Figura 4B). En el gel teñido con azul de coomassie partir de las 72 hpi se puede observar la acumulación de la proteína M sobre el fondo de proteínas celulares presentes en el extracto (Figura 4A). El peso molecular teórico de la proteína M de PToV es de 26 kDa y contando con la cola de histidinas, el peso total teórico de la proteína sería de 29 kDa. Sin embargo, previamente se ha descrito que en el caso del torovirus equino BEV el carácter altamente hidrofóbico de la proteína M hace que su movilidad electroforática corresponda a la de una proteína de 22 kDa (Den Boon y col., 1991).

En muestras de células infectadas con el baculovirus recombinante rBac-PToV-HE el suero anti-his y el suero porcino anti-BRES reconocen una proteína de 65 kDa presente desde las 24 hpi, y a las 48 y 72 hpi se detectaron además proteínas de 120 y 250 kDa con ambos sueros (Figura 5B). Estas mismas bandas se observan en el gel teñido con coomassie en los extractos recogidos a 48 y 72 hpi (Figura 5A). El peso molecular teórico de la proteína HE recombinante es de 51 kDa, 48 kDa correspondiente a la proteína HE y 3 kDa más de la cola de histidinas. Sin embargo, se ha descrito que la proteína HE de torovirus está glicosilada (Cornelissen y col., 1997) y que el peso molecular de la forma glicosilada es de 65 kDa. Por lo tanto, la proteína de 65 kDa detectada en los extractos de células de insecto correspondería a la forma glicosilada de la proteína. Las proteínas de 120 kDa y de 250 kDa podrían corresponder a formas dimericas y tetraméricas de la proteína HE.

d.- *Purificación de las proteínas N, M y HE de PToV-BRES2 recombinantes*

Las proteínas N, M y HE recombinantes de PToV se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina comercial de cobalto (TalónTM, Clontech). Brevemente, las células *High Five*, infectadas a alta multiplicidad, se recogieron en el momento de máxima infección, aproximadamente 48 hpi. Las células se recuperaron por centrifugación a 3000 rpm 10 minutos y se lavaron dos veces con PBS mediante centrifugación a 3000 rpm 10 minutos. Tras los lavados, las células se resuspendieron en una solución de lisis que contenía guanidina 6 M, NaCl 300 mM,

ES 2 339 728 B1

H₂NaPO₄ 50 mM, pH 8,0 e imidazol 1 mM, se homogenizaron por agitación, se incubaron en hielo durante 30 minutos y se sometieron a 3 pulsos de sonicación a 80 V durante 10 segundos. Para eliminar los restos celulares se centrifugó el extracto de células a 3000 rpm, 10 minutos a 4°C. El sobrenadante (10 ml) se añadió a 2 ml de resina de cobalto previamente estabilizada en la misma solución de lisis y se incubó durante 2 horas a 4°C en una noria. Transcurrido este tiempo se recuperó la resina mediante centrifugación a 1500 rpm 5 minutos, y se lavó tres veces con solución de lisis sin imidazol. A continuación, se realizaron tres lavados con una solución de urea 8 M, NaCl 300 mM, H₂NaPO₄ 50 mM, pH 8,0, tras los cuales se recuperaron las distintas proteínas utilizando dos volúmenes de una solución de imidazol 1 M, urea 8 M, 3 00 mM NaCl, H₂NaPO₄ 50 mM, pH 8,0. La resina se mantuvo en agitación en la noria toda la noche a 4°C y tras una centrifugación se recogió el sobrenadante (elución 1) y se añadió de nuevo tampón de elución a la resina. Tras 20 minutos de agitación en la noria a temperatura ambiente la mezcla se centrifugó y se recogió el sobrenadante (elución 2), este proceso se repitió una tercera vez (elución 3). La Figura 3 muestra el análisis mediante electroforesis en SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie de los distintos pasos de purificación de la proteína N.

Una vez purificadas, se dializaron las distintas proteínas frente H₂O MilliQ para eliminar el imidazol, y tras la diálisis se liofilizaron. Las proteínas purificadas se disolvieron en la misma solución de elución pero en ausencia de imidazol y se cuantificaron mediante un ensayo BCA diluyendo cada proteína al menos 1:5 en H₂O MilliQ para disminuir la concentración de urea por debajo de 3 M y así no interfiera en el ensayo. La curva de BSA se preparó en una solución idéntica a la de la proteína diluida.

Ejemplo 3

Generación de virus vaccinia recombinante que exprese la proteína HE de PToV-BRES2 codificada por la ORF4

a.- *Construcción de un vector de transferencia para vaccinia que contenga la ORF4 de PToV que codifica la proteína HE*

El fragmento de DNA correspondiente al gen HE de PToV-BRES-2 (SEQ ID NO: 12) se obtuvo mediante restricción enzimática del plásmido pGT-BRES2-HE con *Bam*HI y *Nco*I y se subclonó en el vector pJR101 (Gherardi y col., 1999), previamente digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el vector pJR-BRES2-HE.

b.- Obtención de un recombinante del virus vaccinia que exprese la proteína HE de PToV codificada por la ORF4

Para la obtención del virus vaccinia recombinante que exprese la proteína HE (SEQ ID NO: 13) se infectaron células BSC40 con un virus vaccinia parental de la cepa Western Reserve (WR) a baja multiplicidad de infección y se transfectaron a continuación con el plásmido pJR101- BRES2-HE, siguiendo un protocolo similar al utilizado en la generación de los recombinantes de baculovirus. A las 48 hpi, se recogieron las células y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Las células depositadas se resuspendieron en medio de cultivo DMEM y se lisaron mediante tres ciclos de congelación/descongelación seguidos de 3 pulsos de sonicación de 10 segundos a 80V cada uno, y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido se utilizó para infectar nuevos cultivos y los virus recombinantes, que denominamos rVV-HE, fueron seleccionados en base al color azul que desarrollan las placas de lisis tras la adición de X-gluc al medio con agar en un ensayo de placa (Carroll y Moss, 1995). Este proceso de selección se repitió tres veces y el virus recombinante seleccionado fue amplificado mediante infección de nuevos cultivos celulares y los extractos obtenidos tras 72 horas de infección fueron lisados según se ha descrito anteriormente, y el sobrenadante obtenido sirvió como *stock* de virus.

c.- Análisis de la proteína recombinante HE

El virus recombinante rVV-HE se utilizó para infectar células BSC40, y analizar la expresión de la proteína HE de PToV mediante inmunodetección con dos sueros de cerdo que contienen anticuerpos frente a PToV (anti-BRES y Serotec). Las células se lavaron dos veces con PBS y se recogieron en tampón de muestra (Laemmli, 1970) y los extractos celulares se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Ambos sueros porcinos reconocen una proteína de aproximadamente 65 kDa en los extractos de células infectadas con el virus recombinante rVV-HE, que no está presente en los extractos de células infectadas con el virus parental WR. Por otra parte, se comprobó que el suero anti-HEpept producido frente a dos péptidos correspondientes a la proteína HE reconocía asimismo una proteína de 65 kDa en los extractos de células infectadas con rVV-HE (Figuras 7A y 7B). Además, por inmunomicroscopía electrónica se comprobó que este suero marcaba la superficie de las partículas virales del asilado PToV-BRES2, indicando que estaba reconociendo específicamente la proteína HE presente en la superficie de los viriones (Figura 8).

d.- Purificación de la proteína recombinante HE

Para purificar la proteína HE se infectaron células BSC40 a alta multiplicidad con el virus rVV-HE. A las 24 hpi se recogieron las células en una solución de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 6,5, NaCl 40 mM, EDTA 20 mM y Tritón X-100 al 0,1%). Los restos celulares se descartaron mediante centrifugación y el sobrenadante se añadió sobre una décima parte del volumen de proteína A unida a sefarosa, a la que previamente se le habían acoplado anticuerpos anti-HEpept. La mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Tras 3 lavados con la solución de lisis se eluyó la proteína por competición utilizando una mezcla de los péptidos 286E1 y 286F1 cada uno a una concentración de 1

ES 2 339 728 B1

mg/ml e incubando en agitación a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se hicieron dos eluciones más incubando 2 horas a temperatura ambiente. La proteína HE es capturada por los anticuerpos anti-HEpept (ver Ejemplo 4.2) y posteriormente eluida con los péptidos sintéticos. Cuando se analiza la preparación de proteína purificada mediante SDS-PAGE se observa una banda principal de 65 kDa y una escalera de bandas superiores sensibles a la reducción con β -mercaptoetanol y que son reconocidas por un suero de rata producido frente al péptido 286E1 (SEQ ID NO: 14). Las muestras de elución se dializaron frente a la solución de lisis pero sin Tritón X-100 y la proteína obtenida se cuantificó por BCA, comparándola con una curva patrón de BSA. Se obtuvieron 1,5 μ g de proteína por $2 \cdot 10^7$ células. Esta proteína purificada ha sido utilizada en ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos frente a PToV, como se detallará en el siguiente apartado.

10

Ejemplo 4

Obtención de anticuerpos policlinales frente a proteínas y péptidos de PToVBRES2 de la invención

15

4.1.- Sueros policlinales frente a la proteína N de PToV (Figura 9)

La proteína N (SEQ ID NO: 9) purificada según se ha descrito anteriormente se utilizó como antígeno para inmunizar animales de experimentación, conejos y ratas, y generar anticuerpos policlinales frente a la misma. Para la generación de anticuerpos se utilizó una primera inoculación de proteína N purificada (500 μ g en conejos y 50 μ g en ratas) emulsionada con adyuvante completo de Freund, seguida de tres dosis de recuerdo con el antígeno (250 μ g para los conejos y 25 μ g para las ratas) mezclado con adyuvante incompleto de Freund.

10 días después de la última dosis se extrajo sangre para comprobar la reactividad de los sueros mediante inmunoblot. Los sueros policlinales generados tanto en conejos como en ratas reconocen específicamente la proteína N recombinante expresada en células de insecto mediante el baculovirus rBac-PToV-(N), así como la proteína N del torovirus equino BEV, aunque frente a ésta última muestra una menor reactividad. Por tanto, estos resultados confirman la inmunogenicidad de la proteína N, y proporcionan un nuevo reactivo específico frente a torovirus porcino que puede tener utilidad para detectar la presencia de partículas virales en muestras biológicas mediante ensayos de ELISA o de inmunocaptura de complejos RNA-proteína N y posterior análisis por RT-PCR.

30

4.2.- Suero policlinal frente a la proteína HE de PToV (Figura 8)

Por otro lado, se generó un suero policlinal en conejo (anti-HEpept) mediante la inmunización con una mezcla de los péptidos sintéticos 286E1 (SEQ ID NO: 14) y 286F1 (SEQ ID NO: 16) correspondientes respectivamente a los aminoácidos 50-60 y 150-160 de la proteína HE de PToV, acoplados a KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*). Asimismo, mediante la inmunización con estos péptidos se han generado sueros policlinales frente a la proteína HE en ratas. Las inmunizaciones en conejos y en ratas con estos péptidos se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 4.1.

40

Ejemplo 5

Utilización de las proteínas N y HE en ensayos serológicos para la detección de anticuerpos frente a PToV en muestras de sueros de cerdos

45

La siguiente descripción muestra cómo la proteína N de PToV (SEQ ID NO: 9) producida mediante el sistema de baculovirus, y la proteína HE (SEQ ID NO: 11) expresada mediante un recombinante del virus vaccinia, una vez purificadas siguiendo el procedimiento descrito en cada caso, pueden ser utilizadas para la detección de anticuerpos en ensayos de ELISA y de Western-blot, de forma aislada, especialmente la proteína N, o de forma conjunta.

50

a. Ensayo de ELISA

Los pocillos de placas de 96 pocillos (Immunoplate F96 Maxisorp, Nunc) se tapizaron por duplicado con 50 μ l del antígeno correspondiente (proteína N, M y HE) diluido en tampón carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, y se incubaron toda la noche a 4°C. A continuación se lavaron los pocillos tres veces con 200 μ l de PBST (PBS conteniendo Tween 20 al 0,05%) y se saturaron con 180 μ l de albúmina de suero bovino (BSA), fracción V (Sigma) al 3% en PBST durante 2 horas a 37°C. Los sueros específicos producidos frente a las proteínas recombinantes o frente a péptidos de las mismas, y los sueros porcinos se diluyeron, a la dilución indicada en cada caso, en una solución de BSA al 1% en PBST, y se añadieron a los pocillos una vez retirada la solución de saturación. Tras 1 hora de incubación a 37°C, se lavaron los pocillos, se añadió el anticuerpo secundario a una dilución 1:1000 en la solución de BSA al 1% en PBST, y se incubó durante 1 hora a 37°C. Se lavaron de nuevo los pocillos tres veces y se reveló el ELISA añadiendo 50 μ l por pocillo del sustrato dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD FAST™, Sigma), preparado según las instrucciones del fabricante e incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ l por pocillo de ácido sulfúrico 2 N. Los valores de absorbancia se midieron a 492 nm en un espectrofotómetro multicanal (Titertek Multiscan MCC/340).

65

ES 2 339 728 B1

En un ensayo de ELISA se comparó la reactividad frente a las proteínas N y HE purificadas de dos sueros porcinos que contienen anticuerpos frente a torovirus anti-BRES y Serotec, así como de otros sueros de campo (Figura 10). En el mismo ensayo se pusieron como controles positivos los sueros de conejo específicos producidos frente a la proteína N (anti-PToV-N) y la proteína HE (anti-HEpept). Todos los sueros porcinos mostraron mayor reactividad frente a la proteína N que frente a la proteína HE (Figura 10). Cada una de las proteínas fue reconocida por el suero de conejo homólogo y no se observó reactividad cuando los anticuerpos de conejo se utilizaron frente a la proteína no homóloga.

Una vez comprobada la mayor utilidad de la proteína N como antígeno para detección de anticuerpos frente a torovirus en sueros porcinos, se estudió cuál sería la cantidad óptima de proteína en el pocillo para tener una mayor sensibilidad. Para ello, se tapizaron los pocillos con distintas cantidades de proteína N (25, 100, 200 y 400 ng/pocillo), y estos se incubaron con distintas diluciones del suero de conejo específico anti-PToV-N. A diluciones intermedias del suero (1:400 y 1:1600) la mayor sensibilidad se obtuvo cuando se utilizaron 400 ng por pocillo (Figura 11). Utilizando esta cantidad de antígeno en el ELISA se analizó la curva de reactividad frente a la proteína N recombinante, de dos sueros porcinos con anticuerpos frente a torovirus, Serotec y anti-Bres, observándose que el suero Serotec produce una mayor reactividad, efecto que se observa más claramente cuando se utiliza la dilución 1:100 de cada uno de los sueros (Figura 12).

Una vez establecidas las condiciones del ELISA frente a la proteína N, se evaluaron las posibles reacciones de reactividad cruzada con otros virus relacionados que infectan cerdos, como el virus del síndrome respiratorio reproductivo de cerdo (PRRSV) y el virus de la gastroenteritis de cerdo (TGEV), pertenecientes a las familias *Arteriviridae* y *Coronaviridae*, respectivamente y ambas pertenecientes al orden Nidovirales (Figura 13). En concreto, se analizó la reactividad de los sueros de cerdo con anticuerpos frente a torovirus anti-BRES y Serotec, y de sueros de cerdos libres de patógenos inmunizados frente a PRRSV (anti-PRRSV) y frente al coronavirus respiratorio de cerdo PRCV (anti-PRCV), que es un mutante de delección de TGEV, serológicamente casi idéntico a TGEV (Zhang y col., 2007). Como control negativo se utilizó un suero de un cerdo libre de patógenos no inmunizado. Como antígenos para este ensayo de ELISA se utilizaron 250 ng/pocillo de los virus TGEV y PRRSV purificados mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, y 400 ng/pocillo de proteína N purificada. Los pocillos se incubaron por duplicado con una dilución 1:100 de cada uno de los sueros de cerdo. Los sueros de cerdo anti-PRRSV y anti-PRCV reaccionaron con los correspondientes virus homólogos pero no reconocieron la proteína N de PToV. Por su parte, los sueros de cerdo anti-BRES y Serotec sí reaccionaron frente a PRRSV y TGEV si bien la reactividad frente a la proteína N de PToV fue siempre superior. La ausencia de reactividad de los sueros procedentes de animales spf inmunizados con PRRSV o PRCV frente a la proteína N de PToV indica la ausencia de reactividad cruzada.

Para comprobar que la reactividad del suero Serotec frente a los otros virus de cerdo es específica y no debida a reactividad cruzada, se separaron por SDS-PAGE 2 μ g de viriones purificados del torovirus equino BEV, 10 μ g de viriones purificados de TGEV y PRRSV y 6 μ g de la proteína PToV-N y estas muestras se hicieron reaccionar en inmunoblot con los sueros Serotec, anti-PRCV y anti-PRRSV, diluidos 1:100. El suero específico frente a PRRSV reconoce específicamente la proteína M del virus homólogo y, en el caso del suero frente a PRCV, éste reconoce tanto la proteína N como la proteína M de TGEV, pero ninguno de estos sueros reaccionó con la proteína PToV-N ni con BEV (Figura 14). Sin embargo, el suero Serotec, que proviene de animales criados en condiciones naturales, mostró una fuerte reactividad frente a la proteína N de PToV, y una reactividad menor frente a la proteína N de BEV, así como frente a las proteínas M de PRRSV y N de TGEV, indicando que la reactividad frente a estos virus observada por ELISA se debe a la presencia en el suero Serotec de anticuerpos frente a estos virus. Además, el suero policlonal generado frente a BEV (anti-BEV) que reconoce la proteína N del virus homólogo pero también la de PToV, no reacciona con las proteínas de PRRSV ni PRCV. Estos resultados ponen de manifiesto la especificidad del ensayo de ELISA desarrollado con la proteína N de PToV como antígeno para la detección de anticuerpos frente a PToV en sueros porcinos.

Una vez determinada la especificidad del ensayo se llevó a cabo un ELISA con sueros porcinos procedentes de distintas granjas españolas situadas en distintas áreas geográficas (Navarra, Aragón y Galicia) (Figura 15). Todos los sueros se utilizaron a una dilución 1:100, y como control positivo se utilizó el suero Serotec y como control negativo una mezcla de sueros de cerdo libres de patógenos. Para establecer el valor de densidad óptica a partir de cuál consideramos una muestra como positiva se utilizó el valor de 0.202, que corresponde al valor medio de densidad óptica del suero control negativo más tres veces la desviación estándar. Con este criterio todos los sueros porcinos analizados resultaron positivos por ELISA.

b. Ensayo de inmunoblot

Para la detección de anticuerpos frente a PToV por inmunoblot, la proteína N recombinante purificada se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 13% (400 ng de proteína por carril). Tras la electroforesis se transfirió la proteína a una membrana de nitrocelulosa, se tiñó la membrana con Rojo Ponceau y antes de retirar la tinción se cortó la nitrocelulosa en tiras correspondientes a cada uno de los carriles y se procedió a la inmunodetección. Se utilizaron los sueros porcinos procedentes de las granjas de Navarra, Aragón y Galicia a una dilución 1:100, y tras la incubación con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa las membranas se revelaron utilizando una solución de 4-cloronaftol (0.5 mg/ml) en PBS conteniendo peróxido de hidrogeno al 0.05% (Sigma) (Figura 16). De los 44 sueros analizados, 37 mostraron reactividad frente a la proteína N en este ensayo de inmunoblot. Al comparar estos resultados con los obtenidos por ELISA con estos mismos sueros (Tabla 2) se comprobó la mayor sensibilidad del ELISA frente al inmunoblot.

ES 2 339 728 B1

TABLA 2

Detección de anticuerpos frente a torovirus porcino mediante ELISA e inmunoblot

5

	Positivos	Negativos	
ELISA	45	0	n=45
Western -blot	37	7	n=44

10

15

El ensayo de inmunoblot se ha llevado a cabo asimismo con la proteína HE purificada, comprobándose de nuevo la menor reactividad de los sueros porcinos frente a esta proteína en comparación con la proteína N. Además, se observó que la intensidad de la banda detectada era similar para todos los sueros, a diferencia de lo que ocurre con la proteína N con la que se observan variaciones significativas en intensidad, que se correlacionan con diferencias en los valores de densidad óptica obtenidos frente a la misma proteína en ELISA.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Complejo proteico útil para el diagnóstico y el desarrollo de vacunas frente a torovirus porcino **caracterizado** porque comprende, al menos, una proteína y/o, un fragmento o péptido de la misma, del siguiente grupo:

- i) proteína N de SEQ ID NO: 9,
- ii) proteína M de SEQ ID NO: 11, y
- iii) proteína HE de SEQ ID NO: 13.

2. Complejo proteico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque está constituido por una única proteína de las pertenecientes al siguiente grupo: proteína de SEQ ID NO: 9, proteína de SEQ ID NO: 11 y proteína de SEQ ID NO: 13.

3. Complejo proteico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque está constituido por una mezcla de las proteínas pertenecientes al siguiente grupo: proteína de SEQ ID NO: 9, proteína de SEQ ID NO: 11 y proteína de SEQ ID NO: 13; preferentemente, un complejo proteico formado por la proteína N y M, o un complejo proteico formado por la proteína N y HE.

4. Complejo proteico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque está constituido por una mezcla de fragmentos o péptidos de las, mismas o distintas, proteínas pertenecientes al siguiente grupo: proteína de SEQ ID NO: 9, proteína de SEQ ID NO: 11 y proteína de SEQ ID NO: 13; preferentemente, un complejo formado por fragmentos de la proteína N o de la proteína HE, preferentemente los péptidos 286E1-HE (SEQ ID NO: 14) y/o 286F1-HE (SEQ ID NO: 16).

5. Procedimiento para la producción de las proteínas de torovirus porcino del complejo proteico según las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque comprende cultivar un microorganismo que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para una o varias de dichas proteínas de torovirus porcino, la expresión y, si se desea, la recuperación de dichas proteínas.

6. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque comprende las etapas de:

- a) cultivar células, preferentemente de insecto o de mamífero, transformadas con un sistema de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para, al menos, una proteína de la invención, en donde dicha proteína es una proteína cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13.
- b) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas proteínas.

7. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque comprende la transfección de una célula de insecto con un baculovirus que comprende la secuencia de nucleótidos del gen N (SEQ ID NO: 8).

8. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque comprende la transformación de una célula de mamífero con un virus vaccina que comprende la secuencia de nucleótidos del gen HE (SEQ ID NO: 12).

9. Secuencia de nucleótidos **caracterizada** porque codifica las proteínas N, M o HE según las reivindicaciones 1 a la 4 útil para la construcción de un vector de expresión y que puede comprender, al menos, una secuencia y/o, un fragmento de la misma, del siguiente grupo:

- i) secuencia de nucleótidos N de SEQ ID NO: 8,
- ii) secuencia de nucleótidos M de SEQ ID NO: 10, y
- iii) secuencia de nucleótidos HE de SEQ ID NO: 12.

10. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 9 **caracterizada** porque está constituida por una única secuencia de las pertenecientes al siguiente grupo: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12.

11. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 9 **caracterizada** porque está constituida por una mezcla de las secuencias pertenecientes al siguiente grupo: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12; preferentemente, una mezcla de secuencias formada por la secuencia de nucleótidos N y M (SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10), o más preferentemente, un complejo proteico formado por la secuencia de nucleótidos N y HE (SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 12).

ES 2 339 728 B1

12. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 9 **caracterizada** porque está constituida por una mezcla de las secuencias codificantes de fragmentos de la proteína N o de la proteína HE, preferentemente, los péptidos 286E1-HE (SEQ ID NO: 14) y/o 286F1-HE (SEQ ID NO: 16).
- 5 13. Proteína o péptido **caracterizado** porque es codificada por una secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 9 a la 12.
14. Sistema o vector de expresión útil para transformar células **caracterizado** porque comprende una secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 9 a la 12.
- 10 15. Sistema según la reivindicación 14 **caracterizado** porque el sistema de expresión comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a una proteína seleccionada entre el siguiente grupo: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13.
- 15 16. Célula hospedadora **caracterizada** porque contiene una secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 9 a la 12.
17. Célula hospedadora según la reivindicación 16 **caracterizada** porque es una célula de insecto, de mamífero o levadura transformada.
- 20 18. Uso de la proteína o péptido según la reivindicación 13 para desarrollar anticuerpos específicos útiles para identificar sueros de animales infectados y para inmunizar animales, en particular, cerdos.
19. Anticuerpo **caracterizado** porque es específico de una proteína según la reivindicación 13, o específico de un fragmento o péptido de la misma, ya sea monoclonal o policlonal.
- 25 20. Anticuerpo según la reivindicación 19 **caracterizado** porque es específico de una proteína perteneciente al siguiente grupo: proteína N de SEQ ID NO: 9, proteína M de SEQ ID NO: 11 y proteína HE de SEQ ID NO: 13.
- 30 21. Anticuerpo según la reivindicación 19 **caracterizado** porque es específico de un fragmento de una proteína según la reivindicación 13 y perteneciente al siguiente grupo: proteína N de SEQ ID NO: 9, proteína M de SEQ ID NO: 11 y proteína HE de SEQ ID NO: 13, preferentemente un fragmento de la proteína HE, y más preferentemente de los péptidos 286E1 (SEQ ID NO: 14) y 286F1 (SEQ ID NO: 16) correspondientes, respectivamente, a los aminoácidos 50-60 y 150-160 de la proteína HE de la invención.
- 35 22. Empleo de un anticuerpo según las reivindicaciones 19 a la 21 en la elaboración de sistema de diagnóstico inmunológico de torovirus porcino que permita la identificación de dichos virus en una muestra biológica.
23. Empleo de un anticuerpo según la reivindicación 22 **caracterizado** porque el sistema inmunológico pertenece al siguiente grupo: sistema de ELISA, tira de inmunocromatografía o de Western blot, que permita la identificación de dichos virus en una muestra biológica.
- 40 24. Sistema de diagnóstico inmunológico de torovirus porcino **caracterizado** porque comprende una cantidad efectiva de uno o varios anticuerpos según las reivindicaciones 19 a la 21, capaces de interactuar con una proteína de un torovirus porcino.
- 45 25. Sistema de diagnóstico inmunológico según la reivindicación 24 **caracterizado** porque es un ELISA que comprende uno de los anticuerpos de la invención frente a las proteínas N, M y HE, o una mezcla de varios de ellos, preferentemente una mezcla de anticuerpos que reconocen las proteínas N y HE porcinas.
- 50 26. Sistema de diagnóstico inmunológico según la reivindicación 24 **caracterizado** porque es una tira cinematográfica que comprende uno de los anticuerpos de la invención frente a las proteínas N, M y HE, o una mezcla de varios de ellos, preferentemente una mezcla de anticuerpos que reconocen las proteínas N y HE porcinas.
- 55 27. Sistema de diagnóstico inmunológico según la reivindicación 24 **caracterizado** porque es un sistema inmunoblot que comprende uno de los anticuerpos de la invención frente a las proteínas N, M y HE, o una mezcla de varios de ellos, preferentemente una mezcla de anticuerpos que reconocen las proteínas N y HE porcinas.
28. Uso de la proteína o péptido según la reivindicación 13 para desarrollar anticuerpos específicos útiles para identificar sueros de animales infectados y para inmunizar animales, en particular, cerdos.
- 60 29. Empleo de la proteína según la reivindicación 13 en la elaboración de un sistema inmunológico de identificación de anticuerpos frente a PToV en muestras de sueros de mamíferos, preferentemente animales, y más preferentemente de cerdo.
- 65 30. Empleo de la proteína según la reivindicación 29 **caracterizado** porque el sistema pertenece al siguiente grupo: sistema de ELISA, tira de inmunocromatografía o de Western blot, que permite la identificación conjunta y simultánea de anticuerpos frente a dichas proteínas presentes en una muestra biológica de cerdos.

ES 2 339 728 B1

31. Empleo según la reivindicación 30 **caracterizado** porque la muestra biológica pertenece al siguiente grupo: suero, plasma o sangre de un animal sospechoso de padecer o haber padecido una infección por torovirus porcino, preferentemente un cerdo.

5 32. Sistema de diagnóstico inmunológico de torovirus porcino **caracterizado** porque comprende una cantidad efectiva de una o varias proteínas según la reivindicación 13, capaces de interactuar con anticuerpos anti-torovirus porcino.

10 33. Sistema de diagnóstico inmunológico según la reivindicación 32 **caracterizado** porque es un ELISA que comprende una de las proteínas de la invención N, M y HE, o una mezcla de varias de ellas, preferentemente una mezcla de N y HE.

15 34. Sistema de diagnóstico inmunológico según la reivindicación 32 **caracterizado** porque es una tira inmunocromatográfica que comprende una de las proteínas de la invención N, M y HE, o una mezcla de varias de ellas, preferentemente una mezcla de N y HE.

20 35. Sistema de diagnóstico inmunológico según la reivindicación 32 **caracterizado** porque es un sistema inmunoblot que comprende una de las proteínas de la invención N, M y HE, o una mezcla de varias de ellas, preferentemente una mezcla de N y HE.

36. Uso de la proteína o péptido según la reivindicación 13 en la elaboración de una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, cerdos, frente a infecciones de torovirus porcino.

25 37. Vacuna frente torovirus porcino útil para proteger animales, en particular, cerdos, **caracterizada** porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una o varias proteínas según la reivindicación 13, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

30 38. Vacuna frente torovirus porcino útil para proteger animales, en particular, cerdos, **caracterizada** porque comprende un virus vaccina que comprende a su vez, al menos una, las secuencias de nucleótidos de los genes N, M y HE (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12).

35 39. Sistema de diagnóstico de torovirus porcino a partir de una muestra biológica mediante la identificación de material genómico específico de torovirus porcino **caracterizado** porque comprende la identificación de los genes N, M y HE, de secuencias SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, respectivamente.

40 40. Procedimiento de identificación genómica según la reivindicación 39 **caracterizado** porque se basa en la amplificación de DNA y porque comprende las siguientes etapas:

i) aislamiento de material génico de una muestra biológica sospechosa de contener torovirus porcino y obtención del cDNA correspondiente,

ii) amplificación por PCR de dicho cDNA mediante oligonucleótidos específicos para, al menos, uno de los genes de la invención, gen N, M y HE que se corresponden, con los siguientes:

45 a. pareja de oligos PToV-N5' y PToV-N3' para el gen N (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2),

b. pareja de oligos PToV-M5' y PToV-M3' para el gen M (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4), Y

c. pareja de oligos PToV-HE5' y PToV-HE3' para el gen HE (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6), y

50 iii) diagnóstico de un torovirus porcino si alguno de los genes de la invención es amplificado en ii).

55 41. Oligonucleótidos o cebadores útiles para la amplificación por PCR según la reivindicación 40 ii) constituidos por parejas **caracterizados** porque pertenecen al siguiente grupo:

a. pareja de oligos PToV-N5' y PToV-N3' para el gen N (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2),

b. pareja de oligos PToV-M5' y PToV-M3' para el gen M (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4), Y

60 c. pareja de oligos PToV-HE5' y PToV-HE3' para el gen HE (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6).

65 42. Procedimiento de identificación genómica según la reivindicación 39 **caracterizado** porque se basa en la técnica de Northern blot mediante sondas de polinucleótidos específicas de los genes N, M y HE, de secuencias SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, respectivamente.

ES 2 339 728 B1

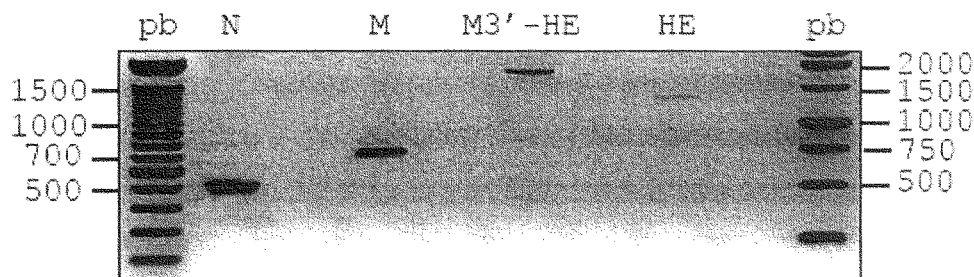


Figura 1

- A) >PT_oV-BRES2_N
GGATCC**ATGA**ATTCTATGCTTAATCCAAATGCTATGCCATTTCAGCCACAGCCACAGGTTGTGGCTATGCCCTTCAATA
TCCAATGGGTTTTCAACCTCAGTTTCGAAGGAGGCGTAATCCTGGTTTTAGACCTATGTTTCAGAGGCGTAATAATGTTA
ACCAGAACCGCAGTCGTGAGAATAGATCGCGCCTTCAAAGTCAACGACGTGGTCTCAATTCTTCACGCACCCAACAGCGT
GCTAATAGGCGTCAGAATAACCAACAGTCATTGTCTTACCCTTTGAACAACAGTTACTTATGATGGCAAATGAGACTGC
ACTTTCAGCAACATTTCCACCTGAGTTGCAGAGTTTGGCGCTACAAAAT TAGTGAAGATTGCTAAGAGGGCTGCATGC
AGATAGTTTCTGGTCAAGCCACTGTTGAAGTGTCCAGTGGTGTATCAAGACACGCCTCATAAAATTGCAACTTTTACAATA
AAAGTGGCTTTGAAT**TAAT**CTAGA
- B) >PT_oV-BRES2_M
GGATCC**ATG**TTTGATACAAAATTTTTGGCCCTTTCCAAACCAGGCCCCAGACCCCTTTAAAGCTCAAGTTGAGCAATTGTC
ATCTACTGAAAATGTTTATATTTTTCTTACAACACTTTTTGGTATACTTCAGTTGGTTATGTTATTTTTAAGTTATTAT
GTACAATGTTTCCAACATTACATTTTTCCACCAATTTGGAGGGGTCTGGAAAACCTTTTTGGCTTTTTCTCAGCCTTACATCT
TTGGCAATGCTTATTGGTGGCTTCTTAGTATGACCTTTACTGGCTACTGGGCCCTTACTGTAATTGCCACCATTTAGT
TTTAGTTATGTTTATTATGATGTTTGTAAAGTTTATTAATTTTGTAAAGTTGTTTTATAGAACAGGTAGCTTTGCAATTG
CTATACGTGGTCCAATGTTTATAGTAGCCCTTGATGTGACTATCAAGTTACATTGCACACCTTTTCCAATTTTAGTTAAA
GAAGTTGGCAGCATTTTTATCTTTCAGAATATTTGTAATAAACCAATTTGAATGCAGCTCAAATAGCTGCACCTTAAAATTTG
TGTTAGTGGACAGTGGTTTGCTTATACTAGATCATCAACTACAAGTGGCTGCAAAAAGTTGCAGCTGCAAACAGTATGCCA
AATATCATCTTTTTTATCTTCAAGGTGTTGCTGATTATACGCAATTGTCAAGTGTAAGTTTGAGT**AGT**CTAGA
- C) >PT_oV-BRES2_HE
GGATCC**ATG**TTTGAGGATGATTTCGAGTTCGTGGTCTCAATGTATTTTTAATTTTTATTTTTCTGTGGCATTGCTGCCAC
ACCTATAACACCACATTTATGGTCCAGGCCATATAACATCTGATTTGGTGTGGTTTTGGTGATAGTCGTTCTGATTGCCACCA
ACCCTTCCACACCAAACAGCTTGGATATTCCTCAGCAGCTTTGCCAAAATTTTCATCTAAAACAGGTTTCATCAATGTTT
ATATCTTTACATTGGAACAATAGTGATATATTTACTGTTTTAATTAATTCAAATTTGGTGTGTTGAGAAAGTTTTTATGA
GGGCGTTAATTTTTACCACATATCGTAACTATACATGTTATCTGAAGGTTCCATTGGTTGGGTTATTAATAAGGCTAGTT
TTTATACCAAACCTTTATCAAATGTCAGCAACATCCCGGTGCATAAAGTTGGTAACTTTAACACCACCTGAGAATATTTCCA
TCACATTCACCTGGTATGTGTAATCCACAACTAATAAAAACCCAGATAATCCAGCCTTATAACTCTGAGTAATAATGT
TTCTGTGTCCATACAATTTAGTTTACCAGACATATGTTGATGGTATTAATTCACAAAACATCTTGTGCCGTTTTTGTATA
TAGATGGTGGTTGTTTTCAAACAAATGGCTATTGTTATCTTTTGGTTACTCATACTCTTCATCTGCATTTTACTATGGC
TTTTATACTGAAGGTACATCTGTTGGTAAACATAATTATATTTGTGATTATTTAGAGATGGAACCAGGTGTATATAATGC
AACCCTTTTGGTAAATTTTTGCTTTATCCAACTAAGACTTATTTGATGGATACTATGAACATTACAGTACCAGTTCAGG
CAGTTCAGAGTATTTGGTCACAAAGCCGTCAGTCTGACGATGCTATTGGTATGGCGTGAAGTCACCTTATTGTATATTT
TATAATAAGACTAAGCCTTATTTGGCACCTAATGGAGCAGATTATAATCACGGTGTGAAGAAGTACGTGAGATGATGCA
GGGCTTGTGGTGAATTTCTCATGATTTCCACTCAGGGCTCCACACCCCTTAGCCTTGTATTCTAGTGAATGATATATA
CACCTAACTATGGTTCATGCCCTCAATATTATAAGTTATTTGAAACATCTGGTGTGAGAATGTTGATGTAACCTCTCT
GCATATTTTGTGGCTACTTGGGTGTTGTAGTTT**AGT**AATTAATTTGATTTTTATTTAATTAGTTTTTGTAAAGTAG
TTAT**TAGG**CTCTAGA

Figura 2

PToV-BRES2 N

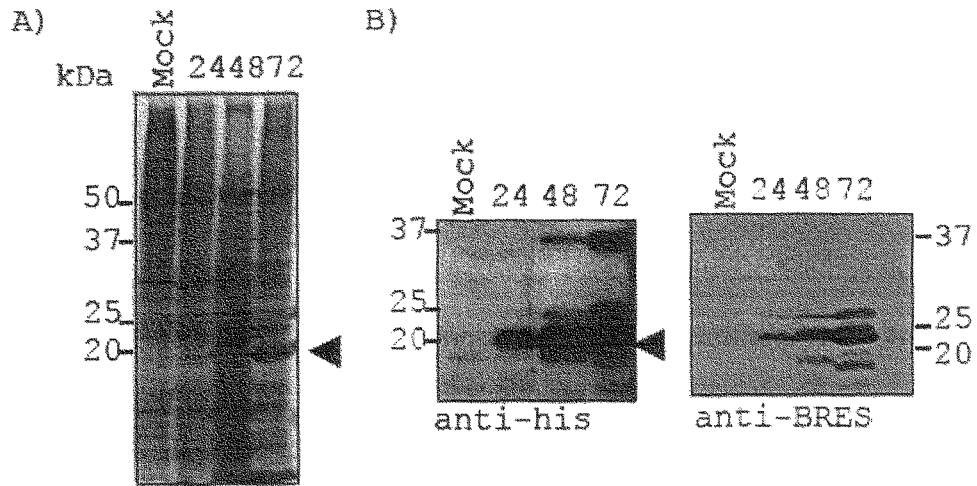


Figura 3

PToV-BRES2 M

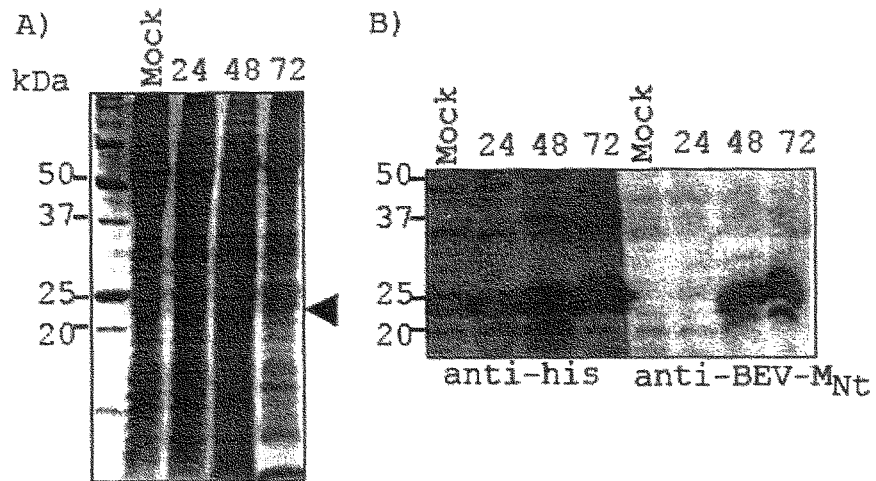


Figura 4

PToV-BRES2 HE

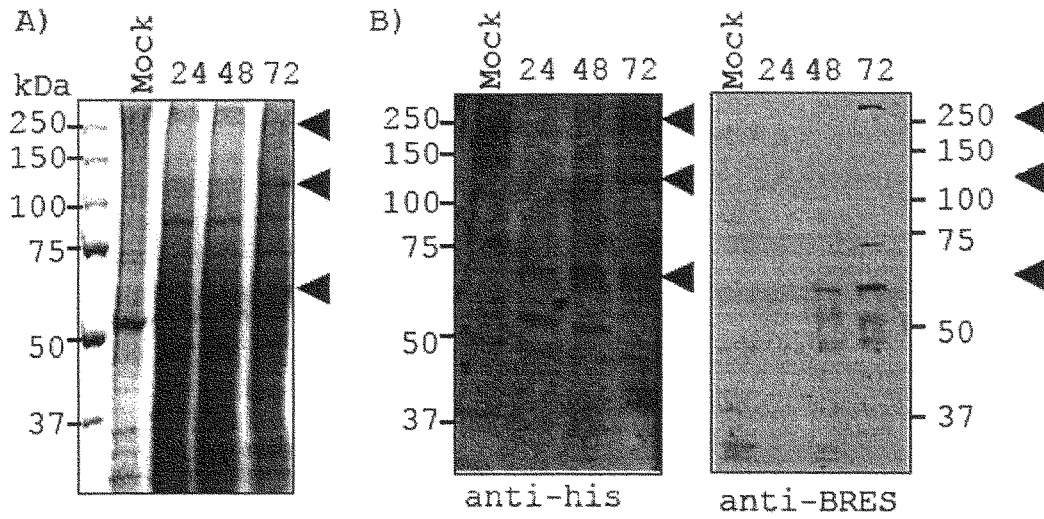


Figura 5

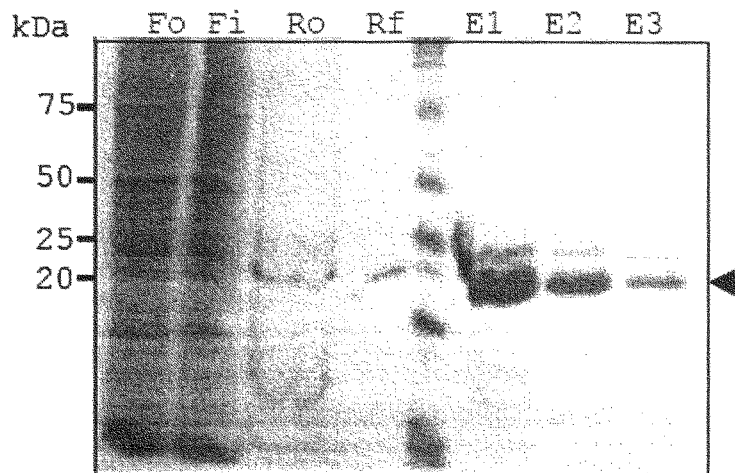


Figura 6

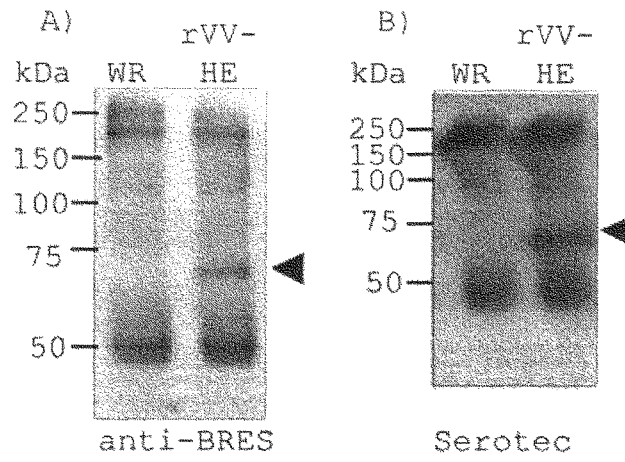


Figura 7

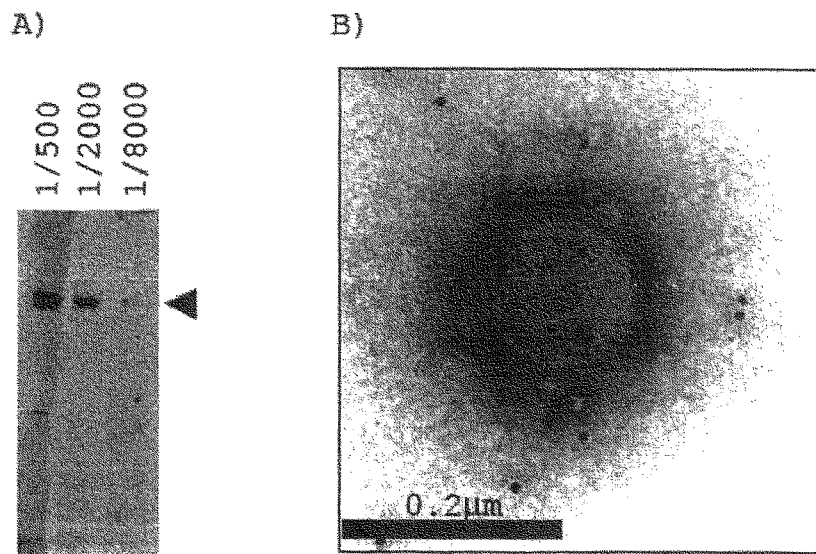


Figura 8

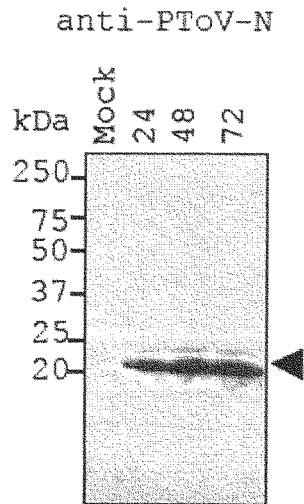


Figura 9

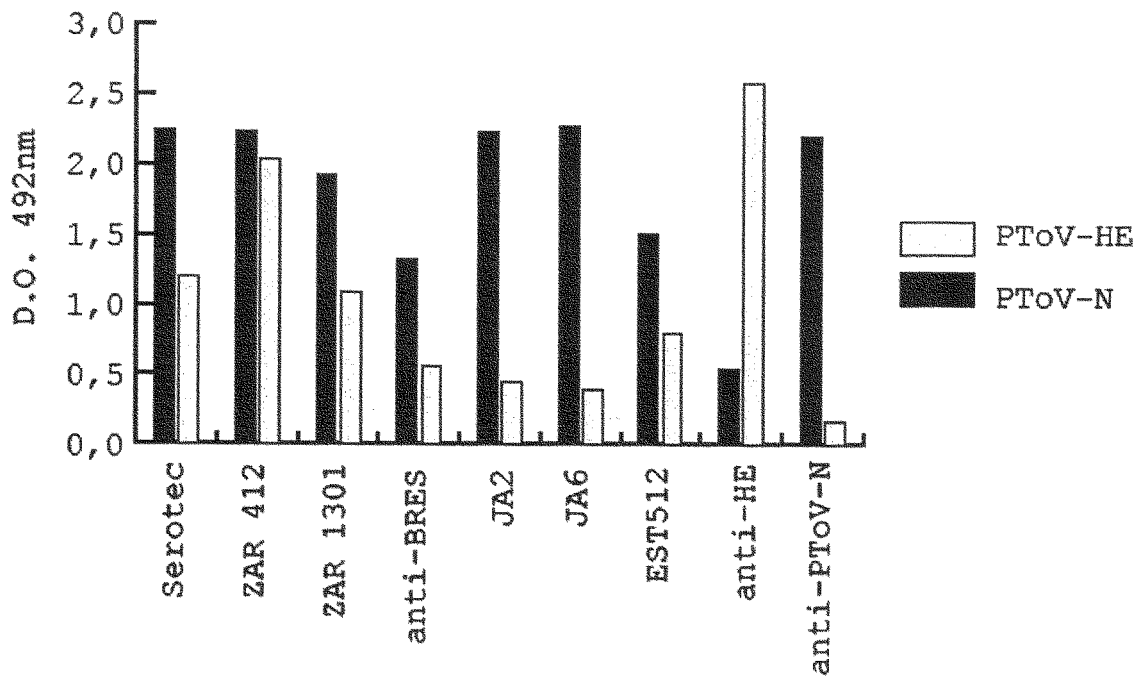


Figura 10

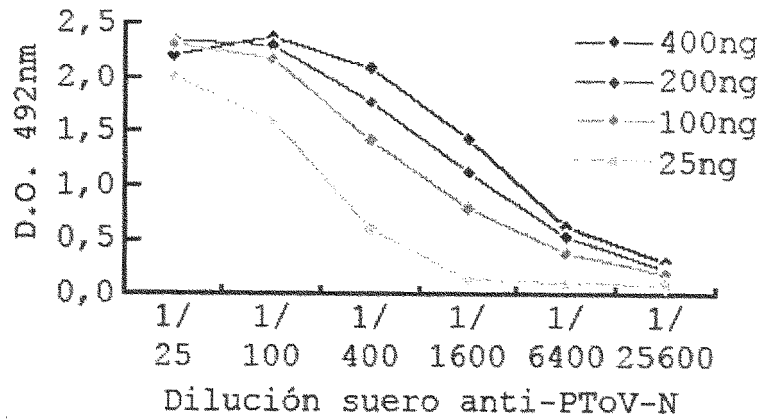


Figura 11

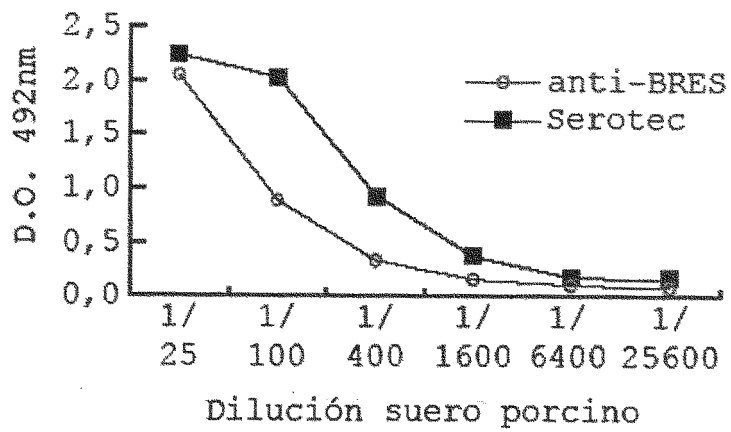


Figura 12

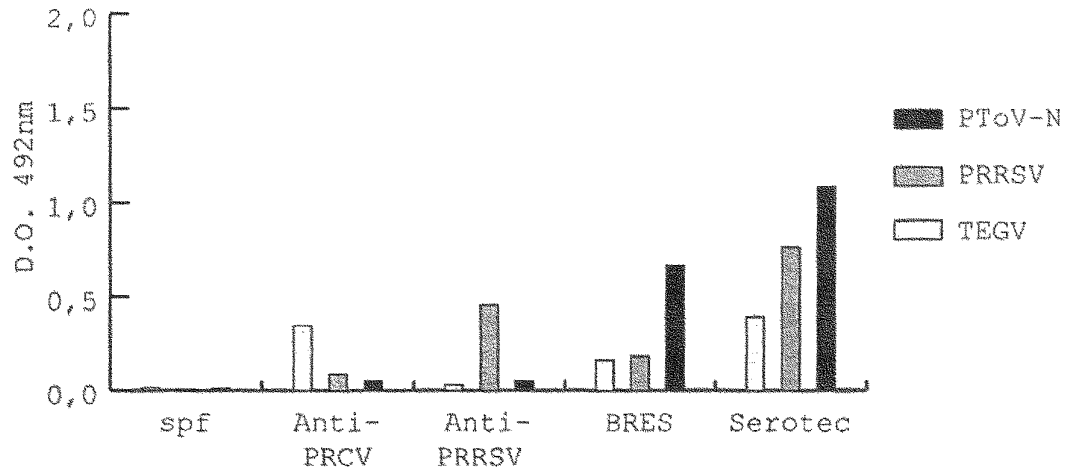


Figura 13

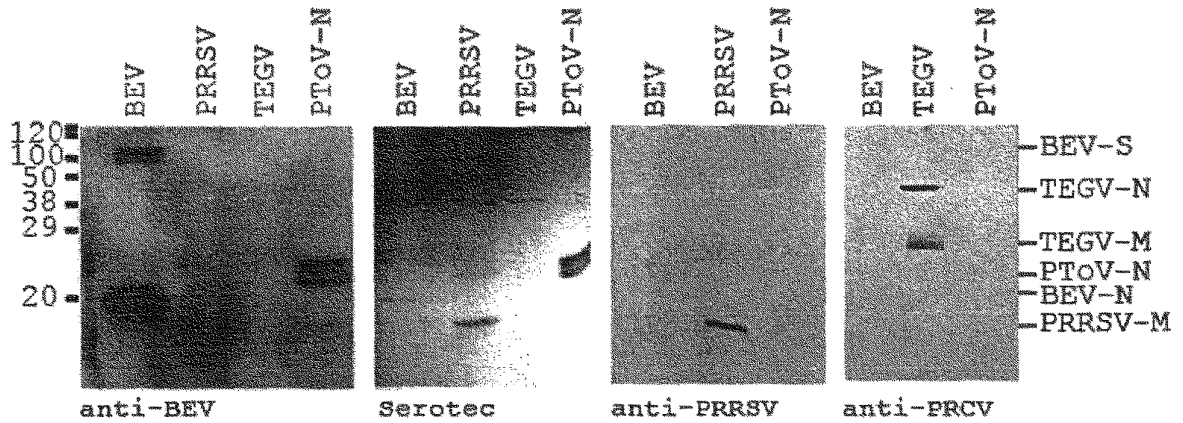
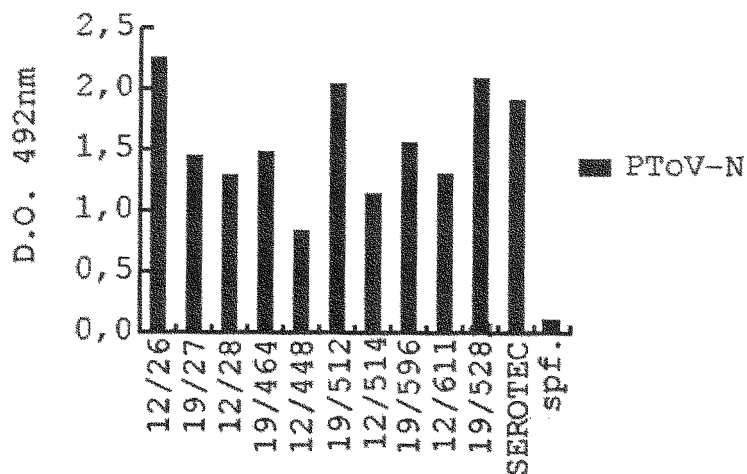


Figura 14

A) Sueros porcinos Navarra



B) Sueros porcinos Aragón

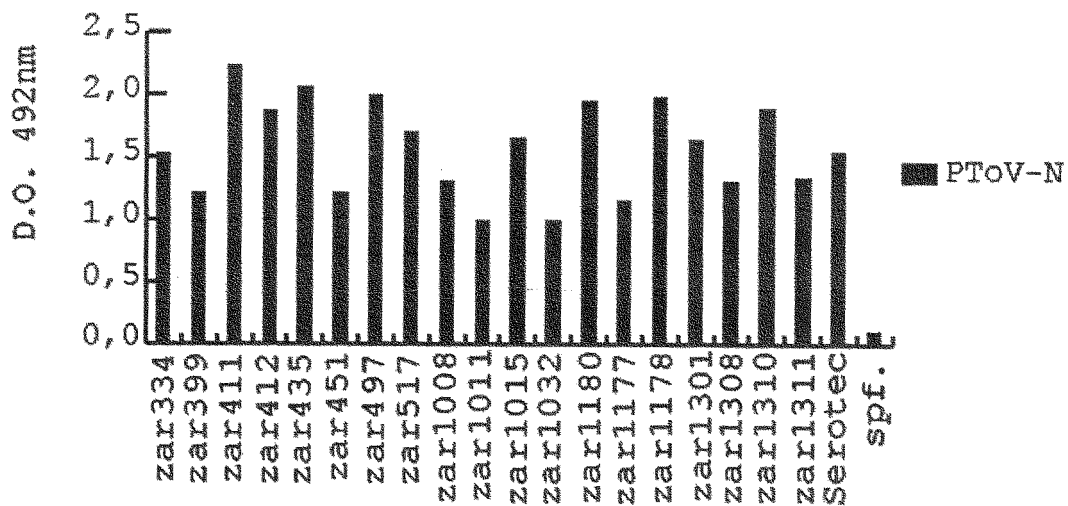


Figura 15

C) Sueros porcinos Galicia

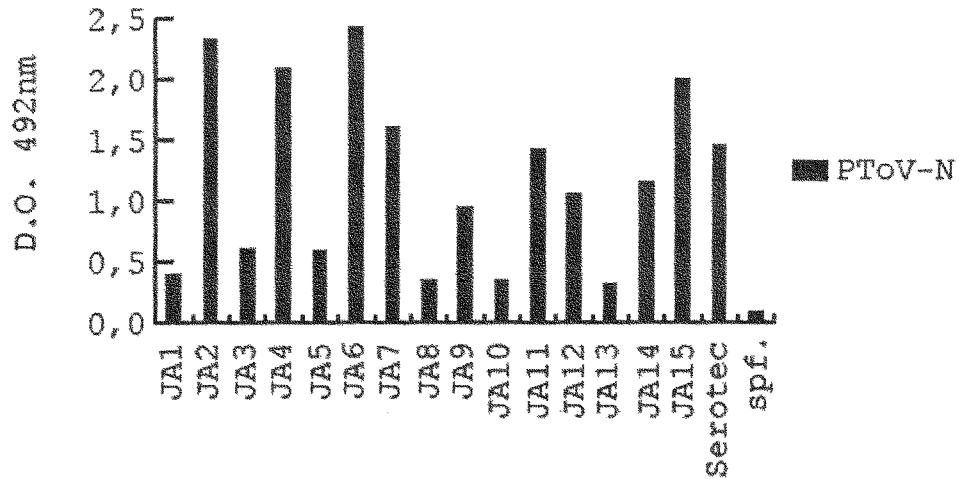
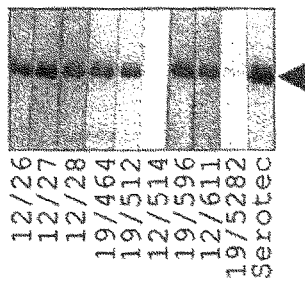
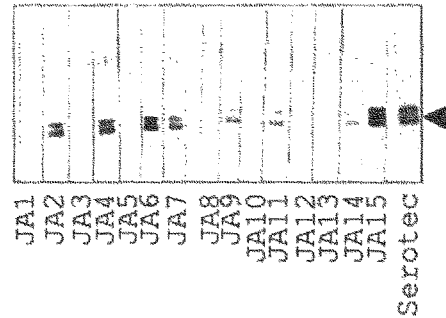


Figura 15

A) Sueros porcinos Navarra



C) Sueros porcinos Galicia



B) Sueros porcinos Aragón

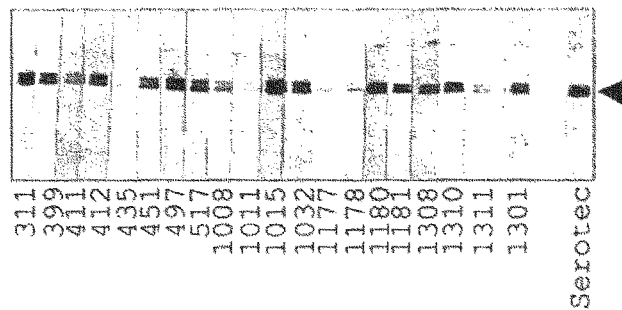


Figura 16

ES 2 339 728 B1

> SEQ ID No9: Proteina de la nucleocápside, N

MNSMLNPNAMPFQPPQVAMPLQYPMGFQPPFRRRRNPGFRPMFQRRNNVNQNRSRQNRSLQSQRRGLNS
SRTQQRANRRQNNQSLSLPFEQQLLMMANETALSATFPPELQSLAPTCLVKIAKRAAMQIVSGHATVEVSS
GDQDTPHKIATFTIKVALN.

> SEQ ID No11: Proteina de membrana, M

MFDTNFWPFPNQAPDPFKAQVEQLSSTENVYIFLTTLFGILQLVYVIFKLLCTMFPTLHFSPWIWRGLENFWL
FLSLTSLAIAYWLLPSMTFTGYWALTVIATILVLMFIMMFVKFINFVKLFYRTGSAIAIRGPIVLVALDV
TIKLHCTPFAILVKEVGSIFYLSEYCNKPLNAAQIAALKICVSGQWFAYTRSSTSAAKVAAANSTAKYHLF
ILQGVADYTLSSVKFE.

> SEQ ID No14: Péptido 286E1

CTNPSTPNSLDIPQQLC

> SEQ ID No15: Péptido 286F1

LTPPENIPSH

> SEQ ID No13: Proteina Hemaglutinin esterasa, HE

MLRMIRVRGPQCILIFFSVAFAATPITPHYGPGHITSDWCGFGDSRSDCTNPSTPNSLDIPQQLCPKFSSK
TGSSMFLSLHWNSDIFTVENYSNCGVEKVFYEGVNFSPYRNYTCYSEGSIGWVINKASFYTKLYQMSATSR
CIKLVTLTPPENIPSHSPGMCNPQTNKIPDNRLITLSNNVSVSIQFSLPTYVDGINCTKHLVFFCYIDGGC
FQTNGYCYPFYSSSAFYGFYTEGTSVKGKHNICDYLEMPEGVYNATTFGKFLLYPTKTYCMDTMNITV
PVQAVQSIWSQRSDDAIGMACKSPYCI FYNKTKPYLAPNGADYNHGDEEVREMMQGLLVNSSCISPQGST
PLALYSSEMIYTPNYGSCPQYYKLFETSGDENVDVTSSAYFVATWVLLVVIILIFILISFCLSSY.

ES 2 339 728 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

5 <120> PROTEÍNAS N, M Y HE DE TOROVIRUS PORCINO, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES EN DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TOROVIRUS PORCINO

10 <130> PToV

<160> 17

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 22

20 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

25 <223> Oligo PToV-N5'

<400> 1

30 ggatccatga attctatgct ta

22

<210> 2

<211> 23

35 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

40 <223> oligo PToV-N3'

<400> 2

45 tctagattaa tcaaagcca ctt

23

<210> 3

<211> 20

50 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

55 <223> Oligo PToV-M3'

<400> 3

60 ggatccatgt ttgatacaaa

20

<210> 4

<211> 26

65 <212> DNA

<213> Artificial

ES 2 339 728 B1

<220>
<223> Oligo PToV-M3'
5 <400> 4
tctagactac tcaaacttta cacttg 26
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
15 <220>
<223> Oligo PToV-HE5'
20 <400> 5
ggatccatgt tgaggatgat 20
<210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial
30 <220>
<223> Oligo PToV-HE3'
35 <400> 6
cgtctagagc ctaataacta cttaaaca 28
40 <210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
45 <220>
<223> Oligo Tov-m 5
50 <400> 7
agtatgacct ttactggcta 20
55 <210> 8
<211> 504
<212> DNA
<213> Torovirus
60 <220>
<221> CDS
65 <222> (7)..(498)

ES 2 339 728 B1

<400> 8

5 ggatcc atg aat tct atg ctt aat cca aat gct atg cca ttt cag cca 48
Met Asn Ser Met Leu Asn Pro Asn Ala Met Pro Phe Gln Pro
1 5 10

10 cag cca cag gtt gtg gct atg ccc ctt caa tat cca atg ggt ttt caa 96
Gln Pro Gln Val Val Ala Met Pro Leu Gln Tyr Pro Met Gly Phe Gln
15 20 25 30

15 cct cag ttt cga agg agg cgt aat cct ggt ttt aga cct atg ttt cag 144
Pro Gln Phe Arg Arg Arg Arg Asn Pro Gly Phe Arg Pro Met Phe Gln
35 40 45

20 agg cgt aat aat gtt aac cag aac cgc agt cgt cag aat aga tcg cgc 192
Arg Arg Asn Asn Val Asn Gln Asn Arg Ser Arg Gln Asn Arg Ser Arg
50 55 60

25 ctt caa agt caa cga cgt ggt ctc aat tct tca cgc acc caa cag cgt 240
Leu Gln Ser Gln Arg Arg Gly Leu Asn Ser Ser Arg Thr Gln Gln Arg
65 70 75

30 gct aat agg cgt cag aat aac caa cag tca ttg tcc tta ccc ttt gaa 288
Ala Asn Arg Arg Gln Asn Asn Gln Gln Ser Leu Ser Leu Pro Phe Glu
80 85 90

35 caa cag tta ctt atg atg gca aat gag act gca ctt tca gca aca ttt 336
Gln Gln Leu Leu Met Met Ala Asn Glu Thr Ala Leu Ser Ala Thr Phe
95 100 105 110

40 cca cct gag ttg cag agt ttg gcg cct aca aaa tta gtg aag att gct 384
Pro Pro Glu Leu Gln Ser Leu Ala Pro Thr Lys Leu Val Lys Ile Ala
115 120 125

45 aag agg gct gct atg cag ata gtt tct ggt cat gcc act gtt gaa gtg 432
Lys Arg Ala Ala Met Gln Ile Val Ser Gly His Ala Thr Val Glu Val
130 135 140

50 tcc agt ggt gat caa gac acg cct cat aaa att gca act ttt aca ata 480
Ser Ser Gly Asp Gln Asp Thr Pro His Lys Ile Ala Thr Phe Thr Ile
145 150 155

55 aaa gtg gct ttg aat taa tctaga 504
Lys Val Ala Leu Asn
160

<210> 9

<211> 163

50 <212> PRT

<213> Torovirus

55

60

65

ES 2 339 728 B1

<400> 9

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

45 <210> 10
 <211> 714
 <212> DNA
 50 <213> Torovirus
 <220>
 <221> CDS
 55 <222> (7)..(708)

60

65

ES 2 339 728 B1

<400> 11

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

<210> 12

60 <211> 1295

<212> DNA

<213> Torovirus

65 <220>

<221> CDS

<222> (7)..(1287)

ES 2 339 728 B1

<400> 12

5 ggatcc atg ttg agg atg att cga gtt cgt ggt cct caa tgt att tta 48
 Met Leu Arg Met Ile Arg Val Arg Gly Pro Gln Cys Ile Leu
 1 5 10

10 att ttt att ttt tct gtg gca ttt gct gcc aca cct ata aca cca cat 96
 Ile Phe Ile Phe Ser Val Ala Phe Ala Ala Thr Pro Ile Thr Pro His
 15 20 25 30

15 tat ggt cca ggc cat ata aca tct gat tgg tgt ggt ttt ggt gat agt 144
 Tyr Gly Pro Gly His Ile Thr Ser Asp Trp Cys Gly Phe Gly Asp Ser
 35 40 45

20 cgt tct gat tgc acc aac cct tcc aca cca aac agc ttg gat att cct 192
 Arg Ser Asp Cys Thr Asn Pro Ser Thr Pro Asn Ser Leu Asp Ile Pro
 50 55 60

25 cag cag ctt tgc cca aaa ttt tca tct aaa aca ggt tca tca atg ttt 240
 Gln Gln Leu Cys Pro Lys Phe Ser Ser Lys Thr Gly Ser Ser Met Phe
 65 70 75

30 ata tct tta cat tgg aac aat agt gat ata ttt act gtt ttt aat tat 288
 Ile Ser Leu His Trp Asn Asn Ser Asp Ile Phe Thr Val Phe Asn Tyr
 80 85 90

35 tca aat tgt ggt gtt gag aaa gtt ttt tat gag ggc gtt aat ttt tca 336
 Ser Asn Cys Gly Val Glu Lys Val Phe Tyr Glu Gly Val Asn Phe Ser
 95 100 105 110

40 cca tat cgt aac tat aca tgt tat tct gaa ggt tcc att ggt tgg gtt 384
 Pro Tyr Arg Asn Tyr Thr Cys Tyr Ser Glu Gly Ser Ile Gly Trp Val
 115 120 125

45 att aat aag gct agt ttt tat acc aaa ctt tat caa atg tca gca aca 432
 Ile Asn Lys Ala Ser Phe Tyr Thr Lys Leu Tyr Gln Met Ser Ala Thr
 130 135 140

50 tcc cgg tgc ata aag ttg gta act tta aca cca cct gag aat att cca 480
 Ser Arg Cys Ile Lys Leu Val Thr Leu Thr Pro Pro Glu Asn Ile Pro
 145 150 155

55 tca cat tca cct ggt atg tgt aat cca caa act aat aaa ata cca gat 528
 Ser His Ser Pro Gly Met Cys Asn Pro Gln Thr Asn Lys Ile Pro Asp
 160 165 170

60 aat cca cgc ctt ata act ctg agt aat aat gtt tct gtg tcc ata caa 576
 Asn Pro Arg Leu Ile Thr Leu Ser Asn Asn Val Ser Val Ser Ile Gln
 175 180 185 190

65 ttt agt tta ccg aca tat gtt gat ggt att aat tgc aca aaa cat ctt 624
 Phe Ser Leu Pro Thr Tyr Val Asp Gly Ile Asn Cys Thr Lys His Leu
 195 200 205

gtg ccg ttt tgt tat ata gat ggt ggt tgt ttt caa aca aat ggc tat 672

ES 2 339 728 B1

Val Pro Phe Cys Tyr Ile Asp Gly Gly Cys Phe Gln Thr Asn Gly Tyr
 210 215 220

5 tgt tat cct ttt ggt tac tca tac tct tca tct gca ttt tac tat ggc 720
 Cys Tyr Pro Phe Gly Tyr Ser Tyr Ser Ser Ser Ala Phe Tyr Tyr Gly
 225 230 235

10 ttt tat act gaa ggt aca tct gtt ggt aaa cat aat tat att tgt gat 768
 Phe Tyr Thr Glu Gly Thr Ser Val Gly Lys His Asn Tyr Ile Cys Asp
 240 245 250

15 tat tta gag atg gaa cca ggt gta tat aat gca acc act ttt ggt aaa 816
 Tyr Leu Glu Met Glu Pro Gly Val Tyr Asn Ala Thr Thr Phe Gly Lys
 255 260 265 270

20 ttt ttg ctt tat cca act aag act tat tgt atg gat act atg aac att 864
 Phe Leu Leu Tyr Pro Thr Lys Thr Tyr Cys Met Asp Thr Met Asn Ile
 275 280 285

25 aca gta cca gtt cag gca gtt cag agt att tgg tca caa agc cgt cag 912
 Thr Val Pro Val Gln Ala Val Gln Ser Ile Trp Ser Gln Ser Arg Gln
 290 295 300

30 tct gac gat gct att ggt atg gcg tgt aag tca cct tat tgt ata ttt 960
 Ser Asp Asp Ala Ile Gly Met Ala Cys Lys Ser Pro Tyr Cys Ile Phe
 305 310 315

35 tat aat aag act aag cct tat ttg gca cct aat gga gca gat tat aat 1008
 Tyr Asn Lys Thr Lys Pro Tyr Leu Ala Pro Asn Gly Ala Asp Tyr Asn
 320 325 330

40 cac ggt gat gaa gaa gta cgt gag atg atg cag ggc ttg ttg gtg aat 1056
 His Gly Asp Glu Glu Val Arg Glu Met Met Gln Gly Leu Leu Val Asn
 335 340 345 350

45 tct tca tgt att tca cct cag ggc tcc aca ccc tta gcc ttg tat tct 1104
 Ser Ser Cys Ile Ser Pro Gln Gly Ser Thr Pro Leu Ala Leu Tyr Ser
 355 360 365

50 agt gaa atg ata tat aca cct aac tat ggt tca tgc cct caa tat tat 1152
 Ser Glu Met Ile Tyr Thr Pro Asn Tyr Gly Ser Cys Pro Gln Tyr Tyr
 370 375 380

55 aag tta ttt gaa aca tct ggt gat gag aat gtt gat gta acc tcc tct 1200
 Lys Leu Phe Glu Thr Ser Gly Asp Glu Asn Val Asp Val Thr Ser Ser
 385 390 395

60 gca tat ttt gtg gct act tgg gtg ttg tta gtt tta gta att att ttg 1248
 Ala Tyr Phe Val Ala Thr Trp Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ile Leu
 400 405 410

65 att ttt att tta att agt ttt tgt tta agt agt tat tag gctctaga 1295
 Ile Phe Ile Leu Ile Ser Phe Cys Leu Ser Ser Tyr
 415 420 425

<210> 13

<211> 426

<212> PRT

<213> Torovirus

<400> 13

Met Leu Arg Met Ile Arg Val Arg Gly Pro Gln Cys Ile Leu Ile Phe
 1 5 10 15

Ile Phe Ser Val Ala Phe Ala Ala Thr Pro Ile Thr Pro His Tyr Gly

ES 2 339 728 B1

			20					25				30				
5	Pro	Gly	His 35	Ile	Thr	Ser	Asp	Trp 40	Cys	Gly	Phe	Gly	Asp 45	Ser	Arg	Ser
10	Asp	Cys 50	Thr	Asn	Pro	Ser	Thr 55	Pro	Asn	Ser	Leu	Asp 60	Ile	Pro	Gln	Gln
15	Leu	Cys	Pro	Lys	Phe	Ser 70	Ser	Lys	Thr	Gly	Ser 75	Ser	Met	Phe	Ile	Ser 80
20	Leu	His	Trp	Asn	Asn 85	Ser	Asp	Ile	Phe	Thr 90	Val	Phe	Asn	Tyr	Ser 95	Asn
25	Cys	Gly	Val	Glu 100	Lys	Val	Phe	Tyr	Glu 105	Gly	Val	Asn	Phe	Ser 110	Pro	Tyr
30	Arg	Asn	Tyr 115	Thr	Cys	Tyr	Ser	Glu 120	Gly	Ser	Ile	Gly	Trp 125	Val	Ile	Asn
35	Lys	Ala 130	Ser	Phe	Tyr	Thr	Lys 135	Leu	Tyr	Gln	Met	Ser 140	Ala	Thr	Ser	Arg
40	Cys	Ile	Lys	Leu	Val	Thr 150	Leu	Thr	Pro	Pro	Glu 155	Asn	Ile	Pro	Ser	His 160
45	Ser	Pro	Gly	Met	Cys 165	Asn	Pro	Gln	Thr	Asn 170	Lys	Ile	Pro	Asp	Asn 175	Pro
50	Arg	Leu	Ile	Thr 180	Leu	Ser	Asn	Asn	Val 185	Ser	Val	Ser	Ile	Gln 190	Phe	Ser
55	Leu	Pro	Thr 195	Tyr	Val	Asp	Gly	Ile 200	Asn	Cys	Thr	Lys	His 205	Leu	Val	Pro
60	Phe	Cys 210	Tyr	Ile	Asp	Gly	Gly 215	Cys	Phe	Gln	Thr	Asn 220	Gly	Tyr	Cys	Tyr
65	Pro	Phe	Gly	Tyr	Ser	Tyr 230	Ser	Ser	Ser	Ala	Phe 235	Tyr	Tyr	Gly	Phe	Tyr 240
70	Thr	Glu	Gly	Thr	Ser 245	Val	Gly	Lys	His	Asn 250	Tyr	Ile	Cys	Asp	Tyr 255	Leu
75	Glu	Met	Glu	Pro	Gly	Val	Tyr	Asn	Ala 265	Thr	Thr	Phe	Gly	Lys 270	Phe	Leu
80	Leu	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Tyr	Cys 280	Met	Asp	Thr	Met	Asn 285	Ile	Thr	Val
85	Pro	Val	Gln	Ala	Val	Gln	Ser	Ile	Trp	Ser	Gln	Ser	Arg	Gln	Ser	Asp

ES 2 339 728 B1

290 295 300

5 Asp Ala Ile Gly Met Ala Cys Lys Ser Pro Tyr Cys Ile Phe Tyr Asn
305 310 315 320

10 Lys Thr Lys Pro Tyr Leu Ala Pro Asn Gly Ala Asp Tyr Asn His Gly
325 330 335

15 Asp Glu Glu Val Arg Glu Met Met Gln Gly Leu Leu Val Asn Ser Ser
340 345 350

20 Cys Ile Ser Pro Gln Gly Ser Thr Pro Leu Ala Leu Tyr Ser Ser Glu
355 360 365

25 Met Ile Tyr Thr Pro Asn Tyr Gly Ser Cys Pro Gln Tyr Tyr Lys Leu
370 375 380

30 Phe Glu Thr Ser Gly Asp Glu Asn Val Asp Val Thr Ser Ser Ala Tyr
385 390 395 400

35 Phe Val Ala Thr Trp Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ile Leu Ile Phe
405 410 415

40 Ile Leu Ile Ser Phe Cys Leu Ser Ser Tyr
420 425

35 <210> 14
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

40 <220>
<223> Secuencia Codificante del péptido 286E1

45 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(33)
<223> Péptido 286E1

50 <400> 14

55 tgc acc aac cct tcc aca cca aac agc ttg gat
Cys Thr Asn Pro Ser Thr Pro Asn Ser Leu Asp
1 5 10

33

60 <210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

65 <220>
<223> Constructo sintético

ES 2 339 728 B1

<400> 15

5 Cys Thr Asn Pro Ser Thr Pro Asn Ser Leu Asp
1 5 10

<210> 16

<211> 33

10 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia codificante Péptido 286F1

<220>

20 <221> CDS

<222> (1)..(33)

<223> Péptido 286F1

25 <400> 16

30 act tta aca cca cct gag aat att cca tca cat 33
Thr Leu Thr Pro Pro Glu Asn Ile Pro Ser His
1 5 10

<210> 17

<211> 11

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Constructo sintético

<400> 17

45 Thr Leu Thr Pro Pro Glu Asn Ile Pro Ser His
1 5 10

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 339 728

② Nº de solicitud: 200702776

③ Fecha de presentación de la solicitud: 23.10.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SMITS, S.L. et al. "Phylogenetic and evolutionary relationships among Torovirus field variants: evidence for multiple intertypic recombination events". JOURNAL OF VIROLOGY. 01.09.2003. Vol. 77, Nº. 17, páginas 9567-9577; todo el documento.	1-40,42
Y		1-42
X	KRONEMAN, A. et al. "Identification and characterization of a porcine Torovirus". JOURNAL OF VIROLOGY. 01.05.1998. Vol. 72, Nº. 5, páginas 3507-3511; todo el documento.	1-40,42
Y		1-42
Y	WO 2005007671 A2 (EPITOMICS, INC.) 25.01.2005, todo el documento.	1-42

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.12.2008

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/165 (2006.01)

C12N 15/50 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 39/215 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, C12N, G01N, A61K, C12Q, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, EBI, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.12.2008

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	41	SÍ
	Reivindicaciones	1-40, 42	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-42	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

Consideraciones:

La invención describe y reivindica, las proteínas N, M y HE del torovirus porcino, los péptidos correspondientes a los fragmentos 50-60 y 150-160 de la proteína HE, los ácidos nucleicos que las codifican y su utilización para obtener anticuerpos; también reivindica un sistema de diagnóstico de la infección por torovirus porcino y la/las vacunas obtenidas utilizando los productos anteriores como principios activos.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SMITS, S.L. et al. "Phylogenetic and evolutionary relationships among Torovirus field variants: evidence for multiple intertypic recombination events". JOURNAL OF VIROLOGY. 01.09.2003. Vol. 77, Nº. 17, páginas 9567-9577.	01-09-2003
D02	KRONEMAN, A. et al. "Identification and characterization of a porcine Torovirus". JOURNAL OF VIROLOGY. 01.05.1998. Vol. 72, Nº. 5, páginas 3507-3511.	01-05-1998
D03	WO 2005007671 A2 (EPITOMICS, INC.)	25-01-2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El torovirus porcino, ha sido descrito previamente en el estado de la Técnica. El documento D02, presenta resultados sobre la identificación y caracterización de dicho virus; el documento D01, presenta resultados con la organización genética del virus y la generación de variantes. Las secuencias presentadas en el documento D02, coinciden con las secuencias reivindicadas en la presente solicitud. Por tanto, las reivindicaciones 1-40, 42 en los términos en que están redactadas, no son nuevas y no cumplen los requisitos de novedad y de actividad inventiva de acuerdo a los Art. 6 y 8 de la LP.

Los péptidos correspondientes a los fragmentos 50-60 y 150-160 de la proteína HE, no han sido descritos previamente. Dichos fragmentos y los anticuerpos obtenidos a partir de ellos, cumplen el requisito de novedad de acuerdo al Art. 6 de la LP.

Las secuencias de los cebadores que forman la reivindicación 41, son nuevas. La obtención de cebadores con fines concretos (en este caso la obtención amplificada de los ácidos nucleicos de la invención), resulta obvia para un experto en la materia (ver Tabla 1, documento D02). La reivindicación 41 por tanto, carece de actividad inventiva y no cumple los requisitos del Art. 8 de la LP. Las reivindicaciones 1-42, cumplen el requisito de aplicación industrial de acuerdo al Art. 9 de la LP.