



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 364 313**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/21 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 5/07 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03756148 .7**

(96) Fecha de presentación : **19.03.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1517987**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2005**

(54)

Título: **Células de pulmón de la rata algodонера para el cultivo de virus.**

(30)

Prioridad: **20.03.2002 US 366014 P**
18.03.2003 US 391498

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.08.2011

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.08.2011

(73)

Titular/es: **MERIAL LIMITED**
3239 Satellite Boulevard, Building 500
Duluth, Georgia 30096, US

(72)

Inventor/es: **David, Frederic, R. y**
Tanner, Michael E.

(74)

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 364 313 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células de pulmón de la rata algodонера para el cultivo de virus

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] Esta invención se refiere a una nueva línea celular y a sus usos, que incluye un nuevo procedimiento para la producción del virus que causa la enfermedad porcina conocida como síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS).

10

[0002] En términos más generales, la descripción se refiere a la propagación de organismos o patógenos tales como virus, por ejemplo, virus virulentos o atenuados, usando células de pulmón de la rata algodонера o las células o la línea celular según la invención (por ejemplo, células depositadas para la producción de organismos o patógenos tales como virus, por ejemplo, virus virulentos o atenuados, tales como organismos o patógenos, por ejemplo, virus, que normalmente no tienen a roedores o ratas o la rata algodонера o las células de pulmón de la rata algodонера como hospedador natural, o virus de ARN, por ejemplo, virus de ARN de cadena sencilla positiva, como los virus del orden Nidovirales, por ejemplo, arterivirus o virus de la familia *Arteriviridae*, por ejemplo, el virus que eleva la lactato deshidrogenasa (LDV), el virus de la arteritis equina (EAV), el virus de la fiebre hemorrágica de simio (SHFV) y el virus del PRRS (cuyo vector normalmente son artrópodos); virus de la familia *Coronaviridae*, por ejemplo, coronavirus tales como el virus de la bronquitis infecciosa, coronavirus canino, coronavirus felino, coronavirus humano 229E, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, virus de la gastroenteritis transmisible porcina, virus respiratorio porcino, coronavirus bovino, coronavirus humano OC43, virus de la hepatitis murina, virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina, coronavirus de rata, virus de la sialodacrioadenitis, virus de la bronquitis infecciosa aviar, coronavirus de pavo, coronavirus de conejo (también virus cuyos vectores normalmente son artrópodos), y Torovirus como torovirus equino, torovirus porcino, torovirus humano, y torovirus bovino.

[0003] Los virus propagados de manera ventajosa usando células de pulmón de la rata algodонера o las células o la línea celular según la descripción incluyen el virus de la parainfluenza canina (CPI), por ejemplo, CPI de tipo 2 (CPI-2), adenovirus, como adenovirus canino (CAV), por ejemplo, adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), adenovirus porcino (PAV), por ejemplo, adenovirus porcino de tipo 3 y tipo 5 (PAV-3), herpesvirus bovino, por ejemplo, herpesvirus bovino de tipo 1 (responsable de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR)), herpesvirus equino (EHV), por ejemplo, de tipo 1 (EHV-1) o de tipo 4 (EHV-4), rotavirus bovino (BRV), virus de la parainfluenza bovina de tipo 3 (PI-3), coronavirus entérico y respiratorio bovino (BCV), y el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV).

[0004] De manera más ventajosa el virus es el virus del PRRS.

[0005] Y en formas de realización muy ventajosas, las células o la línea celular de pulmón de la rata algodонера es aquella que ha sido depositada en el ATCC como PTA-3930 o una célula o línea celular de pulmón de la rata algodонера que tiene todas las características identificativas de ATCC PTA-3930 o una célula o línea celular de pulmón de la rata algodонера producida cultivando células de pulmón de la rata algodонера hasta al menos 10, por ejemplo, hasta al menos 21 ó 76 ó 100 pasos tales como 10 o más o 21 o más o 76 o más pasos, por ejemplo, al menos 10 ó 21 ó 76 pasos y de manera ventajosa hasta (e incluyendo) 100 pasos, y estableciendo una línea celular de tal manera que las células de pulmón de la rata algodонера sean esencialmente células epiteliales y que las características morfológicas se mantengan a lo largo de los pasos.

[0006] Por consiguiente la descripción se refiere a dichas células o línea celular, así como todos sus usos.

[0007] Los virus propagados usando células de pulmón de la rata algodонера o células o la línea celular según la invención son útiles para la preparación de composiciones inmunógenas y vacunas contra enfermedades causadas por los virus, tales como el PRRSV. Asimismo, los organismos u otros patógenos propagados usando las células de pulmón de la rata algodонера o células o la línea celular según la invención son útiles para la preparación de composiciones inmunógenas y vacunas contra dichos otros patógenos u organismos.

55

[0008] Esta descripción también se refiere al uso del virus crecidos mediante el paso por células según la invención, por ejemplo, para proporcionar composiciones inmunógenas y vacunas atenuadas, inactivadas y subunitarias; y así, la descripción se refiere a dichas composiciones inmunógenas y vacunas atenuadas, inactivadas y subunitarias.

ANTECEDENTES

- 5 **[0009]** El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) fue descrito por primera vez en Carolina del Norte (EE.UU.) en 1987. Esta enfermedad porcina se definió en ese momento como "enfermedad porcina misteriosa" o MSD, y posteriormente fue conocida como "síndrome de infertilidad y respiratorio porcino" o SIRS. Apareció después en Europa central en 1990. Al principio, en Europa, la enfermedad se denominó "síndrome abortivo y respiratorio epidémico porcino" o PEARs, y finalmente, "síndrome reproductivo y respiratorio porcino" o PRRS que se convirtió en la denominación aceptada mundialmente.
- 10 **[0010]** El virus del PRRS es un virus de ARN con envuelta de cadena sencilla, aislado por primera vez en Holanda, y denominado virus de Lelystad. Se ha clasificado como un miembro de la familia *Arteriviridae*. Los virus de la familia *Arteriviridae* están dentro del orden Nidovirales. Otros virus del orden Nidovirales son los virus de la familia *Coronaviridae*, tales como los coronavirus y los torovirus.
- 15 **[0011]** El PRRS ha sido descrito en el documento WO92/21375. Un organismo aislado depositado en la Collection Nationale de Culture de Micro-organismes (CNCM) del Instituto Pasteur, París, Francia, bajo el número de acceso I-1102. También se aisló un tipo de Norteamérica (documento WO93/03760) y el virus fue depositado en la American Type Culture Collection (ATCC), bajo el número de acceso VR-2332.
- 20 **[0012]** En cerdas, la enfermedad del PRRS se caracteriza por trastornos reproductivos y síntomas respiratorios. Las células diana de los virus del PRRS son los macrófagos.
- 25 **[0013]** Uno de los problemas que ha impedido la obtención de productos inmunológicos contra el virus del PRRS es una disponibilidad limitada de sustratos estables para la replicación del virus.
- 30 **[0014]** El virus del PRRS sólo se podía amplificar en cultivos de macrófagos alveolares porcinos (PAM) (Wensvoort G., y col. en The Vet. Quart. 13:121-130, 1991). La necesidad de usar cerdos libres de enfermedad de cierta edad para la obtención de estos macrófagos implicaba varios inconvenientes. Además, la susceptibilidad a la infección vírica no estaba garantizada en los PAM recuperados, debido a que los sustratos celulares procedentes de diferentes animales son siempre variables. Esto planteaba un inconveniente mayor en la producción de lotes de antígenos de calidad constante y homogénea, y cada lote debía ser evaluado con el fin de determinar su susceptibilidad.
- 35 **[0015]** Se han realizado investigaciones para otros sustratos celulares. Así, en la patente de EE.UU. Nº 5.476.778, se sometieron a ensayo 15 líneas celulares obtenidas de diversas especies (por ejemplo, bovinas, caninas, felinas, humanas, porcinas, de simios) y de diversos tejidos (por ejemplo, riñón, pulmón, testículo) para el cultivo del virus del PRRS. Sólo un tipo (células MA-104) de las 15 líneas celulares permite el crecimiento del virus del PRRS.
- 40 **[0016]** Las líneas celulares de riñón de mono (por ejemplo, VERO, MA-104, MARC-145, véanse respectivamente la patente de EE.UU. Nº 5.476.778 y el documento WO98/00165) se usan para el cultivo y la atenuación del virus del PRRS. Pero los títulos del virus del PRRS en estas células son bajos y por tanto el coste de producción es elevado. Papp y col. 1997 (J General Virology 78: 2.933-2.943) describen un modelo animal para la infección por herpesvirus bovino de tipo 1 (BHV-1). Papp y col. indican que BHV-1 se puede replicar en células de pulmón de la rata algodónera (CRL) *in vitro*. El documento EP 0 676 467 describe cepas europeas del virus del PRRS, que están atenuadas. El documento EP 0 676 467 describe vacunas para la protección de los cerdos frente al PRRS. El documento EP 0 676 467 describe anticuerpos monoclonales que son reactivos con el PRRS y anticuerpos monoclonales que son no reactivos con las cepas atenuadas.
- 45 **[0017]** Aunque ahora hay disponibles comercialmente vacunas inactivadas y atenuadas para el PRRS, sería de gran valor tener sustratos celulares alternativos para producir el virus del PRRS, por ejemplo, para la producción de vacunas o composiciones inmunógenas, y, en términos más generales, sería de gran valor tener sustratos celulares alternativos para producir patógenos, tales como virus, por ejemplo, virus de ARN, por ejemplo, virus de ARN de cadena sencilla positiva, como los virus del orden Nidovirales, tales como arterivirus o virus de la familia *Arteriviridae* y virus de la familia *Coronaviridae*, por ejemplo, para la producción de vacunas o composiciones inmunógenas.
- 50 **[0018]** Además, sería ventajoso proporcionar una nueva línea celular de pulmón de la rata algodónera.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

- [0019]** la presente invención se basa en el hallazgo de que a pesar de que los roedores no son hospedadores naturales para el virus del PRRS, las células de pulmón procedentes de la rata algodón permitieron el crecimiento o la propagación del virus del PRRS. Además se ha producido y depositado una nueva línea celular procedente del tejido pulmonar de la rata algodón.
- [0020]** La presente invención también se basa en el hallazgo de que las células pulmonares de la rata algodón también permiten el crecimiento o la propagación de otros virus, dichos virus que no son patógenos naturales de roedores. Estos virus incluyen el virus de la parainfluenza canina de tipo 2 (CPI-2), adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), herpesvirus equino de tipo 1 (EHV-1) o herpesvirus equino de tipo 4 (EHV-4), rotavirus bovino (BRV) y coronavirus bovino (BCV).
- [0021]** La presente invención se refiere a una línea celular de la rata algodón depositada en la American Type Culture Collection con el número de acceso ATCC PTA-3930.
- [0022]** En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un virus que comprende la propagación del virus en células de pulmón de la rata algodón; donde el virus es el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) y donde las células de pulmón de la rata algodón son las células de la línea celular de la rata algodón ATCC PTA-3930.
- [0023]** En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de células de pulmón de la rata algodón para la propagación del PRRSV, donde las células de pulmón de la rata algodón son las células de la línea celular de la rata algodón ATCC PTA-3930.
- [0024]** La presente invención, en un aspecto adicional, se refiere a un cultivo que comprende PRRSV y células de pulmón de la rata algodón donde las células de pulmón de la rata algodón son las células de la línea celular de la rata algodón ATCC PTA-3930.
- [0025]** La presente invención, en otro aspecto, se refiere a un kit que comprende PRRSV y células de pulmón de la rata algodón donde las células de pulmón de la rata algodón son las células de la línea celular de la rata algodón ATCC PTA-3930.
- [0026]** La presente descripción, de manera más general, supone el uso de células de pulmón de la rata algodón o células o la línea celular según la invención para propagar organismos o patógenos como virus, por ejemplo, virus virulentos o atenuados, tales como virus que normalmente no tienen a roedores o ratas o la rata del algodón o células de pulmón de la rata del algodón como hospedadores naturales o virus del orden Nidovirales, por ejemplo, arterivirus o virus de la familia *Arteriviridae*, por ejemplo, el virus que eleva la lactato deshidrogenasa (LDV), el virus de la arteritis equina (EAV), el virus de la fiebre hemorrágica de simio (SHFV) y el virus del PRRS (cuyo vector normalmente son artrópodos); virus de la familia *Coronaviridae*, por ejemplo, coronavirus tales como el virus de la bronquitis infecciosa, coronavirus canino, coronavirus felino, coronavirus humano 229E, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, virus de la gastroenteritis transmisible porcina, virus respiratorio porcino, coronavirus bovino, coronavirus humano OC43, virus de la hepatitis murina, virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina, coronavirus de rata, virus de la sialodacrioadenitis, virus de la bronquitis infecciosa aviar, coronavirus de pavo, coronavirus de conejo (también virus cuyos vectores normalmente son artrópodos), y Torovirus como torovirus equino, torovirus porcino, torovirus humano, y torovirus bovino.
- [0027]** Los virus propagados de manera ventajosa usando células de pulmón de la rata algodón o las células o línea celular según la invención incluyen el virus de la parainfluenza canina (CPI), por ejemplo, CPI de tipo 2 (CPI-2), adenovirus, como adenovirus canino (CAV), por ejemplo, adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), adenovirus porcino (PAV), por ejemplo, adenovirus porcino de tipo 3 (PAV-3), herpesvirus bovino, por ejemplo, herpesvirus bovino de tipo 1 (responsable de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR)), herpesvirus equino (EHV), por ejemplo, de tipo 1 (EHV-1) o de tipo 4 (EHV-4), rotavirus bovino (BRV), virus de la parainfluenza bovina de tipo 3 (PI-3 o bPI-3), coronavirus bovino (BCV), y el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV). De manera más ventajosa el virus es PRRSV. Por consiguiente, la descripción se refiere a la propagación o el cultivo o el crecimiento de dichos virus.
- [0028]** Algunos virus pueden crecer en las células de pulmón procedentes de la rata algodón tales como el

herpesvirus bovino de tipo 1 (BHV-1) (véase Papp Z y col., J. Gen. Virol, 1997, 78, 2933-2943, por ejemplo, página 2935), virus de la parainfluenza bovina de tipo 3 (bPI-3) (véase Breker-Klassen MM y col., J. Virol, 1995, 69 (7), 4308-4315), y el adenovirus porcino de tipo 3 (PAV-3) (véase Solicitud de patente PCT WO-A3-99/53047). Estos documentos no describen o sugieren el uso de estas células y los virus producidos en ellas para la preparación de composiciones inmunógenas o vacunas inactivadas, atenuadas o subunitarias y su administración a animales y a procedimientos de inmunización o vacunación.

[0029] La descripción también incluye las células de pulmón de la rata algodónera o la línea celular que se ha depositado en la ATCC como PTA-3930 o una célula de pulmón de la rata algodónera o la línea celular que tiene todas las características identificativas de la ATCC PTA-3930 o una célula de pulmón de la rata algodónera o línea celular producida cultivando células de pulmón de la rata algodónera hasta al menos 10 ó 21 ó 76 pasos tales como 10 o más o 21 o más o 76 o más pasos, por ejemplo, al menos 10 ó 21 ó 76 pasos y de manera ventajosa hasta (e incluyendo) 100 pasos, y estableciendo una línea celular de tal manera que las células de pulmón de la rata algodónera sean esencialmente células epiteliales y que las características morfológicas se mantengan a lo largo de los pasos.

[0030] La presente descripción supone el uso de manera ventajosa de células de pulmón de la rata algodónera (células CRL), por ejemplo, líneas celulares preparadas a partir de estas células, para la propagación de virus del PRRS virulentos o atenuados.

[0031] La presente descripción también supone el uso de manera ventajosa de células CRL, por ejemplo, células o líneas celulares preparadas a partir de estas células tales como células o líneas celulares de la descripción (por ejemplo, la línea celular depositada o células que tienen sus características), para la propagación de organismos patógenos tales como virus, por ejemplo, virus virulentos o atenuados, tales como CPI-2, CAV-2, EHV-1, EHV-4, BRV, BCoV.

[0032] Por lo tanto, la descripción comprende un procedimiento para el cultivo o la propagación de un virus, como el PRRSV, CPI-2, CAV-2, PAV-5, EHV-1, EHV-4, BRV, BCoV, LDV, EAV, SHFV, virus de la bronquitis infecciosa, coronavirus canino, coronavirus felino, coronavirus humano 229E, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, virus de la gastroenteritis transmisible porcina, virus respiratorio porcino, coronavirus bovino, coronavirus humano OC43, virus de la hepatitis murina, virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina, coronavirus de rata, virus de la sialodacrioadenitis, virus de la bronquitis infecciosa aviar, coronavirus de pavo, coronavirus de conejo, torovirus equino, torovirus porcino, torovirus humano, torovirus bovino, que comprende la puesta en contacto del virus con las células de pulmón de la rata algodónera en condiciones adecuadas para el cultivo o la propagación. El procedimiento adicionalmente puede incluir la cosecha de los virus resultantes. Para la preparación de una composición inmunógena o inmunológica o de vacuna, opcionalmente los virus se pueden inactivar y/o presentar proteína(s) o antígeno(s) o epítipo(s) aislados a partir de ellos (para composiciones inactivadas o subunitarias) y el virus o la subunidad se pueden mezclar con un vehículo o diluyente y/o adyuvante adecuado, por ejemplo, un vehículo o diluyente y/o adyuvante farmacéutica o veterinariamente aceptable.

[0033] Los términos "composición inmunógena" y "composición inmunológica" y "composición inmunógena o inmunológica" cubren cualquier composición que desencadene una respuesta inmunitaria contra el patógeno diana; por ejemplo, después de la administración o inyección al animal (por ejemplo, porcino), se desencadena una respuesta inmunitaria contra el patógeno diana (por ejemplo, PRRS). Los términos "composición de vacuna" y "vacuna" cubren cualquier composición que induzca una respuesta inmunitaria protectora frente al patógeno diana o que protege eficazmente contra el patógeno; por ejemplo, después de la administración o inyección al animal (por ejemplo, porcino), se desencadena una respuesta inmunitaria protectora contra el patógeno diana o proporciona una protección eficaz frente al patógeno (por ejemplo, PRRS). Una subunidad de un patógeno, por ejemplo, un virus, un antígeno o un inmunógeno o un epítipo aislado a partir del patógeno, por ejemplo, un virus; y, una composición subunitaria comprende o consta esencialmente de uno o más antígenos, inmunógenos o epítopos aislados a partir del patógeno, por ejemplo, un virus.

[0034] La presente descripción también proporciona cultivos de un organismo o patógeno, por ejemplo, un virus, como un virus que normalmente no tiene a roedores o ratas o la rata algodónera o células de pulmón de la rata algodónera como hospedador natural, por ejemplo, PRRSV, LDV, EAV, SHFV, el virus de la bronquitis infecciosa, coronavirus canino, coronavirus felino, coronavirus humano 229E, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, virus de la gastroenteritis transmisible porcina, virus respiratorio porcino, coronavirus bovino, coronavirus humano OC43, virus de la hepatitis murina, virus de la encefalomiелitis

hemaglutinante porcina, coronavirus de rata, virus de la sialodacrioadenitis, virus de la bronquitis infecciosa aviar, coronavirus de pavo, coronavirus de conejo, torovirus equino, torovirus porcino, torovirus humano, torovirus bovino, CPI-2, CAV-2, PAV-5, EHV-1, EHV-4, BRV o BCV, de manera ventajosa el virus del PRRS, CPI-2, CAV-2, EHV-1, EHV-4, BRV o BCV, obtenidos a partir del cultivo o la propagación en células de pulmón de la rata algodónera o las células o la línea celular de la descripción, por ejemplo, cultivos o preparaciones inactivados, atenuados y subunitarios.

[0035] Dichos cultivos son diferentes de cultivos previos puesto que pueden estar exentos de contaminantes procedentes de cultivos propagados en células diferentes y pueden tener títulos diferentes de los de cultivos propagados en células diferentes. Por ejemplo, considérese de nuevo el virus del PRRS amplificado en células porcinas; sus cultivos son susceptibles de contener contaminantes procedentes de células porcinas, y es probable que el PRRSV cultivado en células CRL no contenga contaminantes encontrados en células porcinas. Este análisis se puede extender a cultivos de PRRSV y otros virus cultivados en otras células que se hayan usado para propagar el PRRSV y otros virus, en comparación con cultivos de virus cultivados en células CRL como en la presente invención, de manera que es evidente que los cultivos de la presente invención son diferentes de los cultivos previos.

[0036] La presente descripción también comprende composiciones inmunógenas y vacunas frente a la enfermedad del PRRS o al PRRSV que se puede obtener a partir de un cultivo del virus del PRRS según la descripción, de manera ventajosa composiciones inmunógenas y vacunas vivas atenuadas, composiciones inmunógenas y vacunas inactivadas y composiciones inmunógenas y vacunas subunitarias.

[0037] La presente descripción también comprende composiciones inmunógenas y vacunas frente a otros patógenos u organismos cultivados o propagados en células CRL o la línea celular o células de la invención, por ejemplo, composiciones o vacunas vivas atenuadas, inactivadas o subunitarias. Estas composiciones inmunógenas o vacunas pueden estar dirigidas contra cualquier organismo o patógeno o virus crecido, cultivado, propagado, o similar en células CRL o la línea celular o células de la invención, por ejemplo, dichas composiciones inmunógenas o de vacuna frente a cualquiera de los virus u organismos o patógenos mencionados en el presente documento, tales como el CPI-2, CAV-2, BHV-1, EHV-1, EHV-4, BRV, bPI-3 o BCV.

[0038] La descripción comprende kits que contienen células y virus u organismos o patógenos para cultivarlos en ellos, de manera ventajosa en contenedores separados; e incluso de manera más ventajosa, los contenedores separados están en el mismo envase; y, opcionalmente, el kit incluye instrucciones para el cultivo, crecimiento, o crianza de las células y/o virus, con las instrucciones que opcionalmente incluyen instrucciones para la cosecha y/o inactivación del virus y/o aislamiento de un antígeno o inmunógeno o epítipo subunitario.

[0039] La descripción comprende adicionalmente composiciones de combinación; por ejemplo, composiciones que comprenden una o más vacunas o composiciones inmunógenas descritas en el presente documento, o una vacuna o composición inmunógena descrita en el presente documento en combinación con otra vacuna o composición inmunógena o componente activo (por ejemplo, un virus o patógeno u organismo inactivado o atenuado o un antígeno o inmunógeno o proteína subunitarios o uno de sus epítopos).

[0040] Así, por ejemplo, la descripción comprende composiciones inmunógenas y vacunas frente a una enfermedad porcina que comprende una mezcla de cultivos de los virus del PRRS y PAV-3 según la descripción tales como composiciones inmunógenas y vacunas vivas atenuadas, composiciones inmunógenas y vacunas inactivadas o composiciones inmunógenas y vacunas subunitarias. El PAV-3 también puede ser un PAV-3 recombinante que contenga una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican, y que expresan, uno o más inmunógeno(s), antígeno(s) o epítipo(s) extraños o heterólogos o exógenos (extraño, heterólogo o exógeno para el virus). Se hace referencia a los documentos WO99/53047, WO99/08706, WO01/83737 y WO00/47756 para ejemplos de vectores de adenovirus porcino recombinante que se pueden usar en la práctica de la descripción.

[0041] Otro ejemplo es aquel en el que la descripción comprende composiciones inmunógenas y vacunas frente a una enfermedad canina que comprende una mezcla de cultivos de los virus CPI-2 y CAV-2 según la descripción tales como composiciones inmunógenas y vacunas vivas atenuadas, composiciones inmunógenas y vacunas inactivadas o composiciones inmunógenas y vacunas subunitarias. El CAV-2 también puede ser un CAV-2 recombinante que contenga una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican, y que expresan, uno o más inmunógeno(s), antígeno(s) o epítipo(s) extraños o heterólogos o exógenos (extraño, heterólogo o exógeno para el virus). Se hace referencia a la patente de EE.UU. Nº 6.090.393 para ejemplos de adenovirus canino recombinante que se puede usar en la práctica de la descripción.

[0042] Otro ejemplo es aquel en el que la descripción comprende composiciones inmunógenas y vacunas frente a una enfermedad bovina que comprende una mezcla de al menos dos o al menos tres o los cuatro cultivos del virus según la descripción que comprenden el BHV-1, BRV, bPI-3 y/o BCV, por ejemplo, BHV-1+BRV, BHV-1+BRV+bPI-3, BHV-1+BRV+bPI-3+BCV, BRV+bPI-3, BRV+bPI-3+BCV, bPI-3+BCV, BHV+bPI-3, BHV+bPI-3+BCV, BHV-1+BCV, BRV+BCV, tales como composiciones inmunógenas y vacunas vivas atenuadas, composiciones inmunógenas y vacunas inactivadas o composiciones inmunógenas y vacunas subunitarias. Se consideran ventajosas las composiciones inmunógenas y vacunas contra la enfermedad respiratoria bovina que comprenden una mezcla de al menos dos cultivos del virus según la descripción que comprenden el BHV-1 y bPI-3, y composiciones inmunógenas y vacunas frente a la enfermedad entérica bovina que comprenden una mezcla de al menos dos cultivos del virus según la descripción que comprenden el BCV y BRV.

[0043] Y otro ejemplo adicional de composiciones de combinación según la descripción son las composiciones inmunógenas y vacunas frente a una enfermedad equina que comprenden una mezcla de cultivos del virus EHV-1 y EHV-4 según la descripción, tales como composiciones inmunógenas y vacunas vivas atenuadas, composiciones inmunógenas y vacunas inactivadas o composiciones inmunógenas y vacunas subunitarias.

[0044] La descripción comprende la preparación de tales composiciones de combinación; por ejemplo, con la mezcla de los componentes activos, de manera ventajosa juntos y con un vehículo o diluyente y/o adyuvante.

[0045] La descripción también comprende un kit para la preparación de las composiciones inmunógenas o de vacuna de la descripción, por ejemplo, dicho kit comprende (a) un organismo, patógeno o virus o uno de sus antígenos o epítomos (de manera ventajosa un virus como se ha mencionado en el presente documento) y (b) un organismo, patógeno o virus o uno de sus inmunógenos, antígenos o epítomos (de manera ventajosa un virus o uno de sus inmunógenos, antígenos o epítomos, pero también están contemplados otros patógenos como se ha mencionado en el presente documento) que es diferente de (a), en contenedores separados, opcionalmente en el mismo envase, y opcionalmente con instrucciones para su mezcla y/o administración.

[0046] La descripción comprende adicionalmente procedimientos para la inducción de una respuesta inmunitaria mediante la administración a un hospedador, tal como un hospedador susceptible a una enfermedad causada por un patógeno u organismo o virus propagado en una célula o línea celular de pulmón de la rata algodónera, por ejemplo, una célula o línea celular de pulmón de la rata algodónera de la descripción, por ejemplo, un virus como se ha mencionado en el presente documento, una composición inmunógena o de vacuna de la descripción que comprende dicho patógeno u organismo o virus inactivado o atenuado, o uno de sus antígenos o inmunógenos o epítomos, en una cantidad suficiente para inducir la respuesta inmunitaria.

[0047] Así, la presente descripción proporciona procedimientos para la inmunización o vacunación o inducción de una respuesta inmunitaria frente a la enfermedad o el virus del PRRS usando una composición inmunógena y/o vacuna descritas en el presente documento, por ejemplo, con la administración de la composición inmunógena o de vacuna a un hospedador, por ejemplo, porcino, en una cantidad suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria adecuada. Y la descripción proporciona adicionalmente procedimientos para la inmunización o vacunación o inducción de una respuesta inmunitaria frente a la enfermedad o el virus del CPI-2, CAV-2, BHV-1, EHV-1, EHV-4, BRV, bPI-3 o BCV usando una composición inmunógena y/o vacunas de la descripción, administrando la composición inmunógena o de vacuna a un hospedador, por ejemplo, un hospedador natural del virus, en una cantidad suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria adecuada.

[0048] Cuando por ejemplo se emplean una combinación o composiciones de combinación, la presente descripción incluye procedimientos de inmunización o vacunación o de desencadenamiento de una respuesta inmunitaria en un animal hospedador frente a dos o más antígenos, epítomos o patógenos u organismos o virus diferentes, tales como en un animal porcino frente a la enfermedad del PRRS y PAV-3 que comprende la administración de una cantidad eficaz para desencadenar la respuesta de la composición(es) inmunógena y/o vacuna(s) de la descripción. (La indicación "(s)" se utiliza puesto que el procedimiento también se puede poner en práctica administrando secuencialmente composiciones o vacunas de la invención). Del mismo modo, como ejemplo adicional, la invención incluye procedimientos de inmunización o vacunación o de desencadenamiento de una respuesta inmunitaria en un cánido frente a la enfermedad o el virus del CPI-2 y CAV-2 usando o administrando una cantidad eficaz de una composición(es) inmunógena y/o vacuna(s) de la descripción. De manera similar, la descripción proporciona procedimientos de inmunización o vacunación o de desencadenamiento de una respuesta inmunitaria en un bóvido frente al menos dos o al menos tres o al menos cuatro enfermedades o virus bovinos usando o administrando una cantidad eficaz de la composición(es) inmunógena y/o vacuna(s) descritas en el

presente documento. Además la descripción incluye procedimientos de inmunización o vacunación o de desencadenamiento de una respuesta inmunitaria en un bóvido frente a la enfermedad o el virus del BHV-1 y bPI-3 usando o administrando una cantidad eficaz de una composición(es) inmunógena y/o vacuna(s) descritas en el presente documento. La descripción también incluye procedimientos de inmunización o vacunación o de desencadenamiento de una respuesta inmunitaria en un bóvido frente a la enfermedad o el virus del BCV y BRV usando o administrando una composición(es) inmunógena y/o vacuna(s) descritas en el presente documento. La descripción incluye procedimientos de inmunización o vacunación o de desencadenamiento de una respuesta inmunitaria en un equino frente a la enfermedad o el virus del EHV-1 y EHV-4 usando o administrando una composición(es) inmunógena y/o vacuna(s) descritas en el presente documento.

[0049] Nótese que en esta memoria descriptiva y particularmente en las reivindicaciones, términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de patentes de EE.UU.; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que términos tales como "que consta esencialmente de" y "consta esencialmente de" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de EE.UU., por ejemplo, tienen en cuenta los elementos no mencionados explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o nueva de la invención.

[0050] Éstas y otras formas de realización se describen o son obvias a partir de, y englobadas por, la siguiente Descripción detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0051] Los inventores han desarrollado un procedimiento para la producción o propagación vírica que usa células de pulmón de la rata algodónera, así como una nueva línea celular; y la propagación o producción o cultivo o crecimiento de organismos o patógenos o virus en dichas células.

[0052] Los pulmones se extraen de las ratas algodóneras y se someten a una digestión enzimática (por ejemplo, con tripsina y/o colagenasa). El sobrenadante que contiene las células disociadas se recoge y se cultiva, por ejemplo, como una monocapa o en suspensión. De manera ventajosa las células se cultivan en forma de monocapa, por ejemplo, en Medio esencial mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) y/o hidrosilato de lactoalbúmina (LAH). De manera ventajosa el medio de cultivo puede contener antibióticos, por ejemplo, gentamicina, estreptomycin y/o penicilina.

[0053] El virus del PRRS se cultivó en dicho cultivo de células de pulmón. También se cultivaron los virus de PAV-3, CPI-2, CAV-2, BHV-1, EHV-1, EHV-4, BRV, bPI-3 o BCV en dicho cultivo de células de pulmón.

[0054] El cultivo celular puede resultar de manera ventajosa a partir de varios pasos de estas células. De manera ventajosa, los pasos de estas células permiten producir líneas celulares que son útiles, por ejemplo, para la propagación del virus del PRRS. Por ejemplo, las células se pueden someter al menos a 10 pasos, por ejemplo, de 10 a 100 pasos. De manera ventajosa estas líneas celulares son duraderas en ausencia de suero fetal bovino (FBS), aunque el establecimiento de la monocapa requiere algo de FBS u otro factor de crecimiento celular apropiado.

[0055] Otra ventaja del cultivo de células CRL según la descripción es que un cultivo de células puede persistir durante al menos un mes en forma de monocapa o suspensión sana sin necesitar la reposición del medio agotado o una suplementación nutricional adicional. Esta robustez le ha conferido la ventaja de múltiples cosechas de virus a partir del mismo cultivo de células sin necesidad de un tiempo de arranque (establecimiento del cultivo) y el consumo de la población de células. Así, es posible tener múltiples cosechas de virus a partir del mismo cultivo celular. En una forma de realización el proceso de cultivo comprende dos o más cosechas del virus, con o sin reinoculación vírica y/o adición del medio de cultivo fresco. De manera ventajosa, después de cada cosecha se añade medio de cultivo fresco al cultivo celular.

[0056] Siguiendo este procedimiento, se han cultivado células de pulmón de la rata algodónera con hasta 76 pasos y se ha establecido como línea celular. Estas células de pulmón de la rata algodónera son esencialmente células epiteliales y las características morfológicas se mantienen a lo largo de los pasos. El paso 21 ha sido depositado el 18 de diciembre de 2001, bajo los términos del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, y se le ha asignado el número de acceso ATCC PTA-3930.

[0057] En una forma de realización, la presente descripción incluye el uso de células epiteliales de pulmón de la rata aldonera, líneas celulares epiteliales derivadas de ellas, tales como la línea celular PTA-3930 o una línea celular que tiene sus características identificativas, para la producción de virus del PRRS virulentos o atenuados. En formas de realización adicionales, la presente descripción incluye el uso de células de pulmón epiteliales de la rata aldonera, las líneas celulares epiteliales derivadas de ellas, tales como la línea celular PTA-3930 o una línea celular que tiene sus características identificativas, para la producción de un virus CPI-2, CAV-2, EHV-1, EHV-4, BRV o BCV virulento o atenuado. En formas de realización adicionales, la presente descripción incluye el uso de la línea celular PTA-3930 o una línea celular que tenga sus características identificativas para la producción de un virus BHV-1 o bPI-3 virulento o atenuado. También se puede usar la línea celular o una línea celular que tenga sus características identificativas con respecto a los otros virus mencionados en el presente documento.

[0058] Así, otro aspecto de la invención es un procedimiento de producción del virus del PRRS, que comprende el cultivo del virus del PRRS en un cultivo de células de pulmón de la rata aldonera, que comprende células epiteliales, de manera ventajosa en una línea de células de pulmón de la rata aldonera. Por ejemplo, la producción vírica se realizará en la línea celular PTA-3930 o una línea celular que tiene sus características identificativas. Este procedimiento de producción de virus también se puede usar para los virus CPI-2, CAV-2, BHV-1, EHV-1, EHV-4, BRV, bPI-3 y BCV, así como para otros virus mencionados en el presente documento.

[0059] El virus puede ser un virus virulento o un virus atenuado.

[0060] La producción de virus comprende las etapas de inoculación y propagación del virus en dichas células. Antes de la inoculación, las células según la invención se pueden crecer en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, medio MEM suplementado con FBS u otro factor de crecimiento celular apropiado. El cultivo celular se realiza de manera ventajosa a una temperatura entre 35 y 39°C, de manera ventajosa en torno a 37°C. De manera ventajosa el cultivo celular es una monocapa. Alternativamente, el cultivo celular es una suspensión. En general, el virus se inocula cuando las células crecidas en una monocapa han alcanzado confluencia. Los virus extracelulares se pueden recuperar directamente con el sobrenadante. Los virus intracelulares se pueden recuperar después de la disrupción adecuada de las células, por ejemplo, mediante congelación/descongelación o sonicación. En el caso de cultivos celulares en suspensión, el virus se puede recuperar, por ejemplo, después de la filtración del filtrado. Los virus se pueden recuperar de 2 a 15 días, tal como de 3 a 7 días, de manera más ventajosa de 5 a 7 días después de la inoculación. La producción del virus se realiza según el conocimiento general de la persona experta en la materia en lo concerniente a la producción vírica. En esta fase se obtiene un cultivo en bruto del virus.

[0061] El medio de cultivo usado en esta invención puede estar suplementado con antibióticos.

[0062] Si fuera necesario, el virus, por ejemplo el virus del PRRS, se adapta al crecimiento en las células según la invención. La adaptación se puede realizar mediante co-cultivos en células según la invención y células de riñón de mono tal como MA-104. La adaptación se realiza como es bien sabido mediante el paso seriado sobre co-cultivos con cantidades que aumentan paulatinamente de células según la invención. Esta adaptación también se puede realizar para los virus de CPI-2, CAV-2, BHV-1, EHV-1; EHV-4, BRV, bPI-3 o BCV, así como otros virus mencionados en el presente documento.

[0063] El cultivo en bruto se puede concentrar y/o purificar.

[0064] La concentración se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento convencional conocido por una persona experta en la materia, por ejemplo, mediante precipitación selectiva o mediante ultrafiltración. La purificación se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento convencional conocido por una persona experta en la materia, por ejemplo, ultracentrifugación o procedimientos cromatográficos, por ejemplo, filtración en gel. En esta fase se obtienen cultivos de virus concentrados, cultivos purificados o cultivos concentrados y purificados.

[0065] En otro aspecto de la descripción, los cultivos de virus según la descripción (en bruto, concentrados, purificados o concentrados y purificados) se pueden inactivar con el uso de cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, un procedimiento térmico y/o químico. Un procedimiento ventajoso es la inactivación química, por ejemplo, usando beta-propiolactona, formalina, etilenimina o uno de sus derivados tal como etilenimina binaria (BEI) y combinaciones de estos compuestos inactivantes. En esta fase se obtienen cultivos de virus del PRRS inactivados.

[0066] En otro aspecto de la descripción, se pueden extraer fracciones inmunógenas como glicoproteínas o proteínas a partir del virus presente en los cultivos de virus según la descripción (en bruto, concentrados, purificados

o concentrados y purificados, opcionalmente inactivados). La extracción de las fracciones inmunógenas del virus se realiza según los conocimientos generales de la persona experta en la materia. En esta fase se obtienen preparaciones de virus subunitarias.

5 **[0067]** Así, otros aspectos de la descripción son los cultivos de virus en bruto descritos en el presente documento, los cultivos concentrados, los cultivos purificados, los cultivos concentrados y purificados, los cultivos inactivados, y las preparaciones subunitarias.

[0068] En una forma de realización ventajosa de la descripción, el virus virulento se puede atenuar con un número de pasos suficiente en células según la descripción. Una persona experta en la materia será capaz de determinar mediante experimentación rutinaria el número de pasos suficientes para la atenuación del virus. Se obtiene una preparación del virus atenuado.

15 **[0069]** También es un objeto de esta descripción proporcionar composiciones inmunógenas y vacunas para prevenir infecciones con el virus. Estas composiciones inmunógenas o vacunas comprenden al menos un cultivo o preparación como se describe en el presente documento.

[0070] El término "composición inmunógena" cubre en el presente documento cualquier composición capaz, una vez administrada a un animal, por ejemplo, un animal porcino, de desencadenar una respuesta inmunitaria frente al virus o antígeno o inmunógeno o epítipo. El término "vacuna" cubre en el presente documento cualquier composición capaz, una vez administrada a un animal, por ejemplo, un animal porcino, de inducir una respuesta inmunitaria protectora frente al virus, o para proteger eficazmente al animal frente a dicho virus.

[0071] Las composiciones inmunógenas o vacunas según la descripción pueden incluir el cultivo o la preparación de virus o un antígeno o un inmunógeno o un epítipo del virus, y al menos un inmunógeno, antígeno o epítipo de otro patógeno, u otro patógeno (por ejemplo, un patógeno inactivado o atenuado). Dicho inmunógeno, antígeno o epítipo puede ser, por ejemplo, de origen bacteriano, parásito o vírico o una forma inactivada o atenuada del patógeno. La descripción también comprende kits para preparar estas composiciones de combinación, así como procedimientos para la preparación de estas composiciones de combinación y el uso de los componentes de estas composiciones de combinación para preparar las composiciones de combinación. Por consiguiente, la descripción incluye un kit para la preparación de las composiciones inmunógenas o de vacuna de combinación de la descripción, por ejemplo, dicho kit que comprende (a) un organismo, patógeno o virus o uno de sus antígenos o epítipos (de manera ventajosa un virus como se ha mencionado en el presente documento) y (b) un organismo, patógeno o virus o uno de sus inmunógenos, antígenos o epítipos (de manera ventajosa un virus o uno de sus inmunógenos, antígenos o epítipos, pero también están contemplados otros patógenos como los que se han mencionado en el presente documento) que es diferente de (a), en contenedores separados, opcionalmente en el mismo envase, y opcionalmente con instrucciones para su mezcla y/o administración.

[0072] Las composiciones inmunógenas y/o vacunas según la descripción pueden incluir el cultivo o la preparación del virus del PRRS (por ejemplo, PRRSV inactivados o atenuados o uno de sus inmunógenos o antígenos o epítipos), y al menos un inmunógeno, antígeno o epítipo de otro patógeno porcino (incluyendo, sin limitación el patógeno en forma inactivada o atenuada). Este patógeno se puede seleccionar del grupo que incluye, pero no está limitado a, el virus de la pseudorrabia, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible (coronavirus), circovirus porcino como circovirus porcino de tipo 2, rotavirus, adenovirus porcino de tipo 3, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. De manera ventajosa las composiciones inmunógenas y vacunas según la descripción pueden incluir un cultivo o preparación del virus del PRRS y virus PAV-3 crecidos y propagados en células o líneas celulares según la descripción, por ejemplo, en la línea celular PTA-3930 o una línea celular que tenga todas sus características identificativas. Los inmunógenos de patógenos porcinos pueden incluir el virus de la pseudorrabia gB, el virus de la pseudorrabia gC, el virus de la pseudorrabia gD, la gripe porcina HA, la gripe porcina NA, la gripe porcina NP, el ORF4 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, el ORF7 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, el ORF5 del PRRSV, el ORF3 del PRRSV, el ORF6 del PRRSV, los marcos de lectura abiertos 5 (ORF5) y 6 (ORF6) del PRRSV, los marcos de lectura abiertos 5 (ORF5) y 3 (ORF3) y 6 (ORF6) del PRRSV, el virus del cólera porcino E1, el gen del virus del cólera porcino E2, parvovirus VP2, el ORF1 del circovirus porcino de tipo 2, o el ORF2 del circovirus porcino de tipo 2. Se hace referencia a las patentes de EE.UU. N° 6.517.843, 6.497.883, 6.391.314, 6.379.676, 6.217.883, 6.207.165 y las publicaciones de patente de EE.UU. 2003003112 y WO99/53047, WO99/08706, WO01/83737 y WO00/47756 para inmunógenos de patógenos porcinos, moléculas de ácidos nucleicos que los codifican y construcciones que expresan los mismos. Así, la

descripción también incluye procedimientos para la preparación de estas composiciones, así como sus kits.

[0073] Las composiciones inmunógenas y vacunas según la descripción pueden incluir cultivos o preparaciones del virus CPI-2 y/o CAV-2 (por ejemplo, CPI-2 y/o CAV-2 inactivados o atenuados o uno de sus inmunógenos o antígenos o epítomos), y al menos un inmunógeno, antígeno o epítomo de otro patógeno canino (incluyendo, sin limitación el patógeno en forma inactivada o atenuada). Este patógeno se puede seleccionar del grupo que incluye, pero no está limitado a, el virus del moquillo canino, parvovirus canino, coronavirus canino, herpesvirus canino, el agente infeccioso de la enfermedad de Lyme, *Borrelia burgdorferi* y el virus de la rabia. De manera ventajosa, las composiciones inmunógenas y vacunas según la descripción incluyen un cultivo o preparación del virus CPI-2 y/o un cultivo o preparación del virus CAV-2 según la descripción. Los inmunógenos de CPI-2 pueden ser CPI-2F y/o HN. Véase también las Patentes de EE.UU. N° 5.616.326, 6.090.393, 6.159.477, 6.228.846 relativas a inmunógenos de patógenos caninos y las moléculas de ácidos nucleicos que los codifican y construcciones que expresan los mismos. Así, la invención también incluye procedimientos de preparación de estas composiciones, así como sus kits.

[0074] Las composiciones inmunógenas y vacunas según la descripción pueden incluir cultivos o preparaciones del virus BHV-1, BRV, bPI-3 y/o BCV (por ejemplo, BHV-1, BRV, bPI-3 y/o BCV inactivados o atenuados o uno de sus inmunógenos o antígenos o epítomos), y al menos un inmunógeno, antígeno o epítomo de otro patógeno bovino (incluyendo, sin limitación el patógeno en forma inactivada o atenuada). Este patógeno se puede seleccionar del grupo que incluye, pero no está limitado a, el virus respiratorio sincitial bovino y el virus de la diarrea vírica bovina. De manera ventajosa, las composiciones inmunógenas y vacunas según la descripción incluyen al menos dos cultivos o preparaciones de virus según la descripción que comprenden el BHV-1, BRV, bPI-3 o BCV. Los inmunógenos del BRSV pueden ser BRSV F o G o N, como BRSV F y/o G o N y/o G. Los inmunógenos del BHV-1 pueden ser gB y/o gC y/o gD. Los inmunógenos del BVDV pueden ser la proteína E0 (gp48) y/o la proteína E2 (gp53). El BVDV puede ser de tipo 1 y/o tipo 2. Los inmunógenos del bPI-3 pueden ser bPI-3 F y/o HN. Véase también las Patentes de EE.UU. N° 6.451.770, 6.376.473, 6.224.878, en relación con los inmunógenos de patógenos bovinos y las moléculas de ácidos nucleicos que codifican para ellos y construcciones que expresan los mismos. Así, la descripción también incluye procedimientos para la preparación de estas composiciones, así como sus kits.

[0075] Las composiciones inmunógenas y vacunas según la descripción pueden incluir un cultivo o preparación del virus EHV-1 y/o EHV-4 (por ejemplo, EHV-1 y/o EHV-4 inactivados o atenuados o uno de sus inmunógenos o antígenos o epítomos), y al menos un inmunógeno, antígeno o epítomo de otro patógeno equino (incluyendo, sin limitación el patógeno en forma inactivada o atenuada). Este patógeno se puede seleccionar del grupo que incluye, pero no está limitado a, el virus de la gripe equina, el virus de la encefalomiелitis oriental (EEV), virus de la encefalomiелitis occidental (WEV), virus de la encefalomiелitis de Venezuela (VEV), agente infeccioso de la enfermedad de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, *Clostridium tetani*, virus de la arteritis equina (EAV) y el virus de la rabia. De manera ventajosa, las composiciones inmunógenas y vacunas según la descripción pueden incluir un cultivo o preparación del virus EHV-1 y un cultivo o preparación del virus EHV-4 según la descripción. Las glicoproteínas del EHV pueden ser gB, gD, gB+gD, gC, y gE. Se hace referencia a las Patentes de EE.UU. N° 6.207.166 y 6.368.603 para inmunógenos de patógenos equinos y las moléculas de ácidos nucleicos que codifican para ellos y construcciones que expresan los mismos. Así, la descripción también incluye procedimientos para la preparación de estas composiciones, así como sus kits.

[0076] Una composición inmunógena o vacuna según la descripción que también comprende dicho componente inmunógeno adicional (inmunógeno, antígeno o epítomo adicional) tiene la ventaja de que al mismo tiempo induce una respuesta inmunitaria o de protección frente a diversas infecciones o enfermedades o sus agentes causantes. Este componente inmunógeno adicional puede ser un microorganismo atenuado o inactivado, una construcción recombinante o subunidades (por ejemplo, proteínas, glicoproteínas, polipéptidos, o epítomos). En la práctica de la descripción se pueden usar procedimientos para la determinación de epítomos, tales como la generación de librerías peptídicas de solapamiento (Hemmer B. y col., Immunology Today, 1998,19 (4), 163-168), Pepscan (Geysen H. M. y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, 81 (13), 3998-4002; Geysen H. M. y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1985, 82 (1), 178-182; Van der Zee R. y col., Eur. J. Immunol., 1989, 19 (1), 43-47; Geysen H. M., Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 1990, 21 (4), 523-533; Multipin Peptide Synthesis Kits de Chiron) y de algoritmos (De Groot A. y col., Nature Biotechnology, 1999, 17, 533-561), para determinar epítomos de inmunógenos, antígenos, polipéptidos, glicoproteínas y similar, sin experimentación innecesaria. Con esa información, se pueden construir moléculas de ácidos nucleicos que codifican para dicho epítomo; y a partir de ese conocimiento y del conocimiento en la materia, se pueden construir vectores o construcciones, por ejemplo, virus o vectores o plásmidos recombinantes que expresan inmunógenos, epítomos o antígenos; todo ello sin experimentación

innecesaria.

[0077] Las composiciones inmunógenas o las composiciones de vacuna comprenden adicionalmente un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable, y opcionalmente un estabilizante y/o un adyuvante. Para la persona experta en la materia serán evidentes las formulaciones adecuadas. Las formulaciones se pueden desarrollar para cualquier vía de administración adecuada.

[0078] El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una disolución acuosa o salina.

10 **[0079]** Las composiciones inmunógenas inactivadas o las vacunas inactivadas comprenden de manera ventajosa al menos un adyuvante.

[0080] Los virus vivos atenuados se pueden crio-desechar, de manera ventajosa con un estabilizante. La crio-desección se puede llevar a cabo según procedimientos de crio-desección habituales muy conocidos. Los estabilizantes farmacéuticamente aceptables pueden ser SPGA (sacarosa, fosfato, glutamato y albúmina) (Bovarnik y col., J. Bacteriology, 1950, 59: 509), carbohidratos (por ejemplo sorbitol, manitol, lactosa, sacarosa, glucosa, dextrano, trehalosa), glutamato sódico (Tsvetkov T y col., Cryobiology 1983, 20(3): 318-23; Israeli E y col., Cryobiology 1993, 30(5): 519-23), proteínas como peptona, albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas tales como leche desnatada (Mills CK y col., Cryobiology 1988, 25(2): 148-52 ; Wolff E y col., Cryobiology 1990, 27(5): 569-75), y tampones (por ejemplo, tampón fosfato, tampón fosfato de un metal alcalino).

[0081] Para hacer solubles las preparaciones crio-desechadas se puede usar un adyuvante.

[0082] Ejemplos de adyuvantes son emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite en agua basadas en un aceite mineral y/o un aceite vegetal y tensioactivos no iónicos tales como copolímeros en bloque, Tween®, Span®. Otros adyuvantes adecuados son, por ejemplo, la vitamina E, saponinas, Carbopol®, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio u óxido de aluminio ("Vaccine Design, The subunit and adjuvant approach", Pharmaceutical Biotechnology, vol. 6, editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, 1995, Plenum Press, Nueva York). Los documentos citados en el presente documento también se pueden consultar en lo que respecta a adyuvantes, así como para excipientes, diluyentes, portadores y vehículos.

[0083] Otro aspecto de la presente descripción es un procedimiento de inmunización o un procedimiento de vacunación usando las composiciones inmunógenas o las composiciones de vacuna según la descripción, respectivamente.

[0084] El procedimiento incluye al menos una administración a un animal de una cantidad eficaz de la composición inmunógena o la vacuna según la descripción. El animal puede ser un macho, una hembra, una hembra preñada o una cría. Esta administración se puede llevar a cabo de manera notable por vía intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC) o por medio de administración intranasal u oral. La composición inmunógena o la vacuna según la descripción se puede administrar con una jeringuilla o con un aparato sin aguja (como por ejemplo, Pigjet o Biojector (Bioject, Oregón, EE.UU.)).

[0085] Para composiciones atenuadas las dosis de los virus u organismos o patógenos producidos en el nuevo cultivo celular pueden estar entre 10^3 aproximadamente y 10^7 aproximadamente CCID₅₀ (dosis infecciosa media de un cultivo celular), de manera ventajosa entre 10^4 aproximadamente y 10^6 aproximadamente CCID₅₀ y de manera más ventajosa de 10^5 aproximadamente CCID₅₀. Los volúmenes están entre 0,2 y 2,0 ml, de manera ventajosa en torno a 2,0 ml. Se pueden realizar una o más administraciones; por ejemplo, con dos inyecciones a un intervalo de 2-4 semanas, y de manera ventajosa con una dosis de recuerdo aproximadamente 3 semanas después la primera inyección.

[0086] Con las composiciones inactivadas del virus u organismo o patógeno producido en el nuevo cultivo celular, al animal se le pueden administrar 10^4 - 10^9 CCID₅₀ equivalentes (titulación antes de la inactivación), de manera ventajosa 10^5 - 10^8 CCID₅₀ equivalentes en una sola unidad de dosificación. El volumen de una sola unidad de dosificación puede estar entre 0,2 ml y 5,0 ml y de manera ventajosa entre 0,5 ml y 2,0 ml y de manera más ventajosa en torno a 2,0 ml. Se pueden realizar una o más administraciones; por ejemplo, con dos inyecciones a un intervalo de 2-4 semanas, y de manera ventajosa con una dosis de recuerdo aproximadamente 3 semanas después la primera inyección.

[0087] Con composiciones subunitarias, por ejemplo, a partir del virus o patógeno u organismo producido en

el nuevo cultivo celular, al animal se le pueden administrar de 5 µg a 500 µg aproximadamente, de manera ventajosa de 20 µg a 50 µg. Los volúmenes están entre 0,2 ml y 2,0 ml, de manera ventajosa en torno a 2,0 ml. Se pueden realizar una o más administraciones; por ejemplo, con dos inyecciones a un intervalo de 2-4 semanas, y de manera ventajosa con una dosis de recuerdo aproximadamente 3 semanas después la primera inyección.

5

[0088] Las composiciones según la descripción también se pueden administrar a otros mamíferos, por ejemplo, ratones o animales de laboratorio, por ejemplo para generar anticuerpos policlonales, o para preparar hibridomas para anticuerpos monoclonales.

10 **[0089]** Ahora se describirá la invención en profundidad por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Obtención de células de pulmón de la rata algodónera (CRL)

15

[0090] Tras su extracción de los animales sacrificados, los pulmones fueron colocados en medio de cultivo celular que contiene medio esencial mínimo F-15 (MEM F-15, Hyclone, cat #SH30024.02) y gentamicina a 30 µg/ml. Este medio fue suplementado con antibióticos comerciales (penicilina y estreptomycin) y antimicóticos (anfotericina B) a una concentración del 2% en v/v. Los pulmones se sometieron a digestión a 37°C en un tubo de centrífuga cónico de 50 ml que contiene 25 ml de una disolución de collagenasa (Sigma, cat # L-0130) y tripsina (Sigma, cat # T-8003) a una concentración de 1 mg/ml y una fuerza 1X (corresponde a una concentración de 2,5 mg/ml), respectivamente, en MEM F-15 que contiene gentamicina a 30 µg/ml. Después de una digestión de 30 minutos, se añadió suero fetal bovino (FBS) (BioWhittaker) a una concentración final del 10% en v/v. Después de la dispersión de las células con una pipeta y su clarificación, el sobrenadante que contiene las células disociadas se recogió y se puso en matraces de 25 cm² con medio MEM F-15 que contiene gentamicina a 30 µg/ml y suplementado con FBS a una concentración final del 10% en v/v.

Ejemplo 2: Cultivo de células CRL

30 **[0091]** Se usó una disolución de tripsina para enjuagar el FBS residual de una monocapa de células CRL confluentes obtenidas en el ejemplo 1. Las células recubiertas con el 0,1% (1X) de una mezcla de tripsina porcina con ácido etilendiamintetracético (EDTA) (JRH Biosciences, cat # 62244-79P) (3 ml para un matraz de 75 cm², 5 ml para un matraz de 150 cm²) se colocaron en una incubadora a 37°C y se controlaron cuidadosamente hasta que el desprendimiento de células se hubo completado. Las células se dispersaron con una pipeta y se recogieron 3 ml de suspensión celular. En ese momento, 1:4 de las células recogidas se cultivaron con medio de cultivo celular fresco que contiene MEM F-15, gentamicina a una concentración de 30 µg/ml y FBS a una concentración del 10% en v/v.

[0092] Se cultivaron células CRL a 37°C en incubadoras con una presión parcial de CO₂ del 5%. Una fracción de 1:4 de una monocapa confluyente alcanzó confluencia en 4 días aproximadamente, y una fracción de 1:8 produjo una monocapa confluyente en 7 días aproximadamente. Esto constituye un paso.

40 **[0093]** A continuación las células se propagaron desde el paso 2 al paso 76.

[0094] Después de la adición de dimetilsulfóxido (DMSO) crioprotector, se congelaron pequeños bancos en todos los pasos hasta el 76. Los bancos se almacenaron en nitrógeno líquido.

[0095] Las células CRL del paso 21 han sido depositadas en la American Type Culture Collection, con el número de acceso ATCC PTA-3930.

50 **Ejemplo 3: Propagación del virus del PRRS en las células CRL**

[0096] Se hizo uso de un virus del PRRS atenuado que sabe que se propaga en células de riñón de mono.

[0097] La propagación del virus del PRRS se realizó sobre una monocapa de células CRL en un matraz de 55 75 cm² (matraz T75) con 50 ml de medio de cultivo que contiene MEM F-15, gentamicina a una concentración de 30 µg/ml y FBS a una concentración del 10% en v/v. Antes de la inoculación vírica, las células se incubaron a 37°C durante 24 horas, hasta que alcanzaron confluencia. Después de la inoculación con 1 ml del virus del PRRS, las células inoculadas se incubaron a 37°C durante 5-7 días. El crecimiento del virus se verificó mediante pruebas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos (IFA) y la titulación del material sobrenadante. Después de

congelar/descongelar, el sobrenadante se recogió. Esto constituye un cultivo en bruto del virus del PRRS.

Pruebas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos (IFA)

- 5 **[0098]** Para la IFA, las células se sometieron a tripsinización, se dispersaron, se recogieron y se resuspendieron en medio MEM F-15 fresco que contiene gentamicina (a 30 µg/ml) y suplementado con FBS a una concentración del 10% en v/v. Las células se sembraron en placas para el cultivo de tejido tratadas de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se dejaron crecer hasta confluencia durante toda la noche. Se prepararon diluciones seriadas de 4 veces de los virus del PRRS. A continuación, se cargaron 100 µl o 200 µl del virus diluido en cada pocillo en una columna de la placa de 96 pocillos. La placa se puso en una incubadora a 37°C con el 5% de CO₂ durante 7 días. Se determinó los pocillos que contienen las células CRL infectadas mediante pruebas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos (IFA) con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el virus del PRRS (SDOW 17, obtenido de la USDA; Magar R. y col., Magar R. y col., Can J vet Res., 1995, 59(3): 232-4).

15 Caracterización del virus del PRRS crecido en el cultivo de CRL:

- [0099]** El virus del PRRS se tituló en una placa de 96 pocillos que contiene células CRL. La titulación se calculó utilizando el método de Spearman-Kärber para la determinación del punto final del 50%, y se presentó en una base por ml. Los resultados se expresan en Log₁₀ (FAID₅₀)/ml. El resultado de la titulación fue de 4,3 en Log₁₀ (FAID₅₀)/ml.

Ejemplo 4: Adaptación del virus del PRRS para el crecimiento en CRL y su propagación

- [0100]** El virus del PRRS NADC 8 se adaptó para crecer en células CRL. El NADC 8 se obtuvo del Centro Nacional de Enfermedades Animales (USDA).

- [0101]** El virus se propaga de forma secuencial en co-cultivos de células CRL y células MA-104 (células de riñón de mono verde africano, línea de células parentales de MARC-145) con una cantidad de células MA-104 que disminuye de manera creciente. Inicialmente, las células CRL se sembraron a una relación de 1:9 con las células MA-104 (20.000 células/ml de CRL por 180.000 células/ml de MA-104) a 37°C, MEM F-15 con hidrosilato de lactoalbúmina (LAH, a una concentración del 0,1% en v/v), gentamicina a una concentración de 30 µg/ml y FBS a una concentración del 10% en v/v. Cuando estos co-cultivos alcanzaron la confluencia, el virus del PRRS fue inoculado (1 ml por matraz T75) sin ningún tipo de reposición medio. El crecimiento del virus se comprobó mediante pruebas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos (IFA, como se describe en el ejemplo 3) y la titulación del material sobrenadante. Las células inoculadas se incubaron a 37°C durante 5-7 días. El paso incluye una congelación/descongelación, una cosecha del sobrenadante y una inoculación posterior de 1 ml de los sucesivos co-cultivos en el matraz T75, es decir, aproximadamente el 10% del sobrenadante recogido.

- [0102]** Esto se repite por el paso del inóculo en co-cultivos de CRL:MA-104 a relaciones de 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, y 9:1, respectivamente. Por último, el virus se cultiva en un matraz T75 en una monocapa compuesta únicamente por las células CRL con 50 ml de medio de cultivo que contiene MEM F-15, gentamicina a una concentración de 30 µg/ml y FBS a una concentración del 10% en v/v (es decir, sin LAH). Las células CRL inoculadas se incubaron a 37°C durante 5-7 días. Después de la congelación/descongelación, el sobrenadante se recogió. Esto constituye un cultivo en bruto del virus del PRRS.

- [0103]** El IFA demostró que el NADC 8 había infectado las células CRL.

Caracterización del virus del PRRS crecido en el cultivo de CRL:

- 50 **[0104]** La cepa NADC 8 del virus del PRRS se tituló en una placa de 96 pocillos que contiene células CRL. El cultivo se realizó como se ha descrito anteriormente. La titulación se calculó usando el método de Spearman-Kärber para la determinación del punto final del 50%, y se presentó en una base por ml. Los resultados se expresan en Log₁₀ (FAID₅₀)/ml.

- 55 **[0105]** El resultado de la titulación fue de 4,12 en Log₁₀ (FAID₅₀)/ml.

- [0106]** Se pueden adaptar otros virus, como otros virus del orden Nidovirales, por ejemplo, arterivirus o virus de la familia *Arteriviridae*, el virus que eleva la lactato deshidrogenasa (LDV), el virus de la arteritis equina (EAV), el virus de la fiebre hemorrágica de simio (SHFV), virus de la familia *Coronaviridae*, por ejemplo, coronavirus tales

como el virus de la bronquitis infecciosa, coronavirus canino, coronavirus felino, coronavirus humano 229E, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, virus de la gastroenteritis transmisible porcina, virus respiratorio porcino, coronavirus bovino, coronavirus humano OC43, virus de la hepatitis murina, virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina, coronavirus de rata, virus de la sialodacrioadenitis, virus de la bronquitis infecciosa aviar, coronavirus de pavo, coronavirus de conejo, Torovirus como torovirus equino, torovirus porcino, torovirus humano, torovirus bovino y otros virus cuyo hospedador natural no es un roedor o una rata o la rata algodónera, para crecer en células de pulmón de la rata algodónera, de manera ventajosa las células de pulmón de la rata algodónera o la línea celular de la descripción (por ejemplo, aquéllas depositadas), empleando técnicas descritas en el presente documento o técnicas análogas a las descritas en el presente documento con respecto al PRRS.

Ejemplo 5: Procedimiento de inactivación

[0107] Se recogió el virus del PRRS propagado en CRL (ejemplo 3 ó 4). La suspensión vírica se sometió a sonicación a una temperatura de 5°C aproximadamente. La suspensión vírica se filtró a través de una membrana con una porosidad de 50-100 µm a 5°C aproximadamente.

[0108] Se añadió beta-propiolactona a la suspensión vírica a la concentración final de 1/3000 (v/v). Después de homogeneizar por agitación, la suspensión se transfiere a otro matraz estéril.

[0109] La inactivación se lleva a cabo en agitación durante 24 horas a 5°C aproximadamente. El pH se regula a 7,2 aproximadamente con la adición de NaOH 1 M.

[0110] La suspensión del virus inactivado se concentra por ultrafiltración en 50 veces aproximadamente. La suspensión vírica concentrada se almacena a - 40°C.

Ejemplo 6: Preparación de la vacuna inactivada en forma de emulsión a base de aceite mineral

[0111] La vacuna se prepara con el virus del PRRS inactivado obtenido en el ejemplo 5 (después de la descongelación y dilución) y según la siguiente fórmula:

- Suspensión del virus del PRRS inactivado:	167 ml
- Fase oleosa:	83 ml

[0112] La fase oleosa tiene el 7% de peso en volumen (p/v) de oleato de anhidromannitol, el 8% de p/v de ácido oleico etoxilado (11 óxidos de etileno) y el 85% de v/v de aceite de parafina líquida ligera (de acuerdo con la Farmacopea Europea).

[0113] La fase acuosa y la fase oleosa se esterilizan por separado por filtración. La emulsión se prepara mezclando y homogeneizando los principios con la ayuda de un emulsionante de turbina Silverson.

[0114] Una dosis de vacuna contiene aproximadamente $10^{7.5}$ CCID₅₀ (títulos antes de la inactivación). El volumen de una dosis de vacuna es de 2,0 ml para la administración por vía intramuscular.

Ejemplo 7: Propagación de los virus en las células CRL

[0115] Las disoluciones madre del virus usadas de manera rutinaria en ensayos como virus de referencia para los que hay disponibles reactivos de anticuerpos fluorescentes (FA) se titularon usando células CRL. Debido a que estos virus de referencia se han titulado de manera rutinaria usando líneas celulares patrón, cada uno tiene una titulación de referencia con diversos grados de variación. Se usaron diluciones de 10 veces o 4 veces de estos virus de referencia para inocular las células CRL en un formato de 96 pocillos usando el procedimiento de titulación patrón para cada virus. Después de 7 días de incubación, las placas se fijaron con acetona y se tiñeron con los reactivos FA apropiados. Los títulos de los cultivos positivos en fluorescencia se compararon con los títulos obtenidos en los cultivos celulares patrón. Los resultados se presentan a continuación:

Virus de referencia	Título/CRL	Título/Línea celular patrón
Parainfluenza canino de tipo 2 (CPI-2)	4,96	5,6 en células MDCK
Adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2)	1,72	5,8 en células MDCK
Herpesvirus bovino de tipo 1 (BHV-1)	3,64	7,1 en células MDBK
Herpesvirus equino de tipo 1 (EHV-1)	5,74	Título no determinado
Herpesvirus equino de tipo 4 (EHV-4)	5,44	6,13 en células Vero
Rotavirus bovino (BRV)	5,32	6,0 en células MA-104
Parainfluenza bovina tipo 3 (bPI-3)	6,46	7,0 en células MDBK
Coronavirus bovino (BCV)	3,52	4,79 en células MDBK
Síndrome Reprod. y Respir. Porcino (PRRSV)	5,22	5,34 en células MARC-145

[0116] Los títulos del virus se expresan en log10 de la dosis infecciosa del cultivo celular 50 por mililitro (log10 CCID₅₀/ml)

[0117] Aunque en cada caso, los títulos generados por el ensayo basado en CRL fue inferior que el de la línea celular patrón, hay que destacar que estos virus no han experimentado el proceso de adaptación celular al utilizar células CRL que presenta el virus de referencia con la línea celular patrón. Ésta fue sólo una prueba para detectar la replicación vírica. En otras palabras, con un poco de esfuerzo, es probable que la concentración de virus vivos cultivados en células CRL se pueda mejorar hasta un grado que sería equivalente o mejor que la concentración de virus crecidos en líneas celulares para las cuales estaba adaptado. Esto se demuestra por el PRRS adaptado a CRL (ejemplo 4) cuyos títulos de la misma dilución seriada de virus fueron de 5,22 y 5,34 (log10 CCID₅₀/ml) cuando se utilizaron células CRL y células MARC-145 (un subclón sensible de células MA-104), respectivamente. Esta diferencia en el título es insignificante.

[0118] Para fines de referencia, en la descripción se incluyen los siguientes párrafos numerados:

1. Un procedimiento de producción del virus del PRRS, en el que se prepara un cultivo de células de pulmón de la rata algodónera y se propaga el virus del PRRS en este cultivo de células.
2. El procedimiento según el párrafo 1, en el que el cultivo de células comprende células epiteliales.
3. Un procedimiento de producción del virus del PRRS, en el que se prepara un cultivo de células de una línea celular de pulmón de la rata algodónera y se propaga un virus del PRRS en este cultivo.
4. El procedimiento según el párrafo 3, en el que el cultivo comprende las células epiteliales.
5. Un procedimiento de producción del virus del PRRS, en el que se prepara un cultivo de células epiteliales de pulmón de la rata algodónera y se propaga el virus del PRRS en este cultivo de células.
6. Un procedimiento de producción del virus del PRRS, en el que se prepara un cultivo de células a partir de una línea de células epiteliales de pulmón de la rata algodónera y se propaga el virus del PRRS en esta línea celular.
7. El procedimiento según el párrafo 3 ó 6, en el que la línea celular es la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-3930, o una línea celular de pulmón de la rata algodónera que tiene todas las características identificativas de la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-3930.
8. El procedimiento según el párrafo 7, en el que la línea celular es la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-3930.
9. El procedimiento según cualquiera de los párrafos 1 a 8, en el que el virus del PRRS es un virus del PRRS virulento.
10. El procedimiento según cualquiera de los párrafos 1 a 8, en el que el virus del PRRS es un virus del PRRS atenuado.
11. El procedimiento según cualquiera de los párrafos 1 a 8, en el que se propaga el virus del PRRS en las células, y

se recupera un cultivo en bruto del virus del PRRS.

12. El procedimiento según cualquiera de los párrafos 1 a 8, en el que se propaga el virus del PRRS en las células, se recupera el virus del PRRS que da lugar a un cultivo en bruto del virus del PRRS, y este cultivo en bruto se
5 somete a purificación que da lugar a un cultivo purificado del virus del PRRS.

13. El procedimiento según cualquiera de los párrafos 1 a 8, en el que se propaga el virus del PRRS en las células, se recupera el virus del PRRS que da lugar a un cultivo en bruto del virus del PRRS, y este cultivo en bruto se
10 somete a concentración que da lugar a un cultivo concentrado del virus del PRRS.

14. El procedimiento según cualquiera de los párrafos 1 a 8, en el que se propaga el virus del PRRS en las células, se recupera el virus del PRRS que da lugar a un cultivo en bruto del virus del PRRS, y este cultivo en bruto se
somete a concentración y purificación que da lugar a un cultivo concentrado y purificado del virus del PRRS.

15. El procedimiento según el párrafo 11, en el que se inactiva el cultivo en bruto.

16. El procedimiento según el párrafo 12, en el que se inactiva el cultivo purificado.

17. El procedimiento según el párrafo 13, en el que se inactiva el cultivo concentrado.

19. El procedimiento según el párrafo 14, en el que se inactiva el cultivo concentrado y purificado.

20. El procedimiento según el párrafo 15, 16, 17 ó 18, en el que el cultivo se inactiva con un agente químico.

21. El procedimiento según el párrafo 19, en el que el agente químico se selecciona entre el grupo formado por beta-propiolactona, formol, etilenimina y etilenimina binaria.

22. El procedimiento según el párrafo 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 en el que el cultivo se trata con el fin de recuperar sub-unidades del PRRS.

23. El procedimiento según el párrafo 9, en el que el virus del PRRS se propaga en las células y se recupera un virus del PRRS atenuado.

24. Un virus del PRRS o el cultivo del virus del PRRS obtenido después de la propagación del virus del PRRS en las
35 células de pulmón de la rata algodонера.

25. Un virus del PRRS o el cultivo del virus del PRRS obtenido después de la propagación del virus del PRRS en la línea celular de pulmón de la rata algodонера.

26. El virus del PRRS o el cultivo del virus del PRRS según el párrafo 23 ó 24, en el que las células son células epiteliales.

27. El virus del PRRS o el cultivo del virus del PRRS según el párrafo 23 ó 24, en el que las células comprenden células epiteliales.

28. El virus del PRRS o el cultivo del virus del PRRS según el párrafo 25, en el que la línea celular es la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-3930 o una línea celular de pulmón de la rata algodонера que tiene todas las características identificativas de la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso
50 PTA-3930.

29. El virus del PRRS o el cultivo del virus del PRRS según el párrafo 25, en el que la línea celular es la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-3930.

30. Un virus del PRRS o el cultivo del virus del PRRS obtenido llevando a cabo el procedimiento de cualquiera de los
55 párrafos 1 a 20 ó 22.

31. El virus del PRRS o el cultivo del virus del PRRS según cualquiera de los párrafos 23 a 28, que está inactivado.

32. El virus del PRRS o el cultivo del virus del PRRS según cualquiera de los párrafos 23 a 28, que está atenuado.

33. Una preparación sub-unitaria del virus del PRRS obtenida llevando a cabo el procedimiento del párrafo 21.
34. Una composición inmunógena que comprende un virus del PRRS o el cultivo del virus del PRRS según cualquiera de los párrafos 23 a 31, y un excipiente, diluyente o vehículo veterinario aceptable.
35. Una composición inmunógena que comprende una preparación sub-unitaria del virus del PRRS según el párrafo 32, y un excipiente, diluyente o vehículo veterinario aceptable.
36. La composición inmunógena del párrafo 33 que adicionalmente comprende un estabilizante.
37. La composición inmunógena del párrafo 33 ó 34 ó 35 que adicionalmente comprende un adyuvante.
38. Una composición inmunógena que comprende un cultivo del virus del PRRS obtenido por el procedimiento según el párrafo 1.
39. Una composición inmunógena que comprende un cultivo del virus del PRRS obtenido por el procedimiento según el párrafo 3.
40. Una composición inmunógena que comprende un cultivo del virus del PRRS obtenido por el procedimiento según cualquiera de los párrafos 1 a 22.
41. Una vacuna que comprende un cultivo del virus del PRRS obtenido por el procedimiento según el párrafo 1.
42. Una vacuna que comprende un cultivo del virus del PRRS obtenido por el procedimiento según el párrafo 3.
43. Una vacuna que comprende un cultivo del virus del PRRS obtenido por el procedimiento según cualquiera de los párrafos 1 a 22.
44. Una vacuna que comprende un virus del PRRS o el cultivo del virus del PRRS según cualquiera de los párrafos 23 a 31, y un excipiente, diluyente o vehículo veterinario aceptable.
45. Una vacuna que comprende una preparación sub-unitaria del virus del PRRS según el párrafo 32, y un excipiente, diluyente o vehículo veterinario aceptable.
46. La vacuna del párrafo 43 que adicionalmente comprende un estabilizante.
47. La vacuna del párrafo 43 ó 44 ó 45 que adicionalmente comprende un adyuvante.
48. Un procedimiento de inmunización de un animal porcino que comprende la administración a los animales porcinos de una composición inmunógena según cualquiera de los párrafos 33 a 39.
49. Un procedimiento de vacunación de animales porcinos que comprende la administración a los animales porcinos de una vacuna según cualquiera de los párrafos 40 a 46.
50. La línea celular de pulmón de la rata algodónera depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-3930 o una línea celular de pulmón de la rata algodónera que tiene todas las características identificativas de la línea celular depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-3930.
51. La línea celular de pulmón de la rata algodónera depositada en la ATCC con el número de acceso PTA-3930.

[0119] Habiendo descrito en detalle las formas de realización preferidas de la presente invención, se entiende que la invención definida por los párrafos anteriores no se limita a los detalles específicos, establecidos en la descripción anterior.

REIVINDICACIONES

1. La línea celular de la rata algodónera depositada en la American Type Culture Collection con el número de acceso ATCC PTA-3930.
5
2. Un procedimiento para producir un virus que comprende la propagación del virus en células de pulmón de la rata algodónera, en la que el virus es el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) y en el que las células de pulmón de la rata algodónera son las células de la línea celular de la rata algodónera ATCC PTA-3930.
10
3. El procedimiento según la reivindicación 2 en el que dicho procedimiento comprende adicionalmente la etapa de cosecha de los virus resultantes.
4. El procedimiento según la reivindicación 2 ó 3 en el que el virus PRRS está adaptado para crecer en
15 las células de la rata algodónera por co-cultivo con células de riñón de mono.
5. El uso de células de pulmón de la rata algodónera para la propagación del virus de PRRS en el que las células de pulmón de la rata algodónera son las células de la línea celular de la rata algodónera ATCC PTA-3930.
20
6. Un cultivo que comprende el PRRSV y células de pulmón de la rata algodónera en el que las células de pulmón de la rata algodónera son las células de la línea celular de la rata algodónera ATCC PTA-3930.
7. El cultivo según la reivindicación 6 en el que dicho cultivo está inactivado.
25
8. Un kit que comprende el PRRSV y células de pulmón de la rata algodónera en el que las células de pulmón de la rata algodónera son las células de la línea celular de la rata algodónera ATCC PTA-3930.
9. El kit según la reivindicación 8 en el que dichas células y el virus se encuentran en contenedores
30 separados.
10. El kit según la reivindicación 8 ó 9 en el que los contenedores están separados en el mismo envase.
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, el uso según la reivindicación 5, el
35 cultivo según la reivindicación 6 ó 7, o el kit según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en el que dicho PRRSV es un virus atenuado.