

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 637**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**C07K 14/08** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09783067 .3**

96 Fecha de presentación: **16.09.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2324112**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2011**

54 Título: **Pestivirus mutante con mutaciones en el gen de núcleo y la región NS3**

30 Prioridad:  
**17.09.2008 EP 08164496**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.09.2012**

73 Titular/es:  
**Intervet International B.V.  
Wim de Körverstraat 31  
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:  
**THIEL, Heinz-Jurgen;  
RUEMENAPF, Hans Tillmann y  
HEIMANN, Manuela**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

**ES 2 387 637 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Pestivirus mutante con mutaciones en el gen de núcleo y la región NS3

5 La presente invención se refiere a pestivirus mutantes y a vacunas que contienen dichos virus. Los pestivirus causan enfermedades económicamente importantes en los animales en todo el mundo. El género pestivirus, dentro de la familia Flaviviridae, comprende al menos tres especies: virus de la diarrea vírica bovina (VDVB), virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) y virus de la enfermedad de Borna (VEB) ovina. Se ha descrito la presencia de un cuarto grupo separado de pestivirus que comprende cepas aisladas de ganado vacuno y ovejas, y ahora se acepta generalmente para referirse a esta especie adicional como VDVB-2; por consiguiente, las cepas de VDVB clásico se llaman VDVB-1.

10 El VFPC produce fiebre porcina clásica en cerdos. La fiebre porcina clásica es una enfermedad de los cerdos altamente contagiosa y algunas veces mortal y puede producir considerables pérdidas económicas.

15 Los animales pueden protegerse contra el VFPC por vacunación; sin embargo, las vacunas vivas inactivadas o modificadas convencionales tienen desventajas en lo referente a la seguridad, además de la eficacia. Por tanto, deben desarrollarse tipos mejorados de vacunas.

20 El virus de la diarrea vírica bovina (VDVB) es una causa de enfermedad congénita y entérica con un amplio intervalo de manifestaciones clínicas. La enfermedad se describió por primera vez como una enfermedad transmisible de ganado vacuno con una alta morbilidad y baja mortalidad. El ganado vacuno afectado mostró temperatura elevada, diarrea y tos. La afección se llamó diarrea vírica bovina. Hoy en día, el VDVB se considera que es un patógeno importante de ganado vacuno con un impacto económico mundial. El patrón clínico de infección por el VDVB dentro de un rebaño y, por consiguiente, su impacto sobre la producción, dependen de la interacción de varios factores, que incluyen la cepa del virus, edad del ganado vacuno, inmunidad en el rebaño e interacción de factores estresantes. VDVB-1 y VDVB-2 producen ambas infecciones agudas en ganado vacuno (diarrea, fiebre, síndrome hemorrágico), además de (si la infección se produce durante el embarazo) aborto, malformación del feto e infección persistente de los terneros.

30 El genoma de los pestivirus consiste en una única cadena de (+)ARN y contiene un único marco de lectura abierto (ORF) grande, flanqueado por una 5' UTR y una 3' UTR. El ORF codifica una poliproteína precursora grande que da lugar a 11 a 12 productos de escisión. El ORF se procesa en las diversas proteínas víricas por proteasas celulares, además de víricas. Las proteínas víricas en el ORF están dispuestas en el orden: NH<sub>2</sub>-Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. Los viriones de pestivirus consisten en cuatro proteínas estructurales, la proteína de núcleo pequeña positivamente cargada (C), que se supone que junto con el genoma del ARN forma una estructura de nucleocápside, y tres proteínas de la envuelta glicosiladas (Erns, E1, E2). La actividad neutralizante se demostró predominantemente para anticuerpos específicos para E2.

40 Los requisitos mínimos para la replicación de pestivirus se investigaron, por ejemplo, creando genomas de pestivirus defectuosos que carecían de secuencias génicas para las proteínas estructurales. Se encontró que los genomas de VFPC defectuosos todavía se replicaban y podían encapsidarse en partículas víricas cuando se introdujeron en células SK-6 junto con ARN de A187-CAT auxiliar (Moser y col., J. Virol., 7787-7794, 1999). Se había descrito un genoma de VDVB autónomamente replicante, pero defectuoso, que carecía de los genes que codifican C, Erns, E1, E2, p7 y NS2 (Behrens y col., J. Virol., 72, 2364-2372, 1998). Los mutantes de delección C y E1 complementados en trans de otro pestivirus, VDVB, se describieron por Beer y col. en el documento WO04/016794.

50 Para VFPC se ha demostrado que los mutantes muestran atenuación vírica. Por ejemplo, Risatti y col., Virology 364, 371-382, 2007, describe mutantes de VFPC con sustituciones en la región E2 que mostraron un fenotipo atenuado. Maurer y col., Vaccine, 23(25), 3318-28, 2005 también describen mutantes de E2 del VFPC que carecen de todo o parte del gen E2 que mostró protección parcial contra la exposición letal a VFPC altamente virulento. Meyers y col., Journal of Virology, 73(12), 10224-10235, 1999, describen mutantes de VFPC con mutaciones en el gen que codifica la proteína Erns que conducen a mutaciones. Los mutantes de delección Erns complementados en trans de VFPC se describieron por Wildjoatmodjo y col., J. Virol., 74(7), 2973-80, 2000.

55 La presente invención proporciona mutantes de pestivirus que tienen una delección en el gen que codifica la proteína de núcleo, haciendo que el virus no pueda expresar una proteína de núcleo funcional, en los que el virus se caracteriza adicionalmente porque contiene una o más mutaciones en el dominio del extremo C del dominio helicasa de NS3 que compensan la falta de una proteína de núcleo funcional.

60 Preferentemente, el pestivirus mutante según la presente invención es un virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) o un virus de la diarrea vírica bovina (VDVB).

65 La mutación en la región del gen que codifica la proteína de núcleo es tal que no puede expresar proteína de núcleo funcional. Esto puede lograrse delecionando el gen que codifica la proteína de núcleo por completo o en parte.

La secuencia señal en el extremo C de la proteína de núcleo es esencial para otro procesamiento de la poliproteína en la dirección 3'. Por tanto, en la delección (de parte) del gen de núcleo debe tenerse cuidado de que se retengan las secuencias señal de translocalización para Erns.

5 La secuencia de translocalización es un estiramiento de 18 aminoácidos localizado entre los aminoácidos 250 y 267, precediendo el sitio de escisión antes del extremo N de la proteína Erns de VFPC (Ala-267/Glu-268). (Rümenapf y col., J. Virol., 65(2), 589-597, 1991; Rümenapf y col., J. Virol., 67(6), 3288-3294, 1993). Para VDVB, el sitio de escisión antes del extremo N de la proteína Erns es Gly-270/Glu-271.

10 La longitud exacta de las secuencias necesarias para el procesamiento en la dirección 3' puede variar por cepa o tipo de célula. Por ejemplo, para VFPC, la secuencia codificante de núcleo puede delecionarse del aminoácido 169-248 (p619), fusionándose así el extremo C de Npro hasta los aminoácidos del extremo C de la proteína de núcleo que constituyen la señal de translocalización para Erns (CPLWVTSC<sub>168</sub>/LEKALLAWAVITILLYQPVA<sub>267</sub>/ENIT).

15 Para VDVB, la secuencia codificante de núcleo puede delecionarse a partir del aminoácido 169-251, fusionándose así el extremo C de Npro hasta los aminoácidos del extremo C de la proteína de núcleo que constituyen la señal de translocalización para Erns de VDVB (CPLWVSSC<sub>168</sub>/LEKALLAWAIIALVFFQVTMG<sub>270</sub>/ENIT). La delección de gran parte del gen de núcleo permitió la replicación del ARN después de la transfección, pero no se produjo progenie de virus infecciosos.

20 Con la presente invención se ha encontrado que la ausencia de un gen que codifica una proteína de núcleo funcional puede compensarse por mutaciones en la región NS3 del genoma vírico.

La introducción de estas mutaciones en una copia de ADNc de pestivirus en la que se delecionó el gen de núcleo (como se ha descrito anteriormente) permitió la recuperación de virus infecciosos.

25 Las mutaciones en la región NS3 se agrupan en el dominio del extremo C del dominio helicasa de NS3, más específicamente dentro de los 100 aminoácidos del dominio del extremo C.

30 Para VFPC se identificaron siete mutaciones independientes en el dominio del extremo C del dominio helicasa de la región de la región NS3 (aminoácidos 2160 - 2260).

Los virus de FPC mutantes preferidos según la invención tienen una o más mutaciones en el dominio del extremo C del dominio helicasa de NS3, seleccionados del grupo que consiste en Asn<sub>2177</sub>Tyr, Glu<sub>2160</sub> Gly, Pro<sub>2185</sub>Thr/Ala, Gln<sub>2189</sub>Lys, Pro<sub>2200</sub>Thr y Asn<sub>2256</sub>Asp.

35 La introducción de la mutación Asn<sub>2177</sub>Tyr en el núcleo de VFPC Δ (p619) y la electroporación del ARNc condujo a la sorprendente liberación de partículas de virus infecciosos viables. El ARN genómico apareció ligeramente reducido en tamaño en análisis de transferencia Northern y partículas de virus concentradas no contuvieron proteína de núcleo. Los títulos de virus alcanzaron hasta 5x10<sup>5</sup> ufc/ml en células SK6 y, por tanto, fueron aproximadamente 10 veces menores que los títulos de p447 wt. A continuación, las otras mutaciones Glu<sub>2160</sub> Gly, Pro<sub>2185</sub>Ala, Gln<sub>2189</sub>Lys, Pro<sub>2200</sub>Thr y Asn<sub>2256</sub>Asp se introdujeron en el núcleo de VFPC Δ (p619) dando lugar a p1033 (Ala<sub>2185</sub>), p1034 (Thr<sub>2200</sub>), p1035 (Lys<sub>2189</sub>), p1036 (Asp<sub>2256</sub>), p1037 (Gly<sub>2160</sub>) y p1038 (Asp<sub>2256</sub>). En todos los casos, el virus se recuperó después de la electroporación de los transcritos de SP6 respectivos, pero la viabilidad se diferenció significativamente (análisis de curvas de crecimiento). El más viable fue el genoma que contenía el intercambio

40

45 Asn<sub>2177</sub>Tyr.

Por tanto, lo más preferido es un VFPC mutante según la invención en el que la mutación en el dominio del extremo C del dominio helicasa de NS3 comprenda la mutación Asn<sub>2177</sub>Tyr.

50 Para estudiar si estas mutaciones tienen un efecto aditivo se combinaron los mutantes de compensación más fuertes. Para mutaciones dobles, Asn<sub>2177</sub>Tyr se combinó con Glu<sub>2160</sub> Gly, Pro<sub>2185</sub>Ala, Gln<sub>2189</sub>Lys, Pro<sub>2200</sub>Thr y Asn<sub>2256</sub>Asp. Las mutaciones triples contuvieron Asn<sub>2177</sub>Tyr, junto con Pro<sub>2185</sub>Ala y Pro<sub>2200</sub>Thr, Pro<sub>2185</sub>Ala y Gln<sub>2189</sub>Lys, Gln<sub>2189</sub>Lys y Pro<sub>2200</sub>Thr y Glu<sub>2160</sub> Gly y Gln<sub>2189</sub>Lys. Todas las combinaciones probadas mostraron una variabilidad reducida en comparación con las mutaciones individuales, que indican que la adición de mutación posibilitante mejora NS3 en la compensación del núcleo.

55

Aunque no fueron evidentes diferencias físicas o fenotípicas para el VFPC wt parental, el núcleo de VFPC Δ fue altamente atenuado en el huésped natural. Por tanto, los virus mutantes según la invención son adecuados para su uso en vacunas para proteger cerdos contra infección por el VFPC.

60 Para VDVB se identificaron ocho mutaciones independientes en el dominio del extremo C del dominio helicasa de la región de la región NS3 (aminoácidos 2169 - 2269).

65 Los virus de DVB mutantes preferidos según la invención tienen una o más mutaciones en el dominio del extremo C del dominio helicasa de NS3, seleccionados del grupo que consiste en Glu<sub>2188</sub>Lys, Leu<sub>2190</sub>Pro, Thr<sub>2191</sub>Ala, Asp<sub>2192</sub> Glu, Pro<sub>2194</sub>Leu, Tyr<sub>2204</sub>His, Asn<sub>2265</sub>Tyr, Asn<sub>2265</sub>Asp.

El más preferido es un VDVB mutante según la invención en el que la mutación en el dominio del extremo C del dominio helicasa de NS3 comprende la mutación Asp<sub>2192</sub> Glu, Tyr<sub>2204</sub>His, Asn<sub>2265</sub> Tyr o Asn<sub>2265</sub>Asp.

La proteína de núcleo es evidentemente no esencial para la formación de partículas infecciosas. Evidentemente, C no se requiere para el ensamblaje de pestivirus, pero proporciona otras funciones. Su función es compensada por mutaciones en el dominio helicasa de NS3. La secuencia exacta de los aminoácidos residuales de la proteína de núcleo que cubren la señal de translocalización (LEKALLAWAVITILLYQPVA<sub>268</sub>) para Erns de VFPC o (LEKALLAWAIIALVFFQVTMG<sub>270</sub>) para Erns de VDVB (englobando la secuencia la distancia entre el extremo C de Npro y el extremo N de Erns) no se requiere para la formación de partículas de virus infecciosas en tanto que se mantenga la translocalización de Erns. La secuencia señal de una glicoproteína sin relacionar puede sustituir funcionalmente la secuencia auténtica. Es viable una construcción en la que los aminoácidos residuales del núcleo han sido enteramente sustituidos por una señal de translocalización CD46 del extremo N (CD46 sólo sirve como un ejemplo para una proteína celular translocalizada). Si se introdujo el dominio transmembrana de CD46 bovino (SSGRSPGWLLLAPLLLLPTSSDA), el virus viable se recuperó alcanzando títulos de  $2 \times 10^4$  uff/ml.

La propagación de pestivirus en ausencia del núcleo abre la oportunidad a una vacuna de marcador de pestivirus. Puede esperarse que los anticuerpos dirigidos contra la proteína de núcleo estén presentes en los sueros de animales que han vencido una infección con pestivirus. El núcleo es inmunogénico y se expresa en cantidades significativas.

Una vacuna que contiene partículas víricas infecciosas según la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable es asimismo parte de la presente invención.

EJEMPLOS:

#### **Ejemplo 1: Construcciones de delección de núcleo**

Para probar la hipótesis de que las sustituciones en NS3 compensan una proteína de núcleo inutilizada, los cambios de nucleótidos se introdujeron en un ADNc de VFPC infeccioso en que la secuencia codificante del núcleo (aa 169 - 248 (SDDGASG - KPPESTRKKL) se delecionó (p619). Por tanto, el extremo C de Npro está fusionado con los aminoácidos del extremo C del núcleo que constituye la señal de translocalización para Erns (CPLWVTSC<sub>169</sub>/LEKALLAWAVITILLYQPVA<sub>267</sub>/ENIT). La delección de la mayoría del gen de núcleo permitió la replicación del ARN después de la transfección, pero no se produjo progenie de virus infeccioso. La introducción de la mutación Asn<sub>2177</sub>Tyr en el núcleo de VFPC  $\Delta$  y la electroporación del ARN condujo a la sorprendente liberación de partículas de virus infecciosas viables. El ARN genómico apareció ligeramente reducido en tamaño en el análisis de transferencia Northern y partículas de virus concentradas no contuvieron proteína de núcleo. Los títulos de virus alcanzaron hasta  $5 \times 10^5$  uff/ml en células SK6 y, por tanto, fueron aproximadamente 10 veces menores que los títulos de p447 wt. A continuación, las otras mutaciones Glu<sub>2160</sub> Gly, Pro<sub>2185</sub>Ala, Gln<sub>2189</sub>Lys, Pro<sub>2200</sub>Thr y Asn<sub>2256</sub>Asp se introdujeron en el núcleo de VFPC  $\Delta$  (p619) dando lugar a p1033 (Ala<sub>2185</sub>), p1034 (Thr<sub>2200</sub>), p1035 (Lys<sub>2189</sub>), p1036 (Asp<sub>2256</sub>), p1037 (Gly<sub>2160</sub>) y p1038 (Asp<sub>2256</sub>). En todos los casos, el virus se recuperó después de la electroporación de los transcritos de SP6 respectivos, pero la viabilidad se diferenció significativamente. El más viable fue el genoma que contenía el intercambio Asn<sub>2177</sub>Tyr ("VFPC 1017 Core  $\Delta$ " mutante). La proteína de núcleo es evidentemente no esencial para la formación de partículas infecciosas. Su función es compensada por mutaciones en el dominio helicasa de NS3.

Para evaluar si la compensación de un núcleo ausente por mutaciones en NS3 también se aplica a VDVB, la secuencia codificante del núcleo del clon de ADNc de VDVB NCP7 (número de acceso GeneBank AF220247) se eliminó por PCR en un subclon que contenía el fragmento XhoI/BglIII (nt 222 - 2335) usando cebadores BVT86 (GCAGCTTGAAACCCATAGGGGGCAG) y Core268 (CTAGAGAAAGCCCTATTGGCCTG). La delección se verificó por secuenciación y se introdujo en el clon de ADNc de longitud completa por ligación de un fragmento XhoI/NcoI (nt 222 - 4671). El plásmido de longitud completa resultante que carece de núcleo (p1026) codificó el N<sup>pro</sup> precedente a la secuencia señal para E<sup>ns</sup> análoga al núcleo de VFPC  $\Delta$  (p619). Los transcritos de p1026 fueron replicativos en células MDBK, pero no se observó virus infeccioso. La introducción de sustituciones Pro<sub>2194</sub>Ala, Pro<sub>2209</sub>Tyr y Asn<sub>2265</sub>Asp en NCP7 $\Delta$ C permitió el rescate de títulos de virus infecciosos de aproximadamente  $10^3$  uff/ml cuando se titularon en células MDBK. Un NCP7 $\Delta$ C modificado que se manipuló para la propagación en células SK6 porcinas reveló la compensación del núcleo en Tyr<sub>2204</sub>His, Asn<sub>2265</sub>Tyr, Asn<sub>2265</sub>Asp, Pro<sub>2194</sub>Leu, Gln<sub>2198</sub>Lys y Leu<sub>2199</sub>Pro. NCP7 que carece de virus de la proteína de núcleo se rescató de células SK6 con títulos significativos (Asn<sub>2265</sub>Tyr:  $3,3 \times 10^5$ , Tyr<sub>2204</sub>His:  $2 \times 10^4$  y Asp<sub>2192</sub> Glu:  $1,5 \times 10^4$  uff/ml).

Basándose en una copia infecciosa de VDVB C86, un virus VDVB de tipo 1 regular que crecía bien en células MDBK, se generó un mutante de delección del núcleo como se ha descrito anteriormente y se introdujo el análogo de mutación para Asn<sub>2265</sub>Asp (Asn<sub>2433</sub>Asp). El virus con un título de  $5 \times 10^4$  uff se recuperó después de la transfección en células SK6.

**La proteína de núcleo derivada del dominio transmembrana puede sustituirse funcionalmente con una secuencia celular huésped**

Para excluir una importancia funcional de los aminoácidos residuales que cubren la señal de translocalización (LEKALLAWAVITILLYQPVAA<sub>268</sub>) para Erns, la secuencia que engloba la distancia entre el extremo C de Npro y el extremo N de Erns se sustituyó en el núcleo de VFPC  $\Delta_{N2177Y}$  (p1017) con el dominio transmembrana de CD46 bovino (SSGRSPGWLLAPLLLLPTSSDA). Los transcritos de SP6 de los ADNc respectivos (p1246) se transfectoron en células SK6. El virus viable se recuperó alcanzando títulos de  $2 \times 10^4$  uff/ml.

### Material y procedimientos

#### *Células y virus*

Las células SK6 se propagaron en placas de plástico en DMEM que contenían 10% de suero bovino fetal y aminoácidos no esenciales en una estufa de incubación con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se fraccionaron cada tres días. Todos los virus VFPC se derivan de la cepa de VFPC no cp Alfort-p447 (Gallei y col., J. Virol., 79(4), 2440-2448, 2005).

#### *Electroporación:*

2  $\mu$ g del transcrito SP6 se electroporaron en  $5 \times 10^6$  células SK6. Para este fin, células SK6 (confluencia del 90%) se tripsinaron, se lavaron dos veces en PBS (Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>) mezclado con el transcrito en un volumen total de 310  $\mu$ l y se sometieron a electroporación (Biorad Genepulser, 0,18 KV y 0,95  $\mu$ Fd) en cubetas con una rendija de 2 mm. Las células se recuperaron de la cubeta y se sembraron en placas de plástico de 35 mm en DMEM complementado con 10% de suero bovino fetal.

#### *Preparación de ARN y síntesis de ADNc:*

Células SK6 infectadas con virus rescatados se lavaron y el ARN se preparó usando el kit Rneasy (Quiagen) como se recomendó por el fabricante. 2  $\mu$ g de ARN se sometieron a transcripción inversa usando diferentes cebadores dependiendo de la localización real de interés. La PCR se realizó con cebadores adecuados y se subclonaron en el vector pGEM-T (Promega).

### **Ejemplo 2: Experimento en animales**

Se llevó a cabo un experimento en animales con el fin de caracterizar la virulencia del mutante del virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) "VFPC 1017 Core  $\Delta$ " bajo condiciones experimentales.

#### **Objetivo:**

El objetivo principal de este experimento fue investigar si el mutante de VFPC "VFPC 1017 Core  $\Delta$ " muestra atenuación en comparación con la cepa parental "VFPC Alfort p447". El uso de cerdos centinela permitió investigar en líneas generales la liberación y la transmisión del virus.

Como se demostró la atenuación, los cerdos restantes se expusieron el 2 de enero a la cepa de VFPC altamente patógena Koslov.

#### **Experimento en animales:**

##### Parte 1 - Infección

Se compraron seis cerdos destetados de una granja de cerdos comercial el 16 de octubre de 2006 y se dispusieron en la unidad de alta contención del Instituto de virología. Los animales se dividieron al azar en dos grupos de tres cerdos cada uno. Todos los animales se marcaron individualmente con números y marcas en las orejas.

Los dos grupos (grupo 1: animales con números 75-77; grupo 2: animales con números 78-80) se mantuvieron bajo condiciones de alta contención (presión del aire negativa de 100 Pa) en establos separados sin ningún contacto entre sí durante todo el experimento. Los animales se alimentaron una vez al día. Se suministró agua a voluntad. Los animales estaban clínicamente sanos al principio del ensayo.

Antes de empezar el experimento se recogieron muestras de sangre de todos los animales y se investigaron para la presencia de anticuerpos neutralizantes para pestivirus (VFPC, virus de la enfermedad de Borna (VEB) y virus de la diarrea vírica bovina (VDVB) por ensayos de neutralización.

Después de un periodo de adaptación al nuevo entorno, dos cerdos de cada grupo se infectaron intramuscularmente con aprox.  $10^7$  TCID<sub>50</sub> de VFPC<sub>1017</sub> (grupo 1) y VFPC Alfort p447 (grupo 2), respectivamente. Los cerdos centinela (uno por grupo) se sacaron de los grupos durante al menos 12 h después de la inoculación. Después de este periodo se pusieron de nuevo en los grupos respectivos.

Los animales de ambos grupos se monitorizaron diariamente para síntomas clínicos y temperatura corporal. Las temperaturas corporales que superaron 40°C se registraron como fiebre. Durante el transcurso del experimento, los animales que mostraron síntomas clínicos que ya no eran tolerables por motivos de bienestar animal se sacrificaron. Se realizaron las autopsias de todos los animales y se registraron.

Se tomaron muestras de sangre (sangre nativa y sangre anticoagulada con EDTA) de todos los animales en los días 0, 2, 4, 7, 10, 14, 21 y 28 después de la infección. Se tomaron muestras adicionales en el día de la eutanasia. Las muestras de sangre nativas se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 min a temperatura ambiente (Labofuge 400R, Heraeus, Alemania) para obtener suero. Entonces, el suero se dividió en alícuotas adecuadas de 0,5 a 2 ml y se guardó a -80°C hasta la posterior prueba.

## Parte II - Exposición

Los cerdos que quedaron después de la parte de infección (parte I) se expusieron intranasalmente (71° día después de la infección) a  $10^{4.5}$  de TCID<sub>50</sub> de la cepa de VFPC altamente patógena Koslov. Se tomaron muestras de sangre en los días 0, 3, 6 después de la exposición y en el día de la eutanasia del cerdo respectivo.

## **Exámenes de laboratorio**

### Recuentos de leucocitos

Se contaron manualmente los leucocitos de sangre en EDTA usando la cámara de recuento según Neubauer (mejorada) después de la lisis de eritrocitos con ácido acético (2%). La sangre en EDTA se extrajo en una pipeta de dilución de sangre según Thoma hasta la marca de 0,5. Entonces se añadió ácido acético (2%) hasta la marca 11 y la dilución de muestra se agitó suavemente durante aprox. 60 s. Después de cargar la dilución en una cámara de recuento, los leucocitos se contaron en los campos de recuento de leucocitos bajo microscopio óptico. El valor correcto se calculó según las especificaciones de la cámara. Los valores inferiores a 10 g/l se registraron como leucopenia.

Los recuentos de leucocitos se realizaron en los días 0, 2, 4, 7, 10, 14, 21 y 28 después de la infección.

### Ensayo de neutralización de anticuerpo ligado a peroxidasa

Los ensayos de neutralización de anticuerpo ligado a peroxidasa (NPLA) se realizaron según el “Manual de diagnóstico” de la Comisión europea (Decisión de la comisión 2002/106 de 1 de febrero de 2002) y la parte técnica adjunta utilizando los siguientes virus para la detección de anticuerpos contra el VFPC y VDVB/pestivirus, respectivamente:

- VDVB NADL
- Cepa de referencia VFPC “Alfort 187” (FPC 902)
- VFPC Alfort p447 (la cepa parental)
- VFPC Koslov (cepa de exposición)
- VFPC Diepholz (FPC0104)

Los NPLA para la detección de anticuerpos contra el VDVB se llevaron a cabo en células de riñón de ternero fetal primarias, mientras que los NPLA para la detección de anticuerpos contra el VFPC se llevaron a cabo en células de riñón porcino permanentes (SK 6). Los títulos de anticuerpos se expresan como la inversa de la mayor dilución en suero inicial que previno la replicación del virus en el 50% de dos pocillos duplicados. Estas diluciones de neutralización del 50% (DN<sub>50</sub>) se calcularon usando el procedimiento de KÄRBER.

Los NPLA para la detección de anticuerpos contra el VFPC se llevaron a cabo en los días 0, 10, 14, 21 y 28 días después de la infección (VFPC Alfort p447 y FPC0902). Adicionalmente se investigaron muestras tomadas en los días 0, 3 y 6 después de la exposición, y en los días de la eutanasia (VFPC Alfort p447 y FPC0902). Las muestras tomadas después de la exposición se sometieron a un NPLA usando VFPC Koslov y también FPC0104. Los NPLA para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el VDVB se realizaron antes de empezar el experimento.

### Enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) de anticuerpos

Además de los NPLA, las muestras de suero recogidas en los días 0, 14, 21 y 28 después de la infección y de los días de eutanasia se sometieron a un enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) de anticuerpos comercialmente disponible para la detección de anticuerpos dirigidos contra el VFPC. Todas las pruebas se realizaron exactamente como se describe en las instrucciones del fabricante.

Se usó el siguiente kit de prueba de ELISA:

- HerdChek CSFV, Idexx Laboratories, Wörrstadt, Alemania

#### Aislamiento de virus

5 El aislamiento de virus de preparaciones de leucocitos se realizó durante dos pases en líneas celulares de riñón porcino permanente SK6 y Rie 5-1 según el Manual de diagnóstico de la EU (Decisión de la comisión 2002/106/CE). El marcado inmune indirecto se hizo con el anticuerpo monoclonal específico para pestivirus BVD/C16 (Peters y col., 1986) y un conjugado ligado a peroxidasa específico para especie comercial (RAMPO, Dako).

#### 10 ELISA de antígeno

Además del aislamiento de virus, un enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) de antígeno comercialmente disponible se realizó exactamente como se describe en las instrucciones del fabricante. Las muestras tomadas en los días 0, 4, 7 y 10 se sometieron a análisis.

15 Se usó el siguiente kit de prueba de ELISA:

- CHEKIT HCV-Antigen, antiguo Dr. Bommeli AG, Liebefeld-Bern, Suiza

#### 20 **Resultados**

##### Parte I - Infección

##### Signos clínicos y temperatura (véase la Figura 1)

25 Durante la parte de infección del experimento, sólo el animal 76 mostró una ligera fiebre en el día ocho después de la infección (40,1°C). Las temperaturas subfebriles de 40,0°C se registraron para los animales 75 y 76 en el día 14 después de la infección.

30 A diferencia, todos los animales del grupo 2 desarrollaron fiebre. El animal 78 mostró temperaturas febriles en los días ocho y nueve después de la infección, y del día 13 después de la infección hasta el final del experimento en el día 28. El animal 79 mostró fiebre en el día 9 después de la infección, y del día 14 hasta el final del experimento. Las temperaturas febriles se registraron para el animal 80 en los días siete, nueve, diez y desde el día 13 hasta el día 20 después de la infección. En el día 21, el animal 80 mostró una temperatura corporal de 35,6°C.

35 Aunque los animales del grupo 1 (75-77) no desarrollaron ningún signo clínico indicativo de una infección por VFPC durante la primera parte del experimento, todos los animales del grupo 2 (78-80) desarrollaron síntomas clínicos distintos. La gravedad de los signos clínicos varió entre los animales. El animal 76 se sacrificó sin relacionar con la infección de FPC en el día 44 después de la infección debido a cojera grave.

40 Durante el transcurso del experimento, el animal 78 desarrolló diarrea grave, conjuntivitis, anorexia, lesiones de la piel y ataxia. El animal se sacrificó en el día 28 después de la infección. El animal 79 sólo desarrolló ligeros síntomas no característicos que incluyeron apetito reducido y una ligera diarrea. El animal se sacrificó en el día 28 después de la infección. El animal 80 desarrolló síntomas graves que incluyeron signos gastrointestinales y respiratorios, anorexia, matidez y lesiones de la piel. El animal se sacrificó moribundo en el día 21 después de la infección.

45

##### Recuentos de leucocitos (Figura 2)

50 En general, los animales del grupo 1 no mostraron leucopenia. Sin embargo, los animales 75 y 77 mostraron valores inferiores 10 g/l en el día 20 después de la infección. En el mismo día, el animal 76 sólo mostró 10,3 g/l.

55 Todos los animales del grupo 2 desarrollaron una leucopenia grave tras la infección por VFPC Alfort p447. En el animal 78, la leucopenia empezó en el día 4 después de la infección, y sólo se registraron 0,45 g/l en el día de la eutanasia. El cerdo centinela 79 mostró valores leucopénicos en los días 21 y 28 después de la infección, y un valor límite de 10,6 g/l ya en el día 14 después de la infección. El animal 80 mostró leucopenia grave empezando en el día 4 después de la infección. El valor terminal fue 1,4 g/l en el día 21 después de la infección.

##### Patología

60 Los animales del grupo 1 no se sacrificaron durante la parte de infección del experimento.

65 Los animales del grupo 2 mostraron signos patológicos variables. El animal 78 mostró dermatitis difusa, ganglios linfáticos hinchados y hemorrágicos en el intestino y el tracto respiratorio, atrofia del timo, bronconeumonía, gastritis ulcerativa, enteritis catarral, pielonefritis y sangrados petequiales en la corteza de los riñones. El animal 79 mostró una ligera atrofia del timo, ganglios linfáticos ligeramente hinchados en el intestino y el tracto respiratorio, neumonía

(l6bulos craneales), gastritis ulcerativa, enteritis catarral grave y cistitis. El animal 80 mostr6 sangrados petequiales del cutis y subcutis (acra, abdomen), ganglios linf6ticos profundamente alargados, edematosos y hemorr6gicos (sist6micos), atrofia del timo grave, sangrados petequiales en las meninges, bazo, epiglotis, tr6quea, est6mago, pared intestinal, v6lvula ileocecal, vejiga, h6gado, ves6cula biliar y los ri6ones. Adem6s, el animal 80 mostr6 una neumon6a catarral-purulenta, hemorragias extensivas bajo el endocardio y dentro del m6sculo del coraz6n, gastritis hemorr6gica grave, estre6imiento y una grave nefritis intestinal.

#### Detecci6n de anticuerpos

##### Ensayo de neutralizaci6n de anticuerpo ligado a peroxidasa (NPLA)

Todos los animales fueron negativos para anticuerpos contra el VDVB/pestivirus antes del experimento. Todas las muestras tomadas en el d6a 0 dieron resultados negativos ( $DN_{50} < 5$ ) con las dos cepas de VFPC usadas en NPLA (FPC0902 y Alfort p447).

Usando la cepa de VFPC Alfort p447, los animales del grupo 1 mostraron resultados positivos empezando en el d6a 14 despu6s de la infecci6n (animal 75). En detalle, el animal 75 mostr6 un t6tulo de anticuerpos de  $DN_{50} 7,5$  en el d6a 14 despu6s de la infecci6n que aument6 despu6s a  $DN_{50} 316$ . El animal 76 mostr6 resultados positivos en los d6as 21 y 28 despu6s de la infecci6n alcanzando un t6tulo de anticuerpos de  $DN_{50} 158,5$ . El animal centinela 77 no desarroll6 ning6n t6tulo de anticuerpos.

Usando FPC0902, s6lo el animal 76 mostr6 un bajo t6tulo de anticuerpos de  $DN_{50} 7,5$  en el d6a 28 despu6s de la infecci6n. Los animales del grupo 2 siguieron siendo negativos ( $ND_{50} < 5$ ) para anticuerpos contra el VFPC en todo los NPLA realizados durante todo el experimento.

##### Enzimoinmunoan6lisis de adsorci6n de anticuerpos (Ab-ELISA)

Aunque el animal 75 mostr6 un primer resultado dudoso en el d6a 21 despu6s de la infecci6n y fue positivo en el d6a 28 despu6s de la infecci6n, el animal 76 mostr6 un resultado dudoso en el d6a 14 despu6s de la infecci6n y resultados positivos en los d6as 21 y 28 despu6s de la infecci6n. El animal 77 sigui6 siendo negativo.

Los animales 78 y 79 mostraron resultados negativos durante todo el ensayo, mientras que el animal 80 mostr6 un resultado dudoso en el d6a de la eutanasia (21 d6as despu6s de la infecci6n).

##### Aislamiento de virus

Los animales del grupo 1 mostraron resultados negativos durante toda la parte de infecci6n del ensayo en tanto las c6lulas SK6 como Rie 5-1.

El animal 78 mostr6 resultados positivos en los d6as cuatro, siete, diez (investigado s6lo en las c6lulas SK6) y 14 despu6s de la infecci6n en c6lulas SK6 y Rie 5-1, respectivamente. Adem6s, se logr6 un resultado positivo para este cerdo en el d6a dos despu6s de la infecci6n en c6lulas Rie 5-1. El cerdo centinela, animal 79, sigui6 siendo negativo en ambas l6neas celulares. En c6lulas SK 6, el animal 80 mostr6 resultados positivos en los d6as siete, diez y 14 despu6s de la infecci6n. Tambi6n se encontraron resultados positivos en c6lulas Rie 5-1 en los d6as siete y 14 (el d6a diez no se prob6 debido a la falta de material de muestra).

##### Enzimoinmunoan6lisis de adsorci6n de ant6geno (Ag-ELISA)

El Ag-ELISA sigui6 siendo negativo para todos los animales del grupo 1 y para los animales 78 y 79 del grupo 2. S6lo el animal 80 mostr6 un resultado positivo en el d6a 10 despu6s de la infecci6n.

#### Parte II - Exposici6n

##### Signos cl6nicos y temperatura corporal

Los cerdos que quedaron despu6s de la parte de infecci6n, animales 75 y 77, se expusieron a la cepa de VFPC altamente pat6gena Koslov en el d6a 71 despu6s de la infecci6n.

El animal 75 no desarroll6 temperaturas febriles ni ning6n signo cl6nico tras la exposici6n a infecci6n y se sacrific6 en el d6a 16 despu6s de la exposici6n.

El animal 77 desarroll6 fiebre en el d6a tres despu6s de la exposici6n que persisti6 hasta la eutanasia. El animal se sacrific6 moribundo en el d6a ocho despu6s de la exposici6n que muestra graves s6ntomas neurol6gicos.

##### Patolog6a

5 Antes de la exposición, el animal 76 se sacrificó debido a cojera grave. Este animal no mostró ninguna lesión patológica indicativa de FPC. Sólo mostró una ligera neumonía de los lóbulos craneales. Además de una ligera neumonía de los lóbulos craneales y una ligera gastritis ulcerativa, el animal 75 no mostró signos patológicos. El animal 77 mostró ganglios linfáticos hinchados parcialmente hemorrágicos, neumonía catarral, ascitis, gastritis ulcerativa ligera, congestiones hepáticas, edema de la vesícula biliar y nefritis intestinal.

#### Detección de anticuerpos

10 Después de la infección por exposición, el animal 75 mostró un título de anticuerpos contra el virus de exposición de DN<sub>50</sub> 160 (día 16 después de la exposición) y un título de >640 contra FPC0104. El animal 77 siguió siendo negativo.

#### **Resumen y conclusiones**

- 15
- El mutante de VFPC "VFPC 1017 Core Δ" mostró prácticamente atenuación completa en comparación con la cepa parental "VFPC Alfort p447"
  - A diferencia de los animales del grupo 2, no pudo detectarse virus en el aislamiento de virus en diferentes líneas celulares para animales del grupo 1.
- 20
- Excepto para el cerdo centinela, los animales del grupo 1 desarrollaron anticuerpos neutralizantes tras la infección con VFPC 1017 Core Δ.
  - El cerdo centinela del grupo 1 no mostró ningún resultado positivo tanto en la detección de anticuerpos como de antígeno. Por tanto, la liberación y la transmisión del mutante del virus es lo más improbable.
  - La ausencia de signos clínicos tras la infección por exposición a una cepa de VFPC altamente patógena demostró protección completa del animal previamente infectado con VFPC 1017 Core Δ.
- 25
- El cerdo centinela mostró un desarrollo de FPC aguda-letal tras la infección por exposición con VFPC Koslov

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Pestivirus mutante, caracterizado porque el virus tiene una mutación en el gen que codifica la proteína de núcleo, haciendo que el virus no pueda expresar una proteína de núcleo funcional, caracterizándose el virus adicionalmente porque contiene una o más mutaciones en el dominio del extremo C del dominio helicasa de NS3 que compensan la falta de una proteína de núcleo funcional.
- 10 2. Pestivirus mutante según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el pestivirus es virus de la fiebre porcina clásica (VFPC).
3. VFPC mutante según la reivindicación 2, **caracterizado por que** la mutación en el dominio del extremo C del dominio helicasa de NS3 se selecciona del grupo que consiste en Asn<sub>2177</sub>Tyr, Glu<sub>2160</sub> Gly, Pro<sub>2185</sub>Thr/Ala, Gln<sub>2189</sub>Lys, Pro<sub>2200</sub>Thr y Asn<sub>2256</sub>Asp.
- 15 4. VFPC mutante según la reivindicación 2 ó 3, **caracterizado por que** la mutación en el dominio del extremo C del dominio helicasa de NS3 comprende la mutación Asn<sub>2177</sub>Tyr.
- 20 5. Pestivirus mutante según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el pestivirus es virus de la diarrea vírica bovina (VDVB).
6. VDVB mutante según la reivindicación 5, **caracterizado por que** la mutación en el dominio del extremo C del dominio helicasa de NS3 se selecciona del grupo que consiste en Glu<sub>2189</sub>Lys, Leu<sub>2190</sub>Pro, Thr<sub>2191</sub>Ala, Asp<sub>2192</sub> Glu, Pro<sub>2194</sub>Leu, Tyr<sub>2204</sub>His, Asn<sub>2265</sub>Tyr, Asn<sub>2265</sub>Asp.
- 25 7. VDVB mutante según la reivindicación 5 ó 6, **caracterizado por que** la mutación en el dominio del extremo C del dominio helicasa de NS3 comprende la mutación Asp<sub>2192</sub> Glu, Tyr<sub>2204</sub>His, Asn<sub>2265</sub>Tyr, o Asn<sub>2265</sub>Asp.
- 30 8. Una vacuna **caracterizada por que** comprende un pestivirus mutante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

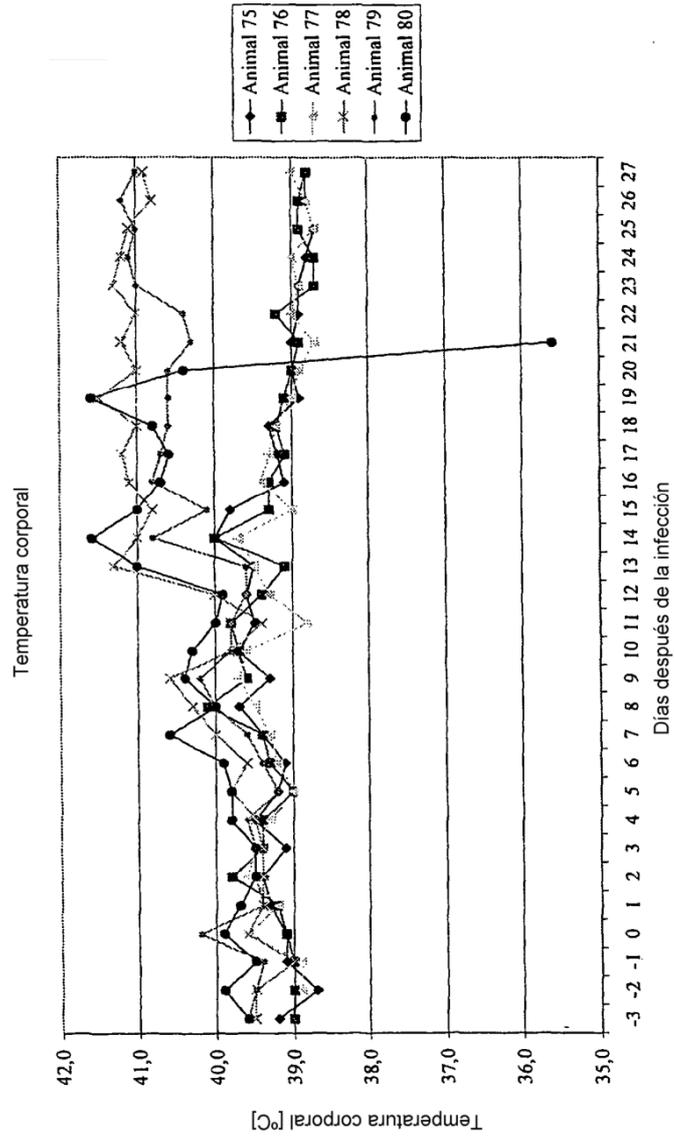


Figura 1: Temperatura corporal. Las temperaturas que superan 40°C se registran como fiebre.

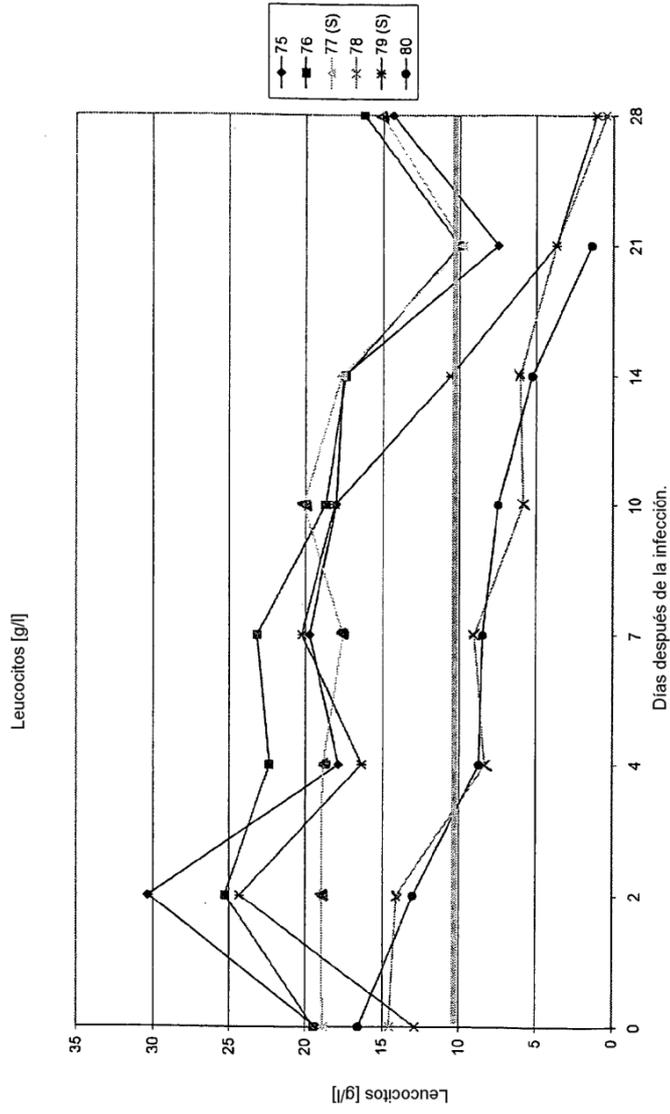


Figura 2: Recuento de leucocitos durante la parte de infección del experimento. Los valores inferiores a 10 g/l se registraron como leucopenia. Este valor se presenta aproximadamente por la línea amarilla oscura.