

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 305**

51 Int. Cl.:

C07K 14/08 (2006.01)

C07K 14/21 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2008 E 08170197 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **03.06.2009 EP 2065392**

54 Título: **Antígeno de fusión utilizado como vacuna**

30 Prioridad:

30.11.2007 US 948327

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.02.2013

73 Titular/es:

**REBER GENETICS CO., LTD. (100.0%)
3F, No. 25-1, Sec. 4, Ren Ai Road, Taipei City
10685, Taiwan , TW**

72 Inventor/es:

**LIAO, CHAO-WEI;
WENG, CHUNG-NAN y
CHANG, HSIU-KANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 395 305 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

Antígeno de fusión utilizado como vacuna

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a un antígeno de fusión. Más particularmente, la invención se refiere a un antígeno de fusión utilizado como vacuna de células T.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Las reacciones inmunes mediadas por las células dependen de interacciones directas entre los linfocitos T y células que llevan el antígeno que reconocen las células T. Las células T reconocen células corporales infectadas con virus, que se replican en el interior de las células utilizando la maquinaria de síntesis de la propia célula. Sin embargo, los antígenos derivados de la replicación de un virus están presentes en la superficie de las células infectadas (por el MHC Clase I), donde aquéllos son reconocidos por las células T citotóxicas (células T CD8+), que pueden controlar luego la infección por destrucción de las células antes que se complete la replicación del virus. Las vacunas para profilaxis de infecciones víricas son usualmente organismos vivos atenuados con patogenicidad reducida que pueden estimular la inmunidad protectora. Las proteínas extrañas de un virus vivo que se utiliza como vacuna viva atenuada son reconocidas y procesadas en el lumen del retículo endoplásmico (ER) de las células presentadoras de antígeno (APCs) cuando el virus se replica para formar un péptido de procesamiento endógeno. El proceso incluye la modificación y digestión apropiada del antígeno. Sin embargo, una vacuna viva atenuada, especialmente en virus de RNA, tiene una tendencia muy acusada a recuperar la toxicidad y la virulencia. Por ejemplo, la toxicidad de un virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV) se recupera tanto en las vacunas como en las cepas atenuadas. Además, deben realizarse pases múltiples de un virus. Por esta razón, la posibilidad de suscitar una respuesta inmune se ha puesto en duda. El desarrollo de una vacuna viva atenuada es una tarea que consume mucho tiempo.

15 Para evitar la recuperación de una vacuna viva atenuada, se desarrollan vacunas génicamente deficientes, tales como las vacunas de la enfermedad de Aujeszky, vacunas gI negativas, y vacunas marcadoras de PRV.

25 Se utilizan virus o bacterias de Vaccinia o de la viruela aviar como vectores para transporte de los genes de antígenos. Por tecnología de DNA recombinante, el tiempo para el desarrollo de una vacuna satisfactoria se reduce y pueden conseguirse al mismo tiempo serotipos múltiples de la vacuna. Ejemplos de tales vacunas son sistemas vectores del virus de la viruela aviar y de Salmonella y vacunas recombinantes de genes Syntro Vet (US). Por otra parte, cuando un microorganismo, especialmente un virus de RNA, se utiliza como vacuna vectora, el microorganismo puede producir una nueva especie o una nueva cepa. La seguridad de tales vacunas vectoras se enfrenta de nuevo a un reto. Adicionalmente, las vacunas subunitarias recombinantes tradicionales son usualmente incapaces de desencadenar una respuesta inmune mediada por las células. Las mismas son antígenos exógenos, que son capturados en los macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Después de la internalización de los antígenos por las APCs por pinocitosis en fase fluida o por receptores fijados a la membrana se generan péptidos de epítopes inmunógenos procedentes de antígenos exógenos. Los péptidos se generan luego en los compartimientos endosómicos de las APCs y son clasificados por las moléculas del MHC Clase II vacías para formar complejos péptido-MHC Clase II basados en las afinidades entre las moléculas del MHC Clase II y los péptidos. Los complejos péptido-MHC Clase II sufren luego translocación a la superficie de las APCs, donde aquéllos son reconocidos por las células T CD4+. Sin embargo, las proteínas de tipo subunitario reconocidas por las células T CD8+ no pueden utilizarse eficientemente como vacunas debido a que una vez administradas, se internalizan en compartimientos endosómicos, donde es probable que las mismas se degraden profundamente o no consigan interactuar con el camino del MHC Clase I. Adicionalmente, las células CD4+ (células Th) pueden activar a la vez inmunidad humoral y respuesta inmune mediada por las células debida a la acción de las células T adyuvantes Th1 y Th2, respectivamente. Las células Th1 y Th2 se regulan unas a otras respecto al equilibrio de la inmunidad humoral y la respuesta inmune mediada por las células.

45 Han sido descubiertos e investigados virus que infectan las células inmunológicas tales como células T, células B, células dendríticas, monocitos, o macrófagos. Ejemplos de tales virus infectados del cerdo son el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, el circovirus tipo II, y el virus infectado humano, virus de la inmunodeficiencia humana. Tales virus destruyen la capacidad de reconocimiento de proteínas extrañas como antígenos en las células presentadoras de antígeno. Las células inmunológicas no pueden suscitar una respuesta de inmunización y transportan los virus. Los animales que han sido infectados con estos tipos de virus son infectados fácilmente de modo secundario por otros patógenos. Es una lástima que falte todavía una vacuna útil direccionada a las células inmunológicas infectadas por virus.

55 En particular, el síndrome del virus reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) da como resultado pérdidas elevadas en la cría de animales todos los años. El virus infecta los macrófagos (en los alveolos y el bazo), la microglia cerebral y los monocitos, y existe en la sangre y los órganos de los animales infectados. Los anticuerpos tienen poco efecto sobre el virus e incluso estimulan mutaciones del virus. En el mecanismo de la mejora dependiente de anticuerpos (ADE), el uso de anticuerpos conduce a infecciones más graves. Aproximadamente 50 a 80% de los cerdos están infectados por dicho virus. Generalmente, los animales infectados por el virus no tienen

síntomas significativos, pero la inmunidad de los animales infectados se reduce. Esto conduce a una disminución de la ganancia de peso y un aumento en la tasa de mortalidad debido a la infección secundaria. PRRSV es un virus de RNA. No sólo los cerdos, sino que también los patos pueden ser infectados asimismo por PRRSV. Se desarrolló una vacuna viva atenuada contra PRRSV. Sin embargo, la mutación de los virus en la vacuna viva ocurre con frecuencia. Por fortuna, informes recientes del desarrollo de vacunas de HIV indican insistentemente que las células T citotóxicas (CTLs) son esenciales para controlar la infección de HIV. (Hanne G-S et al, 2000, Journal of Virology, vol. 74, No. 4, p. 1694-1703). Se desea urgentemente el desarrollo de una vacuna PRRS segura y eficaz.

Por tanto, existe en la técnica una necesidad no abordada hasta ahora de abordar las deficiencias e insuficiencias mencionadas anteriormente, especialmente en conexión con el desarrollo de vacunas de células T contra la infección de virus.

La publicación de Estados Unidos No. US 2004/0247617 da a conocer un antígeno de fusión específico para una célula diana que comprende un resto ligando que es capaz de reaccionar con, reconocer o fijarse a los receptores en la célula diana, un dominio II de translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas*, un resto antigénico, y un resto del terminal carboxilo que permite la combinación del antígeno de fusión con la membrana del retículo endoplásmico de la célula diana.

Li, G. et al, Virus Genes (2007) 35:673-679 exponen la supresión de la replicación del PRRSV en células MARC-145 por direccionamiento de shRNA a la región ORF1.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la invención se refiere a un antígeno de fusión que es específico para una célula diana que comprende: (a) un resto antigénico; (b) un dominio I de fijación de la exotoxina A de *Pseudomonas*; (c) un dominio II de translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas*; y (d) un resto del terminal carboxilo que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de KKDELRVELKDEL (SEQ ID NO: 7), en donde el resto antigénico se deriva del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) ORF1b, y en donde la célula diana es una célula presentadora de antígeno.

En otro aspecto, la invención se refiere a un antígeno de fusión específico para una célula diana que comprende a) un resto antigénico que comprende un polipéptido que es el producto de traducción de un fragmento de DNA que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2; b) un dominio I de fijación de la exotoxina A de *Pseudomonas*; c) un dominio II de translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas*; y d) un resto del terminal carboxilo que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de KKDLRDELKDEL (SEQ ID NO: 5) o KKDELRVELKDEL (SEQ ID NO: 6), en donde el resto antigénico se deriva del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) ORF1b, y en donde la célula diana es una célula presentadora de antígeno.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un antígeno de fusión específico para una célula diana que comprende: a) un resto antigénico que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; d) un dominio I de fijación de la exotoxina A de *Pseudomonas*; c) un dominio II de translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas*; y d) un resto del terminal carboxilo que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de KDEL (SEQ ID NO: 9), y en el cual la célula diana es una célula presentadora de antígeno.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un antígeno de fusión específico para una célula diana que comprende: a) un resto antigénico que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; b) un dominio I de fijación de la exotoxina A de *Pseudomonas*; c) un dominio II de translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas*; y d) un resto del terminal carboxilo que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de KKDELRVELKDEL (SEQ ID NO: 6) o KKDELRVELKDEL (SEQ ID NO: 7), y en donde la célula diana es una célula presentadora de antígeno.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende los antígenos de fusión de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable, así como a tales composiciones farmacéuticas para uso en la inducción de una respuesta inmune en un animal contra la infección de PRRSV.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1A ilustra el fragmento subclonado de Nsp11 PRRSV ORF1b (nucleótido 10805 ~ nucleótido 11297, panel superior) y la secuencia de aminoácidos correspondiente del fragmento proteínico Nsp10 y Nsp11 más K13 (panel inferior).

FIG. 1B ilustra la secuencia de aminoácidos de tres letras correspondiente del fragmento de proteína en FIG. 1A (SEQ ID NO: 1).

FIG. 2 ilustra la secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA M12-K13 (SEQ ID NO: 2).

FIG. 3 ilustra el mapa del plásmido pPE-K13, en el cual PE representa PE(Δ III).

FIG. 4 ilustra el mapa del plásmido pPE-M12-K13, en el cual PE representa PE(Δ III).

FIG. 5 ilustra la inducción de la secreción de IFN γ específico del antígeno en los esplenocitos de ratones inmunizados por los antígenos de fusión PE-M12-K13 y PE-DgD-K13.

5 FIG. 6 ilustra la inducción de la secreción de TNF α específico del antígeno en los esplenocitos de ratones inmunizados por los antígenos de fusión PE-M12-K13 y PE-DgD-K13.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

DEFINICIONES

Los términos utilizados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la invención, y en el contexto específico en el que se utiliza cada término. Ciertos términos que se utilizan para describir la invención se exponen a continuación, o en otro lugar de la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al experto en relación con la descripción de la invención. Por conveniencia, ciertos términos pueden estar resaltados, por ejemplo utilizando cursiva y/o comillas. El uso de realce no tiene influencia alguna sobre el alcance y el significado de un término. El alcance y el significado de un término es el mismo, en el mismo contexto, esté realzado el término o no. Se apreciará que una misma cosa puede decirse de más de un modo. Por consiguiente, pueden utilizarse expresiones y sinónimos alternativos para uno cualquiera o más de los términos expuestos en esta memoria, y no debe considerarse significado especial alguno dependiendo de que un término se elabore o se discuta en esta memoria. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos. Una relación de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier lugar de esta memoria descriptiva, con inclusión de ejemplos de cualesquiera términos expuestos en la misma es únicamente ilustrativo, y no limita en modo alguno el alcance y significado de la invención o de ningún término citado como ejemplo. Análogamente, la invención no está limitada a las diversas realizaciones presentadas en esta memoria descriptiva.

A no ser que se define otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, con inclusión de las definiciones.

Como se utilizan en esta memoria, los términos "alrededor de", "en torno a" o "aproximadamente" significarán generalmente dentro de 20 por ciento, preferiblemente dentro de 10 por ciento, y más preferiblemente dentro de 5 por ciento de un valor o intervalo dado. Las cantidades numéricas expuestas en esta memoria son aproximadas, lo que significa que el término "alrededor de", "en torno a" o "aproximadamente" pueden deducirse si no se indican expresamente.

La invención proporciona un antígeno de fusión específico para una célula diana que comprende un resto antigénico, un resto ligando que es capaz de reaccionar, reconocer o fijarse a un receptor en la célula diana, un dominio II de translocación de la exotoxina A de Pseudomonas, y un resto del terminal carboxilo que permite la retención del antígeno de fusión en la membrana del retículo endoplásmico (ER) de la célula diana.

Como se utiliza en esta memoria, el término "antígeno de fusión" hace referencia a una proteína recombinante que puede provocar una respuesta inmune en un animal. Preferiblemente, el antígeno de fusión comprende epítopes que provocan una respuesta inmune directamente y otras porciones para mejorar una respuesta inmune tal como la mediación del suministro, transporte, procesamiento, y expresión o para equipo de funciones múltiples.

Preferiblemente, la célula diana es una célula presentadora de antígeno. Más preferiblemente, la célula diana se selecciona del grupo constituido por células B, células dendríticas, monocitos, y macrófagos.

Como se utiliza en esta memoria, el término "un resto antigénico" hace referencia a un fragmento peptídico que puede provocar una respuesta inmune. En una realización de la invención, el resto antigénico es un epítope. De acuerdo con la invención, el resto antigénico es una proteína de una especie patógena, que puede activar fuertemente una respuesta inmune. Tales proteínas comprenden, por ejemplo, pero sin carácter limitante, proteínas de la cubierta, nucleoproteínas o proteínas de la membrana celular. El resto antigénico puede ser un péptido clonado directamente de la especie patógena así como una proteína recombinante modificada por técnicos expertos en este campo para mejora de la capacidad para provocar una respuesta inmune, para ser fabricados más convenientemente y para ser suministrados más fácilmente. Preferiblemente, el resto antigénico se deriva del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV). Preferiblemente, el resto antigénico puede ser PRRSV ORF 1, 1b, 2, 3, 4, 5, 6, ó 7. En una realización más preferida de la invención, el resto antigénico es PRRSV ORF 1b, o el dominio M12 semejante a corona. Para provocar una respuesta inmune más fuerte, el resto antigénico comprende al menos una unidad antigénica y la unidad antigénica adyacente está conectada por una región puente. De acuerdo con la invención, la región puente puede ser un pequeño fragmento de péptido que provoca poca respuesta inmune a fin de impedir que el sistema inmune lo reconozca.

Como se utiliza en esta memoria, el término "resto ligando" hace referencia generalmente a todas las moléculas que son capaces de reaccionar, reconocer o fijarse al receptor en una célula diana. Ejemplos de tales receptores

incluyen, pero sin carácter limitante, receptores de anticuerpos, receptores de factores de crecimiento, receptores de linfoquinas, receptores de citoquinas, receptores de hormonas y análogos. En algunas realizaciones de la invención, el receptor para fijación al resto ligando se selecciona del grupo constituido por receptores TGF α , receptores IL2, receptores IL4, receptores IL6, receptores IGF1, receptores CD4, receptores IL18, receptores IL12, receptores EGF, receptores LDL y receptores de macroglobulina α 2. El resto ligando tiene capacidad para fijarse a la membrana celular de la célula diana a fin de anclar el antígeno de fusión a la célula diana. El sistema inmune se inicia por la fijación del antígeno de fusión a los receptores en la célula diana. Preferiblemente, el resto ligando es un dominio I de fijación de la exotoxina A de Pseudomonas. La exotoxina A de Pseudomonas (PE) es una cadena polipeptídica simple de 613 aminoácidos. Estudios cristalográficos de rayos X y análisis mutacional de la molécula PE demuestran que PE está constituida por 3 dominios: un dominio de fijación del receptor celular del terminal amino (Dominio I); un dominio de translocación intermedio (Dominio II); y un dominio de actividad del terminal carboxilo (Dominio III) (véase la patente U.S. No.: 5.705.163).

Como se utiliza en esta memoria, el término "dominio I de fijación de la exotoxina A de Pseudomonas" hace referencia a un fragmento peptídico que tiene la misma secuencia que el dominio de fijación del receptor celular del terminal amino de la exotoxina A de Pseudomonas o un fragmento funcionalmente equivalente. El dominio de fijación del receptor celular del terminal amino de la exotoxina A de Pseudomonas comprende dos subdominios, designados como dominio Ia y dominio Ib. La configuración del dominio Ia y el dominio Ib puede fijarse a un receptor LDL o receptor de α 2-macroglobulina en la superficie de una célula.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "dominio II de fijación de la exotoxina A de Pseudomonas" hace referencia a un fragmento peptídico que tiene la misma secuencia que el dominio de translocación intermedio de la exotoxina A de Pseudomonas o un fragmento funcionalmente equivalente. El dominio II de translocación de la exotoxina A de Pseudomonas tiene capacidad para translocar el antígeno de fusión al citoplasma de la célula diana. El antígeno de fusión se transloca a la célula diana después de fijarse a la membrana de la célula diana.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "resto del terminal carboxilo que permite la retención del antígeno de fusión a la membrana del retículo endoplásmico (ER) de una célula diana" se refiere a un fragmento peptídico que permite que el antígeno de fusión se fije a la membrana del ER y se retenga en el lumen del ER para glicosilación y hace que el mismo se parezca más a una proteína extraña. En una realización de la invención, el resto del terminal carboxilo comprende, en dirección desde el término amino al término carboxilo, los residuos de aminoácidos siguientes:

$R^1-R^2-R^3-R^4-(R^5)_n$
 en donde,
 R^1 es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 R^2 es un residuo de aminoácido cargado negativamente;
 R^3 es un residuo de aminoácido cargado negativamente;
 R^4 es L;
 R^5 es un residuo de aminoácido cargado positivamente; y
 n es 0 o 1.

Preferiblemente, el resto del terminal carboxilo es un miembro de la familia de proteínas KDEL. Como se utiliza en esta memoria, "proteína de la familia KDEL" hace referencia a un grupo de proteínas, que tiene un terminal carboxilo similar que se fija a la membrana del ER de una célula y tiene adicionalmente capacidad para retención de dicha proteína en el lumen del ER. Generalmente, la longitud del extremo carboxilo varía desde 4 a 16 residuos. Como se expone en la patente U.S. No. 5.705.163, los residuos amino en el extremo carboxilo de una proteína de la familia KDEL, particularmente aquéllos que se encuentran en los últimos 5 aminoácidos, son importantes. Como se muestra en los estudios acerca de las secuencias similares presentes en moléculas diferentes y que realizan una función biológica específica, una secuencia que retiene una proteína de nueva formación en el interior del retículo endoplásmico es Lys Asp Glu Leu (KDEL) (SEQ ID NO: 9). Estos descubrimientos sugieren que la secuencia en el extremo carboxilo del antígeno de fusión de acuerdo con la invención actúa como cierto tipo de secuencia de reconocimiento que ayuda a la translocación del antígeno de fusión desde un compartimiento endocítico al ER y lo retiene en el lumen. En una realización preferida, el resto del terminal carboxilo comprende una secuencia de KDEL (SEQ ID NO: 9). En una realización más preferida, el resto del terminal carboxilo comprende una secuencia de KKDL-RDEL-KDEL (SEQ ID NO: 5), KKDELRDELKDEL (SEQ ID NO: 6), o KKDELRVELKDEL (SEQ ID NO: 7), o KKDEL-RXEL-KDEL, en las cuales R es D o V.

La invención se caracteriza por el diseño del resto del terminal carboxilo, que permite que el antígeno de fusión sea procesado en el ER de la célula diana para combinarse con moléculas del MHC Clase I y ser reconocido por las células T. El antígeno de fusión de acuerdo con la invención es útil en el desencadenamiento de reacciones inmunes mediadas por las células.

De acuerdo con la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el antígeno de fusión de la invención junto con un portador farmacéutico aceptable. Preferiblemente, la composición farmacéutica es una

vacuna de células T. las composiciones pueden proporcionarse para uso en la inducción de una respuesta inmune en un animal contra la infección de PRRSV.

5 Como se utiliza en esta memoria, el término "vacuna de células T" hace referencia a una vacuna que puede proteger a un individuo contra la infección por activación de la respuesta inmune mediada por las células. El papel crucial de la vacuna de las células T es el de células T citotóxicas (conocidas también como linfocitos T citotóxicos, células T CD8+, y CTL) y células T de memoria (T_{cm} y T_{em}).

10 La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende un segundo antígeno de fusión específico para una célula diana, en donde la segunda proteína de fusión comprende: a) un resto antigénico privado de PRRSV ORF7; b) un dominio I de fijación de la exotoxina A de Pseudomonas; c) un dominio II de translocación de la exotoxina A de Pseudomonas; y d) un resto del terminal carboxilo que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos KDEL, y en donde la célula diana es una célula presentadora de antígeno.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden utilizarse para inducir una respuesta inmune por inoculación de cualquier modo conocido por los especialistas expertos en la técnica. Por ejemplo, el antígeno de fusión puede ser para suministro por inyección o en forma de una vacuna oral. En caso necesario, son opcionales dosis de refuerzo. Preferiblemente, la inoculación debe realizarse antes de la infección. Las composiciones pueden ser para uso en inoculación de animales recién nacidos, incluso de un embrión, a fin de producir mejor inmunidad.

Las acciones siguientes ocurren durante el proceso de la respuesta a la administración de las composiciones de acuerdo con la invención:

- 20 (c) la membrana de la célula diana se fija al resto ligando para anclar el antígeno de fusión a la célula diana;
 (d) el antígeno de fusión sufre translocación al citoplasma de la célula diana por el dominio II de translocación de la exotoxina A de Pseudomonas;
 (e) la membrana del ER de la célula diana se fija al resto del terminal carboxilo del antígeno de fusión para retención del antígeno de fusión en el lumen del ER;
 25 (f) el resto antigénico es procesado en el lumen del ER;
 (g) el resto antigénico procesado se fija a una molécula del MHC Clase I;
 (h) el resto antigénico procesado es transportado por la molécula del MHC Clase I a la superficie de la célula diana;
 (i) el resto antigénico procesado transportado por la molécula del MHC Clase I es reconocido por la célula T CD8+ para obtener un mensaje inmune; y
 30 (j) el mensaje inmune es almacenado por las células T de memoria para inmunización del animal.

En la Acción (c), el resto ligando del antígeno de fusión conduce el antígeno de fusión para fijarlo a los receptores en la membrana de la célula diana a fin de anclar el antígeno de fusión a la célula diana.

35 En la Acción (d), el antígeno de fusión es translocado al citoplasma de la célula diana por el dominio II de translocación de la exotoxina A de Pseudomonas. La translocación conduce el antígeno de fusión a la entrada en la célula diana.

En la Acción (e), el resto del terminal carboxilo del antígeno de fusión se fija a la membrana del ER de la célula diana para retención del antígeno de fusión en el lumen del ER para el procesamiento del antígeno de fusión.

En la Acción (f), el resto antigénico es procesado en el lumen del ER. El procesamiento incluye, pero sin carácter limitante, modificación del antígeno tal como glicosilación y digestión apropiada por una enzima en el lumen del ER.

40 En la Acción (g), el antígeno de fusión procesado puede fijarse a una molécula del MHC Clase I. La molécula del MHC Clase I propiamente dicha es una proteína incompletamente plegada y se fija a muchas chaperonas. El antígeno de fusión procesado se fija a la hendidura de fijación del péptido a fin de completar el plegamiento y estimula la liberación de las chaperonas.

45 En la Acción (h), el resto antigénico procesado es presentado a la superficie de la célula diana por la molécula del MHC Clase I. El resto antigénico plegado en el MHC Clase I y procesado se suministra a la superficie de la célula.

En la Acción (i), el resto antigénico procesado transportado por la molécula del MHC Clase I es reconocido por la célula T CD8+ para obtener un mensaje inmune para el reconocimiento de la célula T citotóxica y también para el almacenamiento de un mensaje inmune en las células T de memoria. Ejemplos de las células T de memoria son células T_{cm} y T_{em} .

50 En la Acción (j), el mensaje inmune es almacenado por las células T de memoria para inmunización del animal. Cuando el animal inmunizado con el antígeno de fusión es infectado nuevamente por el mismo antígeno, las células T de memoria suscitan una respuesta inmune más fuerte en un tiempo más breve. La vacuna de células T proporciona un antígeno de procesamiento endógeno que puede ser procesado en el lumen del ER de la célula diana.

En una realización de la invención, el resto antigénico se deriva del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) ORF1b. La SEQ ID NO: 1 del antígeno. En otra realización de la invención, el resto antigénico comprende un polipéptido que es un producto de traducción de un fragmento de DNA que contiene la secuencia de nucleótidos indicada por SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, en una realización de la invención, el resto antigénico se deriva de PRRSV Nsp10 y Nsp11, y es SEQ ID NO: 1.

En una realización de la invención, el resto ligando es un dominio I de fijación de la exotoxina A de *Pseudomonas*. En otra realización de la invención, el resto del terminal carboxilo comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos KKDELRLXELKDEL, en la cual X es V o D. El resto del terminal carboxilo puede estar conectado al resto antigénico por un enlazador de sitios de restricción.

En otro aspecto más, la invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un antígeno de fusión como se ha descrito arriba y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización de la invención, la composición farmacéutica contiene una primera proteína de fusión que comprende: (a) un resto antigénico derivado de PRRSV ORF1b; (b) un dominio I de fijación de la exotoxina A de *Pseudomonas*; (c) un dominio II de translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas*; y (d) un resto del terminal carboxilo que incluye un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos KDEL. La composición farmacéutica puede incluir además un segundo antígeno de fusión específico para una célula diana, en el cual la segunda proteína de fusión comprende: (a) un resto antigénico derivado de PRRSV ORF7; (b) un resto ligando que es capaz de reaccionar, reconocer o fijarse a un receptor en la célula diana; (c) un dominio II de translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas*; y (d) un resto del terminal carboxilo que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos KDEL.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas para uso en la inducción de una respuesta inmune en un animal contra la infección de PRRSV. En una realización de la invención, la composición incluye una proteína de fusión que está direccionada específicamente a una célula presentadora de antígeno. Por ejemplo, la célula diana puede seleccionarse del grupo constituido por células B, células dendríticas, monocitos, y macrófagos.

25 EJEMPLOS

Materiales y Métodos

Construcción de los Plásmidos

pPE-M12-K13. El plásmido pPE-M12-K13 contenía un dominio M12 semejante a corona como resto antigénico, PE(Δ III) como resto ligando y resto de translocación, y K13 como resto del terminal carboxilo. La secuencia del dominio M12 está localizada dentro del gen PRRSV ORF 1b. La secuencia de PRRSV ORF 1b se extrajo de la base de datos EMBL/GenBank, con el número de acceso M96262. El fragmento subclonado M12 se derivó de PRRSV Nsp10 (secuencia del dominio terminal C) y Nsp11 (secuencia del dominio del terminal N). El resto antigénico PRRSV M12 (o fragmento ORF 1b subclonado) se sintetizó con los cebadores específicos enumerados en la Tabla 1. Para generar el plásmido pPE-M12-K13, el fragmento de DNA PRRSV ORF 1b, nucleótidos 10805 ~ 11297, se subclonó en el plásmido pPE-K13 por inserción en los sitios Aat II y EcoRI. FIG. 1A muestra el fragmento proteínico de M12 más K13, donde los sitios de restricción se designan por letras en negrilla. La secuencia de aminoácidos de tres letras correspondiente del fragmento proteínico de FIG. 1A se muestra en FIG. 1B (SEQ ID NO: 1), en la cual la secuencia K13 se designa por letras en negrita subrayadas, y los sitios de restricción y un puente corto entre XhoI y la secuencia K13 se designan en letras en negrita y cursivas. FIG. 2 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2) del fragmento de DNA M12-K13, que comprende M12 (es decir, el gen PRRSV Nsp10 más Nsp11) y K13. FIG. 3 muestra el plásmido pPE-K13 y FIG. 4 muestra el plásmido pPE-M12-K13 que comprende el dominio M12 (es decir, el dominio semejante a corona).

pPE-K13. El plásmido pPE-K13 contenía PE(Δ III) como resto ligando más un resto de translocación, y K13 como un resto del terminal carboxilo (FIG. 3). El PE(Δ III) (al que se hace referencia como PE en la FIG. 3) incluía un dominio I de fijación de la exotoxina A de *Pseudomonas* y un dominio II de translocación. Se construyó un plásmido pPE(Δ III) de acuerdo con el método descrito anteriormente en la Publicación de Patente US No. 2004/0247617.

El resto K13 del terminal carboxilo comprende una secuencia peptídica KKDELRLVELKDEL (SEQ ID NO: 7), que era codificado por AAA AAAGACGAACTGAGAGA TGAAGTAAAAGACGAACTG (SEQ ID NO: 8). El fragmento K13 se generó utilizando el método descrito en la Publicación de Patente US mencionada anteriormente, con modificaciones menores.

Resumidamente, un polinucleótido que codificaba el sitio Sal I-KKDELRLVELKDEL-codón de parada-XhoI-EcoRI se sintetizó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en serie. Los fragmentos de DNA amplificados por PCR se escindieron con Sal I y Eco RI y se purificaron luego por electroforesis en gel y electroelución. Los fragmentos de DNA purificados Sal I Eco RI se ligaron a pPE para formar el plásmido pPE-K13.

pPE-DgD-K13. El plásmido codificante de pPE-DgD-K13 se generó utilizando el método descrito en la Publicación de Patente US NO. 2004/0247617 con modificaciones menores. Resumidamente, dos plásmidos pET15-H6-PE(Δ III) PRRS7-DgD y pPE-K13 se digirieron con Pst I y Xho I para generar el fragmento que contenía PE(Δ III) PRRS7-DgD

y el fragmento que contenía el resto del terminal carboxilo, respectivamente. Los dos fragmentos se purificaron y se ligaron luego con ligasa T4 para formar pET23-H6-PE(Δ III)-DgD-K13 (denominado pPE-DgDK13 o pPE-DgD-K13). Los plásmidos pET23-K3, pET-13, o pPE (Δ III)-K13 comprenden todos ellos la secuencia KDEL.

5 pPE-ORF5-K13. El plásmido codificante de PE-ORF5-K13 se generó de acuerdo con el método descrito anteriormente. De modo resumido, se insertó el gen PRRSV ORF5 en pPE (Δ III)-K13 para construir pPE-ORF5-K13.

10 Expresión y Purificación del Antígeno de Fusión. *E. coli* (células BL21 (DE3) pLys) transformadas con un antígeno de fusión plasmídico para expresión de una proteína de fusión PE-ORF5-K, PE-DgD-K13 o PE-M12-K13 se cultivaron en caldo Luria Bertani que contenía ampicilina (100 ~ 500 ppm) a 37°C. Después que el cultivo de *E. coli* hubo alcanzado una fase logarítmica temprana ($A_{600} = 0,1 \sim 0,4$), se añadió isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) en una concentración final de 0,5 mM al cultivo para inducción. Las células se cosecharon dos horas después de la inducción y se guardaron inmediatamente a -70°C. el antígeno de fusión se purificó parcialmente por extracción con urea como se ha descrito anteriormente (Liao et al., 1995, Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:498-507). En condiciones desnaturalizantes, las moléculas del antígeno de fusión que contenían el identificador 6His se expusieron completamente para mejora de la fijación a la matriz eNi-NTA (Ni-NTA agarosa; Qiagen™ Inc. CA). La eficiencia de la purificación se maximizó para ello por reducción del potencial para fijación inespecífica. La purificación por lotes del antígeno de fusión marcado con 6His a partir del cultivo de células de *E. coli* en condiciones desnaturalizantes se describió como sigue.

20 Se añadió 1 ml de suspensión espesa de Ni-TNA al 50% a 4 ml de lisado y se mezcló suavemente por agitación mediante sacudidas (v.g., 200 rpm) durante 60 minutos a la temperatura ambiente para formar una mixtura lisado-resina. La mixtura lisado-resina se cargó cuidadosamente en una columna vacía con la cápsula del fondo fijada todavía. La capsula del fondo se retiró luego para recoger la solución de flujo continuo. La columna se lavó dos veces con 4 ml de tampón de lavado (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM, urea 8 M, pH 8,0). La proteína se eluyó 4 veces con 0,5 ml de tampón de elución de pH 5,9 (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM, urea 8 M, pH 5,9) seguido por elución 4 veces con 0,5 ml de tampón de elución de pH 4,5 (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM, urea 8 M, pH 4,5). Las fracciones recogidas se agruparon y se analizaron por electroforesis en gel SDS-PAGE. El análisis cuantitativo se realizó utilizando la proteína estándar BSA.

ES 2 395 305 T3

TABLA 2

Iniciador	SEQ ID NO:	Secuencia
*M12-F1	10	5'-TGG CCG GTG GTG TCA ACC CAG AAC AAT GAA AAG TGG CCG GAT CGT CTG -3'
*M12-F2	11	5'-CAG TTT GCC AAA CTC CCA ATA GAA CTT GCA CCA CAC TGG CCG GTG GTG TCA -3'
M12-F3	12	5'-AAC TTG GGT TTT TAT TTT TCA CCT GAC TTG ACA CAG TTT GCC AAA CTC -3'
M12-F4	13	5'-GGG TCG AGC TCT CCG CTC CCG AAG GTC GCA CAC AAC TTG GGT TTT TAT -3'
M12-F5	14	5'-TCT CTC CGC GCC ATT TGT GCT GAT CTG GAA GGG TCG AGC TCT CCG -3'
M12-F6	15	5'-GAT AAA TTT CGT GCC ACA GAC AAG CGT GTT GTA GAT TCT CTC CGC GCC ATT -3'
M12-F7	16	5'-ACG GTT GCT CAG GCT CTG GGC AAC GGG GAT AAA TTT CGT GCC -3'
M12-F8	17	5'-CCC CCC GAC GTC AAT AAC AAA GAA TGC ACG GTT GCT CAG GCT -3'
M12-R1	18	5'-GCG GCT GTA TTT GTC GAG AGG GCG AAG GCT GGC AAC CAG ACG ATC CGG CCA -3'
M12-R2	19	5'-AGG GCC CAC CAT ATA GCC GGC ACC GAT GCA CGC GCG GCT GTA TTT GTC -3'
M12-R3	20	5'-GTA TGA CAC GAC CCC TGG AGT GCC CAG AAA CAC CGA AGG GCC CAC CAT ATA -3'
M12-R4	21	5'-AGC CTC GCC CTT AAC AAA CTT TGT GAG ATA GTA TGA CAC GAC CCC -3'
M12-R5	22	5'-TCG GCC GGT ACT GAA GAC CGT TTC CGG AAG CAC TTG AGC CTC GCC CTT AAC -3'
M12-R6	23	5'-G ATA TTC ACG GCA GTC TAC CTC AAT TCG GCC GGT ACT GAA -3'
M12-R7	24	5'-A CGC AGC AAC TTC TCG CTC ACG ATC ATC AAG ATA TTC ACG GCA GTC -3'
M12-R8	25	5'-TTT TTT CTC GAG GAA TTC GTG TGG GAG GGA CGC AGC AAC TTC TCG -3'

*: MF12-F1 y M12-R1 denotan el primer par de cebadores directo e inverso, respectivamente; M12-F2 y M12-R2 denotan el segundo par de cebadores directo e inverso, respectivamente, etcétera.

EJEMPLO 1

Inducción de Respuestas Inmunes Mediadas por las Células por el Antígeno de Fusión PRRSV

El foco de la invención radicaba en descubrir aquellas regiones antigénicas o epitópicas en las proteínas del virus PRRS que tienen las características de inducir una respuesta inmune mediada por las células en los animales, y utilizar dichos antígenos para generar antígenos de fusión como vacunas para inmunización de animales a fin de inducir el sistema inmune a producir una cantidad suficiente de IFN γ y TNF α , y activar la inmunidad de las células T y el camino de las células T citotóxicas. los antígenos de fusión PE-DgD-K13 (o PE PRRSV ORF7) y PE-M12-K13 se encontraron capaces de inducir mecanismos inmunes mediados por las células. En el modelo experimental del ratón inmunizado, se encontró que las células del bazo tenían mecanismos inducidos por inmunidad celular por PE-DgD-K13 y/o PE-M12-K13. Los ratones inmunizados con PE-M12-K13 y PE-DgD-K13, respectivamente, tenían secreciones incrementadas de IFN γ y TNF α comparados con los de los grupos de control. El antígeno de fusión PE-PQGAB-K13, que comprendía el ORF5 y el ORF6 del término N K13, tenía poco efecto en la inducción de secreciones de IFN γ y TNF α (FIGS. 5 y 6).

El gen ORF 1b juega un papel importante en la replicación del virus antes de la proliferación. Los antígenos de fusión PE-DgD-K13 o PE-DgD-K3 y PE-ME12-K13 o PE-M12-K3 serán los ingredientes principales más importantes para las vacunas de PRRSV.

De acuerdo con los estudios de exposición a PRRSV y tests de muestra de sangre previos, se encontró que PE-DgD-K3 era capaz de activar protecciones inmunes en los lechones, evitando que los mismos acusaran viremia.

EJEMPLO 2

Dosificaciones de los Antígenos de Fusión PRRS

Se administró 1 miligramo de antígeno(s) a lechones a la edad de 1, 2, ó 5 semanas, con un total de 3 inmunizaciones. Dos semanas después de la última inmunización, se midieron los títulos de los anticuerpos específicos IgG, IgA, e IgM. Se encontró que el título de anticuerpos podía alcanzar un pico después de inmunizaciones dobles. El título de anticuerpos después de 3 inmunizaciones no exhibía mucha diferencia con respecto al de 2 inmunizaciones.

Cuando se administraron a los lechones 0,05 ~ 0,5 mg, pero preferiblemente 0,1 ~ 0,3 mg, de una composición de vacuna que comprendía un antígeno de fusión PE-M12-K13, se indujo una reacción de anticuerpos suficiente después de la segunda inmunización, y el anticuerpo alcanzaba un pico después de la tercera inmunización.

EJEMPLO 3

Protección Contra el Enfrentamiento al Virus PRRS por una Composición de Vacuna en una Formulación de Mixtura de PE-M12-K13 y otro(s) Antígenos de Fusión

Animales. Se obtuvieron lechones de una piara en la granja SPF que se testó periódicamente respecto a PRRSV y se sabía que estaba exenta de virus por RT-PCR. Antes de los experimentos, se confirmó que las cerdas de la granja SPF estaban exentas de viremia. Adicionalmente, un test de reactivo de diagnóstico Index-RRS exhibió también resultados negativos en las cerdas SPF.

Extracción del RNA. Para detectar la presencia de PRRSV en los animales, se recogieron fracciones de plasma sanguíneo y se extrajeron los RNAs con un kit NUCLEOSPIN RNA II™ para RT-PCR. (Macherey-Magel GmbH & Co. KG, Alemania). Resumidamente, se añadieron 350 microlitros de solución RA1 y 3,5 μ l de β -mercapto-etanol a 100 μ l de fracción de plasma. Después que se hubo reducido la viscosidad y se hubo aclarado el lisado por filtración, se mezcló el lisado con 350 μ l de etanol al 70%. El RNA se adsorbió en una columna de RNA Nucleospin™ por centrifugación seguida por lavado. Se aplicaron 95 microlitros de solución de DNasa a la columna para digestión del DNA. Después de lavado y centrifugación repetidos varias veces, se eluyó el RNA con 60 μ l de agua exenta de RNasa.

Detección de Virus por RT-PCR. Se realizó la RT-PCR utilizando un Kit™ de RT-PCR Onestep (Qiagen® Inc. Calif.) para detectar la presencia de RNA de PRRSV en animales. Se proporcionaron el cebador directo 5'-CCA GCC AGT CAA TCA GCT GTG-3' (SEQ ID NO: 3) y el cebador inverso 5'-GCG GAT CAG GCG CAC-3' (SEQ ID NO: 4) para la síntesis de un fragmento de 293 pb. El límite de detección de la RT-PCR por electroforesis en gel de agarosa era alrededor de 10 copias de PRRSV (TCID₅₀/ml).

Inmunización. Se seleccionaron lechones recién nacidos de 3 ~ 4 cerdas en la granja SPF y se identificaron, se pesaron y se determinó su sexo individualmente. Los lechones se dividieron aleatoriamente en 6 grupos, constituido cada grupo por 5 ó 6 lechones de cada cerda. Los lechones se vacunaron con una composición de vacuna que comprendía uno o más de un antígeno de fusión (es decir, con o sin combinación), o portador sobre la base de estratificación por peso. La inmunización se llevó a cabo dos veces en la etapa lactante a la edad de 4 y 18 días por inyección intramuscular con 2 ml de una composición de vacuna que contenía 1 ml de antígeno(s) de fusión (50 ~

100 µg de cada componente antigénico/dosis) emulsionada en 1 ml de ISA206 (SEPPIC®, Francia), respectivamente. El grupo de control se generó sin inmunización. En la etapa de destete (aproximadamente 3 ~ 4 semanas de edad), cada grupo se desplazó a salas de aislamiento individuales equipadas con acondicionamiento de aire y ventilación.

- 5 Exposición a PRRSV. Dos semanas después de la última vacunación, se expusieron los lechones por vía intranasal a PRRSV después de sedación con Ketamina (100 mg, inyección IM) y se suprimió el reflejo de tos con Lidocaína al 2% (1 ml, instilación intranasal). Se administró por ruta intranasal 1 ml de inóculo que contenía 1×10^7 dosis infectadas de cultivo de tejido al 50% (TCID₅₀) por ml de la cepa MD-1 reciente de PRRSV. Se expusieron 5 lechones en cada grupo.
- 10 RT-PCR Después de Enfrentamiento al Virus. Para detectar el nivel de PRRSV en sangre después de la exposición al virus, se ensayaron las muestras de leucocitos de la sangre (la capa superficial de plasma coagulado ('buffycoat') procedente de sangre entera) de los lechones con RT-PCR dos semanas después de la segunda inmunización. Las muestras de leucocitos de la sangre de los lechones se ensayaron de nuevo con RT-PCR para detección de PRRSV los días 3, 7 y 14 después de la exposición.
- 15 Resultado. Antes de la exposición al virus, todos los lechones exhibían resultado negativo en el test de la muestra de sangre por RT-PCR respecto a PRRSV. Por tanto, no existía viremia alguna en el grupo de control antes de la exposición a PRRSV. Cinco días después de la exposición a PRRSV (DPI-5), los lechones del grupo de control comenzaban a acusar viremia en las muestras de sangre. Aproximadamente 2 semanas después de la exposición a PRRSV, todos los lechones en el grupo de control exhibían viremia (Tabla 2, 5 de 5 en BK-1; 6 de 6 en BK-2). La viremia era detectable durante largo tiempo. Si las muestras de sangre de los lechones presentaban viremia dos semanas después de la exposición al PRRSV era un índice importante para evaluación de la eficacia de la vacuna. La ausencia de viremia podría indicar que la vacuna había ejercido su eficacia. En particular, el grupo vacunado con la composición de vacuna que contenía una mezcla de PE-M12-K13, PE-ORF-K13 y PE-DgD-K13 dio como resultado que sólo 1 de 6 lechones testados era PRRSV-positivo en la muestra de sangre. Algunos grupos vacunados con PE-M12-K13 comenzaban a exhibir reacción de aclaramiento de la viremia el día 14 después de la exposición al virus (DPI-14), como se muestra en la Tabla 2.
- 20
- 25

La Tabla 2 muestra el resultado posterior a la exposición a PRRSV para los grupos de animales. En los lechones vacunados con PE-M12-K13, 1 de cada 3 presentaba viremia el día 7 después de la exposición a PRRSV, pero la viremia se aclaraba el día 21 después de la exposición. La composición como una mezcla de PE-M12-K13, PE-DgD-K13 y PE-ORFS-K13 dio como resultado que 1 de cada 6 lechones presentaba viremia el día 7 después de la exposición, y la viremia se aclaraba hacia el día 21 después de la exposición. Era probable que PE-DgD-K13 (o -K3) y PE-M12-K13 (o -K3) fuesen eficaces en la protección de los animales, pero PE-ORF5-K13 (o -K3) no proporcionaba protección adicional en esta circunstancia.

30

TABLA 2

Resultados del Test de Viremia después de Exposición a PRRSV en el Modelo de los Lechones SPF						
Experimento No.	Composición de Vacuna	No. de Lechones	DPI-2	DPI-7	DPI-14	DPI-21
No. 1	*BK-1	5	1	3	5	2
No. 1	PE-M12-K13	5	2	1	1	0
No. 2	BK-2	6	1	3	6	4
No. 2	PE-DgD-K13, PE-M12-K13, PE-ORF5-K13	6	0	1	1	0
El término "*"BK" representa el grupo de control no vacunado.						

35

EJEMPLO 4

Patogénesis Pulmonar por Exposición a PRRSV

La significación estadística en la diferencia del índice de neumonía intersticial entre los grupos de animales vacunados y no vacunados se determinó por un test ANOVA. El análisis estadístico indicó que los animales vacunados con la composición de vacuna formulada con una sola proteína de fusión PE-PRRSV PE-M12-K13 exhibía un grado moderado de gravedad de la neumonía intersticial en el corte del tejido pulmonar.

40

5 Con respecto a las composiciones de vacuna que incluían más de un solo antígeno de fusión PRRSV, los estudios de la composición de vacuna que comprendía una mezcla de PE-DgD-K13 y PE-M12-K13 demostraron que la misma podía proporcionar una protección eficaz contra los síntomas pulmonares. Las secciones de tejido pulmonar de los lechones vacunados con PE-DgD-K13 y PE-M12-K13 exhibían un grado menor de gravedad de la neumonía intersticial.

En conclusión, se ha demostrado que la composición de vacuna que comprende PE-M12-K13 presenta las características siguientes:

I. Presenta una reacción eficaz de aclaramiento de la viremia.

10 II. La composición de vacuna que no contenía ninguna otra proteína estructural de PRRSV era eficaz para reducir los efectos secundarios que podrían ser inducidos por el virus PRRS.

III. Capacidad para inducir mecanismos de inmunidad celular. Por utilización de ORF 1b, se generaba el antígeno de la proteína de fusión PE-M12-K13 y exhibía eficacia en la inducción de los animales para producir la citoquina INF γ y TNF α , que eran eficaces en el aclaramiento de la infección viral.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> HealthBanks.Co., Ltd.

<120> ANTÍGENO DE FUSIÓN UTILIZADO COMO VACUNA

<130> 10003-00002

<140> US 11/948,327

<141> 2007-11-30

<150> US 10/457,574

<151> 2003-06-09

<160> 25

<210> 1

<211> 186

ES 2 395 305 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio PRRSV ORF1b M12 (Nsp y Nsp11 parciales) más K13

<400> 1

```

Asp Val Asn Asn Lys Glu Cys Thr Val Ala Gln Ala Leu Gly Asn Gly
 1          5          10          15

Asp Lys Phe Arg Ala Thr Asp Lys Arg Val Val Asp Ser Leu Arg Ala
          20          25          30

Ile Cys Ala Asp Leu Glu Gly Ser Ser Ser Pro Leu Pro Lys Val Ala
          35          40          45

His Asn Leu Gly Phe Tyr Phe Ser Pro Asp Leu Thr Gln Phe Ala Lys
 50          55          60

Leu Pro Ile Glu Leu Ala Pro His Trp Pro Val Val Ser Thr Gln Asn
 65          70          75          80

Asn Glu Lys Trp Pro Asp Arg Leu Val Ala Ser Leu Arg Pro Leu Asp
          85          90          95

Lys Tyr Ser Arg Ala Cys Ile Gly Ala Gly Tyr Met Val Gly Pro Ser
          100          105          110

Val Phe Leu Gly Thr Pro Gly Val Val Ser Tyr Tyr Leu Thr Lys Phe
          115          120          125

Val Lys Gly Glu Ala Gln Val Leu Pro Glu Thr Val Phe Ser Thr Gly
          130          135          140

Arg Ile Glu Val Asp Cys Arg Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Glu Arg Glu
 145          150          155          160

Val Ala Ala Ser Leu Pro His Glu Phe Leu Glu Tyr Leu Lys Lys Asp
          165          170          175

Glu Leu Arg Val Glu Leu Lys Asp Glu Leu
          180          185

```

<210> 2

<211> 549

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio PRRSV ORF1b M12 (Nsp y Nsp11 parciales) más K13

ES 2 395 305 T3

<400> 2

```
gacgtcaata acaaagaatg cacggttgct caggctctgg gcaacgggga taaatttcgt      60
gccacagaca agcgtgttgt agattctctc cgcgccattt gtgctgatct ggaaggggctg    120
agctctccgc tcccgaaggt cgcacacaac ttgggttttt attttccacc tgacttgaca      180
cagtttgcca aactcccaat agaacttgac ccacactggc cggtggtgtc aaccagaac      240
aatgaaaagt ggccggatcg tctggttgcc agccttcgcc ctctcgacaa atacagccgc      300
gcgtgcatcg gtgccggcta tatggtgggc ccttcggtgt ttctgggcac tccaggggctc    360
gtgtcatact atctacaaa gtttgtaag ggcgaggctc aagtgcttc ggaaacggtc      420
ttcagtaccg gccgaattga ggtagactgc cgtgaatatc ttgatgatcg tgagcgagaa      480
gttgctgcgt ccctcccaca cgaattctc gagtacctca aaaaagacga actgcgtgta      540
gaactgaaa                                         549
```

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo para detección por RT-PCR de PRRSV en la muestra de sangre

<400> 3

```
ccagccagtc aatcagctgt g          21
```

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso para detección por RT-PCR de PRRSV en la muestra de sangre

<400> 4

```
goggatcagg cgcac          15
```

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia del resto del terminal carboxilo de los antígenos de fusión de PRRSV en los Ejemplos

<400> 5

```
Lys Lys Asp Leu Arg Val Glu Leu Lys Asp Glu Leu
 1           5           10
```

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

ES 2 395 305 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia del resto del terminal carboxilo de los antígenos de fusión de PRRSV en los Ejemplos

<400> 6

Lys Lys Asp Glu Leu Arg Asp Glu Leu Lys Asp Glu Leu
1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia del resto del terminal carboxilo de los antígenos de fusión de PRRSV en los Ejemplos

<400> 7

Lys Lys Asp Glu Leu Arg Val Glu Leu Lys Asp Glu Leu
1 5 10

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia del resto del terminal carboxilo de los antígenos de fusión de PRRSV en los Ejemplos

<400> 8

aaaaaagacg aactgagaga tgaactgaaa gacgaactg 39

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia del resto del terminal carboxilo de los antígenos de fusión de PRRSV en los Ejemplos

<400> 9

Lys Asp Glu Leu
1

<210> 10

<211> 48

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo M12-F1

<400> 10

tggcgggtgg tgtcaacca gaacaatgaa aagtgccgg atcgtctg 48

<210> 11
<211> 51
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo M12-F2

<400> 11
cagttgcca aactccaat agaactgca ccacactggc cggtggtgc a 51

<210> 12
<211> 48
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo M12-F3

<400> 12
aactgggtt ttattttc acctgactg acacagttg ccaaactc 48

<210> 13
<211> 48
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo M12-F4

<400> 13
ggtcgagct ctccgctccc gaaggctgca cacaactgg gttttat 48

<210> 14
<211> 45
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo M12-F5

<400> 14
tctctccgc ccatgtgc tgatctggaa ggtcgagct ctccg 45

<210> 15
<211> 51
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo M12-F6

<400> 15
gataaattc gtgccacaga caagcgtgt gtagatttc tccgcgcat t 51

<210> 16
<211> 42
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo M12-F7

<400> 16

acggtgctc aggtctggg caacgggat aaattcgtg cc 42

<210> 17

<211> 42

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo M12-F8

<400> 17

cccccgacg tcaataaca agaatgcacg gttgctcagg ct 42

<210> 18

<211> 51

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso M12-R1

<400> 18

goggctgtat ttgtcagag gcggaaggct ggcaaccaga cgatccggcc a 51

<210> 19

<211> 48

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso M12-R2

<400> 19

aggccccacc atagccgg caccgatgca cgcgggctg tattgtc 48

<210> 20

<211> 51

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso M12-R3

<400> 20

gtagacacg acccctggag tgcccagaaa cacogaagg cccaccat a 51

<210> 21

<211> 45

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 395 305 T3

<223> Cebador inverso M12-R4

<400> 21
agcctcgccc ttaacaaact ttgtgagata gtatgacacg acccc 45

<210> 22

<211> 51

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso M12-R5

<400> 22
tcggccgcta ctgaagaccg ttccggaag cacttgagcc tcgccctaa c 51

<210> 23

<211> 40

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso M12-R6

<400> 23
gatattcacg gcagtctacc tcaattcggc cggactgaa 40

<210> 24

<211> 46

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso M12-R7

<400> 24
acgcagcaac ttctcgctca cgatcatcaa gatattcacg gcagtc 46

<210> 25

<211> 45

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso M12-R8

<400> 25
tttttctcg aggaattcgt gtgggagga cgcagcaact tctcg 45

REIVINDICACIONES

1. Un antígeno de fusión específico para una célula diana que comprende:
 - a) un resto antigénico;
 - b) un dominio I de fijación de la exotoxina A de Pseudomonas;
 - 5 c) un dominio II de translocación de la exotoxina A de Pseudomonas; y
 - d) un resto del terminal carboxilo que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos KKDELVELKDEL (SEQ ID NO: 7),
 en donde el resto antigénico se deriva del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) ORF 1b; y en donde la célula diana es una célula presentadora de antígeno.
- 10 2. Un antígeno de fusión específico para una célula diana que comprende:
 - a) un resto antigénico que comprende un polipéptido que es el producto de traducción de un fragmento de DNA que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2;
 - b) un dominio I de fijación de la exotoxina A de Pseudomonas;
 - 15 c) un dominio II de translocación de la exotoxina A de Pseudomonas; y
 - d) un resto del terminal carboxilo que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos KKDLRDELKDEL (SEQ ID NO: 5) o KKDELRDELKDEL (SEQ ID NO: 6),
 en donde el resto antigénico se deriva del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) ORF 1b; y en donde la célula diana es una célula presentadora de antígeno.
- 20 3. El antígeno de fusión de la reivindicación 1 ó 2, en el cual el resto antigénico comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
4. El antígeno de fusión de la reivindicación 1 ó 2, en el cual el resto del terminal carboxilo está conectado al resto antigénico por un enlazador del sitio de restricción.
5. Un antígeno de fusión específico para una célula diana que comprende:
 - a) un resto antigénico que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
 - 25 b) un dominio I de fijación de la exotoxina A de Pseudomonas;
 - c) un dominio II de translocación de la exotoxina A de Pseudomonas; y
 - d) un resto del terminal carboxilo que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos KDEL (SEQ ID NO: 9), KKDELRDELKDEL (SEQ ID NO: 6) o KKDELVELKDEL (SEQ ID NO: 7);
 30 en el cual la célula diana es una célula presentadora de antígeno.
6. El antígeno de fusión de la reivindicación 1 ó 5, en el cual la célula diana se selecciona del grupo constituido por células dendríticas, macrófagos, células B y monocitos.
7. Una composición farmacéutica que comprende el antígeno de fusión de la reivindicación 1 ó 5 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 que comprende adicionalmente un segundo antígeno de fusión específico para una célula diana, en el cual la segunda proteína de fusión comprende:
 - a) un resto antigénico derivado de PRSSV ORF7;
 - b) un dominio I de fijación de la exotoxina A de Pseudomonas;
 - c) un dominio II de translocación de la exotoxina A de Pseudomonas; y
 - 40 d) un resto del terminal carboxilo que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos KDEL;
 en donde la célula diana es una célula presentadora de antígeno.
9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 ó 8 para uso como medicamento a fin de inducir una respuesta inmune en un animal contra la infección de PRRSV.
- 45 10. La composición de la reivindicación 9, en la cual el antígeno de fusión es específico para una célula diana que es una célula presentadora de antígeno seleccionada del grupo constituido por células dendríticas y macrófagos.
11. La composición de la reivindicación 9, en la cual el antígeno de fusión es específico para una célula diana seleccionada del grupo constituido por células B, células dendríticas, monocitos, y macrófagos.

SEQ ID NO. 2

PE-M12-K13

La secuencia del fragmento de DNA M12-K13

GAC GTCAAT AAC AAA GAA TGC ACG GTT GCT CAG GCT CTG GGC AAC GGG GAT AAATTT
Aat II
CGT GCCACA GACAAG CGT GTT GTA GAT TCT CTC CGC GCC ATT TGT GCT GAT CTG GAA
GGG TCG AGC TCT CCG CTC CCG AAG GTC GCACACAAC TTG GGT TTT TAT TTT TCACCT
GAC TTG ACA CAG TTT GCC AAA CTC CCA ATA GAA CTT GAC CCA CAC TGG CCG GTG GTG
TCAACC CAG AAC AAT GAA AAG TGG CCG GAT CGT CTG GTT GCC AGC CTT CGC CCT CTC
GAC AAA TAC AGC CGC GCG TGC ATC GGT GCC GGC TAT ATG GTG GGC CCT TCG GTG TTT
CTG GGC ACT CCA GGG GTC GTG TCA TAC TAT CTC ACA AAG TTT GTT AAG GGC GAG GCT
CAA GTG CTT CCG GAA ACG GTC TTCAGT ACC GGC CGA ATT GAG GTA GAC TGC CGT GAA
TAT CTT GAT GAT CGT GAG CGA GAA GTT GCT GCG TCC CTC CCACAC GAA TTCCTCGAG
TAC CTCAAA AAA GAC GAA CTG CGT GTA GAA CTG AAA GAC GAAC TG TAA
EcoRI XhoI

K13

PRRS
Nsp10
(secuencia
del dominio
C-terminal
y
nsp11
(secuencia
del dominio
N-terminal)
= M12

FIG. 2

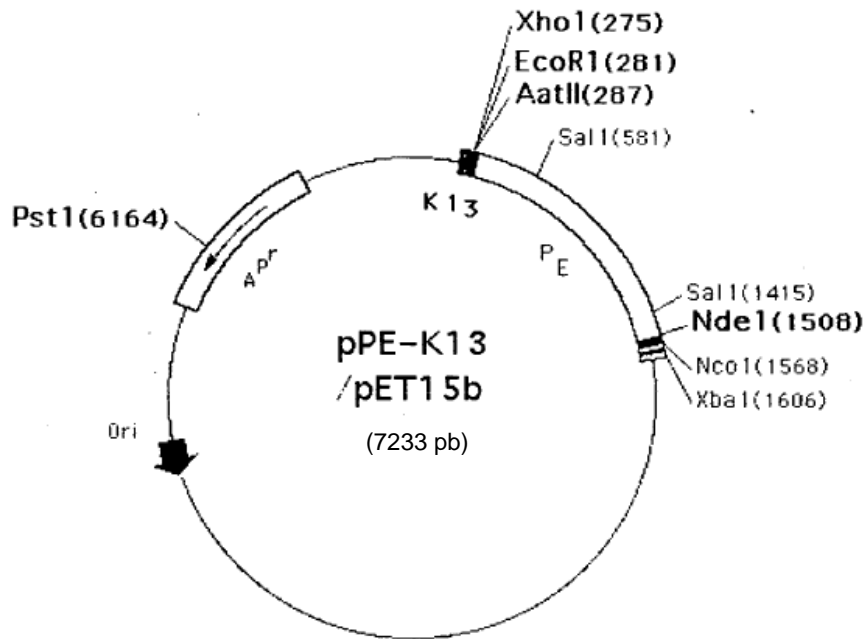


FIG. 3

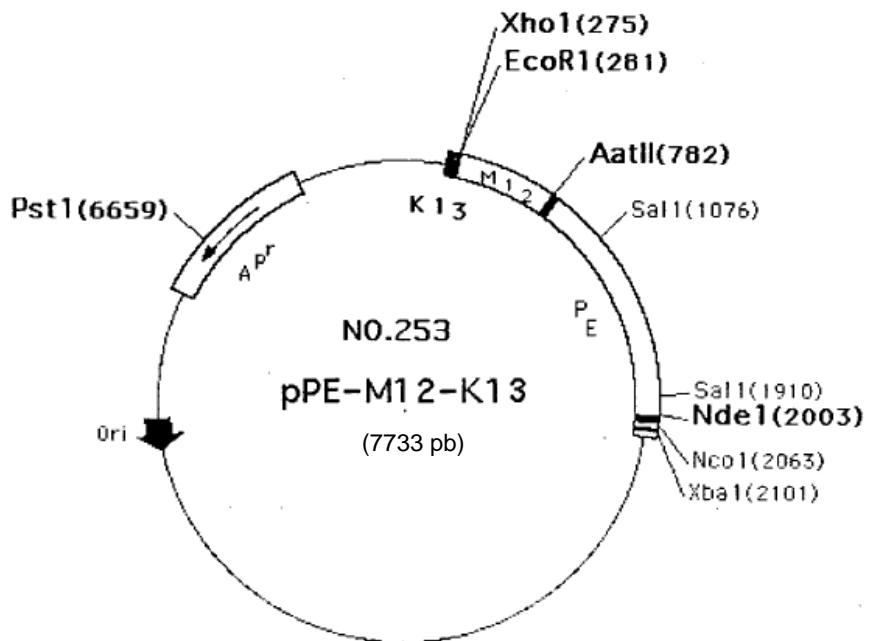


FIG. 4

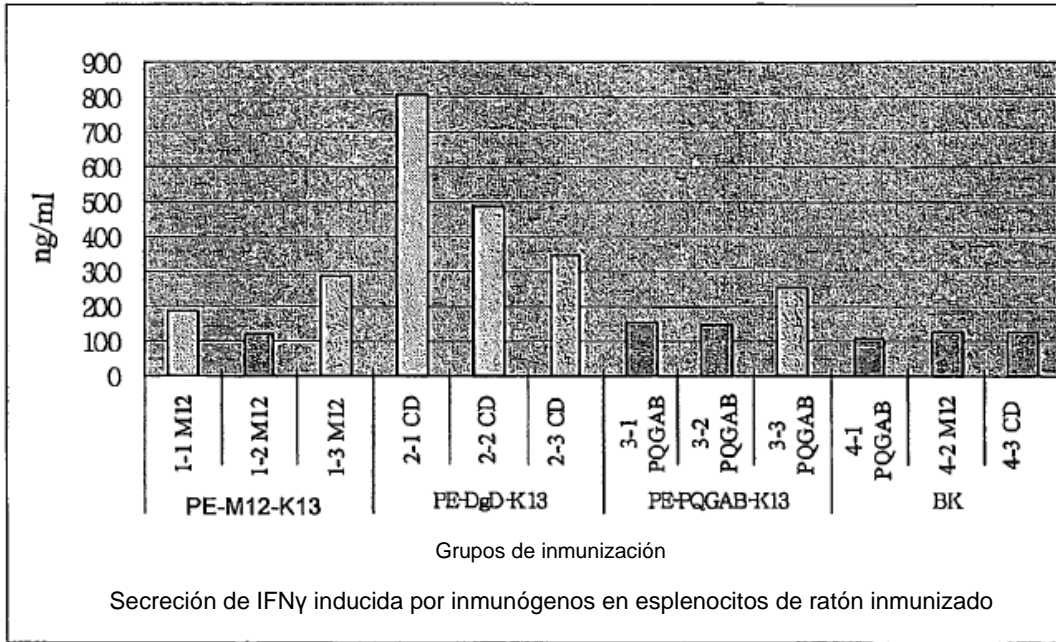


FIG. 5

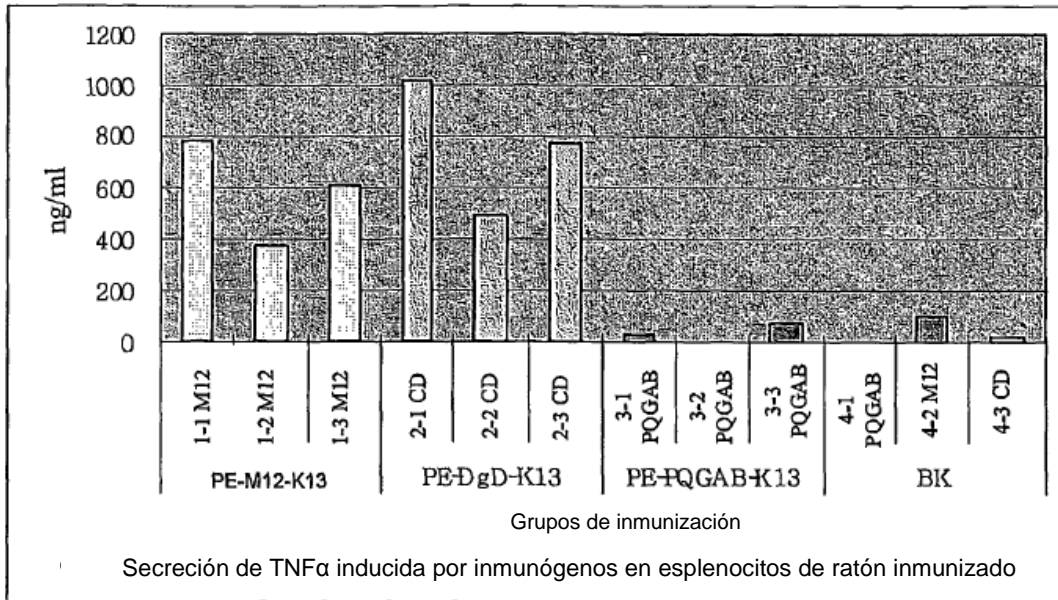


FIG. 6