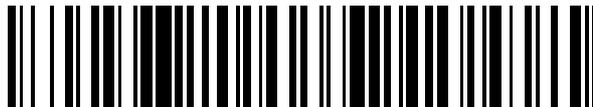


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 403**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/04** (2006.01)

**C07K 14/18** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2009 E 09775363 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2382307**

54 Título: **Virus de la fiebre porcina clásica recombinante (VFPC) que comprende una proteína E2 modificada y métodos para generar dicho VFPC recombinante**

30 Prioridad:

**23.12.2008 EP 08172874**

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

**23.09.2015**

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)  
Wim de Körverstraat 35  
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**KORTEKAAS, JEROEN ALEXANDER y  
VLOET, RIANKA PETRONELLA MARIA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 546 403 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

Virus de la fiebre porcina clásica recombinante (VFPC) que comprende una proteína E2 modificada y métodos para generar dicho VFPC recombinante

5 La invención se refiere a enfermedades animales. Más específicamente, la invención se refiere a un virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) recombinante que comprende una proteína E2 modificada. La invención se refiere adicionalmente a una vacuna que comprende dicho VFPC recombinante que permite diferenciar un animal infectado de un animal vacunado y métodos para generar dicho VFPC recombinante. La invención se expone en las reivindicaciones.

15 El virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) es un virus de ADN de hebra positiva encapsulado que, junto con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y el virus de la enfermedad de la frontera (VEF), comprende el género pestivirus de la familia *Flaviviridae* (Pringle, 1998. Arch Virol 143: 203-10). La introducción del VFPC en piaras de cerdos domesticados puede producir enormes pérdidas económicas (Terpstra any de Smit. 2000. Vet Microbiol 77: 3-15). La vacunación con un virus del VFPC atenuado mediante varios pases en conejos y cultivo celular, las denominadas cepas "chinas" o "C", tiene como resultado una inmunidad rápida y para toda la vida contra el VFPC virulento. El virus de la cepa C se usa con éxito en todo el mundo y a menudo se hace referencia a él como la vacuna veterinaria más eficaz jamás producida. No obstante, esta vacuna no permite la diferenciación serológica entre animales infectados y vacunados (DIVA). Esta es una desventaja importante, ya que la incapacidad para detectar animales infectados por FPC en una población vacunada puede imponer restricciones comerciales importantes.

25 El diagnóstico de FPC en el campo se puede realizar mediante ELISA que detecta anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína estructural E<sup>rns</sup> o E2. Se han desarrollado varias vacunas candidatas que pueden cumplir el criterio DIVA cuando se acompañan del ELISA adecuado, variando de vacunas de subunidades (Hulst et al., 1993. J Virol 67: 5435-42) a virus vivos atenuados (van Gennip et al., 2000. Vaccine 19: 447-59; van Zijl et al., 1991. J Virol 65: 2761-2765) y a vacunas basadas en replicones (van Gennip et al., 2002. Vaccine 20: 1544-56; Widjojoatmodjo et al., 2000. J Virol 74: 2973-2980).

30 La vacuna DIVA disponible comercialmente contra la FPC se basa en la E2 producida en baculovirus, que se acompaña de una prueba serológica que detecta anticuerpos dirigidos contra E<sup>rns</sup> (Van Aarle, 2003. Dev Biol Stand Basel 114: 193-200). Aunque esta vacuna proporciona protección contra la FPC, es menos eficaz que la vacuna de la cepa C con respecto tanto al inicio como a la duración de la inmunidad (van Oirschot, 2003. Vet Microbiol 96: 367-84). Más importante es el hecho de que los ELISA de E<sup>rns</sup> que acompañan a esta vacuna también detectan otros miembros del género pestivirus (es decir, el VDVB y el VEF). Por tanto, su uso no se recomienda en regiones en las que estos virus circulan (2003/265/EC; SANCO/10809/2003).

40 Adicionalmente, anteriormente se ha descubierto que la sensibilidad de los ELISA de E<sup>rns</sup> es insuficiente para diagnosticar animales individuales y, por tanto, solo deberán usarse en rebaños con un número suficientemente grande de animales. 1025-38; Floegel-Niesmann, 2003. Dev Biol (114: 185-91). Esto explica por qué, en general, los ELISA de E2 son considerablemente preferidos sobre los ELISA de E<sup>rns</sup> acompañando a una vacuna DIVA.

45 La proteína E2 contiene dos dominios antigénicos principales, es decir el dominio B/C y el dominio A (van Rijn et al., 1993. J Gen Virol 74: 2053-60; Wensvoort, 1989. J Gen Virol 70: 2865-76). El dominio A, que se localiza entre los aminoácidos 766 y 866 de la poliproteína del VFPC, se divide en los subdominios A1, A2 y A3 (Wensvoort, 1989. J Gen Virol 70: 2865-76). A pesar del hecho de que el dominio A1 es una diana dominante para los anticuerpos neutralizantes, se ha conservado durante la evolución. De hecho, su conservación de la secuencia e inmunodominancia lo han convertido en la diana dominante en los ELISA de E2.

50 Aunque los brotes de FPC están actualmente controlados por restricciones de cuarentena y sacrificio de las piaras en las que se sospecha, existe una urgente necesidad de implementar estrategias de intervención más humanas y más económicas para controlar futuros brotes de FPC. Por tanto, existe una urgente necesidad de una vacuna DIVA que se acompañe de un ELISA sólido y específico del VFPC.

55 La presente invención proporciona un virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) recombinante que comprende una delección de al menos un aminoácido en el dominio "TAVSPTTLR" de la proteína E2, correspondiente a la posición 829 a 837 de una poliproteína del VFPC parental, como se indica en la reivindicación 1.

60 Con poliproteína se quiere decir la poliproteína hipotética de aproximadamente 4.000 aminoácidos que se forma tras la traducción del ARN viral. Dicha poliproteína se procesa para formar los productos de escisión finales N<sup>pro</sup>-C-Erns-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B.

65 La proteína E2 del VFPC contiene un epítipo recién identificado que comprende la secuencia de aminoácidos TAVSPTTLR (residuos 829-837 de la poliproteína del VFPC; usando el código de una sola letra para los aminoácidos) (Lin et al., 2000. J Virol 74: 11619-25). Este epítipo comparte todos los rasgos característicos del dominio A1, siendo inmunodominante, conservado en la evolución, específico del VFPC y una diana para los

anticuerpos neutralizantes. Una comparación de las secuencias alrededor del dominio TAVSPTTLR entre las proteínas E2 de diferentes cepas de pestivirus indica que la secuencia TAVSPTTLR está fuertemente conservadas entre las cepas del VFPC y es altamente variable entre las cepas del VDVB y el VEF (Lin et al., 2000. J Virol 74: 11619-25).

5 Los anticuerpos, especialmente los anticuerpos monoclonales, usados en ELISA específicos de E2 que reconocen el dominio TAVSPTTLR no reaccionan de forma cruzada con otros miembros del género pestivirus y, por tanto, se pueden usar en regiones en las que estos otros virus circulan. Dichos anticuerpos no reconocerán un VFPC recombinante de acuerdo con la invención, que comprenden una delección en dicho dominio de la proteína E2.

10 Por tanto, dicho virus recombinante permite diferenciar los animales que están infectados por el virus recombinante de los animales que están infectados por el VFPC de tipo silvestre y de los animales que no están infectados y/o que no están vacunados. Adicionalmente, el uso de dicho virus recombinante permitirá el uso de una prueba diagnóstica basada en péptidos para discriminar entre estos animales.

15 La presente invención proporciona un virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) recombinante que comprende una delección de al menos un aminoácido en el dominio "TAVSPTTLR" del VFPC, como se indica en la reivindicación 1.

20 El genoma parental comprende, preferentemente, un genoma viral sustancialmente completo derivado de una cepa del VFPC, preferentemente una cepa de VFPC natural o atenuado recombinante. La expresión genoma parental comprende una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ADN y/o una copia de ADNc de la misma. En la invención, el genoma parental es el genoma de una cepa C (china).

25 Con la expresión "delección de al menos un aminoácido", como se usa en la descripción, se quiere decir la eliminación de al menos un aminoácido. El término "delección" no cubre una eliminación de al menos un aminoácido, seguido de la inserción de otro al menos un aminoácido en la misma posición. Por tanto, el término "delección" como se usa en el presente documento no cubre la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido.

30 Una molécula de ADNc recombinante como se hace referencia en el presente documento como parte de la divulgación realizada comprende, preferentemente, un genoma del virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) recombinante sustancialmente completo, de modo que dicho genoma codifica una proteína E2 que comprende una delección de al menos un aminoácido en el dominio "TAVSPTTLR" conservado correspondiente a la posición 829 a 837 de la poliproteína de la FPC. La expresión "sustancialmente completo" indica que dicho virus generado por dicho genoma es capaz de infectar una célula o línea celular adecuada y se puede reproducir en dicha célula o línea celular adecuada. Un genoma viral "sustancialmente completo" preferentemente es un genoma competente para la replicación. Más preferido es un genoma viral infeccioso competente para la replicación competente para el empaquetado. Adicionalmente se prefiere que también el virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) recombinante "sustancialmente completo", preferentemente un genoma competente para la replicación, o, más preferido, un genoma viral infeccioso competente para la replicación y competente para el empaquetado.

40 En la divulgación hecha, una delección de al menos un aminoácido en el dominio TAVSPTTLR de un VFPC recombinante comprende una delección de la prolina central de dicho dominio "TAVSPTTLR".

45 La prolina es única entre los 20 aminoácidos comunes en que tiene la cadena lateral ciclada sobre el átomo de nitrógeno de la estructura básica. Esto restringe la conformación de dicha prolina y también del residuo precedente a la prolina. Adicionalmente, la prolina puede actuar como "cambio" conformacional, de modo que permite que partes de proteínas adopten conformaciones alternativas. Por tanto, la alteración de la prolina central en el dominio TAVSPTTLR no solo cambia la secuencia primaria sino que también cambia la conformación del dominio TAVSPTTLR inmunogénico. Una proteína E2 que comprende una delección de la prolina central del dominio TAVSPTTLR no será reconocida por los anticuerpos que reconocen dicho dominio dentro de la proteína E2.

50 Una proteína E2 alterada de un VFPC recombinante puede comprender una delección de al menos dos aminoácidos de dicho dominio TAVSPTTLR. Una delección de dos aminoácidos comprende la delección de TA, AV, VS, SP, PT, TT, TL y LR, respectivamente, del dominio TAVSPTTLR de E2. La invención se refiere a la delección de dos aminoácidos (PT) en la posición 833-834 en el dominio TAVSPTTLR.

55 Una proteína E2 alterada de un VFPC recombinante puede comprender una delección de al menos tres aminoácidos de dicho dominio TAVSPTTLR, tal como tres aminoácidos, cuatro aminoácidos, cinco aminoácidos, seis aminoácidos, siete aminoácidos, ocho aminoácidos o nueve aminoácidos. La proteína E2 puede comprender una delección de las secuencias de aminoácidos VSP, SPT, AVSP o SPTTL.

60 La invención proporciona un VFPC recombinante como se hace referencia en la reivindicación 1, que comprende al menos una alteración adicional del genoma del VFPC parental como se hace referencia en la reivindicación 1. Los virus que comprenden una delección en dicho dominio TAVSPTTLR conservado fueron menos eficientes en células infectadas, lo que tiene como resultado un título menor en comparación con el virus parental. El pase continuo de las

5 células infectadas con un virus que comprende una delección en el dominio TAVSPTTLR conservado tuvo como resultado un virus de rescate que infectó y/o se replicó con mayor eficiencia en las células lo que produjo títulos que eran comparables a los títulos del virus parental. El virus de rescate había introducido una o más alteraciones adicionales en el genoma parental que compensó por la pérdida de idoneidad del virus con una delección en el dominio TAVSPTTLR conservado.

10 La al menos una alteración adicional puede ser una mutación silenciosa que cambia el genoma del virus, pero no da lugar a una alteración de un aminoácido. Dicha mutación silenciosa está presente en una parte no codificante del genoma viral o una parte codificante del genoma viral, tal como en una parte del genoma viral que codifica N<sup>pro</sup>, C, E<sup>ns</sup>, E1, y/o E2, y/o en una parte que codifica proteínas no estructurales. Una mutación silenciosa puede contribuir a la recuperación de la idoneidad de los virus alterados en algún momento durante la generación de estos virus. Sin pretender imponer ninguna teoría, una mutación silenciosa, por ejemplo, da como resultado una estabilidad mejorada y/o una replicación mejorada del genoma viral porque dicho mutación silenciosa altera una conformación del ácido nucleico genómico viral. Además, dicha mutación silenciosa puede dar lugar a un mejor uso de los codones. Una mutación silenciosa preferida se proporciona mediante una alteración de U a C en la posición 1549 en el gen de E<sup>RNS</sup>.

20 La al menos una alteración adicional puede estar en una región que codifica la proteína E1 que se sabe que se ensambla en heterodímeros unidos por puentes disulfuro con la proteína E2. Una delección en el dominio TAVSPTTLR conservado de E2 está, por tanto, al menos parcialmente, compensada por una alteración de al menos un aminoácido en la proteína E1. La al menos una alteración adicional puede ser una región que codifica la proteína N<sup>pro</sup>, C, E<sup>ns</sup> o E2. Dicha al menos una alteración adicional comprende preferentemente al menos dos alteraciones en diferentes regiones seleccionadas de las regiones que codifican la proteína N<sup>pro</sup>, C, E<sup>ns</sup>, E1, y/o E2 o dentro de una región que codifica la proteína N<sup>pro</sup>, C, E<sup>ns</sup>, E1, y/o E2. Dichas al menos dos alteraciones adicionales comprenden preferentemente al menos una mutación silenciosa. Una mutación silenciosa preferida se proporciona mediante una alteración de U a C en la posición 1549 en el gen de E<sup>RNS</sup>.

30 La al menos una alteración adicional puede resultar en la introducción de un sitio adicional de glicosilación ligada a N en la proteína E2. Un sitio de glicosilación ligada a N en una posición adicional en la proteína E2 aparentemente compensa, ya sea directamente o en virtud de su función como un sitio de anclaje para un resto de carbohidrato, por la pérdida de idoneidad impuesta por dicha delección en el epítipo TAVSPTTLR. Dicho sitio de glicosilación ligado a N se puede introducir mediante la alteración del dominio LFDGTNP desde la posición de aminoácidos 772 a 778, tal como, por ejemplo, una alteración de D a N en la posición 774. Como alternativa, o además, un sitio de glicosilación ligado a N se introduce mediante la alteración de A a N en la posición 830 en la proteína E2.

35 Dicha alteración adicional altera preferentemente un codón en las posiciones 1547-1549, que codifican V392 dentro de la proteína E<sup>ns</sup>; un codón en las posiciones 2273-2275, que codifica E634 dentro de la proteína E1; un codón en las posiciones en la posición 2693-2695 que codifican D774 dentro de la proteína E2; y/o un codón en las posiciones en la posición 2864-2866 que codifica V831 dentro de la proteína E2. Dicha alteración de un codón en las posiciones indicadas comprende una mutación silenciosa o comprende una alteración del aminoácido codificado. En una realización preferida, al menos una alteración adicional comprende una sustitución de valina (V) en la posición 831 por glicina (G).

45 La al menos una alteración adicional del genoma parental puede resultar en una sustitución de S a F en la posición 789 y/o una sustitución de A a T en la posición 445. La serina en la posición 789 y la alanina en la posición 445 están presentes en todos virus de la cepa C de la cepa y cepas de VFPC lapinizadas relacionadas, mientras que la fenilalanina en la posición 789 y la treonina en la posición 445 se conservan en las cepas virulentas del VFPC. Aunque la historia del virus de la cepa C no está bien documentada, está claro que el virus se atenuó mediante pases en conejos cientos de veces, para los cuales una S en la posición 789 y una A en la posición 445 puede ser beneficioso. La alteración de S a F en la posición 789 y la alteración de A a T en la posición 445 son, probablemente, beneficiosas para la propagación de un virus que comprende una delección en el epítipo TAVSPTTLR, mientras que estarán cerca de la neutralidad en un virus que comprende el epítipo TAVSPTTLR.

55 La divulgación proporciona un VFPC recombinante que comprende una delección de P en la posición 833 y una alteración silenciosa. Una alteración silenciosa preferida es una alteración de U a C en la posición 1549 en el gen de E<sup>RNS</sup>. El VFPC recombinante puede comprender una delección de P en la posición 833 y una alteración de S a F en la posición 789 y/o una alteración de A a T en la posición 445; una delección de P en la posición 833, una alteración de D a N en la posición 774, una sustitución de Va G en la posición 831 y una delección de T en la posición 834, en adición o no a una alteración de U a C en la posición 1549. Un VFPC recombinante más preferido comprende una delección de prolina y treonina en la posición 833 y 83, respectivamente, del dominio "TAVSPTTLR" de la proteína E2, una alteración de U a C en la posición 1549, una sustitución de un ácido glutámico (E) por ácido aspártico (D) en la posición 634, una sustitución de ácido aspártico (D) por asparagina (N) en la posición 774 en la proteína E2 y una sustitución de valina (V) por glicina (G) en la posición 831.

65 La divulgación proporciona un virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) recombinante, que comprende una alteración de al menos un aminoácido en un dominio "TAVSPTTLR" desde la posición 829 a 837 en E2 de una poliproteína de

VFPC parental, de modo que dicha alteración comprende una sustitución de la prolina central en el dominio TAVSPTTLR a asparagina. Dicha sustitución se encontró que reducía al mínimo o incluso inhibía la unión de los anticuerpos monoclonales específicos de E2 a la proteína E2 alterada.

5 Además de cambiar la secuencia de aminoácidos primaria, la introducción de dicha asparagina tiene como resultado la introducción de un sitio de glicosilación ligada a N que comprende la secuencia consenso de la glicosilación [NxS/T], en la que x denota cualquier aminoácido a excepción de P o D (Kornfeld y Kornfeld, Annu Rev Biochem 1985. 54: 631-64). La N-glicosilación de las proteínas virales se ha implicado en la inmunogenicidad, de modo que la introducción de una glicosilación ligada a N puede limitar tanto la respuesta tanto celular como de anticuerpos a una  
10 proteína viral. Por tanto, dicha sustitución puede usarse para generar un virus recombinante que permite la diferenciación de los animales infectados con un virus de tipo silvestre a partir de animales infectados con dicho virus recombinante.

15 En un aspecto, un VFPC recombinante, que comprende una sustitución de la prolina central en el dominio TAVSPTTLR por asparagina, comprende al menos una alteración adicional en el genoma. Otra al menos una alteración preferida da como resultado un sitio de N-glicosilación adicional en N<sup>pro</sup>, C, E<sup>rns</sup>, E1, y/o E2, y/o en una parte que codifica proteínas no estructurales. Una N-glicosilación adicional preferida está presente dentro de E2, tal como, por ejemplo, dentro del dominio TAVSPTTLE o dentro de un epítopo LFDGTNP de la proteína E2.

20 Otra al menos una alteración adicional preferida es una mutación silenciosa presente en una parte no codificante del genoma viral o en una parte codificante del genoma viral, tal como en una parte del genoma viral que codifica N<sup>pro</sup>, C, E<sup>rns</sup>, E1, y/o E2, y/o en una parte que codifica proteínas no estructurales. Una mutación silenciosa preferida se proporciona mediante una alteración de U a C en la posición 1549 en el gen de E<sup>rns</sup>.

25 Una al menos otra alteración adicional preferida más comprende además una alteración de al menos un aminoácido en N<sup>pro</sup>, C, E<sup>rns</sup>, E1, y/o E2, y/o en una parte que codifica proteínas no estructurales. Dicha al menos una alteración adicional se selecciona preferentemente de una alteración silenciosa, por ejemplo una alteración de U a C en la posición 1549 en el gen de E<sup>rns</sup>, una alteración de S a F en la posición 789, una alteración de A a T en la posición 445, una alteración de D a N en la posición 774, una alteración de V a G en la posición 831, y/o una delección de T  
30 en la posición 834. Se prefiere incluso más que dicha al menos una alteración adicional comprenda al menos dos alteraciones adicionales seleccionadas de una mutación silenciosa, un sitio de N-glicosilación adicional y/o una alteración de aminoácidos, además de la sustitución de la prolina central en el dominio TAVSPTTIJR por asparagina. Dichas al menos dos alteraciones adicionales están presentes en la misma proteína o en proteínas diferentes seleccionadas de N<sup>pro</sup>, C, E<sup>rns</sup>, E1, E2, y proteínas no estructurales. Se prefiere que dichas al menos dos alteraciones  
35 adicionales estén presentes en la misma proteína o en proteínas diferentes seleccionadas de N<sup>pro</sup>, C, E<sup>rns</sup>, E1, y E2.

40 En un aspecto adicional más, la divulgación proporciona un virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) recombinante, que comprende una adición de al menos un aminoácido en un dominio "TAVSPTTLR" desde la posición 829 a 837 en E2 codificada por un genoma de VFPC parental. Dicha inserción reducirá al mínimo o incluso inhibirá la unión de los anticuerpos monoclonales específicos de E2 a la proteína E2 alterada. Una inserción de al menos un aminoácido en un dominio "TAVSPTTLR" se combina preferentemente con al menos una alteración adicional seleccionada de una mutación silenciosa, un sitio de N-glicosilación adicional y/o una alteración de aminoácidos, de una combinación de los mismos, en N<sup>pro</sup>, C, E<sup>rns</sup>, E1, E2, y la proteína no estructural. Dicha al menos una alteración adicional se selecciona preferentemente de una alteración silenciosa, por ejemplo una alteración de U a C en la posición 1549 en  
45 el gen E<sup>rns</sup>, una alteración de S a F en la posición 789, una alteración de A a T en la posición 445, una alteración de D a N en la posición 774 y/o una alteración de V a G en la posición 831.

50 El genoma parental de un CSPV recombinante de acuerdo con la divulgación preferentemente es el genoma de una cepa de CSPV atenuado.

Las cepas de VFPC atenuados se puede generar mediante mutación del gen E<sup>rns</sup> que codifica una proteína con actividad ARNasa (Mayer et al., 2003. Virus Res. 98: 105-16); mediante delección de N<sup>pro</sup> de las cepas virulentas del VFPC (Mayer et al. 2004. Vaccine 22: 317-328); mediante la combinación de mutaciones en E<sup>rns</sup> y E2 (van Gennip et al. 2004. J. Virol. 78: 8812-8823); mediante la mutación del gen E1 (Risatti et al., 2005. Virology 343: 116-127); y  
55 mediante la mutación del gen E2 (Risatti et al., 2007. Virology 364: 371-82).

Una cepa atenuada del VFPC preferida comprende una inserción en la región no codificante en el extremo 3'. Por ejemplo, una inserción de 12 nucleótidos de la región no traducida 3' conduce a la atenuación del VFPC (Wang et al., 2008. Virology 374: 390-8). Dicha inserción comprende preferentemente una secuencia de 12 nucleótidos que  
60 consiste en 5'-CUUUUUUCUUUU.

65 En la invención, el genoma parental es el genoma de una cepa C (china). Aún más preferida como genoma parental es el genoma de la cepa C Cedipest, que es un virus de la cepa C que se adaptó para cultivos en suspensión de la línea celular de riñón porcino SK6 (Terpstra et al., 1990. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 97:77-9). Los cerdos a los que se inocularon 400 - 600 DICT<sub>50</sub> de la cepa Cedipest están totalmente protegidos contra la exposición con más de 100 DL50 de cerdo de una cepa virulenta de VFPC a los 7 días ya los 6 meses después de la vacunación. La

divulgación proporciona una molécula de ADNc que comprende una copia del genoma del virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) recombinante que codifica un dominio "TAVSPTTLR" alterado desde la posición 829 a 837 en E2. Dicha molécula de ADNc comprende preferentemente un genoma viral parental del VFPC recombinante sustancialmente completo de acuerdo con invención, por lo que dicho genoma parental deriva de la cepa C (china), o, más preferido, de la cepa Cedipest. Una molécula de ADNc preferida comprende una copia de un genoma del VFPC recombinante que codifica una proteína E2 que comprende una delección de al menos un aminoácido en un dominio "TAVSPTTLR". La divulgación también proporciona un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal, que dominio específicamente dicho dominio "TAVSPTTLR" alterado. La divulgación también proporciona una construcción que codifica una proteína que comprende dicho dominio "TAVSPTTLR" alterado. La invención divulgación también se refiere a una proteína que comprende dicho dominio "TAVSPTTLR" alterado y a un péptido que comprende dicho dominio "TAVSPTTLH" alterado y al uso de dicha proteína o péptido en un inmunoensayo tal como, por ejemplo, un ELISA.

La invención proporciona una vacuna viva frente a la FPC que comprende un VFPC recombinante de acuerdo con la invención.

Una vacuna, o composición INMUNOLÓGICA activa, que comprende un VFPC recombinante de acuerdo con la invención combina la rápida inducción y duración de la protección inducida por un virus vivo, atenuado con la posibilidad de diferenciación entre animales vacunados y animales infectados con el virus de tipo silvestre debido a las diferencias específicas en el dominio TAVSPTTLK conservado de E2, que es un importante epítipo inmunodominante de la proteína E2.

Se han desarrollado varias vacunas que conducen a una marcada reducción en los niveles de virus circulante y una reducción concomitante de los casos clínicos. Por ejemplo, se ha desarrollado una vacuna de subunidad contra el CSKV que se basa en la glicoproteína de la cubierta E2. Esta vacuna de subunidad permite la discriminación entre cerdos vacunados e infectados sobre la base de la detección de anticuerpos contra E<sup>RNS</sup> (Van Aarle, 2003. Dev Biol Stand (Basel) 114: 193-200). Sin embargo, la vacuna es inferior a la vacuna de la cepa C con respecto tanto al inicio como a la duración de la inmunidad. Más importante es el hecho de que los ELISA de E<sup>rns</sup> que acompañan a esta vacuna también detectan otros miembros del género pestivirus (es decir, el VDVB y el VEF). Por tanto, su uso no se recomienda en regiones en las que estos virus circulan (2003/265/EC; SANCO/10809/2003).

La vacuna adicional la proporciona la denominada partícula del replicón vírico (VRP)). Una partícula de VRP contiene un ARN genómico mutante que es capaz de replicarse y expresar las proteínas virales codificadas, pero que no contiene la información completa requerida para la formación de partículas debido a delecciones en al menos uno de los genes que codifican una proteína estructural viral. Estas partículas de virus no son transmisibles y, por lo tanto, cumplen uno de los requisitos para una vacuna segura. Sin embargo, la VHP con una delección parcial o completa del gen E2 indujo protección únicamente parcial contra la exposición letal al VFPC altamente virulento (Maurer et al., 2005. Vaccine 23: 3318-28).

La divulgación proporciona además un método para proteger a un animal contra la FPC, que comprende administrar a dicho animal una cantidad eficaz de una vacuna de acuerdo con la invención.

Una cantidad eficaz se define como una cantidad de dicho vacuna que inducirá una respuesta inmunológica en el individuo al que se administra que tiene como resultado el desarrollo en el individuo de una respuesta inmunitaria secretora, celular y/o mediada por anticuerpos a la vacuna. Dicha respuesta inmunitaria secretora, celular y/o mediada por anticuerpos a la vacuna es también eficaz frente a una exposición con una cepa del VFPC virulenta.

Dicha cantidad efectiva se administra preferentemente por vía oral u oronasal o intramuscular. Una composición inmunogénica contra la fiebre porcina clásica, que comprende un VFPC recombinante de acuerdo con la invención, se administra preferentemente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un método divulgado adicional de proteger a un animal contra la FPC comprende proporcionar una cantidad eficaz de una vacuna de acuerdo con la invención como una vacuna de cebo, especialmente para proteger a los animales silvestres tales como jabalíes.

Las vacunas eficaces reducen o previenen los signos clínicos mediante la prevención de la replicación del virus y/o la reducción de la transmisión del virus. El término DIVA (para diferenciar a los animales infectados de los vacunados) se utiliza para vacunas y sus pruebas diagnósticas acompañantes que se basan en mutantes de los virus de tipo silvestre, junto con una prueba de diagnóstico de diferenciación. Este sistema hace posible la vacunación masiva de una población animal susceptible sin comprometer la identificación serológica de los animales convalecientes.

La divulgación proporciona un método para diferenciar los animales infectados con VFPC de los animales no infectados o de animales vacunados con la vacuna para la FPC de acuerdo con la invención, que comprende analizar el suero de un animal en una prueba serológica. En este caso, la vacuna del VFPC comprende una alteración del dominio TAVSPTTLR de acuerdo con la invención, y, más preferida, al menos una alteración adicional

en la proteína E2 tal como, por ejemplo, una alteración en el dominio LFDCTNP de la posición de aminoácido 772 – 778.

5 Dicha prueba serológica comprende preferentemente uno o más anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales que reconocen una proteína E2 que comprende un dominio TAVSPTTLR intacto, y uno o más anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales que reconocen un epítipo adicional codificado por VFPC, tal como un epítipo adicional dentro de la proteína E2, por ejemplo, el epítipo LFDGTNP.

10 En un aspecto preferido, dichos ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de anticuerpos permiten el diagnóstico de la FPC en cerdos vivos. ELISA preferidos son los ELISA de tipo sándwich. Un ELISA preferido es un ELISA de competición basado en E2, tal como, por ejemplo, Ceditest 2.0 ELISA. Mediante preincubación del suero de un animal con una proteína E2 mutante que comprende un dominio TAVSPTTLJFV alterado, en combinación o no con un dominio LFDGTNP alterado, es posible reducir dicho suero para anticuerpos dirigidos contra dicho dominio TAVSPTTLE alterado y dominio LFDGTNP alterado.

15 Un ELISA más preferido es un ELISA basado en péptidos, en el que los péptidos están reticulados a placas de ensayo de micropocillos. Dicha reticulación se realiza, preferentemente, a través de una proteína de anclaje tal como, por ejemplo, poli-L-lisina. Los ELISA que emplean péptidos reticulados son en general, más sensibles en comparación con los ELISA que emplean péptidos recubiertos pasivamente. La técnica es relativamente simple de realizar, no requiere instalaciones para cultivo tisular, es adecuada para la automatización y puede proporcionar resultados en medio día. Se pueden usar anticuerpos monoclonales y/o policlonales que diferencien de forma inequívoca entre cepas de campo y de vacuna del VFPC por un lado y entre el VFPC y otros pestivirus por otro lado. Se podría usar un péptido para bloquear la reactividad cruzada inespecífica.

25 Dicho ELISA basado en péptido es, preferentemente, un ELISA de péptido en fase líquida (Ip-ELISA). En dicho Ip-ELISA para la detección de anticuerpos contra el VFPC, se incuba un suero de prueba con una mezcla de un péptido modificado de VFPC y un péptido control heterólogo, por ejemplo un péptido de la VDVB. Dicho péptido de VFPC modificado está biotinilado preferentemente, mientras que el péptido de control no está biotinilado. Los anticuerpos específicos del VFPC se unirán a dicho péptido del VFPC y son capturados a través de dicha modificación, por ejemplo mediante la unión a avidina o estreptavidina del péptido VFPC biotinilado. Los anticuerpos que forman complejos con el péptido modificado de VFPC se pueden detectar, por ejemplo, se pueden detectar anticuerpos porcinos en complejo mediante un conjugado de peroxidasa antiporcina y la posterior incubación con un sustrato adecuado.

35 Una prueba alternativa para la diferenciación de un animal que está infectado con el VFPC de campo o vacunado con un virus recombinante de la invención se proporciona mediante una prueba con anticuerpos fluorescentes (FAT) y transcriptasa inversa, seguida de la amplificación del ADNc, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa y análisis de la secuencia del ADN amplificado. Se usa FAT para detectar el antígeno del VFPC en secciones de crioestado de amígdalas, bazo, riñón, ganglios linfáticos o porciones distales del íleon aislado de un cerdo que se sospecha que está infectado con VFPC o que está vacunado con una vacuna de acuerdo con la invención. En una prueba alternativa, el VFPC se aísla de, por ejemplo, las amígdalas de un animal que está infectado o que se sospecha que está infectado con el VFPC de campo y se incuba con células PK-15. Los virus replicados se detectan posteriormente en las células PK-15 utilizando anticuerpos que diferencian entre un virus de campo y un virus recombinante de acuerdo con la invención.

45 Una prueba serológica preferida adicional comprende un ELISA competitivo para determinar si dicho suero comprende anticuerpos que inhiben la unión de un anticuerpo dirigido contra una proteína E2 que comprende un dominio TAVSPTTLR intacto, o si dicho suero comprende anticuerpos que inhiben la unión de un anticuerpo dirigido contra una proteína E2 que comprende un dominio TAVSPTTLR alterado.

50 Una prueba serológica preferida adicional comprende uno o más anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, que reconocen específicamente una proteína E2 que comprende un dominio TAVSPTTLR alterada de acuerdo con la invención. Dicha prueba serológica puede comprender uno o más anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales, que reconocen específicamente una proteína E2 que comprende un dominio TAVSPTTLR alterado de acuerdo con la invención y un dominio inmunogénico adicional alterado de dicha proteína E2. Dicha vacuna marcadora requiere la inducción fiable y la detección (sensible y específica) de anticuerpos discriminatorios después de la vacunación de los animales. La presencia de dichos anticuerpos discriminatorios se detecta mediante dicho prueba serológica que se selecciona preferentemente a partir de una prueba de anticuerpo vírico neutralizante fluorescente, un ensayo ligado a peroxidasa neutralizante y un ELISA de anticuerpos.

60 La divulgación proporciona un método para aislar un virus recombinante infeccioso que puede usarse en una vacuna marcadora que permite diferenciar a los animales infectados de los animales vacunados, comprendiendo el método la selección de un dominio inmunodominante de una proteína codificada por dicho virus y que está conservado en al menos el 90 % de los virus, preferentemente en al menos 95 % de los virus, más preferentemente en al menos el 99 % de los virus; la introducción de una alteración, preferentemente una delección, en una región genómica de dicho virus que codifica dicho dominio inmunodominante, tal como para generar un virus de partida; poner en contacto el

genoma alterado con una célula o línea celular adecuada; pasar la célula o línea celular adecuada para permitir la propagación de un virus; y aislar un virus infeccioso de dicha célula o línea celular adecuada que comprende una o más alteraciones adicionales en el genoma que compensan una pérdida de idoneidad del virus de partida.

5 Dicha alteración en un dominio inmunodominante conservado de una proteína permite la generación de anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales y policlonales, que discriminan un virus que expresa un dominio inmunodominante de tipo silvestre de un virus que expresa un dominio de inmunodominante alterado. La divulgación también proporciona un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal, que dominio específicamente dicho dominio inmunodominante conservado alterado.

10 La divulgación también proporciona una construcción que codifica una proteína que comprende dicho dominio inmunodominante conservado alterado. La divulgación también se refiere a una proteína que comprende dicho dominio inmunodominante conservado alterado y a un péptido que comprende dicho dominio inmunodominante conservado alterado.

15 Una vacuna que comprende una alteración en un dominio inmunodominante conservado además no induce la generación de anticuerpos en un individuo vacunado que reconozcan un dominio inmunodominante sin alterar., A prueba de diagnóstico dirigida al reconocimiento de dicho dominio inmunodominante conservado sin alterar permite discriminar a un animal infectado con un virus que expresa un dominio inmunodominante de tipo silvestre de un animal vacunado.

20 Dicha alteración de un dominio inmunodominante conservado puede dar lugar a un virus que es menos eficiente en las células que infectan, en comparación con el virus de tipo silvestre y/o que se replica de forma menos eficiente en las células infectadas. Los pases de una célula o línea celular infectada permiten la introducción de una o más alteraciones genómicas en el segundo sitio que rescatan el virus. Dicho virus rescatado infecta de manera más eficiente y/o se replica en células, en comparación con el virus alterado, o ha antagonizado otra desventaja que se correlaciona con la alteración de un dominio inmunodominante conservado. Por tanto, el virus rescatado comprende una o más alteraciones adicionales en el genoma parental que compensan por una pérdida de la idoneidad introducida por la alteración en un dominio inmunodominante conservado. Las una o más alteraciones adicionales en el genoma parental pueden obstaculizar la generación de un virus revertiente que comprende un dominio inmunodominante parental.

25 Dicha alteración en una región genómica puede tener como resultado una delección de al menos un aminoácido. Una delección de al menos un aminoácido, tal como un aminoácido, dos aminoácidos, tres aminoácidos o más de tres aminoácidos, obstaculizará aún más la generación de un virus que comprende un dominio inmunodominante parental.

30 Una delección de al menos un aminoácido se puede combinar con al menos una alteración adicional en el genoma del virus parental. Dicha al menos una alteración adicional permite el pase de una célula o línea celular infectada del virus de partida en el caso de que dicha delección de al menos un aminoácido sea perjudicial para la replicación del virus en dicha célula o línea celular. La introducción de dicho al menos una alteración adicional restaura la idoneidad del virus de partida en alguna medida, lo que permite que el virus de partida se replique en dicha célula o línea celular.

35 En la divulgación realizada, dicho virus se selecciona entre virus de ARN de cadena negativa, tales como el virus de la rabia y el virus de la enfermedad de Newcastle, y virus de ARN de cadena positiva tales como *Flaviviridae*, preferentemente un pestivirus, tales como el virus de la diarrea viral bovina, el virus de la enfermedad de la frontera y el VFPC.

40 La invención proporciona además un VFPC recombinante infeccioso como se define en la reivindicación 1.

45 La divulgación también proporciona el uso de un virus recombinante infeccioso, preferentemente VFPC, en una vacuna para vacunar a uno o más animales para proteger a dicho animal frente a la infección con un virus de campo virulento.

50 Dicho uso de la vacuna permite diferenciar a los animales infectados de los animales no infectados o de los animales vacunados.

55 Una gran ventaja de una vacuna marcadora eficaz es que permite la detección de cerdos infectados en una población de cerdos vacunados y, por lo tanto, ofrece la posibilidad de controlar la propagación o la reintroducción del CSPV en una población de cerdos. Por lo tanto, hace posible declarar, con un cierto nivel de confianza, que una población de cerdos vacunados está libre de FPC según los resultados de pruebas de laboratorio.

60 Este último podría dar lugar a una reducción del período de restricción para la exportación de cerdos vivos o productos de cerdo. La ventaja económica de una rápida reanudación del comercio es evidente y, por lo tanto, está estrechamente relacionada con el uso de cualquier vacuna marcadora.

**Leyendas de las figuras**

Fig. 1. Mutaciones introducidas y adaptativa en E2.

<sup>a</sup>Comparación de los aminoácidos de las posiciones 772 a 791 y 823 a 842 de los virus recombinantes en estudio. <sup>b</sup>Las sustituciones de aminoácidos introducidas se indican en negrita, las mutaciones adaptativas se indican en cursiva en negrita.

<sup>c</sup>Los epítomos TAVSPTTLR y LFDGTNP están en recuadros.<sup>d</sup>++; El virus se rescató y el crecimiento fue comparable al del vFlc34 (de tipo silvestre), +; Virus con alteraciones del crecimiento en comparación con vFlc34, ‡; el virus se perdió del medio de cultivo después de unos pocos pases, -; No se detectó el virus, nd; No determinado.

<sup>e</sup>Uno de los codones AAU recientemente introducido se eliminó durante la propagación del virus.

Fig. 2. Características de crecimiento *In vitro* de vFlc34 (cepa C de tipo silvestre), mutaciones de glicosilación de la cepa C CvFlc-N1 y vFlc-N2 y mutantes de delección de la cepa C vFlc-ΔP y vFlc-ΔPTa1. Las monocapas SK6.T7 se infectaron, cubrieron con medio de crecimiento que contiene metilcelulosa y se incubaron a 37 °C durante cuatro días. Las monocapas se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se inmunotñieron con mAb conjugado con peroxidasa de WB103.

Fig. 3. (A) Curvas de crecimiento de virus de múltiples etapas vFlc34 (○), vFlc-N1 (□), vFlc-N2 (◊), y (B) of vFlc34 (◇), vFlc-ΔP (x) y vFlc-ΔPTa1 (Δ). Las células SK6.T7 se infectaron con una multiplicidad de infección de 0,1.

Fig. 4. Transferencia de tipo Western de un gel de desnaturalización PAGE que contiene lisados de células SK6.T7 no infectadas (simuladas) o infectadas con vFlc34, vFlc-N1 o vFlc-N2, respectivamente, y las mismas muestras después del tratamiento con PNGasa F.

Las proteínas se detectado mediante el mAb C2 e inmunoglobulinas de conejo anti-ratón conjugadas con peroxidasa como anticuerpo secundario. Las posiciones de los oligómeros (O), monómeros (M) y monómeros tratados con PNGasa F (M \*) están indicadas. La posición de las proteínas estándar de peso molecular estándar se indica a la izquierda.

Fig. 5. Análisis de la respuesta de anticuerpos a E2 y E<sup>RNS</sup> mediante el Ceditest 2,0 E2 ELISA (A) y el ELISA CHEKIT E<sup>RNS</sup> (□), respectivamente, inducido por vFlc-34 (A), vFlc-N1 (B), o vFlc-ΔP (C). Los valores representados son los promedios (n = 4) con desviación estándar.

Fig. 6A-E. Paneles de la izquierda: Análisis de la respuesta de anticuerpos a E2 y E<sup>RNS</sup> mediante el Ceditest 2.0 E2 ELISA (A) y el ELISA CHEKIT E<sup>RNS</sup> ELISA (□), respectivamente, inducidos por vFlc34 (Conejos 1.1 (A) y 1.2 (B)) o vFlc-ΔPTa1 (Conejos 2.1 (C), 2.2 (D) y 2.3 (E)). Paneles de la derecha: Análisis de los antisueros de conejo obtenidos el día 36 mediante análisis de PEPSCAN. Se muestra la reactividad de los antisueros de conejo con 162 péptidos (eje x). Los números en el eje x corresponden a la posición del péptido en el extremo N en el polipéptido del VFPC. El eje y representa los valores ODccd.

Fig. 6F-G. Comparación de la reactividad de los anticuerpos a partir de antisueros de conejo contra vFlc34 (F) o vFlc-ΔPTa1 (G) con el epítomo TAVSPTTLR. Los números en el eje x corresponden a la posición del péptido en el extremo N en el polipéptido del VFPC. El eje y representa los valores ODccd.

Fig. 7. Estructura antigénica propuesta del ectodominio de la proteína E2 de la cepa C del VFPC (modificada de Van Rijn et al., 1994. J Virol 68: 3934-42).

Los dominios antigénicos B/C y A están indicados. Las posiciones de PNGS mencionados en el texto se indican con flechas. En estos mutantes, el aminoácido indicado es sustituido por un resto de Asn. Los glicanos unidos a N auténticos están dibujados con líneas continuas, los glicanos unidos a N recién introducidos (supuestos) están dibujados con líneas discontinuas. Las posiciones en E2 que se ha predicho que están colocalizadas en la estructura E2 nativa están sombreadas. Los epítomos de linfocitos B <sup>829</sup>TAVSPTTLR<sup>837</sup> y <sup>772</sup>LFDGTNP<sup>778</sup> están indicados en negrita.

Fig. 8. Las temperaturas del cuerpo (símbolos cerrados) y las puntuaciones clínicas (CS; símbolos abiertos) de los cerdos vacunados con vFlc34 (A; n° de cerdos: 3166-3170), vFlc-ΔPTa1 (B; n° de cerdos 3171-3175) o cerdos que inoculado con solo medio de cultivo (C; n° de cerdos 3176-3178). Los cerdos fueron expuestos a la cepa Brescia virulenta el día 28. La fiebre se definió como una temperatura corporal por encima de 40 °C (línea discontinua).

Fig. 9. Recuentos de leucocitos de sangre periférica (A) y de plaquetas (B) en sangre periférica obtenidos a partir de cerdos expuestos a una dosis letal de la cepa Brescia altamente virulenta. A los 28 días antes de la exposición, se inoculó a los cerdos medio de cultivo solamente, o fueron vacunados una vez con vFlc34 (n° de cerdos 3166-3170) o vFlc-ΔPTa1 (n° de cerdos 3171-3175).

Fig. 10. Análisis de las respuestas de anticuerpos inducidos en cerdos vacunados con vFlc34 o vFlc-ΔPTa1 y posteriormente expuestos con la cepa virulenta Brescia. El ELISA PrioCHECK VFPC Ab 2.0 E2 (A) y el ELISA Chekit ERNS (B) se usaron para el análisis de las respuestas de anticuerpos. Los sueros que proporcionan más

del 40 % o el 50 % de bloqueo se consideran positivos para los anticuerpos frente al VFPC en el ELISA de E2 y el ELISA de ERNS, respectivamente. Los cerdos fueron vacunados el día 0 con vFlc34 (nº de cerdos 3166-3170; líneas interrumpidas) o vFlc-ΔPTa1 (nº de cerdos 3171-3175; líneas continuas) y fueron expuestos el día 28 (flecha).

5

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 10 Materiales y métodos

Virus y células. Células de riñón porcino que expresan constitutivamente la ARN polimerasa de T7 (SK6.T7) (van Gennip et al., 1999. J. Virol 78: Métodos. 117-28) se cultivaron en medio K1000 suplementado con glutamina (0,3 mg/ml, Gibco), 5 % de suero bovino fetal y los antibióticos penicilina (100 U/ml, Gibco), estreptomina (100 U/ml, Gibco), anfotericina B (2,5 µg/ml, Gibco) y, cuando sea apropiado, con L-histidinol dihidrocloruro 10 mM (Sigma). A menos que se indique lo contrario, se produjeron reservas de virus mediante tres a cuatro pases del virus en las células SK6.T7, seguido por dos ciclos sucesivos de congelación/descongelación de las monocapas infectadas. Este último se llevó a cabo para maximizar la liberación del virus de la cepa C, que se asocia fuertemente a las células. Las reservas de virus se titularon en células SK6.T7 en diluciones log 10 y se determinaron como la DIT50/ml.

20

Construcción de mutantes de la cepa C. El plásmido pPRK-flc34, que contiene una copia de ADN de la cepa C del VFPC bajo el control del promotor de T7 se utilizó como una plantilla para introducir mutaciones mediante mutagénesis dirigida al sitio. Se descubrió que la copia de ADN previamente publicada del virus de la cepa C, denominada pPRKflc-133 (Moormann et al., 1996. J Virol 70:763-70) carecía de una citosina en la posición -10 en el extremo 3' del genoma. En pPRK-flc34, se corrige este error. Los cebadores se describen en la Tabla 1. El nombre del cebador directo corresponde al nombre del virus recombinante construido. El cebador RV-r se utilizó como cebador inverso para cada construcción. La amplificación por PCR se realizó usando el sistema de PCR Expand High-Fidelity (Roche). Los productos de PCR se clonaron en vectores pGEM-T Easy de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega) y se secuenciaron usando un analizador genético ABI 310 PRISM (Applied Biosystems). Los productos de la PCR se liberaron de los plásmidos pGEM-T mediante digestión con *Apa*I y se utilizaron para reemplazar el correspondiente fragmento del genoma del plásmido pPRCl29, un plásmido derivado de pOK12 que contiene ADNc que codifica la mitad 5' del virus de la cepa C. Los plásmidos pPRCl29 se digirieron después con *Not*I y *Sal*I, y los fragmentos resultantes se utilizaron para sustituir el segmento correspondiente del plásmido pPRK-flc34, que tiene como resultado los plásmidos pFlc-N1, pFlc-N2, pFlc-N3, pFlc-N4, pFlc-N5, pFlc-ΔP, pFlc-ΔPT, pFlc-ΔSP, pFlc-ΔSPT, pFlc-ΔVSP, pFlc-ΔAVSP y pFlc-ΔSPTTL.

35

Producción en virus de mutantes de la cepa C. Los plásmidos que contienen clones de ADNc de longitud completa se linealizaron con *Xba*I y se transfectaron en células SK6.T7 como se ha descrito anteriormente (van Gennip et al., 1999. J Virol Methods 78:117-28). Cuatro días después de la transfección, la expresión de proteínas virales se determinó mediante ensayos de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) utilizando mAb WB103, que está dirigido contra la proteína no estructural del VFPC NS3 (Edwards et al., 1991. Vet Microbiol 29:101-8). Las células procedentes de otro pocillo se trataron con tripsina, se transfirieron a un matraz de cultivo tisular de 25 cm<sup>2</sup> y se cultivaron durante tres a cuatro días. Cuando sea necesario, las células se pasaron varias veces para apoyar el crecimiento del virus. Las monocapas se congelaron-descongelaron, se centrifugaron para eliminar los restos celulares y posteriormente se almacenaron -70 °C. Los lisados aclarados se utilizaron para preparar lotes de semillas de las vacunas candidatas mediante la infección de células SK6.T7 recientes seguida de recolección cuatro días después. El crecimiento de los virus siempre se realizó en células SK6.T7. Aunque los virus descritos en el presente documento también se replicaron normalmente en las células SK6, los rendimientos de producción fueron reproducibles con mayor precisión cuando se utilizaron células SK6.T7.

40

Para estudiar la cinética de crecimiento de los virus rescatados, las monocapas subconfluentes matraces de cultivo tisular de 25 cm<sup>2</sup> se infectaron a una multiplicidad de infección de 0,1. Después de 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas de la infección, se determinaron los títulos de virus en los lisados celulares. El material se congeló-descongeló dos veces, se aclaró mediante centrifugación a 2.500 x g a 4 °C y se almacenó a -70 °C. Los títulos de virus (log DICT<sub>50</sub>/ml) se determinaron en células SK6.T7.

55

Los genes de E2 de los virus rescatados se secuenciaron. Cuando sea apropiado, también se secuenciaron los genes que codifican las proteínas de la cápside ((C), E<sup>RNA</sup>s y E1 (es decir, las proteínas estructurales). Con este fin, el ARN viral se aisló utilizando el kit de aislamiento de ARN High Pure Total RNA (Roche) y se utilizó para la síntesis de ADNc usando el sistema de síntesis Superscript First-Strand Synthesis (Invitrogen) y un cebador específico de gen. El ADNc se secuenció como se ha descrito en lo que antecede.

60

Análisis de transferencia de tipo Western. Los lisados de células SK6.T7 infectadas se prepararon a partir de monocapas confluentes cultivadas en matraces de cultivo tisular de 25 cm<sup>2</sup>. Con este fin, las células se lisaron en 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene 1 % de Nonidet P40 (BDH) y el cóctel inhibidor de proteasa (Complete, Roche). Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación de 4 minutos a 10.000

65

x g a 4 °C. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 12 % (sistema de NuPAGE, Invitrogen) y posteriormente se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Protran, Schleicher y Schuell). Después de bloquear con PBS que contenía 0,05 % de Tween-20 y 1 % de Protifar (Nutricia), las transferencias se incubaron con mAb C2 específico de la cepa C, que está dirigido contra el dominio B/C de E2 (Bognar y Meszaros, 1963. Acta Vet Acad Sci Hung 13:429-438) y, posteriormente, con inmunoglobulinas de conejo anti-ratón conjugadas con peroxidasa (DAKO). La actividad de peroxidasa se detectó con el sistema de quimioluminiscencia mejorada (ECL Plus, GE Healthcare) usando un generador de imágenes molecular Storm 860 (GE Healthcare).

Ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA). Las monocapas se lavaron con D-PBS (Gibco), se secaron al aire y se congelaron a -20 °C. Las monocapas se fijaron con paraformaldehído (4 % p/v en PBS) durante 15 minutos y posteriormente se lavaron con PBS. Los mAb específicos del dominio A conjugados con peroxidasa b2, b3, b4, b7 (Wensvoort et al., 1989. J Gen Virol 70: 2865-76), c1, c4, c8, c11 (Bognár y Mészáros, 1963. Acta Vet Acad Sci Hung 13:429-438) y el mAb usado en el ELISA Ceditest 2.0, denominado mAb 18.4, se usaron en PBS que contiene 0,05 % de Tween-80 (PBS-T) y 5 % de suero de caballo. Después de incubar a 37 °C durante 1 hora, las placas se lavaron tres veces con PBS-T, después de lo cual la actividad de la peroxidasa se detectó utilizando 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, Sigma) como sustrato.

Inoculación de Conejos. Conejos blancos New Zealand de aproximadamente 2 kg se estabularon en grupos de dos a cuatro animales. Las temperaturas corporales se controlaron diariamente, a partir de tres días antes de la inoculación hasta cinco días después. La temperatura normal del cuerpo de los conejos varía de 38,5 a 40,1 °C. En consecuencia, la fiebre se definió como una temperatura corporal por encima de 40,1 °C. Se inocularon a los conejos a través de la vena marginal de la oreja 200 µl de medio de crecimiento que contiene 10<sup>3</sup> DICT<sub>50</sub> de virus. Cada siete días, se recogió el suero. La sangre con EDTA, para su uso para el aislamiento del virus, se recogió cuatro días después de la inoculación.

Aislamiento del virus. Los leucocitos de sangre periférica (PBL) se concentraron a partir de las muestras de sangre con EDTA mediante precipitación en cloruro amónico (0,83 % de NH<sub>4</sub>Cl) como se ha descrito (Terpstra y Wensvoort, 1988. Vet Microbiol 16: 123-8). Los PBL se resuspendieron en PBS y se congelaron a -70 °C. Al día siguiente, las monocapas de células SK6.T7 subconfluentes se incubaron con la suspensión de PBL congelados-descongelados durante 1 hora, tras lo cual la suspensión se sustituyó por medio de cultivo recién preparado, seguido de un período de incubación de cuatro días. Para producir suficiente virus para el análisis de secuencias, los virus rescatados se pasaron algunas veces en las células SK6.T7.

Análisis PEPSCAN. Un conjunto completo de 15 péptidos de 15 aminoácidos de longitud derivados de la proteína E2 de la cepa Brescia de VFPC, que abarca los aminoácidos 690 a 851 de la poliproteína del VFPC, se sintetizaron en tarjetas miniPEPSCAN en formato de tarjeta de crédito como se ha descrito previamente (Geysen et al., 1984. Proc Natl Acad Sci U S A 81:3998-4002). La unión de anticuerpos a partir de sueros a cada péptido se analizó en un ELISA basado en pernos como se describe en Sloodstra et al. (Sloodstra et al., 1996. Mol Divers 1:87-96).

## 40 RESULTADOS

Producción y caracterización de mutantes de la cepa C con potenciales sitios de glicosilación ligado a N recién introducidos (PNGS). Se construyeron construcciones de ADNc de longitud completa que codifican los virus de la cepa C mutante con sitios de N-glicosilación ligadas a N recién introducidos en el epítipo TAVSPTTLR (Fig. 1) mediante modificación genética de pPRK-flc34, un clon de ADNc de la cepa C "Cedipest" bajo el control del promotor T7. El requisito mínimo para la N-glicosilación es la presencia de la secuencia de aminoácidos asparagina (Asn) -X-treonina (Thr) o serina (Ser), en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro o aspartato (Asp) (Kornfeld y Kornfeld, Annu Rev Biochem 1985. 54: 631-64). El virus vFlc-N1 mutante contiene un solo PNGS recién introducido, mientras que los mutantes vFlc-N2, vFlc-N3, vFlc-N4 y vFlc-N5 contienen varios (Fig. 1). En el virus vFlc-N5, el resto de Pro central del epítipo TAVSPTTLR (Pro<sup>833</sup>) está sustituido por dos restos de Asn (N), lo que tiene como resultado dos PNGS solapantes (es decir, NNNT).

Para producir el virus recombinante, plásmidos linealizados se transfectaron en células SK6.T7, que expresan constitutivamente ARN polimerasa de T7. Cuatro días después de la transfección, en todos los casos, la presencia de virus infecciosos en el medio de cultivo se demostró mediante la infección de células SK6-T7 recién preparadas. Sin embargo, se observaron grandes diferencias en la idoneidad viral. Aunque los focos de infección de vFlc-N1 eran algo más pequeños que los de vFlc34 (Fig. 2), las curvas de crecimiento de varios etapas no mostraron diferencias significativas en la idoneidad de estos dos virus (Fig. 3A). El virus vFlc-N2 estaba claramente más atenuado, lo que da focos considerablemente más pequeños y títulos finales menores (Figs. 2 y 3A, respectivamente). Los virus del sobrenadante de las células transfectadas con pFlc-N3-N4 o pFlc podrían pasarse una vez o dos veces, pero en última instancia se perdieron. Para proporcionar los virus con la oportunidad de aumentar su idoneidad mediante mutación, las células que contienen estos virus se pasaron varias veces. Por desgracia, sin embargo, el número de células teñidas positivamente no aumentó durante estos pases, lo que sugiere que no se introdujeron mutaciones para compensar la idoneidad.

Curiosamente, el virus producido a partir de pFlc-N5 (Fig. 1) se pudo rescatar después de solo unos pocos pases de células transfectadas, que con el tiempo produjo un título de 10<sup>4</sup> DIT<sub>50</sub>/ml. El gen de E2 de este virus se secuenció

y se descubrió que no había cambiado. . Para producir vFlc-N5 en cantidades mayores, se usó el virus para infectar células SK6.T7 recién preparadas. Aunque este hecho resultó en títulos similares a los obtenidos normalmente de vFlc34 (datos no mostrados), la secuenciación consenso demostró que el virus había perdido uno de los dos restos de Asn recién introducidos y era, por lo tanto, esencialmente idéntico a vFlc-N1. Este hallazgo sugiere que un  
 5 segundo resto de Asn en el epítipo TAVSPTTLR es perjudicial para el virus en alguna etapa del proceso de infección.

En consecuencia, solo los virus vFlc-N1 y vFlc-N2 se consideraron adecuados para estudios posteriores.

10 Para ser adecuado como una vacuna DIVA, la vacuna candidata debe ser incapaz de inducir anticuerpos específicos del dominio A *in vivo*. Sin embargo, para tener una primera idea de si las modificaciones introducidas en los actuales candidatos afectaban a la estructura antigénica del dominio A, los inventores determinaron si los virus recombinantes podrían ser reconocidos en IPMA mediante cualquiera de sus mAb específicos del dominio A. Los mAb específicos del dominio A se produjeron contra la cepa Brescia del VFPC (es decir, los mAb b2, b3, b4, b7) o la  
 15 cepa C (es decir, c1, c4, c8 y c11). Asimismo, el mAb que se usó en el LISA Ceditest 2.0 denominado mAb 18.4, se incluyó en estos experimentos. Dado que algunos de los anticuerpos de los inventores tiñeron solo débilmente la cepa C silvestre, la capacidad de los anticuerpos para reconocer los virus de la cepa C mutante se estudió mediante la tinción de los focos de infección, producidos mediante el cultivo del virus con superposición con metilcelulosa. Mientras que los focos de infección de la cepa C de tipo silvestre C se tiñeron claramente por todos los anticuerpos  
 20 utilizados, estos experimentos demostraron que la sustitución Pro<sup>833</sup> → Asn fue suficiente para impedir el reconocimiento del dominio A por los mAb *in vitro* (datos no mostrados).

A pesar de su exposición en la superficie del virión y el hecho de que es una diana dominante para los anticuerpos neutralizantes, el epítipo TAVSPTTLR del dominio A se ha conservado durante la evolución. Esto sugiere que los  
 25 virus que contienen esta secuencia exacta tienen una ventaja selectiva sobre variantes dentro de la población de virus que contienen sustituciones de aminoácidos en esta región. Aunque los inventores tuvieron éxito en la recuperación de virus con uno (es decir vFlc-N1) o dos (es decir vFlc-N2) PNGS recién introducidos en este epítipo, fue de importancia para estudiar la evolución de estos mutantes en el crecimiento en cultivo de tejidos. Con este fin, vFlc-N1 se pasó treinta veces *in vitro*. Para estudiar la estabilidad fenotípica del virus, las monocapas infectadas se inmunotiñeron con un anticuerpo dirigido contra la proteína no estructural NS3, denominado WB103, y las monocapas duplicadas se tiñeron con una mezcla de anticuerpos específicos del dominio A b3 y b4 para determinar si había revertientes fenotípicas (es decir, virus de los cuales el dominio A se pudo teñir con estos anticuerpos). Después de solo tres pases, se tiñó un porcentaje muy pequeño de células infectadas con vFlc-N1 con la mezcla de  
 30 b3/b4, lo que claramente indica que se había producido la reversión fenotípica.

El principio de exclusión competitiva general de la biología de poblaciones afirma que cuando dos organismos conviven en un entorno en el que los recursos son limitados, uno eventualmente supera al otro (Gause, 1934. Science 79:16-17). Teniendo en cuenta esto, los inventores han querido determinar si la reversión fenotípica podría superar en crecimiento a vFlc-N1 mediante varios pases del virus. Sorprendentemente, la cantidad de la reversión  
 40 fenotípica se mantuvo en un nivel muy bajo, en la mayoría de los experimentos representados por sólo unas pocas células que se tiñeron con la mezcla de mAb b3/b4. Por lo tanto, parecía que el virus de reversión fenotípica se había creado de forma continua, pero siempre se mantuvo como una variante minoritaria en la población de virus. Dado que este hallazgo sugirió una idoneidad inferior de la reversión fenotípica en relación la de vFlc-N1, se consideró improbable que el virus revertiente representaba una verdadera reversión a la secuencia de tipo silvestre de la cepa C. Para identificar la mutación que era responsable del fenotipo de reversión, la población de virus tenía que enriquecerse con el virus de reversión con el fin de ser capaz de secuenciar su genoma. Sembrando diluciones de virus en placas de 96 pocillos, podrían seleccionarse las poblaciones que se enriquecieron en los revertientes fenotípicos. Después de repetir esta selección, se obtuvo una población que contenía cantidades suficientes del virus de reversión para determinar su secuencia del genoma. En dos experimentos individuales, se demostró que el revertiente fenotípico contenía un residuo Ser en la posición en la que introdujo la Asn (es decir, la posición 833 de la poliproteína de VFPC), como resultado de una única transición en el codón de Asn (de AAU a AGU). Dado que esta mutación da lugar a una pérdida del PNGS, no es de extrañar que se acompañe de una capacidad restaurada de los mAb para reconocer el dominio A. En conclusión, la detección de la subpoblación de reversión demuestra que vFlc-N1 exploraba posibilidades para aumentar su idoneidad mediante mutación. Sin embargo, dado que el codón  
 50 AAU recién introducido se mantuvo mediante el genotipo maestro, el virus se considera genéticamente estable a nivel de la población.

El análisis de vFlc-N2 reveló variantes fenotípicas con características similares a las observadas durante los experimentos con vFlc-N1, pero estas no se caracterizaron adicionalmente.

60 Análisis de las movilidades electroforéticas relativas de las proteínas E2 con uno o múltiples PNGS recién introducidos. Para determinar si los PNGS recién introducidos en el epítipo TAVSPTTLR de vFlc-N1 y vFlc-N2 resultaban en la unión de nuevos restos de carbohidratos a E2, las movilidades electroforéticas relativas de las proteínas E2 modificadas se estudiaron mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE) en condiciones reductoras condiciones, seguida de transferencia Western. Las transferencias Western que contienen proteínas separadas de las células infectadas con vFlc34, vFlc-N1 y vFlc-N2 demostraron que la proteína E2 de vFlc-N1 tenía  
 65

un mayor peso molecular que la proteína correspondiente de vFlc34 (Fig. 4). También se detectaron oligómeros que contienen E2, sin embargo, teniendo en cuenta que las proteínas se analizaron en condiciones desnaturizantes, estos oligómeros probablemente no sean fisiológicos (Fig. 4). El tratamiento de los lisados celulares con PNGasa F, una enzima que elimina los glicanos ligados a N de proteínas, produjo proteínas E2 de peso molecular idéntico.

Las transferencias Western que contienen proteínas separadas de vFlc-N2 sugirieron que al menos una de las dos secuencias de glicosilación recién introducidas se utiliza como sitio de anclaje para un resto de hidrato de carbono (Fig. 4). Estos lisados parecían también para contener proteínas E2 de peso molecular incluso mayor, lo que sugiere glicosilación del segundo sitio de glicosilación.

Producción y caracterización de mutantes de la cepa C con deleciones dirigidas al epítipo TAVSPTTLR. Las construcciones de ADNc de longitud completa que codifican virus de la cepa C con deleciones específicas en el epítipo TAVSPTTLR (Fig. 1) se construyeron como se ha descrito anteriormente para los mutantes de glicosilación. La deleción del resto de Pro central del epítipo TAVSPTTLR produjo vFlc-ΔP, que produjo algo de focos de infección algo más pequeños en comparación con vFlc34 (Fig. 2) y creció en la mayoría de los experimentos a 10 veces los títulos más bajos (Fig. 3B). Los títulos más altos obtenidos, sin embargo, superaron  $10^6$  DICT<sub>50</sub>/ml. El análisis de vFlc-ΔP mediante IPMA demostró que este mutante de la cepa C no era detectado por ninguno de los mAb específicos del dominio A de los inventores. En particular, después de 20 pases, la secuenciación consenso demostró una mutación de transición en el codón de Ser<sup>789</sup> (de UCC a UUC), que dio lugar a la sustitución de Ser por fenilalanina (Phe). El virus resultante se denominó vFlcΔPa1 (Fig. 1).

En contraste con vFlc-ΔP, los virus con deleciones de más de un aminoácido estaban altamente debilitados. Similar a lo ya descrito para los mutantes de glicosilación vFlc-N3 y vFlc-N4, los virus del sobrenadante de células transfectadas con plásmidos que codifican estos virus pudieron pasarse algunas veces, pero después se perdieron. Para proporcionar los virus con la oportunidad de aumentar su idoneidad mediante mutación, las células transfectadas con estas construcciones se pasaron varias veces. El pase de las células transfectadas con pFlc-ΔSP, pFlc-ΔSPT, pFlc-ΔVSP, pFlc-ΔAVSP y pFlc-ΔSPTTL no dio lugar a un aumento en la producción de virus.

Durante pases iniciales de las células transfectadas con pFlc-ΔPT, los resultados fueron similares a los obtenidos con las otras construcciones de deleción, produciendo focos de infección que eran de pequeño tamaño constante (promedio de 10-20 células). Sin embargo, después de algunos pases adicionales, la inmunotinción demostró una repentina mejoría en el crecimiento del virus, lo que sugiere que el virus había introducido las mutaciones de compensación de la idoneidad. El virus resultante se denominó vFlc-ΔPTa1. Para identificar las supuestas mutaciones de resucitación en vFlc-ΔPTa1, se determinó la secuencia consenso de su gen de E2. Sorprendentemente, esto demostró que el virus había conservado la deleción introducida y había introducido dos mutaciones en el gen de E2. Convenientemente, un doble pico claro en el cromatograma de la secuencia de una de las mutaciones sugirió que una mutación de transición que resulta en un cambio de codón de GAC a AAC era la primera en producirse (datos no mostrados). Esta mutación dio como resultado la sustitución de Asp<sup>774</sup> a Asn y, curiosamente, introdujo un nuevo PNGS en el dominio A de E2 (Figs. 1 y 7). El segundo cambio era una transversión dentro del codón de la (Val) -831 del epítipo TAVSPTTLR (de GUG a GGG), que tuvo como resultado una sustitución de Val a glicina (Gly).

Teniendo en cuenta la posibilidad de que las mutaciones adaptativas también pueden estar presentes en genes que codifican otras proteínas estructurales, también se determinó la secuencia consenso de los genes C, E<sup>RNS</sup> y E1. El análisis de secuencia del gen C y el gen E<sup>RNS</sup> reveló sólo una única mutación silenciosa en este último (U1549 → C). Curiosamente, en el gen de E1, se detectó una mutación de transversión en la posición 2275 (A2275 → U) que dio lugar a la sustitución de ácido glutámico (Glu)-634 por un ácido aspártico (Asp) (Tabla 2).

Las características de crecimiento *in vitro* de vFlc-ΔPTa1, en relación con vFlc34 y vFlc-ΔP, se visualizan mediante curvas de crecimiento de varias etapas (Fig. 3). Aunque el virus vFlc-ΔPTa1 crece algo más lento que vFlc34, se obtienen títulos finales idénticos.

Experimental evolución de los virus producidos a partir del plásmido pFlc-ΔPT. ΔPT. Los resultados obtenidos del análisis de la secuencia de vFlc-ΔPTa1 llevaron a los inventores a sugerir que la mutación silenciosa en E<sup>RNS</sup>, la sustitución de aminoácido en E1 y las dos sustituciones en E2 fueron los responsables de la recuperación de la idoneidad. Para probar esta hipótesis, se realizaron diez transfecciones independientes con pFlc-ΔPT y se secuenciaron los genes que codifican las proteínas estructurales. Las células transfectadas se pasaron repetidamente y la presencia de virus se controló mediante IPMA utilizando el mAb WB103. Después de sólo de dos a tres pases, el número de células positivas aumentó claramente, lo que sugiere que los virus habían introducido mutaciones de compensación de la idoneidad. Después de once pases, se analizaron los genomas de los virus como se describe para vFlc-ΔPTa1. Los resultados de este experimento se resumen en la Tabla 2. La mutación que dio lugar a la sustitución Asp<sup>774</sup> → Asn se encontró en seis de diez virus evolucionados, lo que demuestra claramente la evolución paralela. Sin embargo, en uno de estos virus, se encontró una mutación que da como resultado una sustitución Asp<sup>774</sup> → Glu y en los tres virus restantes no se encontró ninguna mutación en el codón de aminoácido 774. La mutación que era responsable de la Val<sup>831</sup> → Gly en vFlc-ΔPTa1 se detectó en un virus (es decir, vFlc-ΔPTa8, Tabla 2). Curiosamente, la mutación silenciosa en la posición 1549 se encontró en todos los

virus. Este resultado sugiere que la selección natural también funcionaba a nivel del ARN y que las mutaciones adaptativas adicionales se pueden encontrar posiblemente en las regiones del genoma que no fueron analizadas en este experimento. Sin embargo, fue sorprendente descubrir que tres de las cuatro mutaciones detectadas en el genoma de vFlc- $\Delta$ P<sub>Ta1</sub> se introdujeron de nuevo durante la evolución de los virus en el experimento actual. Cabe destacar que en el virus vFlc- $\Delta$ P<sub>Ta5</sub> se detectó una mutación en la quinta posición. Además de la mutación silenciosa en el gen E<sup>RNS</sup> y la sustitución Asp<sup>774</sup>→Asn en E2, este virus había introducido una mutación de transición en el codón de Ala<sup>445</sup> (de GCA a ACA) del gen E<sup>RNS</sup>, que dio lugar a la sustitución de Ala<sup>445</sup> por Thr (Tabla 2).

10 Análisis de la respuesta de anticuerpos contra vFlc- $\Delta$ P y vFlc-N1. La incapacidad de los anticuerpos específicos del dominio A para reconocer vFlc- $\Delta$ P y vFlc-N1 *in vitro* demostró que los inventores habían tenido éxito en la modificación de la estructura antigénica del dominio A. Sin embargo, para ser adecuado como vacuna DIVA, la respuesta de anticuerpos inducida *in vivo* debe disminuir suficientemente como para ser capaz de diferenciar serológicamente los animales infectados de los vacunados. Aunque en última instancia se analizará la propiedad DIVA de las vacunas candidatas y la eficacia protectora en cerdos, en el trabajo actual se prefiere utilizar conejos para el análisis de la respuesta inmunitaria humoral, por dos razones principales. En primer lugar, los inventores querían determinar si los virus de la vacuna en estudio son capaces de producir una infección productiva *in vivo*. En los cerdos, la inoculación de virus de la cepa C no induce ningún síntoma clínico, mientras que la inoculación en conejos induce una enfermedad febril temporal. Por lo tanto, el uso de conejos permitió confirmar la infección productiva y, además, permitió estudiar las posibles diferencias en la virulencia de los candidatos seleccionados, lo que podría proporcionar una idea de la idoneidad de los virus *in vivo* (de Smit, et al., 2000. Vaccine 18:2351-8). Una segunda ventaja del uso de los conejos es que el virus de la cepa C se puede aislar de la sangre, lo que a menudo no tiene éxito cuando se utilizan cerdos. El aislamiento del virus de la vacuna después de la replicación *in vivo* permitió determinar si las modificaciones genéticas introducidas se mantenían de forma estable. Se inoculó a grupos de cuatro conejos vFlc- $\Delta$ P o vFlc-N1. Se inoculó a animales control vFlc34 o medio de cultivo. Durante los días del período de aclimatación, las temperaturas corporales promedio de los conejos fueron normales (39,2 °C, SD  $\pm$  0,28, n = 68). La fiebre se define como una temperatura corporal por encima de 40,1 °C. La fiebre se observó primero en los grupos a los que se inoculó vFlc34 (40,7 °C, SD  $\pm$  0,48, n = 4) y vFlc-N1 (40,5 °C, SD  $\pm$  0,32, n = 4), ambos dos días después de la inoculación. Una temperatura corporal elevada en los conejos a los que se inoculó vFlc- $\Delta$ P (40,0 °C, SD  $\pm$  0,13, n=4) se observó a los tres días después de la inoculación.

El virus se aisló de PBL de tres de cuatro conejos a los que se inoculó vFlc34, tres de cuatro conejos a los que se inoculó con vFlc-N1 y dos de cuatro conejos a los que se inoculó vFlc- $\Delta$ P. La secuenciación consenso demostró que los genes E2 de estos virus no se alteraron por el pase en conejos.

Para determinar si los mutantes de la cepa C permiten la diferenciación entre animales infectados y vacunados, los antisueros de conejo se analizaron mediante ELISA Ceditest 2,0 E2 (Prionics). Este ELISA detecta específicamente anticuerpos contra el dominio A de E2. Como control de referencia para la inmunización efectiva, se utilizó el ELISA CHEKIT CSF E<sup>RNS</sup> (IDEXX laboratories).

Las respuestas de E<sup>RNS</sup> inducidas por vFlc34, vFlc-N1 y vFlc- $\Delta$ P fueron comparables (Fig. 5). La comparación de las respuestas E2 específicas del dominio A inducidas por vFlc34 y vFlc-N1 mediante el ELISA Ceditest 2.0 demostró que la modificación presente en vFlc-N1 tenía un efecto menor sobre esta respuesta. Por el contrario, la comparación de las respuestas E2 de vFlc- $\Delta$ P con la de vFlc34 demostró que la delección de Pro<sup>833</sup> sí daba lugar a un cambio cuantitativo en la respuesta de anticuerpos contra el dominio A (Fig. 5). Teniendo en cuenta el efecto decepcionante del sitio de glicosilación ligada a N de recién introducido de vFlc-N1 sobre la respuesta de anticuerpos específica del dominio A, los inventores no estudiaron las propiedades antigénicas de vFlc-N2 en conejos, sino que en su lugar se centraron en los mutantes de delección para experimentos adicionales.

Análisis de la respuesta de anticuerpos contra vFlc- $\Delta$ P<sub>Ta1</sub>. En el segundo ensayo con animales, la respuesta de anticuerpos contra vFlc- $\Delta$ P<sub>Ta1</sub> se comparó con la inducida contra vFlc34. La temperatura corporal promedio de los conejos antes de la inoculación era normal (39,2 °C, SD  $\pm$  0,37, n = 28). En este experimento, sólo uno de dos conejos a los que se inoculó vFlc34 experimentó fiebre dos días después de la inoculación (40,3 °C). Un conejo (conejo 2.1) al que se inoculó vFlc- $\Delta$ P<sub>Ta1</sub> no mostró ninguna elevación de la temperatura corporal. Por el contrario se observó fiebre en los dos animales restantes a los que se inoculó vFlc- $\Delta$ P<sub>Ta1</sub> (conejos 2.2 y 2.3). En uno de estos animales se observó una temperatura de 40,6 °C a los cinco días de la inoculación, mientras que en el otro conejo se observó una temperatura de 40,4 °C a los siete días de la inoculación. Teniendo en cuenta el hecho de que vFlc- $\Delta$ P no indujo fiebre, este hallazgo fue muy inesperado. Es importante señalar, sin embargo, que poco después de la inoculación, los conejos 2.2 y 2.3 participaron en una pelea que resultó en la formación de heridas. Teniendo en cuenta que estas heridas inducían una infección de la piel y el hecho de que los síntomas de esta infección coincidieron con la aparición de fiebre, es plausible asumir que la fiebre era el resultado de la infección de la piel, en lugar de ser una consecuencia de la inoculación del virus.

A los cuatro días de la inoculación, el virus se aisló de ambos animales a los que se inoculó vFlc34. No se aisló ningún virus de los PBL de los tres conejos a los que se inoculó vFlc- $\Delta$ P<sub>Ta1</sub>, lo que probablemente está relacionado con la atenuación de este virus.

Los sueros de los dos conejos a los que se inoculó vFlc34 (animales 1.1 y 1.2; Fig. 6, panel izquierdo) dio resultados en el ELISA de E<sup>RNS</sup> y de E2 que fueron comparables a los obtenidos en el primer experimento. Los porcentajes de bloqueo determinados por el ELISA de E2 fueron más altos que los detectados por el ELISA de E<sup>RNS</sup>. Por el contrario, el análisis de los sueros del conejo 2.1, al que se inoculó con vFlc-ΔPTa1, demostró que los porcentajes de bloqueo en el ELISA de E2 eran menores que los detectados en el ELISA de E<sup>RNS</sup>. Este resultado es coherente con los resultados obtenidos con vFlc-ΔP (Fig. 5), ambos demostrando una disminución específica de la respuesta de anticuerpos específicos del dominio A. Inesperadamente, sin embargo, el análisis de los sueros de los animales 2.2 y 2.3 no confirmó este resultado. Estos animales desarrollaron claramente altos niveles de anticuerpos E2 específicos del dominio A. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con animales 2.1 y los resultados anteriores obtenidos con vFlc-ΔP, este hallazgo fue muy sorprendente. La inducción de anticuerpos específicos del dominio A en los animales 2.2 y 2.3, posiblemente se puede explicar por una reorientación de la respuesta de anticuerpos específica del dominio A hacia los epítomos del dominio A distintos del epítomo TAVSPTTLR, que normalmente son subdominantes.

Para analizar las respuestas de anticuerpos más a fondo, los inventores han usado el análisis PEPSCAN usando péptidos solapantes de 15 aminoácidos de longitud previamente construidos derivados de la proteína E2 de la cepa Brescia del VFPC. Este análisis reveló que los sueros obtenidos el día 36 de los animales a los que se inoculó la cepa C de tipo silvestre reconocían dos epítomos de cepa Brescia del VFPC (Fig. 6, panel derecho). Como era de esperar, el primero de estos epítomos fue el epítomo <sup>829</sup>TAVSPTTLR<sup>837</sup>. En particular, los residuos de <sup>831</sup>VSPTTLR<sup>837</sup> parecían más críticos (Fig. 6B, panel superior). El segundo epítomo consta aminoácidos <sup>754</sup>YLASHKDAPT<sup>764</sup>. Curiosamente, este epítomo, que es reconocido por primera vez, se encuentra fuera del dominio A definido previamente (es decir, los aminoácidos 766 a 866; Fig. 7). Ninguno de los sueros obtenidos de conejos A LOS QUE SE INOCULÓ vFlc-ΔPTa1 reconoce cualquiera de los epítomos mencionados anteriormente. Aunque la falta de reconocimiento del epítomo <sup>829</sup>TAVSPTTLR<sup>837</sup> (Fig. 6B, panel inferior) se puede explicar por las mutaciones introducidas en vFlc-ΔPTa1, la falta de reconocimiento del epítomo fue más sorprendente. Este hallazgo sugiere que el epítomo <sup>754</sup>YLASHKDAPT<sup>764</sup> de alguna manera interactúa con el epítomo <sup>829</sup>TAVSPTTLR<sup>837</sup> y que estos epítomos se encuentran en proximidad en la estructura de E2 nativa (Fig. 7). Aunque el análisis de PEPSCAN no reveló los epítomos del dominio A que son reconocidos por los antisueros de conejos 2.2 y 2.3, se ha demostrado que ninguno de estos sueros reconoce el epítomo TAVSPTTLR. A partir de esto, los inventores pueden concluir que vFlc-ΔPTa1 cumple el criterio DIVA si van acompañados por un péptido basado en TAVSPTTLR ELISA.

## DISCUSIÓN

En las últimas dos décadas se han desarrollado varias vacunas experimentales DIVA que tienen que acompañarse de un ELISA de E2 o un ELISA de E<sup>RNS</sup>. A menudo se afirma en la literatura que ambas pruebas de diagnóstico son adecuadas para la detección de la FPC en el campo. Aunque esto es en principio correcto, es importante tener en cuenta que los ELISAS de E<sup>RNS</sup> tienen dos grandes desventajas sobre el ELISA de E2. En primer lugar, aunque los ELISAS de E<sup>RNS</sup> se pueden utilizar para detectar de forma fiable rebaños infectados, anteriormente se descubrió que estos ELISA eran insuficientemente sensibles para diagnosticar animales individuales. En segundo lugar, y mucho más importante, los ELISAS de E<sup>RNS</sup> ELISA no son específicos de la FPC (2003/265/CE). SANCO/10809/2003. Comisión Europea, Directorio General para la protección de la salud y el consumidor, Bruselas). En consecuencia, el uso de ELISA de E<sup>RNS</sup> no se recomienda en las regiones en las que los virus VDVB y/o VDB circulan.

El objetivo del presente trabajo era construir una vacuna DIVA basada en la cepa C que es compatible con un ELISA de E2. El objetivo era lograr esto mediante la introducción de mutaciones juiciosas en el epítomo TAVSPTTLR del dominio A, que es la diana dominante en estas pruebas ELISA. En el primero de los dos enfoques, el resto de Pro central (es decir, Pro<sup>833</sup>) del epítomo TAVSPTTLR se sustituyó por Asn, introduciendo de este modo un PNGS en el centro del epítomo TAVSPTTLR. Aunque los glicanos ligados a N son bien conocidos por su capacidad para proteger a los dominios inmunogénicos del sistema inmunológico humoral, pueden ser notablemente bien tolerados en o cerca de los dominios funcionalmente importantes, dos características que se atribuyen a la flexibilidad estructural de la cadena de carbohidratos. Aunque los inventores han tenido éxito en la producción de un mutante de la cepa C, denominado vFlc-N1, que mantiene de manera estable un N-glicano ligado recién introducido anclado al centro del epítomo TAVSPTTLR, esta modificación parecía tener un único efecto menor sobre la respuesta de anticuerpos específica del dominio A. Por esta razón, los inventores eligieron no seguir este enfoque.

En un enfoque alternativo, los inventores tuvieron como objetivo alterar la estructura antigénica del dominio a mediante la delección aminoácidos del epítomo TAVSPTTLR. La delección del resto de Pro central (es decir, Pro<sup>833</sup>) produjo un virus, denominado vFlc-ΔP, que mantenía de manera estable la delección introducida, aunque el virus finalmente adquirió una mutación adaptativa, lo que resulta en la sustitución de Ser 789 por fenilalanina (Phe). Los inventores encontraron que esta sustitución no conservadora era interesante, ya que Ser<sup>789</sup> está presente en todos los virus de la cepa C y de cepas de VFPC lapinizadas relacionadas, mientras que Phe<sup>789</sup> está completamente conservada en las cepas del VFPC virulenta e incluso altamente conservadas entre otros miembros del género pestivirus (van Rijn et al., 1997. Virology 237:337-48). Aunque la historia del virus de la cepa C no está bien documentada, está claro que el virus se atenuó mediante el pase en conejos cientos de veces (van Oirschot, 2003.

Vet Microbiol 96: 367-84). Por tanto, se podría plantear la hipótesis de que Ser<sup>789</sup> es ventajosa para la replicación de la cepa C en conejos. Si esta suposición es correcta, es interesante razonar por qué la cepa C no revierte a Phe<sup>789</sup> con el crecimiento de células porcinas *in vitro*. Esto puede explicarse por el concepto de idoneidad del paisaje de Wright (Wright, 1931. Genetics 16:97-159). De acuerdo con este concepto, las mutaciones ventajosas surgen lentamente cuando existe un genotipo en la región superior de un pico de la idoneidad, como probablemente se aplica al virus de la cepa C silvestre, mientras que éstas surgen más rápidamente cuando existe el genotipo en un nivel inferior el pico de idoneidad, como es el caso de vFlc-ΔP.

El análisis de los sueros obtenidos de conejos a los que se inoculó vFlc-ΔP demostró que la supresión de Pro<sup>833</sup> ya es suficiente para disminuir considerablemente la inmunogenicidad del dominio A. Aunque este resultado demostró una prueba de principio de nuestro enfoque, también puso de manifiesto que la estructura antigénica del dominio A tenía que modificarse más ampliamente para hacer que el virus resultante sea adecuado como vacuna DIVA. Aunque los plásmidos que codifican mutantes de la cepa C con deleciones de dos a cuatro aminoácidos del epítipo TAVSPTTLR (ΔSP, ΔPT, ΔSPT, ΔVSP, ΔAVSP) producían virus infecciosos, estos estaban altamente debilitados y eran incapaces de mantener un crecimiento sostenido. Después de unos pocos pases de las células que contienen vFlc-ΔPT, sin embargo, se observó un notable incremento de la idoneidad. El virus rescatado se denominó vFlc-ΔPTa1. Los inventores consideraron que lo más probable era que las mutaciones adaptativas en el gen de E2 eran responsables de la recuperación de la idoneidad. De hecho, se detectaron dos mutaciones adaptativas en el gen de E2 (Fig. 1). La primera mutación dio como resultado la sustitución del residuo Val del epítipo TAVSPTTLR por Gly. Aunque se podían haber esperado mutaciones adaptativas que están en estrecha proximidad de la deleción introducida, se encontró una segunda mutación localizada distal al epítipo TAVSPTTLR en la secuencia lineal de E2. Fue además interesante observar que esta segunda mutación (Asp<sup>774</sup> → Asn) introducía un PNGS en el dominio A.

El rescate de un mutante de cepa C con un PNGS en el dominio A (es decir, vFlc-ΔPTa1, Figs. 1 y 7) poco después de la construcción de un virus similar mediante genética inversa (es decir, vFlc-N1; Figs. 1 y 7), parece una coincidencia notable. Mirando hacia atrás a los resultados anteriores que impulsaron a los inventores a iniciar sus estudios, sin embargo, sugiere que sus resultados pueden no ser coincidencia. Su trabajo se inspiró en el fenotipo de un mutante del VFPC que se seleccionó mediante el crecimiento del virus en presencia mAb neutralizantes (van Rijn, et al., 1994. J Virol 68:3934-42). Este mutante MAR (resistente a anticuerpo monoclonal-resistente) de la cepa Brescia, denominado vPK26.2, tenía dos sustituciones de aminoácidos en E2 que afectaron a la estructura antigénica del dominio A, a saber, Pro<sup>833</sup>→Leu (en el epítipo TAVSPTTLR) y una Thr<sup>858</sup>→Asn (24). El análisis de mutantes también otros MAR demostró que la sustitución Pro<sup>833</sup> → Leu era responsable de la neutralización del escape y, además, interfería con la unión de un segundo mAb específico del dominio A. embargo, a pesar de que un mutante MAR que contenía sólo Leu<sup>833</sup> todavía era reconocido por otros dos mAb específicos del dominio A, el mutante de MAR vPK26.2, que contenía Leu<sup>833</sup> y Asn<sup>858</sup>, no se detectó con ninguno de los mAb específicos del dominio A. Teniendo en cuenta que la Asn<sup>858</sup> afectaba claramente a la estructura antigénica del dominio A, la hipótesis de que la posición<sup>858</sup> de alguna manera interactúa con, o está muy cerca de, el epítipo TAVSPTTLR en la estructura E2 nativa. Además, es interesante observar que la sustitución Thr<sup>858</sup> → Asn introducía un nuevo PNG en el dominio A (Fig. 7). Aunque la glicosilación en este sitio no se ha abordado anteriormente, el efecto de esta mutación sobre la estructura antigénica de E2 podría explicarse por un apantallamiento del dominio A mediante un glicano ligado a N. El fenotipo de vPK26.2 urgió a investigar no sólo el efecto de la supresión de la Pro central del epítipo TAVSPTTLR, sino también a estudiar la viabilidad de la protección del dominio A por glicanos ligados a N. Los inventores descubrieron que era conveniente la sustitución de Pro<sup>833</sup> por ASN, que dio lugar al virus vFlc-N1, elimina el residuo Pro<sup>833</sup> estructuralmente importante y al mismo tiempo presenta una nueva PNG en el epítipo TAVSPTTLR. Es importante tener en cuenta que esta modificación puede considerarse un reemplazo de Pro<sup>833</sup> por Asn, pero también puede ser considerado como una inserción de un residuo Asn en un virus que carece de Pro<sup>833</sup>. Aunque esto parece una cuestión de semántica, abre una perspectiva totalmente nueva que podría explicar el fenotipo de vPK26.2 así como la estabilidad genética y la idoneidad de vFlc-N1. Una característica habitual sorprendente de estos virus es que ambos carecen de Pro<sup>833</sup> y ambos contienen una nueva PNG en el dominio A. A partir de esto, es tentador especular que las posiciones 833 y 858 están de hecho, situadas en posiciones similares en la estructura E2 nativa, y que un resto Asn en cada una de estas posiciones, directamente o en virtud de su función como un sitio de anclaje para un resto de carbohidrato, puede compensar el costo de la aptitud que impone la supresión o sustitución de Pro<sup>833</sup> (Fig. 7).

Volviendo al virus vFlc-ΔPTa1, es interesante observar que los archivos PNG de reciente introducción en vFlc-ΔPTa1 en la posición 774 también podrían estar situados en la proximidad del epítipo TAVSPTTLR en la estructura de E2 nativa. A saber, la sustitución Asp<sup>774</sup> →Asn en este virus se encuentra en el centro de un epítipo recientemente identificado que comprende los aminoácidos<sup>772</sup>LFDGTNP<sup>778</sup> (Peng et al, 2008. Virus Res 135 267-72). Al igual que el epítipo<sup>829</sup> TAVSPTTLR<sup>837</sup>, el epítipo<sup>772</sup> LFDGTNP<sup>778</sup> comparte las tres características que definen el dominio A1, siendo específico del VFPC, evolutivamente conservado y un objetivo para los anticuerpos neutralizantes. Según lo anterior y los hallazgos experimentales de los inventores, han postulado la hipótesis de que el epítipo TAVSPTTLR y el epítipo LFDGTNP están localizados conjuntamente en la estructura nativa de E2 y, posiblemente, juntos conforman el dominio A1.

En resumen, los inventores postulan la hipótesis de que una mutación del resto Pro central del epítipo TAVSPTTLR puede compensarse por glicanos ligados a N localizados en una de tres posibles posiciones en la proteína E2 y que

estas posiciones se encuentran en las proximidades de la estructura nativa de E2. La primera se encuentra en el propio epítipo <sup>829</sup>TAVSPTTLR<sup>837</sup>, la segunda en el epítipo <sup>772</sup>LFDGTNP<sup>778</sup> y el tercer dominio incluye la secuencia de aminoácidos <sup>858</sup>TTT<sup>860</sup> (Fig. 7). Posiblemente, los aminoácidos últimos son también parte de un epítipo aún no identificado localizado en el dominio A. Se están realizando experimentos para corroborar estas hipótesis.

5 Si bien es plausible suponer que las mutaciones adaptativas en el gen de E2 desempeñan un papel importante en la recuperación de la idoneidad, los inventores también han razonado que mutaciones en otros genes que codifican proteínas estructurales podrían desempeñar un papel. Por lo tanto, también se secuenciaron los genes C, E<sup>RNS</sup> y E1 de vFlc-ΔPTa1. La secuenciación de esta parte del genoma de hecho reveló dos mutaciones adicionales. La primera se detectó en el gen de E1. Esta mutación dio como resultado la sustitución del resto Glu <sup>634</sup> completamente conservado por Asp. Teniendo en cuenta que se sabe que la proteína E2 se ensambla en heterodímeros unidos por puentes disulfuros con la proteína E1 (Thiel, et al., 1991. J Virol 65:4705-12), es concebible que esta mutación contribuya a la recuperación de la idoneidad de vFlc-ΔPTa1. Aunque no se detectaron mutaciones en el gen C, se detectó una única mutación silenciosa en el gen E<sup>RNS</sup>. Teniendo en cuenta que la secuencia consenso del VFPC de tipo silvestre es excepcionalmente estable y acumula prácticamente ninguna mutación tras el pase *in vitro* o *in vivo* (Vanderhallen, et al., 1999. Arch Virol 144:1669-77), la detección de una mutación silenciosa de este tipo mediante secuenciación consenso demostró que la selección natural también funcionaba a nivel de ARN, y de tal modo que también mutaciones sinónimas en otras regiones del genoma podrían haber contribuido a la recuperación de la idoneidad de vFlc-ΔPTa1.

20 Para profundizar en la vía molecular de la recuperación física, se realizó un experimento de evolución. Este experimento demostró la evolución paralela de la mutación silenciosa en el gen E<sup>RNS</sup>, la mutación que resultó en la sustitución Val<sup>831</sup>→Gly y la mutación que introdujo la nueva PNGS en la posición 774 (Tabla 2). Aunque claramente se requieren estudios adicionales para dilucidar plenamente el mecanismo molecular de la recuperación de la idoneidad, este hallazgo apoya la idea de que las mutaciones mencionadas anteriormente estaban de hecho implicadas en la recuperación de la idoneidad de vFlc-ΔPTa1. Es muy posible que estas mutaciones puedan restaurar la idoneidad de los mutantes con deleciones más grandes en el epítipo TAVSPTTLR.

30 Cabe mencionar, en uno de los virus estudiados en el experimento de evolución (es decir vFlc-ΔPTa5), se detectó una mutación en el gen E<sup>RNS</sup> que dio lugar a la sustitución de Ala <sup>445</sup> por Thr (Tabla 2). Al igual que se ha descrito previamente, la sustitución de Ser<sup>789</sup> por Phe encontrada con la evolución de vFlc-ΔP, el aminoácido que está alterado en vFlc-ΔPTa5, en este caso Ala<sup>445</sup>, cambia a un aminoácido que está conservado entre las cepas de campo del VFPC, en este caso Thr<sup>445</sup>. Aunque esto está fuera del ámbito del trabajo actual, este hallazgo demuestra una vez más que la atenuación del VFPC puede proporcionar información valiosa sobre la evolución molecular.

40 Estudios anteriores con mutantes MAR realizados por Van Rijn et al., sugirieron que Pro<sup>833</sup> y Thr<sup>834</sup> del epítipo TAVSPTTLR son muy importantes para la integridad de los epítopos conservados del dominio A (van Rijn, et al., 1994. J Virol 68: 3934-42). La producción exitosa de un mutante de la cepa C en crecimiento que carece de estos dos aminoácidos y, además, contiene una sustitución Val<sup>831</sup>→Gly sugirió que la estructura antigénica del dominio A de este virus había cambiado drásticamente. Por lo tanto, los inventores esperaban que la respuesta inmunitaria inducida por vFlc-ΔPTa1 fuera diferenciable de la inducida por el VFPC de tipo silvestre usando el ELISA Ceditest 2,0 E2. Fue sorprendente encontrar que vFlc-ΔPTa1 en realidad puede ser muy potente en la inducción de anticuerpos específicos del dominio A. Una posible explicación para este hallazgo es que la interrupción del epítipo TAVSPTTLR por otro lado inmunodominante puede dar lugar a una reorientación de la respuesta de anticuerpos hacia los epítopos del dominio A que normalmente son subdominantes. En un intento de identificar estos epítopos, los antiseros se analizaron mediante análisis PEPSCAN. Aunque este análisis no reveló los epítopos reconocidos recientemente, sí demostró que ninguno de los antiseros reconocía los péptidos que contenían el epítipo TAVSPTTLR. Curiosamente, esto sugiere que se puede usar un ELISA basado en el epítipo TAVSPTTLR como una prueba DIVA para acompañar al virus de la vacuna vFlc-ΔPTa1.

55 En resumen, el presente trabajo demuestra que la evolución forzada del virus puede ser una herramienta potente para modificar genéticamente el virus de la FPC. Aquí, este método se usó con éxito para producir un mutante de la cepa C genéticamente estable que se puede diferenciar serológicamente del VFPC de tipo silvestre.

## Ejemplo 2

### Materiales y métodos

60 El virus mutante por deleción de la cepa vFlc-ΔPTa1 se produjo como se describe en el Ejemplo 1. Las células SK6-T7 son células renales porcinas que expresan de forma constitutiva ARN polimerasa de T7 (van Gennip et al., 1999. Vaccine 19(4-5), 447-59). Estas células se cultivaron en medio K1000 suplementado con glutamina (0,3 mg/ml, Gibco, Invitrogen, Breda, Países Bajos), suero bovino fetal (FBS) al 5 % y los antibióticos penicilina (100 U/ml, Gibco), estreptomina (100 U/ml, Gibco) y anfotericina B (2,5 pg/ml, Gibco). Las reservas de virus se titularon en células SK6.T7 y se comunican en forma de las dosis infecciosas al 50 % en cultivo tisular (DICT<sub>50</sub>).

Trece cerdos convencionales libres de anticuerpos contra pestivirus se dividieron en dos grupos de cinco cerdos y un grupo de tres cerdos. Los cerdos del grupo 1 (nº 3166-3170) fueron vacunados una vez el día 0 por vía intramuscular con 1 ml de medio de cultivo que contiene suero bovino fetal (FBS) al 2 % y  $10^5$  de DICT<sub>50</sub> del virus de la cepa C recombinante vFlc34 (véase el Ejemplo 1). Los cerdos del grupo 2 (nº 3171-3175) se vacunados con el mismo protocolo que el de la vacuna vFlc-ΔPTa1. Se inoculó a los cerdos del grupo 3 (nº 3176-3178) una vez medio de cultivo que contenía 2 % de FBS.

El día 28, se expuso a los cerdos de los grupos 1, 2 y 3 por vía intranasal a 1 ml (0,5 ml en cada fosa nasal) que contenía 200 x 50 % de dosis letal de la cepa Brescia del VFPC. Se observó a todos los cerdos a diario para detectar enfermedad y se midieron sus temperaturas corporales a partir del día -3. La gravedad de los síntomas clínicos se puntuó utilizando una lista previamente definida de 10 criterios específicos de la FPC (Mittelholzer et al., 2000. Vet Microbiol 74(4), 293-308).

Se prepararon muestras de suero semanalmente de todos los cerdos. Se recogieron muestras de EDTA y fluidos orofaríngeos de todos los cerdos de los grupos 1, 2 y 3 el día de la exposición (día 28) y posteriormente los días 30, 32, 35, 37, 39, 42, 44, 46, 49, 52 y 56. Las muestras de EDTA se utilizaron para determinar el número de leucocitos y trombocitos. Este análisis se realizó con el contador CA Medonic CA 620 Coulter (Boule Medical AB). En cerdos criados convencionales, las concentraciones de leucocitos y trombocitos en la sangre varían entre  $11 \times 10^9$  y  $23 \times 10^9$  y entre  $320 \times 10^9$  y  $720 \times 10^9$  /l, respectivamente. En consecuencia, la leucopenia se definió como  $<8 \times 10^9$  células/l de sangre y trombocitopenia como  $<200 \times 10^9$  trombocitos/l de sangre.

El aislamiento del virus y la PCR de transcripción inversa en tiempo real (qRRT-PCR) usando leucocitos de sangre periférica (PBL) o frotis de garganta se realizaron esencialmente como se ha descrito (Weesendorp et al., 2009. Vet Microbiol 135(3-4), 222-30).

Las muestras de suero se analizaron usando un ELISA de E2 comercial (PrioCHECK VFPC Ab 2.0 E2 ELISA, Prionics, Lelystad, Países Bajos) y un ELISA de E<sup>RNS</sup> comercial (Chekit CSF E<sup>RNS</sup> ELISA, IDEXX laboratories, Hoofddorp, Países Bajos), de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

### 30 Resultados

Los inventores compararon la eficacia protectora del virus vFlc-ΔPTa1 con su virus parental, vFlc34, contra una exposición letal con la cepa Brescia altamente virulenta. Se vacunó a dos grupos de cinco cerdos el día 0 con vFlc34 (grupo 1) o con vFlc-ΔPTa1 (grupo 2). A un grupo de control (grupo 3), formado por tres cerdos, se inoculó solo medio de cultivo celular. Los cerdos de los grupos 1, 2 y 3 fueron expuestos a la cepa altamente virulenta Brescia el día 28.

Todos los cerdos en el grupo control desarrollaron signos clínicos típicos de FPC, incluyendo fiebre alta (Fig. 8C), leucopenia (Fig. 9A) y trombocitopenia (Fig. 9B). El virus se aisló de los PBL de dos de tres cerdos el día 4 y de los tres cerdos los días 7 y 9 después de la exposición. El virus se aisló de hisopos de garganta de dos animales el día 7 después de la exposición y de un animal el día 9 después de la exposición. Los cerdos de este grupo se encontraron en estado moribundo y se les sacrificó 9 días (cerdo 3178) o 10 días (cerdos 3176 y 3177) después de la infección.

Ninguno de los cerdos vacunados con la vacuna de la cepa C recombinante (es decir vFlc34) desarrolló signos clínicos después de la exposición (Fig. 8A), aunque un cerdo (nº 3168) tuvo fiebre durante un día y otro cerdo (nº 3166) presentó trombocitopenia durante al menos un día (Fig. 9B). Ningún virus se aisló en los PBL o los frotis de garganta.

Todos los cerdos que fueron vacunados con vFlc-ΔPTa1 desarrollaron fiebre durante de 3 a 6 días y mostraron signos clínicos leves después de la exposición (Fig. 8B), pero todos los cerdos se recuperaron por completo. El virus se aisló de los PBL de un cerdo (cerdo nº 3175) el día 2 después de la exposición. A partir de esto, los inventores llegaron a la conclusión de que una sola vacunación con vFlc-ΔPTa1 proporciona protección contra una exposición letal a la cepa Brescia altamente virulenta.

Todos los sueros se analizaron para determinar la presencia de anticuerpos anti-E2 y anti-E<sup>RNS</sup> con el ELISA PrioCHECK VFPC Ab 2.0 E2 ELISA (Prionics) y el Chekit CSF E<sup>RNS</sup> ELISA (IDEXX laboratories), respectivamente. Todos los cerdos vacunados con vFlc34 dieron resultados positivos en el ELISA de E2 a los 21 días de la infección (Fig. 10A), mientras que estos cerdos dieron resultados positivos en el ELISA de E<sup>RNS</sup> a los 35 días de la infección (Fig. 10B). Ninguno de los cerdos vacunados con vFlc-ΔPTa1 fueron positivos para el ELISA DE E2 antes de la exposición (Fig. 10A). En los 7 días después de la exposición, todos los cerdos fueron positivos para el ELISA de E2 (Fig. 10A). Es interesante observar que dos cerdos (es decir, los cerdos 3171 y 3172) vacunados con vFlc-ΔPTa1 seroconvirtieron para anticuerpos frente a E<sup>RNS</sup> mucho antes que los vacunados con vFlc34 (Fig. 10B).

Por lo tanto, se concluye que todos los cerdos vacunados con vFlc-ΔPTa1 se mantuvieron por debajo de la línea de corte del ELISA PrioCHECK E2 hasta la exposición, lo que demuestra que vFlc-ΔPTa1 puede usarse como vacuna

DIVA también en cerdos.

En conclusión, los inventores demuestran que una sola vacunación con vFlc-ΔPTa1 proporcionaba protección contra una exposición altamente virulenta en todos los cerdos vacunados y se facilitan pruebas de que no se producía diseminación de virus o esta era muy poca.

5

Tablas

Tabla 1. Cebadores usados para construir mutantes de la cepa C

Cebador	Secuencia <sup>a</sup>
RV-N1	5'-GAGTGCACAGCAGTGAGCA <b>AAT</b> ACAACCTCTGAGAACAGAAG-3'
RV-N2	5'-GAGTGCAC <b>AAAT</b> GTGAGCA <b>AAT</b> ACAACCTCTGAGAACAGAAGTGGTAAAGACCTTC-3'
RV-N3	5'-GAGTGCACAGCAGTGAGCA <b>AAT</b> ACAAC <b>AAT</b> AGAACAGAAGTGGTAAAGACCTTCAGGAGA-3'
RV-N4	5'-GAGTGCAC <b>AAAT</b> GTGAGCA <b>AAT</b> ACAAC <b>AAT</b> AGAACAGAAGTGGTAAAGACCTTC-3'
RV-N5	5'-GAGTGCACAGCAGTGAGCA <b>AATAAT</b> ACAACCTCTGAGAACAGAAG-3'
RV-ΔP	5'-GAGTGCACAGCAGTGAGCACAACCTCTGAGAACAGAAGTGGTAAAGACC-3'
RV-ΔPT	5'-GAGTGCACAGCAGTGAGCACTCTGAGAACAGAAGTGGTAAAGACC-3'
RV-ΔSP	5'-GAGTGCACAGCAGTGACAACCTCTGAGAACAGAAGTGGTAAAGACCTTC-3'
RV-ΔSPT	5'-GAGTGCACAGCAGTGACTCTGAGAACAGAAGTGGTAAAGACCTTC-3'
RV-ΔVSP	5'-GAGTGCACAGCAACAACCTCTGAGAACAGAAGTGGTAAAGACC-3'
RV-ΔAVSP	5'-GAGTGCACAACAACCTCTGAGAACAGAAGTGGTAAAGACC-3'
RV-ΔSPTTL	5'-GAGTGCACAGCAGTGAGAACAGAAGTGGTAAAGACCTTCCAGGAGA-3'
RV-r	5'-CTCTGTCTTCACAGACGGTGCAC-3'

<sup>a</sup>Se indican los sitios de restricción *Apa*LI (subrayados) y las sustituciones de nucleótidos (en negrita).

10

Tabla 2

Determinación de la secuencia<sup>a</sup> de los genes C, E1, E<sup>RNS</sup> y E2 del virus evolucionados independientemente producidos a partir de pFlc-ΔPT<sup>b</sup>.

Virus:	ORF:	Mutación:	Cambio de codón:	Cambio de aminoácido:	
ΔPTa1		U1549 → C	GUU → GUC	ninguno	E <sup>RNS</sup>
		A2275 → U	GAA → GAU	E634 → D	E1
		G2693 → A	GAC → AAC	D774 → N	E2
		U2865 → G	GUG → GGG	V831 → G	E2
ΔPTa2		U1549 → C	GUU → GUC	ninguno	E <sup>RNS</sup>
		C2695 → A	GAC → GAA	D774 → E	E2
ΔPTa3		U1549 → C	GUU → GUC	ninguno	E <sup>RNS</sup>
		G2693 → U	GAC → AAC	D774 → N	E2
ΔPTa4		U1549 → C	GUU → GUC	ninguno	E <sup>RNS</sup>
ΔPTa5		U1549 → C	GUU → GUC	ninguno	E <sup>RNS</sup>
		G1706 → A	GCA → ACA	A445 → T	E <sup>RNS</sup>
		G2693 → U	GAC → AAC	D774 → N	E2
ΔPTa6		U1549 → C	GUU → GUC	ninguno	E <sup>RNS</sup>
		G2693 → U	GAC → AAC	D774 → N	E2
ΔPTa7		U1549 → C	GUU → GUC	ninguno	E <sup>RNS</sup>
		G2693 → U	GAC → AAC	D774 → N	E2
ΔPTa8		U1549 → C	GUU → GUC	ninguno	E <sup>RNS</sup>
		U2865 → A	GUG → GGG	V831 → G	E2
ΔPTa9		U1549 → C	GUU → GUC	ninguno	E <sup>RNS</sup>
ΔPTa10		U1549 → C	GUU → GUC	ninguno	E <sup>RNS</sup>
		G2693 → U	GAC → AAC	D774 → N	E2
ΔPTa11		U1549 → C	GUU → GUC	ninguno	E <sup>RNS</sup>

## ES 2 546 403 T3

G2693 → U

**GAC → AAC**

D774 → N

E2

---

<sup>a</sup>Las mutaciones identificadas se indican en negrita.

<sup>b</sup>Las características del crecimiento *in vitro* de virus vFlc-ΔPTa1 se representan en las figuras 2 y 3b. No se determinaron las características de crecimiento de los otros virus.

---

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un virus de la peste porcina clásica (VFPC) recombinante infeccioso y de replicación competente, en el que el genoma parental es el genoma de una cepa C (china) que comprende una delección de al menos dos aminoácidos en un dominio "TAVSPTTLR" de la proteína E2, correspondiente a las posiciones 829 a 837 de una poliproteína de VFPC parental, en el que dicha delección comprende una delección de prolina y de treonina en las posiciones 833 y 834 en dicho dominio "TAVSPTTLR" no seguida de una inserción de aminoácidos en las mismas posiciones, y el virus comprende al menos una alteración adicional en el genoma parenteral para hacer que el virus sea adecuado para su uso como vacuna DIVA.
- 10 2. El VFPC recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la al menos una alteración adicional es una mutación silenciosa.
- 15 3. VFPC recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la mutación silenciosa es una alteración de U a C en la posición 1549 en el gen E<sup>RNS</sup>.
- 20 4. El VFPC recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la al menos una alteración adicional forma un sitio de glicosilación ligada a N en la proteína E2.
- 25 5. El VFPC recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha al menos una alteración adicional es una sustitución de ácido aspártico (D) en la posición 774 en la proteína E2.
6. El VFPC recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha al menos una alteración adicional tiene como resultado una glicina (G) en la posición 831 y/o una fenilalanina (F) en la posición 789 y/o una treonina (T) en la posición 445.
- 30 7. El VFPC recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una delección de prolina y treonina en las posiciones 833 y 834, respectivamente, del dominio "TAVSPTTLR" de la proteína E2, que comprende además una alteración de U a C en la posición 1549, un ácido aspártico (D) en la posición 634, una asparagina (N) en la posición 774 en la proteína E2 y una glicina (G) en la posición 831.
- 35 8. Una vacuna DIVA de VFPC vivo que comprende un VFPC recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 40 9. Un método para diferenciar los animales infectados con VFPC de animales no infectados o de animales vacunados con la vacuna contra la FPC de la reivindicación 9, que comprende analizar una muestra de suero obtenida de un animal en una prueba serológica.
- 45 10. El método de la reivindicación 9, en el que dicha prueba serológica es un ELISA basado en péptidos.
11. Una molécula de ADNc que comprende un virus de la peste porcina clásica (VFPC) recombinante infeccioso y de replicación competente, en el que el genoma parental es el genoma de una cepa C (china) que comprende una delección de al menos dos aminoácidos en un dominio "TAVSPTTLR" de la proteína E2, correspondiente a las posiciones 829 a 837 de una poliproteína de VFPC parental, en el que dicha delección comprende una delección de prolina y treonina en las posiciones 833 y 834 en dicho dominio "TAVSPTTLR" no seguida de una inserción de aminoácidos en las mismas posiciones, y la molécula comprende al menos una alteración adicional en el genoma parenteral para hacer que el correspondiente virus sea adecuado para su uso como vacuna DIVA.

Fig. 1

	772	823	Idoneidad <sup>d</sup> :
vFlc34 (de tipo silvestre:)	<u>LFDG</u> TN <u>F</u> STEEMGDDFRSGL // / TGVIEC <u>TAVSPTTLR</u> TEVVK		++
vFlc-N1	.....	N.....	++
vFlc-N2	.....	N.N.....	+
vFlc-N3	.....	N.N.....	†
vFlc-N4	.....	N.N.N.....	†
vFlc-N5	.....	NN.....	+ <sup>e</sup>
vFlc-ΔP	.....	Δ.....	+
vFlc-ΔPT	.....	ΔΔ.....	†
vFlc-ΔSP	.....	ΔΔ.....	†
vFlc-ΔSPT	.....	ΔΔΔ.....	†
vFlc-ΔVSP	.....	ΔΔΔ.....	†
vFlc-ΔAVSP	.....	ΔΔΔΔ.....	†
vFlc-ΔSPTTL	.....	ΔΔΔΔΔ.....	-
vFlc-ΔPa1	.....	F.....Δ.....	+
vFlc-ΔPTa1	..N.....	G.ΔΔ.....	++
vFlc-ΔPTa2	..E.....	ΔΔ.....	nd
vFlc-ΔPTa3, a5, a6, a7, a10, a11	..N.....	ΔΔ.....	nd
vFlc-ΔPTa8	.....	E.ΔΔ.....	nd

Fig. 2.

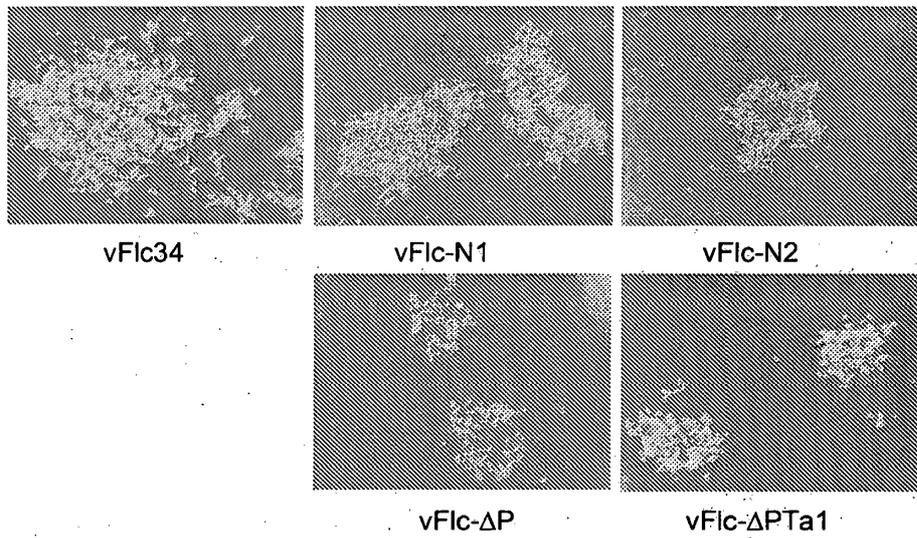
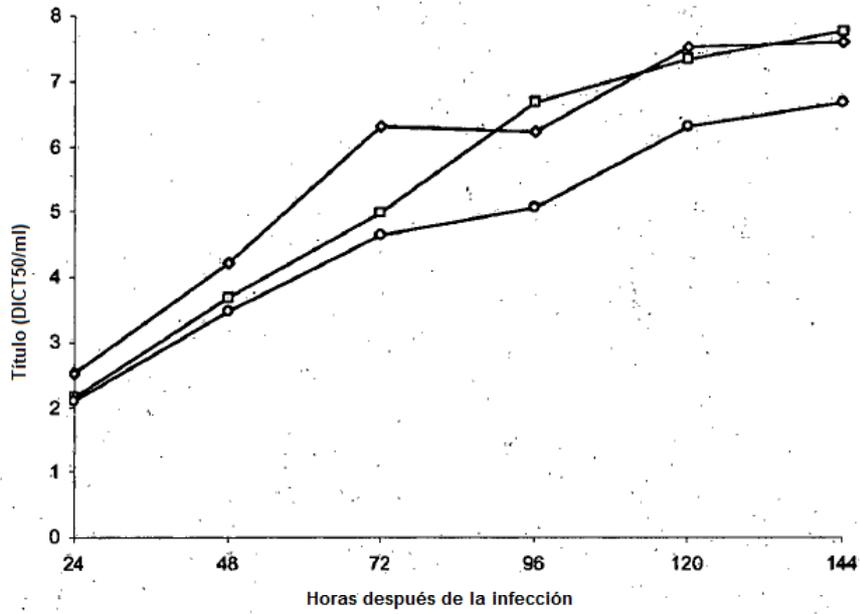


Fig. 3

A



B

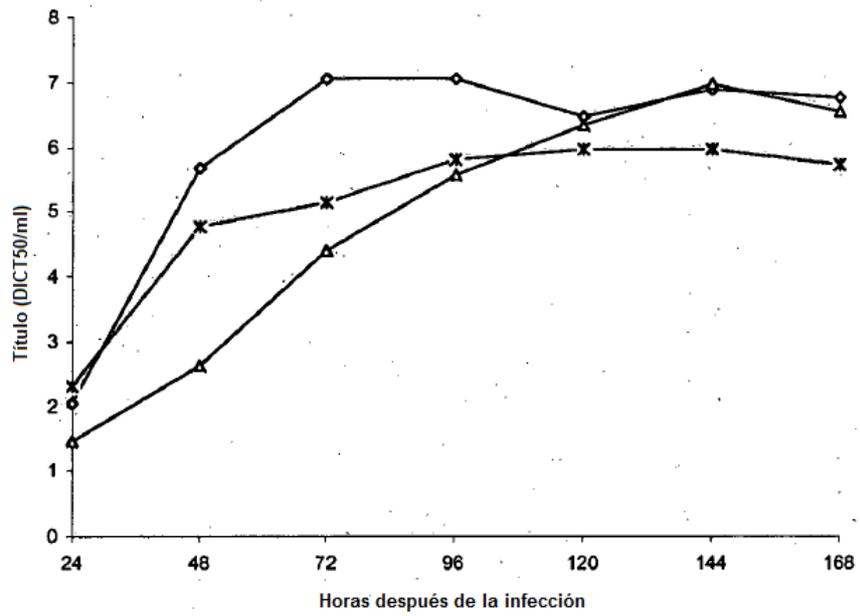


Fig. 4

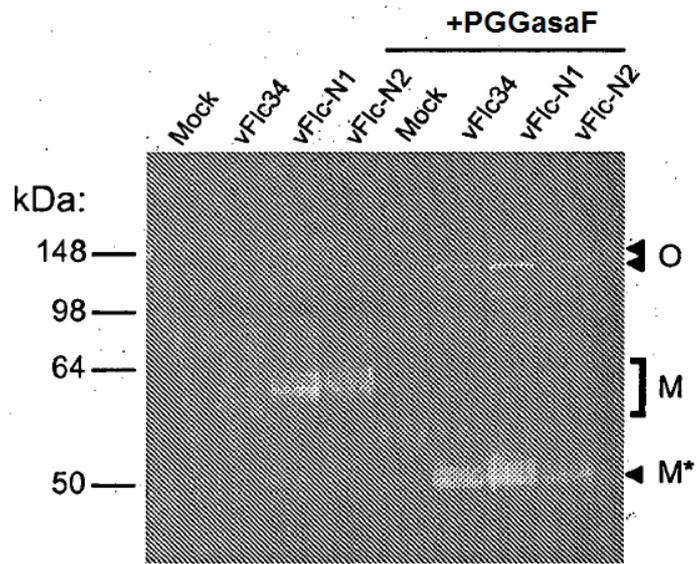
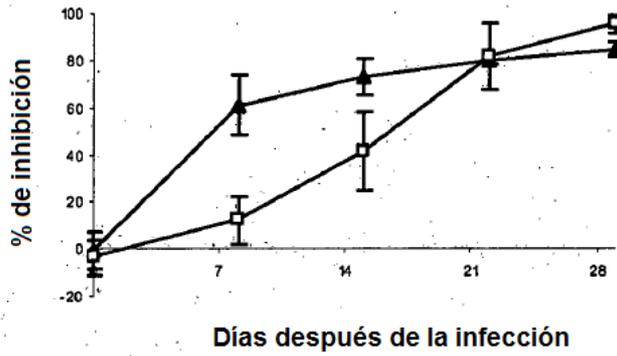
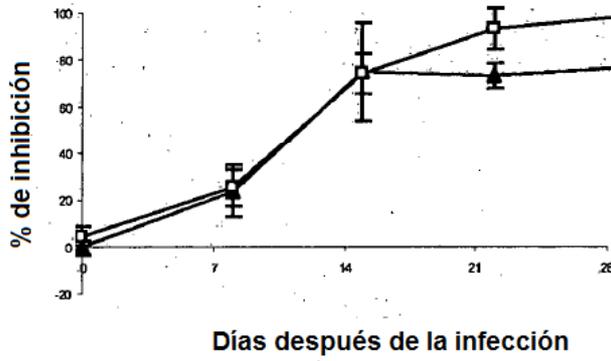


Fig. 5

A



B



C

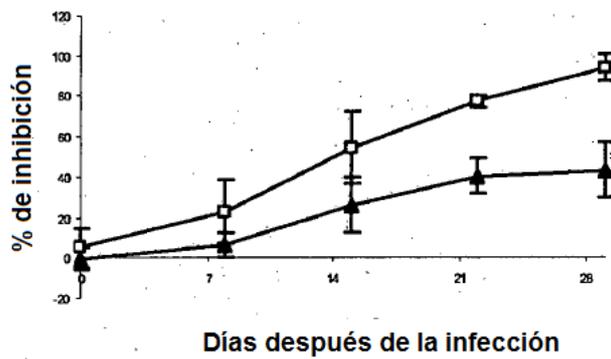
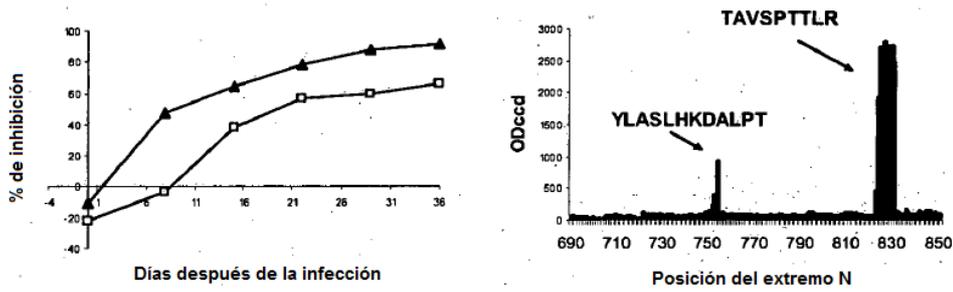


Fig. 6

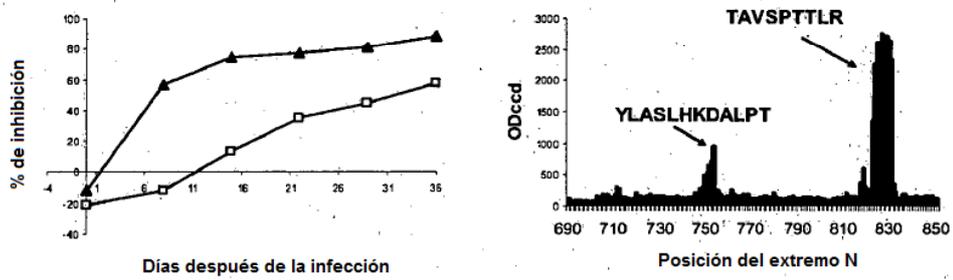
A

Conejo 1.1: vFlc34 (de tipo salvaje)



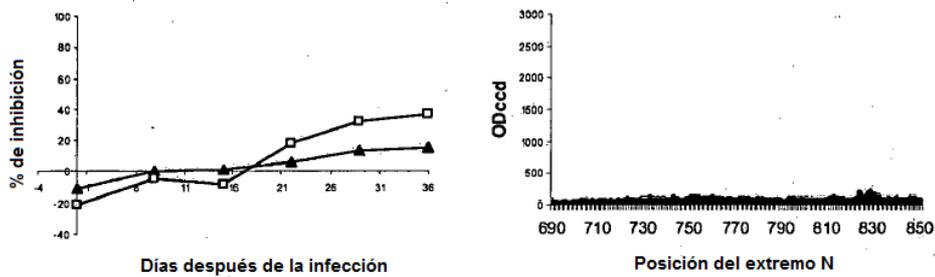
B

Conejo 1.2: vFlc34 (de tipo salvaje)



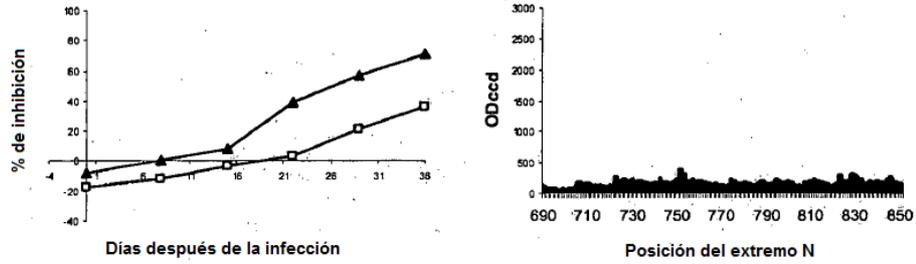
C

Conejo 2.1: vFlc-ΔPTa1



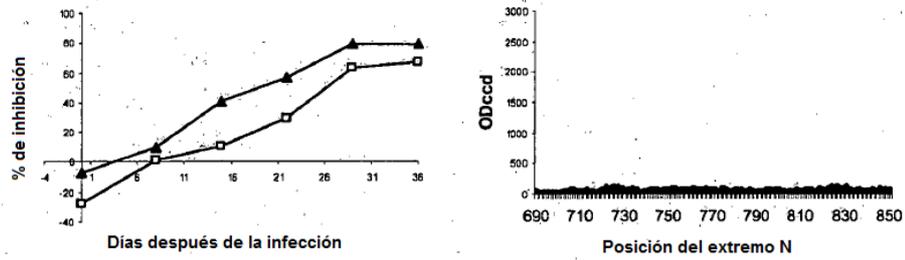
D

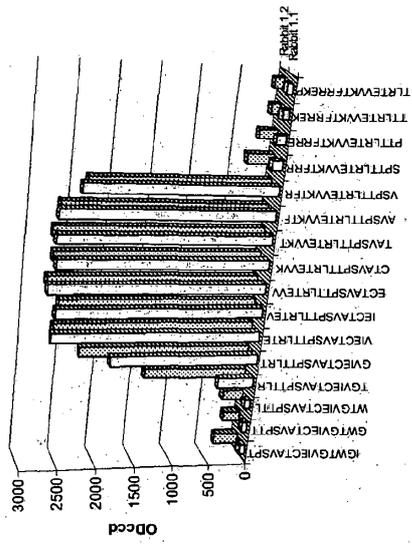
Conejo 2.2: vFlc- $\Delta$ PTa1



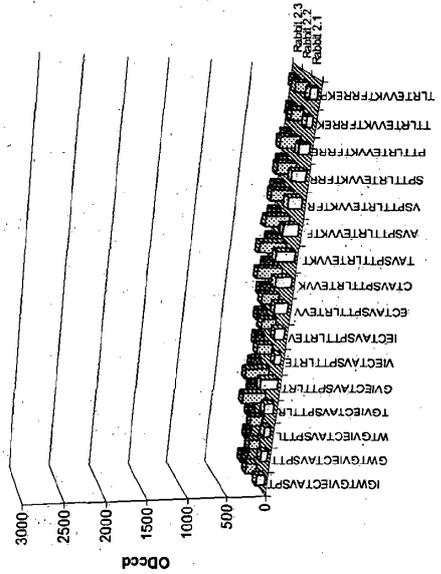
E

Conejo 2.3: vFlc- $\Delta$ PTa1





F



G

Fig. 7

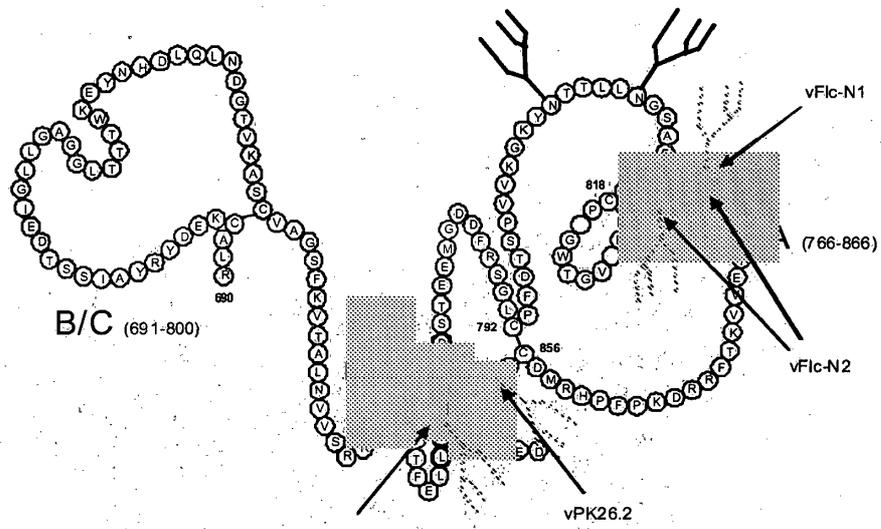
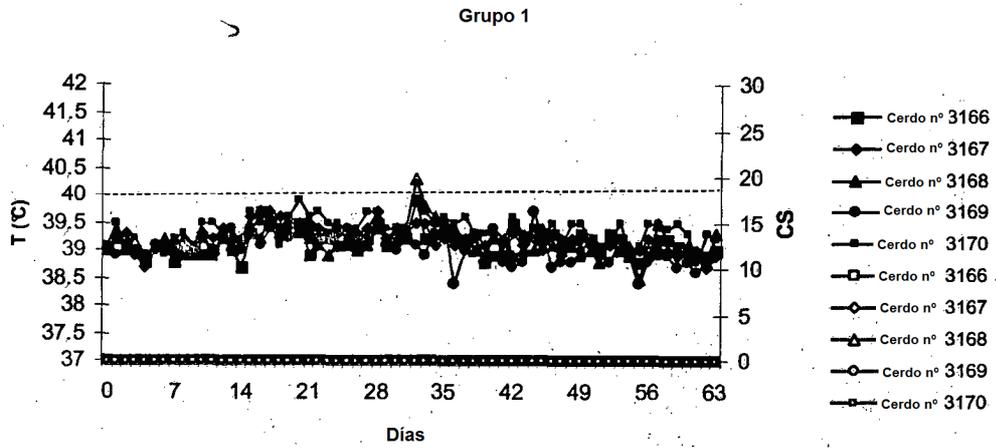
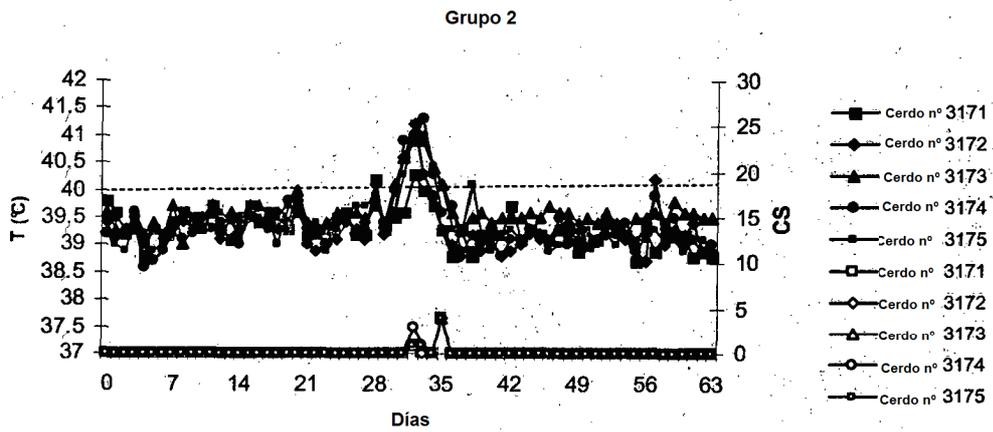


Fig. 8

A



B



C

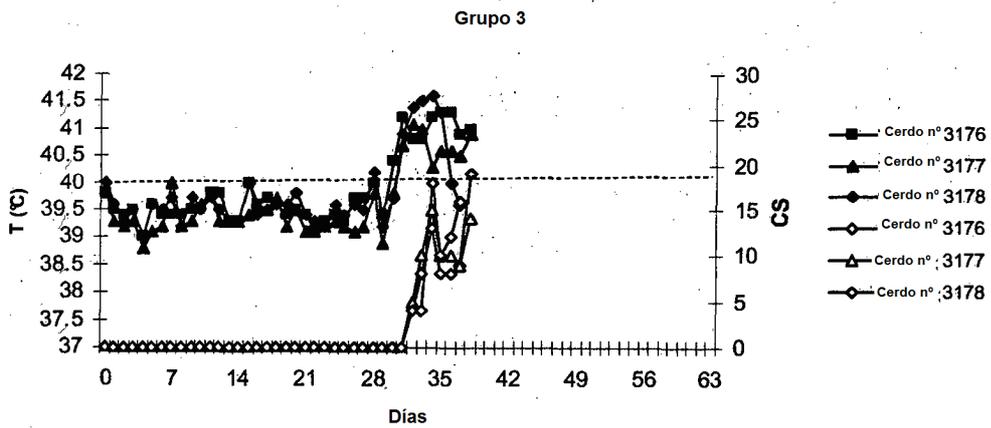
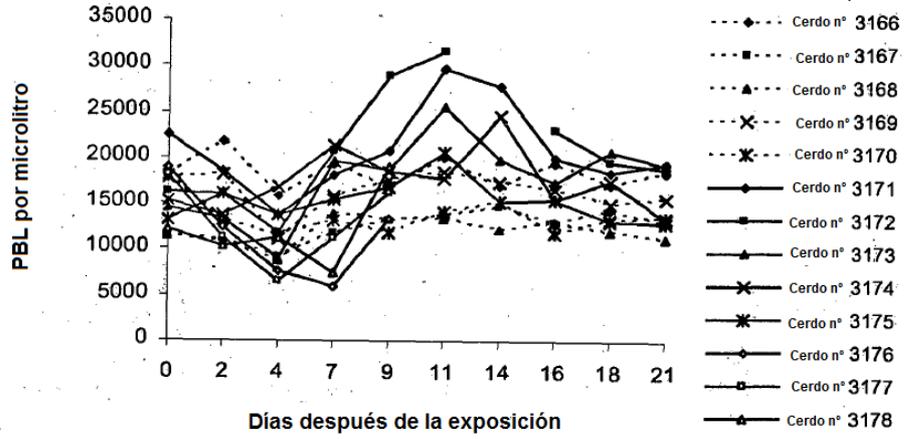


Fig. 9

**A**



**B**

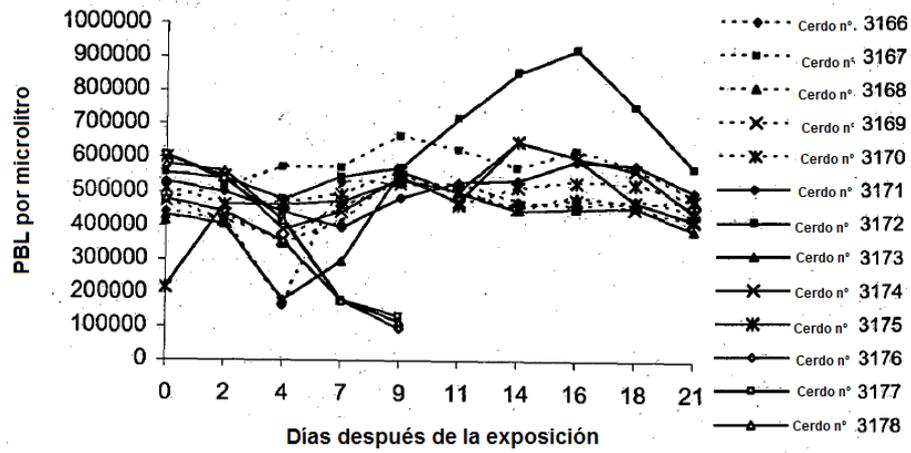


Fig. 10

