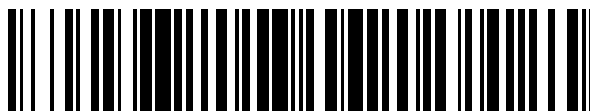


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 432**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 7/08 (2006.01)

C12P 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2008 E 08727607 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2106440**

54 Título: **Células no símicas para el desarrollo del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS)**

30 Prioridad:

12.01.2007 US 884782 P

17.08.2007 US 956597 P

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

19.02.2016

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS (100.0%)
352 Henry Administration Building, 506 South Wright Street
Urbana, IL 61801, US**

72 Inventor/es:

ZUCKERMANN, FEDERICO A.

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 560 432 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células no símicas para el desarrollo del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS)

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 **[0001]** La presente solicitud reivindica beneficio de la solicitud número de serie US 60884782 presentada el 12 de enero de 2007 y US 60956597 presentada el 17 de agosto de 2007, cada una de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia en la medida en que no se contradigan con el presente documento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 **[0002]** El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) es una enfermedad viral de los cerdos que causa la mayor pérdida económica anual en comparación con cualquier enfermedad infecciosa actual o anterior que haya afectado nunca a la industria porcina. El PRRS, también conocido como "enfermedad misteriosa del cerdo", síndrome respiratorio y de infertilidad porcino (SIRS, por sus siglas en inglés), y "enfermedad de la oreja azul", se detectó por primera vez en Norteamérica en 1987 y en Europa en 1990. Desde entonces, el PRRS se ha convertido en una grave amenaza para las industrias porcinas en la mayoría de las zonas productoras de cerdos de todo el mundo, excepto Australia. El PRRS tiene su efecto más pronunciado en los lechones jóvenes y recién nacidos. Hasta un 20 %-30 % de los lechones de las camadas de las cerdas infectadas son mortinatos, y hasta un 80 % de los lechones de las piaras infectadas mueren antes del destete. Por consiguiente, las consecuencias económicas de la enfermedad son devastadoras (véase la patente estadounidense 5476778 de Chladek *et al.*). En un estudio financiado en parte por el National Pork Board, se observó que las pérdidas atribuidas al PRRS superaban los 560 millones de dólares solo en Estados Unidos (Neumann EJ *et al.*, 2005).

20 **[0003]** La investigación del PRRS y el desarrollo de los enfoques diagnósticos y terapéuticos, incluyendo nuevas vacunas y tecnología para la producción de vacunas, están restringidos por la disponibilidad limitada de opciones para cultivar el virus del PRRS *in vitro*. Anteriormente, las células símicas habían sido el único tipo de línea celular conocida disponible para sostener el desarrollo del PRRS para la producción de vacunas. La línea celular símica MA-104 y los derivados relacionados (por ejemplo, MARC-145) pueden representar lo que hasta ahora podría haber sido la única opción práctica para soportar la replicación del virus del PRRS *in vitro*.

25 **[0004]** La presente invención mejora el estado de la técnica al proporcionar opciones alternativas para trabajar con el virus del PRRS, tales como el modo de realización de células macrófagas alveolares porcinas fetales aisladas que pueden soportar el desarrollo del PRRS.

30 **[0005]** Se han adoptado otros enfoques, con menos resultados deseables, para desarrollar las opciones para el crecimiento del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés). En un enfoque, se pueden utilizar macrófagos alveolares porcinos para el desarrollo del PRRSV; no obstante, el alto grado de variabilidad inherente en las células aisladas de diferentes cerdos se considera una desventaja (véase Vincent *et al.*, 2005; Bautista *et al.*, 1993). En otro enfoque, Weingartl *et al.* establecieron líneas celulares monomieloides porcinas después de la transfección de los macrófagos alveolares porcinos primarios obtenidos de cerdos de 12 semanas. Aquellas células se probaron, pero no soportaron la replicación del PRRSV (Weingartl *et al.*, 2002, *Journal of Virological Methods* 104:203-216). Por el contrario, la presente invención describe sorprendentemente, entre otras cosas, el descubrimiento de que determinadas células de cerdos fetales son, de hecho, capaces de soportar el desarrollo del PRRSV.

40 **[0006]** Las aplicaciones tecnológicas de gran interés para la utilización de la presente invención incluyen aspectos de investigación aplicada tales como la producción de vacunas veterinarias, además de la de estudiar el desarrollo del virus del PRRS en el nivel de investigación básica. Las vacunas para el PRRSV que son vacunas vivas modificadas o vacunas muertas inactivadas se pueden producir por las células y las líneas celulares de la invención. Una herramienta para desarrollar este virus en particular y métodos relacionados también son significativos en el contexto de generación de material útil para aplicaciones de diagnóstico. En el contexto de una analogía histórica destinada a enfatizar el avance de la ciencia, la capacidad de trabajar con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se suprimió de forma general debido a las dificultades y a una falta de opciones para cultivar el virus *in vitro*. Los avances cruciales en la capacidad de estudiar y generar diagnósticos y vacunas potenciales para el VIH están relacionados con el acontecimiento decisivo de poder cultivar satisfactoriamente el virus *in vitro*; véase Gallo RC, 2002, *Historical essay. The early years of HIV/AIDS*; Science 298(5599):1728-30.

50 **[0007]** Se cree que la principal limitación para el control de la enfermedad del PRRS está en la disponibilidad y la eficacia de las tecnologías de las vacunas. La contribución de células y métodos innovadores para el desarrollo del virus del PRRS representa, de esta manera, un avance significativo en la capacidad de trabajar con el virus del PRRS, para desarrollar tecnologías de vacunas alternativas y/o mejoradas, y para abordar el problema de la enfermedad del PRRS.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0008] La invención se refiere en líneas generales a células macrófagas alveolares porcinas fetales aisladas capaces de reproducir el virus del PRRS y métodos para reproducir el virus del PRRS utilizando dichas células.

5 **[0009]** En el presente documento se describen células no símicas aisladas capaces de reproducir el virus del PRRS, donde la célula no símica se obtiene de un animal individual y se cultiva durante al menos 5 pases.

[0010] En un modo de realización, la invención proporciona una célula pulmonar fetal porcina aislada capaz de reproducir el virus del PRRS. En un modo de realización, la célula es una célula macrófaga alveolar. En un modo de realización, la célula se propaga en cultivo durante al menos 5 pases. En un modo de realización, la célula se propaga en cultivo durante al menos 10 pases. En un modo de realización, la célula se propaga en cultivo durante al menos 20 y/o 50 pases.

10

[0011] En el presente documento se describe una célula primaria aislada o una población celular obtenida de un pulmón de un feto porcino. Como se describe en el presente documento, el feto tiene de aproximadamente 30 a aproximadamente 90 días de gestación. Como se describe en el presente documento, la célula puede ser un macrófago alveolar o la población celular puede comprender al menos una célula macrófaga alveolar. Como se describe en el presente documento, la célula puede ser un macrófago, de linaje macrófago, o progenitora del mismo.

15

[0012] En un modo de realización, la invención proporciona una célula o línea celular designada en el presente documento como ZMAC. En el presente documento se describe una célula o línea celular designada en el presente documento como FBAL-A. En un modo de realización, la invención proporciona una célula representada por un depósito en la American Type Culture Collection designado como depósito de patente ATCC N.º PTA-8764 o un derivado del mismo.

20

[0013] En un modo de realización, la invención proporciona una variante de célula inmortalizada o un derivado de una célula descrita en el presente documento que tiene la capacidad de soportar el desarrollo del PRRSV.

[0014] En un modo de realización, la invención proporciona un método para generar progenie de un virus del PRRS que comprende:

25

- a) proporcionar una célula macrófaga alveolar porcina fetal aislada o purificada capaz de replicar un virus del PRRS, donde dicha célula se cultiva durante al menos 5 pases, donde dicha célula se obtiene opcionalmente de un animal individual;
 - b) exponer dicha célula a dicho virus del PRRS; y
 - c) permitir que el virus del PRRS se replique en la célula;
- 30

generando de esta manera progenie de un virus del PRRS. Como se describe en el presente documento, el método puede comprender además recoger el PRRSV desarrollado.

[0015] En un modo de realización, la invención proporciona un método para producir una vacuna contra el PRRS, que comprende proporcionar una cepa de virus vivo modificado (MLV, por sus siglas en inglés) del PRRSV, y desarrollar dicha cepa de MLV en una célula macrófaga alveolar porcina aislada o purificada capaz de replicar dicha cepa de MLV del PRRSV. En un modo de realización, la célula es una célula primaria, una población celular, una variante o un derivado de la misma. En un modo de realización del método, la célula se representa por una célula designada como ZMAC-1, un depósito en la American Type Culture Collection designado como depósito de patente ATCC N.º PTA-8764 o un derivado del mismo.

35

[0016] En un modo de realización, la invención proporciona una composición que comprende una célula o línea celular designada como ZMAC-1 o representada por un depósito en la American Type Culture Collection designado como depósito de patente ATCC N.º PTA-8764 o un derivado del mismo. En el presente documento se describe una composición que comprende una célula o línea celular designada como FBAL-A.

40

[0017] En un modo de realización, la invención incluye un método para aislar una célula de un pulmón fetal porcino que comprende proporcionar un sujeto fetal porcino; obtener una muestra de lavado broncoalveolar que contenga células de dicho sujeto; y separar un componente celular de dicha muestra; aislando de esta manera dicha célula. En un modo de realización, dicha muestra que contiene células es una muestra de lavado broncoalveolar. Como se describe en el presente documento, dicha muestra puede ser una muestra de tejido extirpado que se procesa opcionalmente mediante maceración y/u homogeneización.

45

[0018] En un modo de realización, la invención proporciona un método para desarrollar un virus del PRRS, que comprende: (a) aislar una célula de un pulmón fetal porcino; (b) cultivar dicha célula; y (c) poner en contacto dicha célula con dicho virus para permitir la replicación viral; desarrollando de esta manera el virus. Como se describe en el presente documento, dicho virus puede ser un virus del PRRS atenuado o un aislado de campo del virus del PRRS. Como se describe en el presente documento, el aislado de campo puede ser virulento o de

50

baja virulencia de forma natural o no virulento. En un modo de realización, dicho cultivo comprende pasar dicha célula durante al menos 5 pases y/o desarrollar dicha célula durante al menos 10 días de cultivo continuo.

5 **[0019]** En el presente documento se describe un método para desarrollar y aislar el PRRSV, que comprende inocular el virus en un cultivo de células no símicas en presencia de suero en un medio de crecimiento adecuado e incubar las células inoculadas hasta que se genere el material vírico de progenie del PRRSV. Como se describe en el presente documento, el PRRSV puede ser ATCC-VR2332. Como se describe en el presente documento, las células no símicas pueden haber sido previamente desarrolladas en cultivo durante al menos 5 pases. Como se describe en el presente documento, las células no símicas pueden haber sido previamente cultivadas durante al menos 10, 20 y/o 50 pases.

10 **[0020]** En el presente documento se describe un método para desarrollar el PRRSV que comprende (a) inocular el PRRSV en células no símicas que han sido previamente cultivadas durante al menos 5, 10, 20 y/o 50 pases; y (b) incubar las células no símicas inoculadas. Como se describe en el presente documento, las células no símicas pueden ser macrófagos alveolares porcinos. Como se describe en el presente documento, las células no símicas se pueden obtener de una muestra de pulmón fetal porcino. Como se describe en el presente documento, el PRRSV se puede derivar de un homogeneizado de tejido porcino infectado con el virus. Como se describe en el presente documento, el método puede comprender la incubación del cultivo hasta que se observe un periodo de tiempo fijo y/o un efecto citopático. Como se describe en el presente documento, el periodo de tiempo fijo puede ser de aproximadamente 16 horas a aproximadamente 72 horas.

20 **[0021]** En el presente documento se describe una composición inmunogénica que comprende PRRSV inactivado, donde el virus inactivado se forma mediante un proceso que incluye desarrollar el PRRSV en células no símicas antes de inactivar el virus, donde las células no símicas se han cultivado previamente durante al menos 5, 10, 20 y/o 50 pases. Como se describe en el presente documento, desarrollar el virus puede comprender: (a) inocular el virus del síndrome respiratorio y de infertilidad porcino en las células; y (b) incubar las células inoculadas a aproximadamente 34 °C hasta aproximadamente 37 °C. Como se describe en el presente documento, desarrollar el virus puede implicar un medio de crecimiento que incluye suero. Como se describe en el presente documento, el virus inactivado puede ser una cepa muerta del PRRSV ATCC-VR2332. Como se describe en el presente documento, la composición inmunogénica puede comprender adicionalmente un adyuvante y/o un portador farmacéuticamente aceptable.

30 **[0022]** En un modo de realización, la invención proporciona una composición que comprende un virus del PRRS desarrollado en una célula de la invención.

35 **[0023]** En un modo de realización de los métodos de la invención, una célula de la invención se pone en contacto con una composición de factor de crecimiento. En un modo de realización, la composición de factor de crecimiento comprende un factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF, por sus siglas en inglés). En un modo de realización, la composición de factor de crecimiento comprende un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GMCSF, por sus siglas en inglés).

40 **[0024]** En un modo de realización, la invención proporciona una composición que comprende el PRRSV en o de un cultivo de células no símicas; donde las células no símicas se han cultivado previamente durante al menos 5, 10, 20 y/o 50 pases, se derivan de un macrófago alveolar porcino procedente de una muestra de pulmón fetal porcino, o ambos. Como se describe en el presente documento, el PRRSV es un virus ARN con envoltura, fastidioso, no hemaglutinante y es capaz de ocasionar el PRRS en cerdos. Como se describe en el presente documento, la composición puede tener un título de virus de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^7 TCID₅₀/ml. Como se describe en el presente documento, el título de virus puede ser de hasta aproximadamente 10^9 TCID₅₀/ml. Como se describe en el presente documento, el PRRSV puede ser una cepa de MLV. Como se describe en el presente documento, el PRRSV se puede derivar de un inóculo que comprende un homogeneizado de tejido de un cerdo afectado por el PRRS. Como se describe en el presente documento, el inóculo se puede derivar de un homogeneizado de tejido neutralizado, y el homogeneizado de tejido neutralizado se puede obtener neutralizando el homogeneizado de tejido con sueros de anticuerpos para enfermedades porcinas seleccionadas del grupo consistente en *haemophilus*, brucelosis, leptospira, parvovirus, pseudorabia, encefalomiocarditis, enterovirus, gripe porcina, y mezclas de las mismas. Como se describe en el presente documento, el inóculo se puede derivar de un homogeneizado filtrado del homogeneizado de tejido, conteniendo el homogeneizado filtrado partículas que tienen un tamaño no mayor que aproximadamente 0,45 micras.

55 **[0025]** En el presente documento se describe una célula no símica donde la célula es una célula porcina. Como se describe en el presente documento, la célula se puede derivar de un pulmón porcino. Como se describe en el presente documento, la célula se puede derivar de un pulmón porcino. Como se describe en el presente documento, el pulmón fetal porcino puede ser de un feto porcino de aproximadamente 20 días a aproximadamente 80 días de gestación. Como se describe en el presente documento, el feto porcino puede tener una gestación de aproximadamente 50 días a aproximadamente 70 días. Como se describe en el presente documento, la célula se puede obtener de una muestra de lavado de pulmón de un feto porcino. En un modo de realización de la invención, la célula es una célula macrófaga alveolar porcina fetal.

- [0026]** En el presente documento se describen células no adherentes y/o relativamente menos adherentes. Como se describe en el presente documento, se puede obtener una población celular mixta de un pulmón fetal porcino. Como se describe en el presente documento, puede haber al menos dos tipos de células en la población celular mixta incluyendo una célula precursora de linaje macrófago/monocito que es autorrenovable y relativamente menos diferenciada o no diferenciada; y una célula diferenciada de linaje macrófago/monocito que es relativamente más diferenciada. Como se describe en el presente documento, puede haber al menos un tercer tipo de célula en la población celular mixta, que es un tipo de célula alimentadora/auxiliar. Como se describe en el presente documento, el tercer tipo de célula puede proceder de una muestra endógena o se añade de manera exógena.
- [0027]** Como se describe en el presente documento, una célula y/o una población celular de la invención se puede describir diciendo que tiene una población de precursores de células endoteliales que se pueden realizar para producir células endoteliales bajo condiciones de cultivo adecuadas. Por ejemplo, las condiciones de cultivo pueden incluir el tipo de material de plástico y/o los tratamientos de superficie.
- [0028]** Como se describe en el presente documento, puede haber una fracción de células que expresa CD90 Y CD117. Como se describe en el presente documento, la fracción puede ser de aproximadamente 30 % o al menos 30 %.
- [0029]** En un modo de realización, la célula macrófaga alveolar porcina fetal aislada de la invención se utiliza para producir una vacuna contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV).
- [0030]** En el presente documento se describe una célula o línea celular capaz de soportar el desarrollo de un virus del PRRS que es un virus natural o una cepa de laboratorio. En un modo de realización preferido, la invención soporta el desarrollo de un virus vivo modificado del PRRS. Como se describe en el presente documento, el virus puede ser una cepa correspondiente a o derivada de una línea de productos de Boehringer Ingelheim tales como las vacunas porcinas Ingelvac® PRRS y ReproCyc® PRRS. Como se describe en el presente documento, el virus puede ser una cepa correspondiente a o derivada de una línea de productos de Schering-Ploug de la vacuna Prime-Pac® PRRS. Como se describe en el presente documento, el virus puede ser un aislado utilizado en la licencia de productos biológicos veterinarios de Estados Unidos (United States Veterinary Biological Product License) (29/03/96) para la vacuna contra el síndrome reproductivo y respiratorio porcino, forma reproductiva, virus muerto, Código 19S5.20. Como se describe en el presente documento, el virus del PRRS puede ser un virus atenuado. Como se describe en el presente documento, el virus del PRRS puede ser un aislado de campo. Como se describe en el presente documento, el aislado de campo puede ser una cepa virulenta o una cepa de baja virulencia de forma natural o no virulenta. Las composiciones o métodos como se describen en el presente documento se pueden aplicar para el desarrollo del material del virus del PRRS que se utiliza para la fabricación de la vacuna, viva, atenuada o inactivada.
- [0031]** En una célula o línea celular de la invención o como se describe en el presente documento, se puede establecer un derivado inmortalizado del material inicial de una célula o línea celular no inmortalizada o ya inmortalizada. Como se describe en el presente documento, se puede establecer una línea celular inmortalizada o línea celular utilizando una o más técnicas de transformación u otras de inmortalización como se entiende en la técnica.
- [0032]** En una célula o línea celular de la invención o como se describe en el presente documento, se pueden establecer uno o más subclones. Por ejemplo, un subclón se puede aislar y reproducir de conformidad con técnicas tradicionales, tales como limitar la dilución en cultivo.
- [0033]** En un modo de realización de la invención, se cultiva una célula o línea celular durante al menos 5 pases. En otros modos de realización, se cultiva una célula o línea celular durante al menos 10 pases, al menos 20 pases, y/o al menos 50 pases. Como se describe en el presente documento, se puede cultivar una célula primaria o línea celular durante al menos una semana. Como se describe en el presente documento, se puede cultivar una célula primaria o línea celular durante al menos dos semanas. Como se describe en el presente documento, se puede cultivar una célula primaria o línea celular durante al menos cuatro semanas, al menos ocho semanas, y/o al menos dieciséis semanas.
- [0034]** Como se describe en el presente documento, se puede aislar o purificar una composición tal como una célula o línea celular.
- [0035]** En el presente documento se describe un proceso para desarrollar un virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) desarrollando el virus en un cultivo de tejidos en una cantidad suficiente para proteger a los animales contra el PRRS para diagnosticar el PRRS o para identificar la estructura molecular del PRRSV para productos de subunidades o recombinantes, que comprende inocular el PRRSV en un cultivo de tejidos de una célula o línea celular no símica y recoger el virus desarrollado. Como se describe en el presente documento, la célula o línea celular puede ser porcina. Como se describe en el presente documento, la célula o línea celular puede ser un macrófago alveolar porcino. Como se describe en el presente documento, se puede proporcionar un cultivo de tejidos que contenga el PRRSV producido de conformidad con el proceso. En el

presente documento se describe un proceso para preparar una vacuna efectiva para proteger a los cerdos contra el PRRS que comprende proporcionar el PRRSV como se describe en el presente documento, liberar el PRRSV a partir de las células del cultivo de tejidos y ajustar la masa antigénica mediante dilución, concentración o extracción para producir una cantidad inmunológicamente efectiva de la masa antigénica para un producto de subunidad o recombinante relativamente intacto.

[0036] Como se describe en el presente documento, se puede utilizar una célula o línea celular no símica de la invención para producir PRRSV vivo o PRRSV inactivado/muerto.

[0037] En el presente documento se describe una célula o línea celular no símica purificada de linaje macrófago derivada de un organismo fetal porcino. En el presente documento se describe un método para generar una célula o línea celular no símica purificada de linaje macrófago derivada de un organismo fetal porcino. Como se describe en el presente documento, la célula o línea celular se puede cultivar *in vitro* durante al menos tres, cinco o 10 pases.

[0038] Sin desear estar ligados a ninguna teoría en particular, puede haber en el presente documento un análisis de creencias o interpretaciones de los principios o mecanismos subyacentes relativos a la invención. Se reconoce que, independientemente de la exactitud final de cualquier explicación o hipótesis, un modo de realización de la invención puede, no obstante, ser operativo y útil.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0039]

La Figura 1 ilustra el desarrollo de dos cepas atenuadas del PRRSV (PrimePac y Syva) en un cultivo de células no símicas UIMAC FBAL-A.

La Figura 2 ilustra el fenotipo de las células UIMAC-FBAL-A incluyendo la expresión de los marcadores de superficie de células macrófagas características.

La Figura 3 ilustra características morfológicas de las células FBAL-A utilizando técnicas de microscopía: A) tinción de Giemsa para mostrar la apariencia morfológica (citospina); B) microscopía confocal de FBAL-A teñida para CD14; C) microscopía confocal de fluorescencia con tinción para CD172; y D) tinción de FBAL-A infectada con PRRSV con tinción para el antígeno de la nucleocápside que indica una localización característica del antígeno N con respecto al núcleo y la asociación con el nucléolo. La Fig. 3B y la Fig. 3C ilustran la morfología real de las células recientes teñidas para CD14 o CD172 con filopodios y lamelipodios característicos.

La Figura 4 ilustra los datos sobre la cinética de crecimiento de las células ZMAC (Fig. 4A) y el crecimiento del PRRSV utilizando las células (Fig. 4B).

La Figura 5 ilustra las células ZMAC a las 20 horas después de ser infectadas con la cepa del virus del PRRS NADC20 con una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 1 (Fig. 5A) y 0,1 (Fig. 5B). Las células se fijaron y se tiñeron con mAb (anticuerpo monoclonal) SDOW17 marcado con FITC que es específico para la proteína de la nucleocápside (N).

La Figura 6 ilustra los resultados del cambio de peso en cerdos después de la exposición al virus del PRRS natural.

La Figura 7 ilustra la extensión y la frecuencia de viremia en cerdos después de la exposición al virus del PRRS natural.

La Figura 8 ilustra los resultados de la medición de la carga viral en las muestras del lavado broncoalveolar de los cerdos después de la exposición al virus del PRRS natural.

La Figura 9 ilustra el desarrollo de las células ZMAC-1 en presencia de factores de crecimiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0040] Son aplicables las siguientes abreviaturas: PRRS, síndrome reproductivo y respiratorio porcino; PRRSV, virus del PRRS; TCID₅₀, dosis infecciosa de cultivo de tejidos al nivel del 50 %; ATCC, American Type Culture Collection; MOI, multiplicidad de infección.

[0041] En general, los términos y expresiones utilizados en el presente documento tienen su significado reconocido en la técnica, que se puede encontrar por referencia a textos estándar, referencias de revistas y contextos conocidos por los expertos en la materia. Las siguientes definiciones se proporcionan con el fin de aclarar su utilización específica en el contexto de la invención.

[0042] Cuando se utiliza en el presente documento, el término “célula” se puede referir a una entidad biológica como se entendería en la técnica y que pretende abarcar entidades específicas que se pueden describir como una célula primaria o una línea celular. Cuando se utilizan varios de estos términos en el presente documento, un experto en la materia entenderá que dicha utilización es meramente para fines de enfatizar bien las distinciones entendidas. Por ejemplo, la expresión “una célula o línea celular” puede enfatizar el contraste entre un aislado primario original frente a una versión inmortalizada que podría ser un derivado directo del aislado primario original.

[0043] Cuando se utiliza en el presente documento, el término “aislado” se refiere a un estado manipulado que es diferente al que es el estado natural y/o se modifica en relación con un material inicial, en cuyo caso el término pretende ser coherente con el concepto de ser purificado. Por ejemplo, una célula primaria aislada se extirpa de un tejido natural u otra fuente en un organismo huésped y se mantiene separada de la fuente original. Como ejemplo adicional, un componente celular se puede colocar en cultivo o separarse de manera adicional de una muestra basada en fluido de lavado pulmonar, consiguiendo de esta manera una célula relativamente aislada.

[0044] Cuando se utiliza en el presente documento, el término “purificado” se refiere a una condición en la que ha habido un enriquecimiento, una separación y/o una eliminación relativa de una sustancia en relación con un material inicial. El término puede abarcar las condiciones de una purificación al menos parcial y no implica necesariamente un estado absoluto de pureza. Por ejemplo, el término se puede aplicar a una célula que sea capaz de reproducir un virus del PRRS y que esté presente en un cultivo mixto e independientemente se puede aplicar a lo que normalmente se puede considerar un cultivo puro. El término se puede aplicar a un cultivo celular primario que es opcionalmente un cultivo mixto. El término se puede aplicar a una línea celular.

[0045] En un modo de realización, la invención proporciona una línea celular macrófaga alveolar porcina fetal que es capaz de soportar el desarrollo del PRRSV. Una composición a modo de ejemplo descrita en el presente documento es una línea celular no símica. Las composiciones concretas descritas en el presente documento incluyen una célula o población celular obtenida de muestras de pulmón fetal porcino. Una composición adicional descrita en el presente documento incluye un macrófago alveolar porcino fetal. En un modo de realización, la invención proporciona métodos para desarrollar el PRRSV en una célula o línea celular macrófaga alveolar porcina fetal.

[0046] La invención se puede entender de manera adicional mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO 1. El aislado de célula no símica UIMAC FBAL-A es capaz de soportar el desarrollo del PRRSV.

[0047] La línea celular macrófaga alveolar porcina UIMAC FBAL-A se derivó del pulmón de un feto porcino de 45 días mediante lavado broncoalveolar con medio de cultivo. El cultivo inicial se expandió *in vitro* desde unos pocos miles de células iniciales hasta varios millones durante un periodo de 6 meses. En ese momento, se llevaron a cabo experimentos para medir el desarrollo del virus del PRRS. Estos experimentos mostraron que las células FBAL-A fueron capaces de soportar la replicación del virus. Este aislado no se transformó deliberadamente y demostró además una capacidad de desarrollarse y propagarse en cultivo y un fenotipo para la capacidad de soportar la infectividad y el desarrollo del virus del PRRS.

[0048] Las condiciones del cultivo celular fueron como sigue. Medio de cultivo: RPMI 1640 complementado con L-glutamina y 25 mM de HEPES. El medio se complementó con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, gentamicina y suero fetal bovino al 10 %. Las células se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % a una humedad del 100 %. Para la superficie del cultivo se utilizaron placas de 6 pocillos de grado para cultivo de tejidos. Se utilizó un volumen de cultivo de 4-6 ml de medio de cultivo/pocillo. Para los pases, se seleccionaron las células por ser no adherentes o poco adherentes. Cada 3-4 días se retiró una parte de las células del cultivo con la ayuda de una pipeta Pasteur y una pera de succión suspendiendo suavemente las células en el fluido de cultivo y transfiriendo 1/3 del volumen del pocillo a un nuevo pocillo. El nuevo pocillo y el pocillo original se alimentaron con medio nuevo.

[0049] La Figura 1 ilustra el desarrollo de cepas atenuadas del PRRSV PrimePac y Syva en UIMAC FBAL-A. Los resultados demuestran que se pueden utilizar las células porcinas para producir el virus para la vacuna contra el PRRS en cantidades suficientes para la producción de vacunas.

[0050] Las células porcinas aisladas se pueden identificar y/o aislar mediante la expresión de determinadas moléculas de superficie. El patrón de expresión de las moléculas de superficie se puede utilizar para aislar otras células porcinas independientes o para seleccionar líneas celulares como indicadores potenciales para la capacidad de soportar el desarrollo del PRRSV. Por ejemplo, las células se seleccionaron opcionalmente para la expresión de CD163. En un ejemplo concreto, las células o líneas celulares se sometieron a técnicas de tinción y/o separación debido a las moléculas de superficie celular.

[0051] La Figura 2 ilustra el fenotipo de las células UIMAC-FBAL-A incluyendo la expresión de los marcadores de superficie de células macrófagas características. Las células FBAL-A expresan CD14, CD163 y CD172. La molécula de proteína CD163 es indicativa del linaje monocito/macrófago y se correlaciona con la tolerancia de

infección por el virus de la fiebre porcina africana. Las células también expresan las moléculas de MHC de clase II a bajo nivel. La línea roja hacia el lado izquierdo representa los resultados de la tinción de la muestra de control negativo. Se observa que la expresión de determinado marcador, incluyendo el descrito en el presente documento, se puede utilizar para la caracterización de las células, aunque independientemente también se puede utilizar para el enriquecimiento, la separación (por ejemplo, mediante clasificación) y otros fines. En un modo de realización, una célula tal como una célula macrófaga de la invención puede no necesariamente expresar uno o más determinados marcadores dados, o su patrón de expresión puede cambiar con el tiempo, pero puede, no obstante, ser capaz de replicar el PRRSV.

[0052] La Figura 3 ilustra características morfológicas de las células FBAL-A utilizando técnicas de microscopía: A) tinción de Giemsa para mostrar la apariencia morfológica (citospina); B) microscopía confocal de FBAL-A teñida para CD14; C) microscopía confocal de fluorescencia con tinción para CD172; y D) tinción de FBAL-A infectada con PRRSV con tinción para el antígeno de la nucleocápside que indica una localización característica del antígeno N con respecto al núcleo y la asociación con el nucléolo. La Fig. 3B y la Fig. 3C ilustran la morfología real de las células recientes teñidas para CD14 o CD172 con filopodios y lamelipodios característicos.

[0053] En los experimentos de examen microscópico, las células se centrifugaron sobre un portaobjetos y se tiñeron con tinción de Giemsa. Las células no fijadas se incubaron con anticuerpo monoclonal específico para SWC3 o CD14 seguido de la exposición a Ig de cabra anti-ratón marcada con FITC. Para la detección de la nucleocápside del PRRSV, las células se infectaron con el virus del PRRS (cepa VR-2332). Después de 18 horas, las células se centrifugaron sobre un portaobjetos, se fijaron con acetona y se incubaron con mAb SDOW17 de la proteína N del virus anti-PRRS marcado con FITC. Las células no infectadas no reaccionaron con el mAb SDOW17. En estudios sobre la cinética de crecimiento, se utilizó el aislado del PRRSV VR2332 en células UIMAC-FBAL-A. Los rendimientos del virus obtenidos de la línea celular macrófaga se titularon en células MARC-145.

[0054] Sin desear estar ligados a una explicación teórica, se cree que para determinadas composiciones las células descritas en el presente documento derivadas de pulmones fetales porcinos pueden contener progenitoras autorregeneradoras. Estas progenitoras autorregeneradoras pueden producir macrófagos de progenie, que se pueden diferenciar de manera adicional y además pueden tener la capacidad de producir células progenitoras adicionales que permiten la propagación continua.

EJEMPLO 2. El aislado de células no símicas ZMAC es capaz de soportar el desarrollo del PRRSV.

[0055] Además del desarrollo de las células FBAL-A, un esfuerzo independiente dio como resultado el desarrollo de un segundo aislado de células designado como ZMAC. Las células ZMAC se caracterizaron y se observó que tenían la capacidad de soportar la infectividad y el desarrollo del PRRSV.

[0056] En este intento independiente, se recogieron de manera aséptica seis fetos de 58 días del útero de la cerda 9688 obtenida de la piara de cerdos de la granja de investigación de medicina veterinaria de la Universidad de Illinois. Esta cerda era una cerda cruzada con la siguiente composición de raza: 17/32 Landrace, 13/32 Yorkshire y 2/32 Duroc. Los fetos se transportaron al laboratorio de cultivos celulares y se diseccionaron sus pulmones en el interior de una cabina de bioseguridad en condiciones de esterilidad.

[0057] Las células de las vías respiratorias de los pulmones de cada uno de los 6 fetos se aislaron por separado mediante lavado broncoalveolar. Se obtuvieron aproximadamente 100 000 células del pulmón de cada feto. Las células de cada feto se cultivaron por separado en diferentes pocillos de una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos. Después de un cultivo inicial de 4 días, las células se purificaron mediante un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. En un modo de realización, las células se pueden purificar mediante la técnica de Ficoll-Hypaque ya sea el día del aislamiento o posteriormente, por ejemplo, 1, 2 o 3 semanas más tarde, se reconoce que esto puede facilitar la eliminación de ciertos componentes tales como los glóbulos rojos, y potencialmente otro material, presentes en una preparación original). A los 20 días después del establecimiento de los cultivos iniciales, las células exhibieron un crecimiento sólido y se separaron en placas adicionales de 6 pocillos. Estas células se denominaron ZMAC/FBAL-II y se designaron adicionalmente como sublíneas 1-6 para identificar las células aisladas de los 6 fetos diferentes. Posteriormente, las células se separaron aproximadamente cada 4-5 días. El crecimiento sólido de las células fue evidente por la presencia de grupos de células que empezaron a duplicarse por lo que se refiere a células por grupo aproximadamente cada 2,5 a 3 días. A los 60 días después del inicio del cultivo, las células ZMAC/FBAL-II.1, y ZMAC/FBAL-II.2 exhibieron un mejor crecimiento que las otras cuatro líneas. Después de pases adicionales, las líneas ZMAC/FBAL-II.1, y ZMAC/FBAL-II.2 crecieron lo suficientemente bien como para transferirse a matraces de cultivo de tejidos de 75 cm². Las condiciones de cultivo fueron en general como se describe anteriormente. En este experimento, se utilizaron matraces Sarstedt para los cultivos en suspensión.

[0058] Después de múltiples pases, las células exhibieron un crecimiento vigoroso; se pudieron recoger varios millones de células cada 10-12 días. Las curvas de crecimiento indicaron que las células eran capaces de replicar el virus del PRRS, así como las células FBAL-1 (FBAL-A). En un análisis, la producción del virus fue de aproximadamente 0,2 TCID₅₀/célula. Se analizó el crecimiento de dos tipos de aislados del virus del PRRS vivo

modificado en estas células (cepa PrimePac de Schering-Plough y el aislado de vacuna española de Syva en Europa).

[0059] Se congelaron cinco lotes de células y se almacenaron en nitrógeno líquido. Cada lote tenía un mínimo de 10 viales con dos millones de células cada uno. Se observó que un vial representativo de cada lote tenía >80 % de viabilidad después de descongelarse y mostraba un crecimiento vigoroso en los 4 días posteriores al inicio del cultivo. Se observó que la población ZMAC era un 70 % susceptible a la infección por el virus del PRRS, como se determinó mediante tinción de inmunofluorescencia para proteínas virales en las 18 horas posteriores a la infección con una MOI de 0,01. En otra valoración, se determinó que la línea celular ZMAC era 100 % susceptible a la infección por el virus del PRRS, como se determinó mediante tinción de inmunofluorescencia para proteínas virales 12 horas después de la infección con una MOI de 10.

[0060] También se realizaron múltiples curvas de crecimiento por etapas infectando las células ZMAC con el virus del PRRS (PrimePac) con una MOI de 0,02. Basándose en el análisis de PCR en tiempo real de la expresión del genoma del virus en las células infectadas y mediante la titulación de la cantidad de la progenie del virus producida, se determinó que el primer ciclo de replicación del virus del PRRS se completó a las 9 horas después de la infección, y que la producción máxima de la progenie del virus se alcanzó en el segundo ciclo de replicación a las 18 horas después de la infección (Fig. 4B).

[0061] En la Figura 4, la Fig. 4A muestra los resultados de la cinética de crecimiento de las células ZMAC. Los cultivos establecidos de células ZMAC se desarrollaron en matraces de cultivo de 75 cm² que contenían 15 ml de células a 2-3,2 x 10⁵ células/ml; las células se alimentaron con un volumen igual de medio de cultivo nuevo para conseguir una densidad celular de 1-1,6 x 10⁵ células/ml. Las células se contaron a los 0, 3 y 6 días después de que se proporcionara el medio nuevo. Cada matraz fue capaz de producir 2-3 x 10⁶ células cada cuatro días.

[0062] La Figura 4B ilustra una curva de crecimiento de múltiples etapas del virus del PRRS en células ZMAC. En estos experimentos, los resultados indican la producción viral y la cinética de crecimiento del PRRSV en células ZMAC. Se infectó una suspensión de células ZMAC a 1x10⁶/ml con una MOI de 0,02 con el aislado del virus del PRRS atenuado PrimePac. Después de una hora de incubación a 37 °C, el inóculo se retiró mediante centrifugación, y las células se suspendieron a 1x10⁶/ml. Se retiró un volumen de 0,1 ml en los tiempos indicados después de la infección y se determinó el número de unidades TCID₅₀ en células MARC-145. La cepa del virus del PRRS atenuado PrimePac, potencialmente adecuada como un material de la vacuna, se desarrolla bien en la línea celular ZMAC.

[0063] La Figura 5 ilustra las células ZMAC a las 20 horas después de ser infectadas con la cepa del virus del PRRS NADC20 con una MOI de 1 (Fig. 5A) y 0,1 (Fig. 5B). También se observó un control negativo con células infectadas simuladas (no se muestra). Las células se fijaron y se tiñeron con mAb SDOW17 marcado con FITC que es específico para la proteína de la nucleocápside (N). También se realizó una microscopía de contraste de fases para observar las células. Generalmente estas células no mostraron CPE hasta aproximadamente 28-36 horas después de la infección. No obstante, una cantidad sustancial de material vírico se liberó de las células mucho antes, por ejemplo aproximadamente 18-20 horas después de la infección.

[0064] Se utilizan las muestras de células para adaptar las condiciones del desarrollo celular y las condiciones del desarrollo del virus con el fin de maximizar y/u optimizar los títulos de virus. En consecuencia, se generan concentraciones virales del PRRS y se pueden utilizar para el desarrollo de vacunas y fines de vacunación.

EJEMPLO 3. Líneas celulares no símicas inmortalizadas capaces de soportar el desarrollo del PRRSV.

[0065] Una célula o línea celular de la invención se establece como una o más de una variante inmortalizada espontánea, un derivado transformado deliberadamente, otra variante o derivado y una versión inmortalizada de otra manera de una célula o línea celular primaria como se describe en el siguiente documento.

[0066] Por ejemplo, se utilizan técnicas como se entendería en la técnica, tales como la implicación de tecnología de transformación viral; la fusión con una pareja inmortalizada; la exposición a condiciones químicas/físicas que incluyen, por ejemplo, irradiación; y tecnología relacionada con la manipulación de la función de la telomerasa. En un enfoque preferido, se utiliza el sistema TERT para establecer una célula o línea celular que pueda evitar, retrasar o alterar de otra manera la senescencia. Véase, por ejemplo, Carrillo *et al.*, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 89 (2002) 91-98; Kwak S *et al.*, 2006 *Animal Biotechnology*, 17: 51-58; <http://www.atcc.org/common/products/CellImmortProducts.cfm>.

[0067] En intentos de aislamiento preliminares, o desarrollo posterior de una célula inmortalizada, aspectos tales como la purificación y/o la subclonación se facilitan mediante una clasificación de células activadas por fluorescencia u otra técnica de análisis o separación por citometría de flujo. Otras técnicas, tales como la separación celular magnética, se pueden adaptar para utilizarse con las células y métodos de la presente invención.

EJEMPLO 4. Determinación de la inmunogenicidad y la eficacia de una vacuna viva modificada del PRRS.

[0068] En este ejemplo, se determina la inmunogenicidad y la eficacia de una vacuna del virus vivo modificado del PRRS producida utilizando una línea celular macrófaga porcina. Se analizó una línea celular macrófaga alveolar porcina. En un ejemplo concreto, se utilizaron las líneas celulares primarias macrófagas porcinas UIMAC-FBAL-A y/o ZMAC. De manera alternativa, se pueden generar materiales iniciales independientes y/o derivados, tales como transformantes de conformidad con la exposición del presente documento.

[0069] Se seleccionó y se produjo un candidato de MLV del PRRSV en relación con una célula o línea celular como se describe en el presente documento para generar material de MLV del PRRSV para la evaluación del ensayo clínico. Se llevó a cabo un estudio de vacunación y provocación con 32 cerdos de 4 semanas, aleatoriamente distribuidos en cuatro grupos de n=8 por grupo. Los cerdos se obtuvieron de la piara de cerdos sin virus del PRRS de la granja de investigación veterinaria de la Universidad de Illinois y se aclimataron en una instalación de aislamiento durante una semana antes de iniciar el estudio.

[0070] Los animales de los grupos 1 y 2 se inmunizaron una vez en la zona de los cuartos traseros con una dosis de 5×10^4 unidades TCID₅₀ en un volumen de 2 ml de la concentración del MLV desarrollado en las células UIMAC-FBAL-A o en las células MARC-145. A los animales del grupo 3 se les inyectó una mezcla 50:50 de 2 ml de sobrenadante de cultivo gastado de células UIMAC-FBAL-A y células MARC-145 símicas. Los animales del grupo 4 no se trataron y sirvieron como controles. Como medición de la inmunidad específica del virus, se tomaron muestras de sangre periférica de cada animal en las semanas 0, 2, 4, 6 y 8 después de la inmunización. A partir de estas muestras, se obtuvieron suero y células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y se midió la intensidad de la respuesta inmune humoral y celular. El título de los anticuerpos neutralizantes del virus presentes en el suero y la frecuencia de las células secretoras (SC, por sus siglas en inglés) de interferón (IFN)-gamma específicas del virus del PRRS por separado frente a los dos aislados del virus del PRRS parental FL-12 y NEB-1, un virus quimérico (Kwon B, 2006), y la cepa de provocación virulenta VR2385 (Opriessing T, 2002).

[0071] Para medir el nivel de inmunidad protectora inducida por el material de la vacuna, a los animales de los grupos 1-3 se les provocó el virus a las 6 semanas después de la inmunización mediante instilación de 2 ml de la cepa del virus del PRRS virulenta VR2385 (dosis 10^5 TCID₅₀ por 2 ml, administrada en alícuotas de 1 ml por fosa nasal). Los animales del grupo 4 permanecieron sin vacunar y no se les provocó el virus para determinar los parámetros clínicos normales, así como la apariencia normal de los pulmones. Los animales del grupo 3, sin tratamiento previo con el virus del PRRS, servirán como los controles de la provocación, para determinar la severidad de la provocación. El grado de inmunidad protectora producido por la vacuna se estableció basándose en factores que incluyen la medición de la temperatura corporal y el cambio de peso y la observancia de signos clínicos, tales como síntomas respiratorios y de depresión. Estos parámetros se monitorizaron diariamente durante catorce días. El nivel de viremia, la respuesta a IFN-gamma y el peso corporal se determinaron a los 0, 4, 7, 10 y 14 días después de la provocación. Catorce días después de la provocación, se sacrificó a los animales y se determinó la carga viral en el tejido pulmonar y el fluido del lavado broncoalveolar. Los cambios patológicos en el pulmón se evaluaron a niveles macro y microscópicos.

[0072] En otro experimento, se evaluó la inmunogenicidad y la eficacia del material biológico generado a partir de ZMAC. El material ZMAC se comparó con el mismo virus de la vacuna pero desarrollado en las células MARC-145. Con este propósito, se realizaron 3 pases en serie de la cepa del virus PrimePac en células ZMAC. El tercer pase de este virus en las células ZMAC se utilizó para llevar a cabo el estudio de vacunación comparativo de este biológico con respecto al virus PrimePac desarrollado en células MARC-145. Las concentraciones de la vacuna PrimePac desarrollada ya sea en las células ZMAC o en las células MARC-145 se prepararon a un título de 10^6 TCID₅₀/ml. Los grupos de cerdos se inmunizaron con una dosis de 5×10^4 TCID₅₀ en un volumen de 2 ml de la concentración del MLV desarrollado en las células UIMAC-FBAL-A o en las células MARC-145.

EJEMPLO 5. Utilización de una línea celular macrófaga alveolar porcina para producir una vacuna de un virus vivo modificado del PRRS.

[0073] Introducción. A mediados de 1994, se lanzó la primera vacuna de MLV del PRRS (Ingelvac PRRS MLV). Desde entonces, la utilización de virus atenuados como vacunas ha sido habitual en Norteamérica y Europa. Está aceptado que estos agentes son eficaces para conferir niveles adecuados de inmunidad protectora homóloga a la vez que confieren grados variables de protección contra la provocación del virus mediante cepas heterólogas (Mengeling *et al.*, 1996; Mengeling *et al.*, 1999). De esta manera, existe una motivación y un interés dirigidos a un progreso adicional de las tecnologías de herramientas, vacunas y estrategias alternativas y mejoradas y métodos en relación con las mismas.

[0074] En este estudio, una línea celular macrófaga alveolar porcina, designada ZMAC-1, se utilizó para la producción de una vacuna de virus vivo modificado (MLV) del PRRS. Además, la eficacia del virus de la vacuna desarrollado en este huésped porcino se comparó con la propagada en la única línea celular distinta conocida al inicio del presente estudio para soportar el desarrollo del virus del PRRS, a saber, la línea celular símica MA-104 y/o su derivado, la línea MARC-145.

[0075] Inicialmente, se descubrió que las células ZMAC-1 eran fácilmente susceptibles a la vacuna de MLV Prime Pac PRRS (Schering-Plough Animal Health). Además, después del tercer pase del virus en las células ZMAC-1, se obtuvo una producción comparable con la conseguida cuando se utilizaron células MARC-145. Para evaluar el potencial de la vacuna de ambos virus desarrollados en células ZMAC-1, se llevó a cabo un estudio de inmunización-provocación estándar. En este caso, a seis credos de 8 semanas se les inyectó una dosis equivalente de la vacuna Prime Pac desarrollada ya sea en las células ZMAC-1 o en las células MARC-145, mientras que dos grupos adicionales de tres animales no se inmunizaron. Cuatro semanas después, a todos los grupos vacunados y a un grupo sin tratamiento previo con el virus del PRRS se les provocó el virus con el aislado NADC-20 del virus de "tormenta de abortos del PRRS atípica". Un resultado del estudio fue que la vacuna de MLV Prime Pac desarrollada en cualquiera de las líneas celulares fue igualmente efectiva en la prevención de la pérdida de peso corporal de los cerdos sin tratamiento previo con el virus del PRRS que habían estado expuestos al virus heterólogo 7 días antes. No obstante, el virus de la vacuna desarrollado en las células ZMAC-1 fue significativamente más efectivo que el desarrollado en MARC-145 para reducir la extensión de la viremia y también para eliminar el virus virulento de los pulmones a los 7 y 10 días después de la provocación del virus, respectivamente.

[0076] La observación de que el tipo de línea celular utilizada para desarrollar la vacuna de MLV del PRRS puede mejorar el nivel de inmunidad protectora producida por el mismo virus de vacuna contra un virus del PRRS virulento genéticamente divergente tiene importantes implicaciones para la posibilidad de desarrollar una vacuna altamente efectiva contra este patógeno. A saber, los resultados de este estudio sugieren que la eficacia de una vacuna del virus de MLV del PRRS no se determina solo, como se suele creer, por su similitud genética con respecto al virus de provocación, sino que también influye la manera en que se produce. Los resultados de este estudio son significativos para demostrar que las células porcinas son útiles para generar una vacuna de MLV eficaz contra el virus del PRRS.

[0077] Resumen. Se generó una línea celular macrófaga alveolar porcina, designada ZMAC-1, y se examinó su utilidad para elaborar una vacuna efectiva del virus vivo modificado (MLV) del PRRS. Se descubrió que esta línea celular era 100 % susceptible a la infección por el virus del PRRS, como se demostró mediante la tinción de inmunofluorescencia exitosa para proteínas virales a las 20 horas después de la infección. Además, basándose en análisis de curvas de crecimiento de múltiples etapas, se determinó que el primer ciclo de replicación del virus del PRRS se completó a las 9 horas después de la infección, y la producción de la progenie del virus durante el segundo ciclo de replicación a las 19 horas después de la infección.

[0078] Para comparar la eficacia de las concentraciones de la vacuna de MLV Prime Pac PRRS (Schering-Plough Animal Health) preparada en la línea celular ZMAC-1 o en la línea celular símica MARC-145, se llevó a cabo un estudio de inmunización-provocación estándar. A seis credos de 8 semanas se les vacunó inicialmente de manera intramuscular con una dosis equivalente (10^4 TCID₅₀) de la vacuna Prime Pac desarrollada en las células ZMAC-1 o en las células MARC-145, mientras que dos grupos adicionales de tres animales no se inmunizaron. A todos estos animales, así como a uno de los dos grupos de controles no vacunados, se les provocó el virus 4 semanas después con 10^4 TCID₅₀ del aislado NADC-20 del virus de "tormenta de abortos del PRRS atípica". Mientras que los animales no vacunados experimentaron una pérdida de peso corporal media de $-2,26 \pm 1,81$ kg (-5 ± 4 lb) a los 7 días después de la provocación del virus virulento, los controles sin tratamiento previo con el virus del PRRS ganaron de media $8,93 \pm 2,72$ kg ($19,7 \pm 6$ lb) durante este intervalo de tiempo. En cambio, a los 7 días después de la provocación, los animales vacunados con el virus de MLV desarrollado en las células ZMAC-1 o en las células MARC-145 mostraron un aumento de peso corporal medio de $3,71 \pm 2,35$ y $4,21 \pm 1,63$ kg ($8,2 \pm 5,2$ y $9,3 \pm 3,6$ lb), respectivamente. De esta manera, estadísticamente, la vacuna de MLV Prime Pac desarrollada en cualquier línea celular fue igualmente efectiva para reducir el efecto negativo de la exposición de los cerdos a un virus del PRRS altamente virulento en su crecimiento. Cabe señalar que, los análisis de la carga viral en las muestras de suero y lavado pulmonar de los animales inmunizados contra el virus del PRRS y a los que se les provocó el virus revelaron que el virus de la vacuna desarrollado en las células ZMAC-1 fue significativamente ($P=0,015$) más efectivo para reducir la extensión de la viremia a los 7 días después de la provocación y también para eliminar el virus virulento de sus pulmones a los 10 días después de la provocación. La observación de que el tipo de línea celular utilizada para desarrollar la vacuna de MLV del PRRS puede mejorar el nivel de inmunidad protectora producida por este producto contra un virus del PRRS virulento genéticamente divergente tiene implicaciones significativas para el desarrollo de una vacuna altamente efectiva contra este patógeno. A saber, los resultados de este estudio sugieren que la eficacia de una vacuna del virus de MLV del PRRS no se determina solo, como se suele creer, por su similitud genética con respecto al virus de provocación, sino que también influye la manera en que se produce.

[0079] Los objetivos de este estudio, al menos en parte, incluyeron la determinación de (1) las características del desarrollo de las cepas del virus del PRRS atenuado en la línea celular macrófaga porcina ZMAC-1; y (2) la inmunogenicidad y la eficacia de una vacuna del virus vivo modificado del PRRS producida en la línea celular macrófaga porcina ZMAC-1.

60 Materiales y métodos

[0080] Células. Se seleccionaron células macrófagas alveolares porcinas, por ejemplo, como se describe adicionalmente en el presente documento, procedentes del lavado pulmonar de un feto de 58 días obtenido de una cerda libre de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640, se complementaron con suero fetal bovino al 10 %, piruvato de sodio y aminoácidos no esenciales, y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Se estableció una línea celular, designada ZMAC-1, en mayo de 2006 y ha estado continuamente desarrollándose desde entonces. Las concentraciones representativas de subdivisiones temporales diferentes de esta línea celular se han criopreservado.

[0081] Virus. La vacuna de MLV Prime Pac PRRS (Schering-Plough Animal Health) se sometió secuencialmente a tres pases en las células ZMAC-1. Aunque el título fue solo de 10⁴ TCID₅₀/ml después de los dos primeros pases, el virus pareció haberse adaptado durante el tercer pase, puesto que el título aumentó a 10^{6,25} TCID₅₀/ml. Por consiguiente, esta progenie se utilizó para vacunación. También se prepararon concentraciones de la vacuna Prime Pac en células MARC-145 como se describió anteriormente (Osorio et al., 2006) y alcanzaron un título de 10⁶ TCID₅₀/ml. El aislado NADC-20 del virus de "tormenta de abortos del PRRS atípica" (Harms et al., 2001) se desarrolló en células ZMAC-1 y mostró un título máximo de 10^{7,6} TCID₅₀/ml.

[0082] Estudio de vacunación y provocación: Dieciocho cerdos SPF (libres de todos los patógenos porcinos principales incluyendo el virus del PRRS, micoplasma y circovirus) de 8 semanas se distribuyeron aleatoriamente en 6 cubículos de aislamiento (3 cerdos por cubículo) en un departamento de la instalación de biocontención de la Universidad de Illinois. A los animales de cuatro cubículos se les inyectó una vez en la zona de los cuartos traseros 2 ml de una solución que contenía 10⁴ TCID₅₀ del virus Prime Pac desarrollado en células ZMAC-1 o en células MARC-145, para un total de 2 cubículos por formulación de vacuna (6 cerdos en total). Los seis cerdos restantes en los otros dos cubículos no se inmunizaron y sirvieron como controles sin vacunar. Cuatro semanas después de la vacunación, a todos los animales inmunizados, así como a tres de los cerdos de control alojados en un cubículo, se les provocó el virus con 10⁴ TCID₅₀ de cepa NADC-20 del virus del PRRS. Mientras que los animales no vacunados a los que se les provocó el virus sirvieron para establecer la gravedad de la infección por el virus del PRRS NADC-20, los cerdos sin tratamiento previo con el virus del PRRS del cubículo restante se utilizaron para proporcionar parámetros clínicos normales de crecimiento y salud. El grado de inmunidad protectora producido por la vacuna se determinó basándose en una comparación de los cambios de peso corporal y la aparición de síntomas respiratorios y de depresión. Estos parámetros se monitorizaron diariamente durante diez días después de la provocación. El nivel de viremia se determinó a los 0, 4, 7 y 10 días después de la provocación midiendo las unidades infecciosas en las células MARC-145. Diez días después de la provocación, se sacrificó a los animales y se determinó la carga viral en el fluido del lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés) utilizando PCR en tiempo real y métodos virológicos como se describió anteriormente (Zuckermann et al., 2007).

[0083] Análisis estadístico. Se utilizó el análisis de varianza para determinar las diferencias significativas entre los grupos de cerdos en relación al aumento de peso. Las medias de los grupos se compararon mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher utilizando el software Stat View (SAS). Para minimizar el efecto de las diferencias de peso corporal entre los animales en el momento de la provocación, los datos se calcularon como la diferencia entre el peso corporal de los animales en el momento de la provocación y 7 días después.

Resultados

[0084] Objetivo 1. Determinar las características de crecimiento de las cepas del virus del PRRS atenuado en la línea celular macrófaga porcina ZMAC-1. La finalidad de este objetivo fue determinar la solidez de la línea celular ZMAC-1 y su susceptibilidad a la infección por el virus del PRRS. Además, se trató de determinar las condiciones óptimas para el desarrollo del virus del PRRS atenuado en las células ZMAC-1 y demostrar que las concentraciones de la vacuna de MLV preparadas en esta línea celular se podrían utilizar para fines comerciales.

[0085] Caracterización de la línea celular macrófaga alveolar porcina ZMAC-1. La línea macrófaga ZMAC-1 mostró un patrón de desarrollo muy sólido con un tiempo de duplicación de aproximadamente 72 horas (Fig. B1; esto corresponde a la Fig. 4A). Se pudo adaptar las células para que se desarrollaran en matraces de 75 cm² y mantener este tipo de cultivo celular en producción continua durante los últimos 15 meses. Hasta la fecha, se han generado más de mil millones de células a partir de una población inicial de unos pocos miles. Para asegurar la perpetuidad de esta línea celular valiosa se han preparado más de 100 concentraciones de células congeladas. Cada lote tenía al menos 10 viales, y cada vial contenía al menos 2-3 millones de células. Después de descongelar un vial representativo de cada lote, se determinó que estos viales tenían >90 % de células viables que mostraban un crecimiento vigoroso en los 4 días posteriores al reinicio de su cultivo. Se confirmó que esta línea celular era de origen porcino por la reactividad del 100 % de las células en la población con el anticuerpo monoclonal K252.1 E4, que es específico para CD45 porcino (Schnitzlein y Zuckermann, 1998; Zuckermann et al., 2001). Además, las células ZMAC-1 expresan los siguientes marcadores de superficie celular: CD14, CD163, CD172, MHC clase II, cuya presencia es característica de los macrófagos (Fig. 2).

[0086] La Figura B1 (corresponde a la Fig. 4A). Cinética de crecimiento de la línea celular ZMAC-1. Cultivos establecidos de células ZMAC-1 en matraces de 75 cm² que contenían 2-3,2 x 10⁵ células/ml de medio se combinaron con un volumen igual de medio nuevo para conseguir una densidad celular de 1-1,6 x 10⁵ células/ml. Las células se contaron en los días 0, 3 y 6 después de poner el medio nuevo en el matraz de cultivo.

5 **[0087]** Desarrollo del virus del PRRS en células ZMAC-1. La línea celular ZMAC-1 es 100 % susceptible a la infección por el virus del PRRS, como se demostró mediante la tinción de inmunofluorescencia exitosa para proteínas virales a las 20 horas después de la infección (Fig. B2; corresponde a la Fig. 5A). Además, se determinó que el primer ciclo de replicación del virus del PRRS se completó a las 9 horas después de la infección (no se muestran los datos), y que la producción máxima de la progenie del virus se alcanzó en el segundo ciclo de replicación a las 19 horas después de la infección (Fig. B3; corresponde a la Fig. 4B).

10 **[0088]** Figura B2 (corresponde a la Fig. 5A). Expresión de la proteína de la nucleocápside del virus del PRRS en células ZMAC-1. A las 20 horas después de la infección con la cepa NADC-20 del virus del PRRS con una MOI de 1, las células se fijaron y se tiñeron con mAb SDOW17 de la nucleocápside del virus anti-PRRS marcado con FITC.

15 **[0089]** Figura B3 (corresponde a la Fig. 4B). Curvas de crecimiento de múltiples etapas del virus del PRRS en células ZMAC-1. Una suspensión de células ZMAC-1 a 1x10⁶/ml se infectó con una MOI de 0,02 con el aislado del virus del PRRS atenuado PrimePac. Después de una hora de incubación a 37 °C, el inóculo se retiró mediante centrifugación y las células se suspendieron en el medio a una concentración de 1x10⁶/ml. Se retiró 0,1 ml de alícuotas en los tiempos indicados después de la infección y se utilizó para determinar la presencia del virus infeccioso (TCID₅₀ en células MARC-145).

20 **[0090]** Objetivo 2. Determinar la inmunogenicidad y la eficacia de una vacuna del virus vivo modificado del PRRS producida en la línea celular macrófaga porcina ZMAC-1. La finalidad de este objetivo fue comparar los niveles de inmunidad protectora producida por la misma vacuna de MLV del PRRS, en este caso el virus del PRRS Prime Pac, producido en la línea celular ZMAC-1 o en la línea celular MARC-145.

25 **[0091]** Para probar la eficacia de la vacuna del virus del PRRS Prime Pac, que se preparó en células ZMAC-1 o en células MARC-145, se inmunizó a grupos de cerdos con un virus de vacuna derivado de una de las dos líneas celulares o se les hizo un tratamiento simulado. En el momento de la provocación, 4 semanas después de la inmunización, el peso corporal medio de los 18 cerdos del estudio fue 53,07 ± 3,90 kg (117±8,6 lb). Puesto que no se observaron diferencias significativas entre el peso corporal medio de los animales vacunados y no vacunados, la vacunación con el MLV propagado en células ZMAC-1 o en las células MARC-145 no tuvo un impacto evidente en el crecimiento de los animales. En cambio, a los 7 días después de la provocación con el aislado NADC-20 virulento, los cerdos no vacunados tuvieron una pérdida de peso corporal media de -2,26 ± 1,81 kg (-5±4 lb), mientras que los animales a los que no se les provocó el virus ganaron de media 8,93 ± 2,72 kg (19,7±6 lb) (Fig. 6). También se observó un aumento de peso corporal medio de 3,71± 2,35 y 4,21 ± 1,63 kg (8,2±5,2 y 9,3±3,6 lb), que no fue estadísticamente diferente entre sí, para los grupos que habían recibido previamente la vacuna del virus de MLV preparada en las células ZMAC-1 o en las células MARC-145, respectivamente. De esta manera, independientemente del tipo de célula utilizada para propagar el virus, la vacuna de MLV Prime Pac fue igualmente efectiva para reducir el efecto negativo de la exposición al virus del PRRS virulento en el crecimiento, como se demostró por la pérdida de peso corporal significativa de los cerdos sin tratamiento previo con el virus del PRRS que habían estado expuestos a un virus virulento heterólogo 7 días antes. Cabe señalar que, los análisis de la carga viral en las muestras de suero y lavado pulmonar de los animales inmunizados contra el virus del PRRS a los que se les provocó el virus revelaron que el virus de la vacuna desarrollado en las células ZMAC-1 fue significativamente (P=0,015) más efectivo para reducir la extensión de la viremia a los 7 días después de la provocación (Figura 7) y también para eliminar el virus virulento de sus pulmones a los 10 días después de la provocación (Figura 8).

30 **[0092]** Figura 6. Cambio de peso en cerdos después de la exposición al virus del PRRS natural. Los pesos corporales de los animales sin tratamiento previo con el virus del PRRS (n=3) e inmunizados (n=6 para cada tipo de vacuna generada mediante células) se midieron inmediatamente antes y a los 7 días después de la provocación con el aislado NADC-20 del virus del PRRS natural. También se realizaron mediciones en estos momentos para los animales sin tratamiento previo con el virus del PRRS a los que no se les provocó el virus (n=3). Se promediaron los cambios de peso durante el intervalo de 7 días para los miembros de cada grupo y se muestran estos valores ± el error estándar. Un asterisco (*) indica que la media del grupo es estadísticamente diferente (P<0,01) de los animales de control sin tratamiento previo con el virus del PRRS a los que se les provocó el virus. Se utilizan dos asteriscos (**) para indicar que la media del grupo es estadísticamente diferente (P<0,01) de los animales de control sin tratamiento previo con el virus del PRRS a los que no se les provocó el virus.

55 **[0093]** Figura 7. Extensión y frecuencia de viremia en cerdos después de la exposición al virus del PRRS natural. Se tomaron muestras de suero de animales sin tratamiento previo con el virus del PRRS e inmunizados inmediatamente antes de y en los días indicados después de la provocación con el aislado NADC-20 del virus del

PRRS natural. También se tomaron muestras en estos momentos para los animales sin tratamiento previo con el virus del PRRS a los que no se les provocó el virus. El nivel de carga viral en el suero se determinó realizando una titulación en las células MARC-145 y después se hizo el promedio. Los datos representan el nivel medio de viremia para cada grupo. La proporción al lado de los símbolos indica el número de cerdos virémicos (numerador) y el número total de cerdos por grupo (denominador).

[0094] Figura 8. Carga viral en el lavado broncoalveolar de cerdos después de la exposición al virus del PRRS natural. Se recogió el lavado broncoalveolar de los pulmones de los cerdos sin tratamiento previo con el virus del PRRS y previamente inmunizados a los 10 días después de la provocación con el aislado NADC-20 del virus del PRRS natural. También se obtuvieron muestras en este momento de animales sin tratamiento previo con el virus del PRRS a los que no se les provocó el virus. El nivel de carga viral en el lavado broncoalveolar de cada animal se determinó realizando una titulación en las células MARC-145.

Análisis

[0095] La observación de que la línea celular utilizada para desarrollar la misma cepa de la vacuna de MLV del PRRS puede mejorar el nivel de inmunidad protectora producida por este producto contra un virus del PRRS virulento genéticamente divergente tiene importantes implicaciones para desarrollar una vacuna altamente efectiva contra este patógeno. A saber, los resultados de este estudio sugieren que la eficacia de una vacuna del virus de MLV del PRRS no se determina solo, como se suele creer, por su similitud genética con respecto al virus de provocación, sino que también influye la manera en que se produce. Una interpretación razonable de las observaciones descritas anteriormente es que las propiedades biológicas del virus de la vacuna se modificaron de manera positiva simplemente desarrollándose en células ZMAC-1. Por consiguiente, se desarrolló una respuesta inmune protectora más efectiva en los animales vacunados. De esta manera, los resultados de este estudio demuestran que se puede crear una vacuna de MLV más efectiva contra el virus del PRRS.

Referencias para el Ejemplo 5

[0096]

Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S. 2001. *Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Vet Pathol. 38:528-39.

Hill, H., M. JA, K. JJ, H. A, y R. C. 2004. *PRRS Control: To Hell and Back*. American Assoc Swine Veterinarians, Des Moines, Iowa, EE.UU. Marzo 6-9, 2004:369-376.

Mengeling, W. L., K. M. Lager, y A. C. Vorwald. 1999. *Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome*. Am J Vet Res 60:796-801.

Mengeling, W. L., A. C. Vorwald, K. M. Lager, y S. L. Brockmeier. 1996. *Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure*. Am J Vet Res 57:834-9.

Osorio, F. A., F. Zuckermann, R. Wills, W. Meier, S. Christian, J. Galeota, y A. Doster. 1998. *PRRSV: comparison of commercial vaccines in their ability to induce protection against current PRRSV strains of high virulence*. Allen D. Lemman Swine Conference 25:176-182.

Kwon, B., Ansari, I.H., Osorio, F.A, Pattnaik, A.K. 2006. *Infectious clone-derived viruses from virulent and vaccine strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus mimic biological properties of their parental viruses in a pregnant sow model*. Vaccine. 24:7071-80.

Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A. 1998. *Determination of the specificity of CD45 and CD45R monoclonal antibodies through the use of transfected hamster cells producing individual porcine CD45 isoforms*. Vet Immunol Immunopathol. 60:389-401.

Zuckermann, F.A., Schnitzlein, W.M., Thacker, E., Sinkora, J., Haverson, K. 2001. *Characterization of monoclonal antibodies assigned to the CD45 subgroup of the Third International Swine CD Workshop*. Vet Immunol Immunopathol. 80:165-74.

Zuckermann, F.A, Alvarez Garcia, E., Diaz Luque, I., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M., Osorio, F. 2007. *Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge*. Vet Microbiol. 123:69-85.

EJEMPLO 6. Materiales celulares y desarrollo de las células

[0097] Materiales celulares. Se prepararon células designadas como ZMAC-1 y se depositaron en una autoridad internacional de depósito reconocida, la American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, Estados Unidos de América) de conformidad con el Tratado de Budapest. El número de acceso es el depósito de patente ATCC N.º PTA-8764 para células caracterizadas por ser de origen de tejido pulmonar *Sus scrofa* (cerdo/porcino). De acuerdo con el documento de certificado de depósito de la ATCC con fecha del 7 de diciembre de 2007, (Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes; Formulario internacional; Recibo en caso de depósito inicial emitido de conformidad con la regla 7.3 y Declaración de viabilidad emitida de conformidad con la regla 10.2), la fecha de recibo del cultivo es el 14 de noviembre de 2007 para la designación del depósito de patente ATCC® PTA-8764.

[0098] Desarrollo de las células. En modos de realización de la invención, se cultivan *in vitro* células tales como las células ZMAC-1. En general, se aplican los principios de cultivo de células de mamíferos. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en presencia de antibióticos; se utiliza gentamicina pero no se requiere necesariamente.

[0099] Las células se preparan como sigue (medio de cultivo: RPMI-1640 complementado con suero fetal bovino al 10 %, piruvato de sodio (1 mM; Mediatech Cellgro, Cat. N.º 25-000-C1), aminoácidos no esenciales (1 X; Mediatech Cellgro Cat. N.º 25-025-C1) y gentamicina (50 mcg/ml; Gibco, Cat. N.º 15750-060). Las células se mantuvieron a concentraciones celulares de aproximadamente 1 a 5 x 10⁵ por ml. Estas células se desarrollan generalmente en suspensión. Se pueden desarrollar colonias separadas de células de baja adherencia, pero la mayoría de las células se desarrollan en suspensión. Los cultivos normales producirán grupos de células flotantes. Para reducir la adherencia, el tipo preferido de matraz de cultivo es el matraz de cultivo de tejidos Sarstedt para células en suspensión con tapa con ventilación PE (Cat. No. 83.1813.502). Se pueden recoger los matraces establecidos cada 4-5 días con retirada de 2/3 del fluido y adición de medio de cultivo nuevo. Se establecen matraces nuevos añadiendo al menos 3-6 millones de células en un volumen de 20 ml en un matraz T25 (mínimo de 1,5 x 10⁵ células/ml). El desarrollo se puede mejorar añadiendo 2-10 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (ratón; producto Sigma-Aldrich N.º M9170). La congelación de las células se puede conseguir mezclando volúmenes iguales de suspensiones de células heladas a 4-8 millones de células por ml y medio de congelación helado (suero al 90 %, DMSO al 10 %). Se rellenan crioviales helados con las células suspendidas en medio de congelación y se mantiene a temperatura helada durante el proceso.

[0100] La Figura 9 ilustra el desarrollo de células ZMAC-1 en presencia de factores de crecimiento. Se cultivaron células ZMAC-1 a 1,2 x 10⁵ células por ml durante 8 días sin factor de crecimiento exógeno o en presencia de la concentración indicada de un factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF) o un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GMCSF). La concentración de células se determinó con la ayuda de un hemocitómetro al cuarto y octavo día de cultivo. El eje-y indica células/ml (x10⁵).

[0101] En un modo de realización, una célula de la invención se representa mediante una célula designada como ZMAC-1 o un depósito en la American Type Culture Collection designado como depósito de patente ATCC N.º PTA-8764 o un derivado del mismo.

EJEMPLO 7. Generación de materiales celulares y métodos de aislamiento a partir de muestras porcinas fetales.

[0102] Se desarrollaron composiciones y métodos adicionales. En un intento independiente, se derivaron materiales de una cerda con 60 días de gestación de una piara porcina de la granja de investigación de medicina veterinaria de la Universidad de Illinois (identificada como Cerda número 5850). Después de la eutanasia, se retiró el útero de manera aséptica de la cavidad abdominal y se transportó al laboratorio de cultivos celulares. Se realizaron manipulaciones en general utilizando una cabina de bioseguridad en condiciones de esterilidad. Se recogieron seis fetos de manera aséptica del útero y se colocaron en placas de Petri de plástico. Los órganos pulmonares, con la tráquea intacta y unida al pulmón, se diseccionaron del corazón, el esófago y otras membranas. La parte exterior del pulmón se enjuagó minuciosamente con una solución salina equilibrada estéril de Hank (HBSS, por sus siglas en inglés) para eliminar cualquier sangre visible y otros tejidos restantes contaminantes. Las células de las vías respiratorias de los pulmones de cada uno de los 6 fetos se aislaron por separado mediante lavado broncoalveolar colocando el pulmón en una placa de Petri limpia y estéril y rellenando las vías respiratorias con 10 ml de HBSS estéril. Los 10 ml de HBSS se propulsaron en el interior del pulmón con la ayuda de una jeringa de 10 cc y una aguja de 18 g de 2,54 cm (1 pulgada), que se insertó a través del lumen de la tráquea. El fluido se propulsó gradualmente a través de la tráquea mientras se realizó un estreñimiento mediante compresión con fórceps para evitar el reflujo del HBSS, provocando que los pulmones se volvieran visiblemente hinchados con el fluido. Después, el fluido que contenía las células del lavado pulmonar se autoexpulsó del pulmón simplemente liberando la compresión de la tráquea. La suspensión celular recogida en la placa de Petri se transfirió a un tubo de plástico cónico estéril de 15 ml, y se reforzó con 3-4 ml de Ficoll-Hypaque

1077 caliente. Inmediatamente después, se purificó la suspensión celular mediante centrifugación isopícnica (400 g durante 30 minutos a temperatura ambiente).

[0103] En un modo de realización, las células se pueden purificar mediante centrifugación isopícnica utilizando Ficoll-Hypaque 1077 el día del aislamiento o en un momento posterior, por ejemplo, 1, 2 o 3 semanas después. Se reconoce que este procedimiento de purificación puede facilitar la eliminación de ciertos componentes tales como, glóbulos rojos, y potencialmente otro material, presentes en una preparación original. El grupo de células obtenidas después de la centrifugación en la interfaz entre el Ficoll-Hypaque 1077 y el medio se recogió y se lavó con HBSS dos veces y las células se recuperaron cada vez mediante centrifugación. Después de la segunda centrifugación, el sedimento celular recuperado de cada lavado pulmonar fetal se suspendió en medio de cultivo: RPMI-1640 complementado con suero fetal bovino al 10 %, piruvato de sodio (1 mM; Mediatech Cellgro, Cat. N.º 25-000-C1), aminoácidos no esenciales (1X; Mediatech Cellgro Cat. N.º 25-025-C1), y se colocó de manera independiente en un pocillo de una placa de 6 pocillos (Sarstedt) para cultivo en suspensión. Cada pocillo se marcó del 1-6 para identificar las células purificadas de manera independiente de cada uno de los seis fetos. Aunque en este intento se recuperaron muy pocas células y muy pequeñas (<100) después del procedimiento de centrifugación isopícnica, a los 14 días posteriores al establecimiento de los cultivos iniciales, se observó un desarrollo significativo en cada pocillo. Puesto que las progenitoras de macrófagos recogidas del pulmón fetal eran aparentemente muy pequeñas y podrían tener una densidad mayor a 1,077 (yendo de esta manera a través del medio de densidad hacia al fondo del tubo durante la centrifugación isopícnica), en el caso del feto #1, el sedimento de glóbulos rojos obtenido después de la centrifugación isopícnica se recogió también y se colocó en cultivo y se marcó P1. En este caso, aunque el tipo celular predominante al inicio del cultivo consistió en glóbulos rojos, se observó un número pequeño de células mononucleares muy pequeñas. A los 16 y 24 días posteriores al inicio del cultivo, el desarrollo de las células derivadas del lavado pulmonar del feto #4 mostró un desarrollo suficiente para merecer la división en nuevos pocillos de una placa de 6 pocillos. Las células derivadas de este cultivo se denominaron ZMAC1107-4. De manera similar, el desarrollo en el pocillo marcado como P1, que se derivó del sedimento de glóbulos rojos, fue claramente evidente a los 36 días posteriores al inicio del cultivo y también se dividió en 2 pocillos. Las células derivadas de este cultivo se denominaron ZMAC1107-P1. El desarrollo de las células fue evidente por la presencia de grupos de células que constaban de 2, 4, 8, 16 o más células por grupo.

[0104] A los 37 días posteriores al inicio del cultivo de ZMAC1107-4, el medio de cultivo para esta línea celular se complementó en uno de los pocillos duplicados con 10 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (ratón; producto Sigma-Aldrich N.º M9170). Siete días después, resultó evidente que el desarrollo de las células ZMAC1107-4 había sido significativamente ayudado en esta etapa temprana de cultivo por la complementación exógena con el factor de crecimiento, y, a partir de entonces, el medio de todos los cultivos se complementó con MCSF a 5-10 ng/ml. Los cultivos se alimentaron cada 4-6 días eliminando mediante aspiración la mitad del volumen del cultivo celular y sustituyéndolo con medio nuevo complementado con el factor de crecimiento. El crecimiento sólido de ambas líneas ZMAC 1107-4 y ZMAC 1107-P1 fue evidente por la formación de colonias celulares que se desarrollaron en suspensión y poco unidas a la superficie de cultivo.

[0105] En otro intento independiente, se desarrollaron composiciones y métodos adicionales. Una cerda identificada como número 9093 con 54 días de gestación se obtuvo de la piara porcina de la granja de investigación de medicina veterinaria de la Universidad de Illinois. Después de la eutanasia, se retiró el útero de manera aséptica de la cavidad abdominal y se transportó al laboratorio de cultivos celulares. Todas las manipulaciones de este momento en adelante se realizaron dentro de una cabina de bioseguridad en condiciones de esterilidad. Se recogieron ocho fetos de manera aséptica del útero y se colocaron en placas de Petri de plástico y sus pulmones, con la tráquea intacta y unida al pulmón, se diseccionaron del corazón, el esófago y otras membranas. La parte exterior del pulmón se enjuagó minuciosamente con HBSS para eliminar cualquier sangre visible y otros tejidos restantes contaminantes. Las células de las vías respiratorias de los pulmones de cada uno de los ocho fetos se aislaron por separado mediante lavado broncoalveolar colocando el pulmón en una placa de Petri limpia y estéril y rellenando las vías respiratorias con 10 ml de solución salina equilibrada estéril de Hank (HBSS). Los 10 ml de HBSS se propulsaron en el interior del pulmón con la ayuda de una jeringa de 10 cc y una aguja de 18 g de 2,54 cm (1 pulgada), que se insertó a través del lumen de la tráquea. El fluido se propulsó gradualmente a través de la tráquea mientras se comprimía con fórceps para evitar el reflujo del HBSS, provocando que los pulmones se volvieran visiblemente hinchados con el fluido. Después, el fluido que contenía las células del lavado pulmonar se autoexpulsó del pulmón simplemente reduciendo la compresión de la tráquea. En algunos casos, el pulmón se presionó gradualmente con la punta roma de unas tijeras para ayudar a expulsar el fluido de lavado restante. La suspensión celular recogida en la placa de Petri se transfirió a un tubo de plástico cónico estéril de 15 ml, y se centrifugó durante 10 minutos a 1500 RPM en una centrifugadora clínica de mesa. El sedimento celular recuperado de cada lavado pulmonar fetal se suspendió en medio de cultivo: RPMI-1640 complementado con suero fetal bovino al 10 %, piruvato de sodio (1 mM; Mediatech Cellgro, Cat. N.º 25-000-C1), aminoácidos no esenciales (1X; Mediatech Cellgro Cat. N.º 25-025-C1), y se colocó de manera independiente en un pocillo de una placa de 6 pocillos (Sarstedt) para cultivo en suspensión. Cada pocillo se marcó del 1-8 para identificar las células purificadas de manera independiente de cada uno de los ocho fetos. Aproximadamente 10 000 células se colocaron inicialmente en cultivo procedentes de cada lavado

pulmonar fetal. El desarrollo en estos cultivos fue evidente a los 5 días. Grandes grupos de células fueron evidentes en los cultivos derivados de los fetos #1, 3, 6, 7 y 8.

[0106] A los 12 días posteriores al inicio del cultivo, las células no adherentes y de baja adherencia de los 8 cultivos celulares de lavado pulmonar fetal se recogieron pipeteando gradualmente y se purificaron mediante centrifugación isopícnica utilizando Ficoll-Hypaque 1077. Esto se consiguió transfiriendo la suspensión celular a un tubo de plástico cónico estéril de 15 ml, que se reforzó con 3-4 ml de Ficoll-Hypaque 1077 caliente y después se centrifugó a 400 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvo un grupo de células claramente visible después de la centrifugación en la interfaz entre el Ficoll-Hypaque 1077. El medio se recogió y se lavó con HBSS dos veces, y las células se recuperaron cada vez mediante centrifugación. Después de la segunda centrifugación, el sedimento celular recuperado de cada cultivo de lavado pulmonar fetal individual se suspendió en 3 ml de medio de cultivo: RPMI-1640 complementado con suero fetal bovino al 10 %, piruvato de sodio (1 mM; Mediatech Cellgro, Cat. N.º 25-000-C1), aminoácidos no esenciales (1X; Mediatech Cellgro Cat. N.º 25-025-C1), y se colocó de manera independiente en un pocillo de una placa de 6 pocillos (Sarstedt) para cultivo en suspensión y se marcó del 1-8, lo cual correspondía directamente al marcado original de los cultivos. Cinco días después, todos los cultivos celulares se alimentaron con 2 cc de medio de cultivo nuevo. Nueve días después, un desarrollo significativo de células en suspensión, así como células adherentes, fue evidente en cultivos derivados de los cultivos celulares de lavado pulmonar fetal con las marcas 3 y 6, que mostraron un número significativo de colonias de macrófagos que se desarrollaron en suspensión, así como macrófagos redondos poco adherentes. Se observaron varias células sincitiales esféricas grandes, rodeadas por pequeños macrófagos que formaban una estructura que aparecía como una corona celular. A los 26 días posteriores al inicio del cultivo, los cultivos celulares se alimentaron con medio nuevo complementado con 5 ng/ml de MCSF (ratón; producto Sigma-Aldrich N.º M9170). Cinco días después, un desarrollo sólido de las colonias de macrófagos celulares que se desarrollaban en suspensión, así como las poco adherentes en la superficie de la placa de cultivo, se observó en los cultivos derivados de los fetos #3, #6 y #8. Estas líneas se denominaron ZMAC1207-3, ZMAC1207-6 y ZMAC1207-8 respectivamente y se expandieron unos pocos días después transfiriéndolas a matraces T75 en medio de cultivo complementado con 5-10 ng/ml de MCSF.

DECLARACIONES SOBRE LA INCORPORACIÓN POR REFERENCIA Y VARIACIONES

[0107] En el caso de cualquier contradicción entre las referencias citadas y la exposición de la presente solicitud, la exposición del presente documento tiene prioridad. Algunas referencias proporcionadas en el presente documento se incorporan por referencia para proporcionar información, por ejemplo, detalles sobre fuentes de materiales iniciales, materiales iniciales adicionales, reactivos adicionales, métodos de síntesis adicionales, métodos de análisis adicionales, materiales biológicos adicionales, células adicionales y usos adicionales de la invención.

[0108] Todas las patentes y publicaciones mencionadas en el presente documento son indicativas de los niveles de experiencia de los expertos en la materia a la que pertenece la invención. Las referencias citadas en el presente documento pueden indicar el estado de la técnica a partir de su fecha de publicación o presentación, y se pretende que esta información se pueda emplear en el presente documento, en caso necesario, para excluir modos de realización específicos que sean de la técnica anterior. Por ejemplo, cuando se reivindica la composición de materia en el presente documento, debe entenderse que no se pretende que los compuestos conocidos y disponibles en la técnica anterior a la invención del solicitante, incluyendo los compuestos para los que se proporciona una exposición habilitante en las referencias citadas en el presente documento, se incluyan en las reivindicaciones de composición de materia del presente documento.

[0109] Cualquier apéndice o apéndices aquí presentes se incorporan por referencia como parte de la memoria y/o los dibujos.

[0110] Cuando los términos “comprenden”, “comprende”, “comprendido” o “que comprende” se utilizan en el presente documento, estos han de interpretarse como que especifican la presencia de las características, los números enteros, las etapas o los componentes establecidos a los que se hace referencia, pero no excluyen la presencia o la adición de otra u otras características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos. De esta manera, como se utiliza en el presente documento, comprender es sinónimo de incluir, contener, tener o caracterizarse por, y es inclusivo o abierto. Como se utiliza en el presente documento, “que consta de” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente, etc. no especificado en la descripción de la reivindicación. Como se utiliza en el presente documento, “que consta esencialmente de” no excluye materiales o etapas que no afectan materialmente las características básicas y nuevas de la reivindicación (por ejemplo, relacionadas con el principio activo). En cada caso del presente documento, cualquiera de los términos “que comprende”, “que consta esencialmente de” y “que consta de” se puede sustituir por cualquiera de los otros dos términos, describiendo de esta manera modos de realización y/o alcances distintos que no son necesariamente coextensivos. La invención descrita de manera ilustrativa en el presente documento se puede practicar de manera adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos o limitación o limitaciones no descritos específicamente en el presente documento.

[0111] Siempre que se expone un intervalo en el presente documento, por ejemplo, un intervalo de temperatura, un intervalo de tiempo, un intervalo de composición o concentración, u otro intervalo de valor, etc., se pretende que todos los intervalos y subintervalos intermedios, así como todos los valores individuales incluidos en los intervalos dados, se incluyan en la exposición. La presente invención no se ha de limitar por los modos de realización expuestos, incluyendo cualquiera mostrado en los dibujos o ejemplificado en la memoria, que se proporcionan a modo de ejemplo o ilustración y no de limitación. Se entenderá que cualquier subintervalo o valor individual en un intervalo o subintervalo que esté incluido en la descripción del presente documento se puede excluir de las reivindicaciones del presente documento.

[0112] La invención se ha descrito con referencia a varios modos de realización y técnicas específicos y/o preferidos. Resultará evidente para un experto en la materia que las composiciones, métodos, dispositivos, elementos de dispositivos, materiales, procedimientos y técnicas distintos a los descritos específicamente en el presente documento se pueden emplear en la práctica de la invención como se expone ampliamente en el presente documento sin recurrir a experimentación indebida; esto se puede extender, por ejemplo, a materiales iniciales, materiales biológicos, reactivos, métodos sintéticos, métodos de purificación, métodos analíticos, métodos de ensayo, y métodos biológicos distintos de los específicamente ejemplificados. Se pretende que todos los equivalentes funcionales de lo anterior conocidos en la técnica (por ejemplo, composiciones, métodos, dispositivos, elementos de dispositivos, materiales, procedimientos y técnicas, etc.) descritos en el presente documento estén abarcados por la presente invención. Los términos y las expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no existe intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. De esta manera, debe entenderse que, aunque la presente invención se ha expuesto de manera específica mediante modos de realización, modos de realización preferidos y características opcionales, los expertos en la materia pueden recurrir a la modificación y la variación de los conceptos expuestos en el presente documento, y que se considera que dichas modificaciones y variaciones están dentro del alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REFERENCIAS

[0113]

Patentes estadounidenses: US 5.510.258 publicada el 23/4/96 por Sanderson *et al.*; Patente estadounidense N.º 5.587.164 publicada el 24/12/96 por Sanderson *et al.*; US 5.476.778 por Chladek *et al.*, publicada el 19 de diciembre, 1995; US 6241990; US 6110468; US6042830 publicada el 28-03-2000; US 5989563 publicada el 23-11-1999; US 5846805; US6660513; US7081342; US6806086; US6500662; US6498008; US6455245; US6251404; US6197310; US 5583053; US 6210963; US 5840563; US 5925359 publicada el 20/7/1999; US 5.698.203 publicada el 16 de diciembre, 1997.

Publicación de solicitud de patente estadounidense N.º 20060063151; US20030219460A1 por David *et al.* (*Cotton rat lung cells for virus culture; cell line ATCC PTA-3930*); US 20050271685 por Calvert *et al.*

Publicación Internacional PCT N.º WO9835023A1 publicada el 13 de agosto, 1998; WO9855626A2 publicada el 10 de diciembre, 1998

EP0610250B1; US6033844

Delputte PL *et al.* *Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus.* Journal of Virology (2004), 78(15), 8094-8101

Wissink *et al.* *Identification of porcine alveolar macrophage glycoproteins involved in infection of porcine respiratory and reproductive syndrome virus.* Archives of Virology (2003), 148(1), 177-187

Weingartl HM, *et al.* *Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages. Partial characterization and virus susceptibility.* Journal of Virological Methods (2002), 104(2), 203-216

Delputte PL *et al.* *Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages.* Journal of Virology (2002), 76(9), 4312-4320

CHIOU, Ming-T *et al.*, *Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro.* Veterinary microbiology (2000), 71(1-2), 9-25

Opriessnig T *et al.*, J of Virology, Dic. 2002, pp. 11837-11844. *Comparison of Molecular and Biological Characteristics of a Modified Live Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Vaccine (Ingelvac PRRS MLV), the Parent Strain of the Vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and Two Recent Field Isolates of PRRSV.*

- Naviaux RK *et al.*, *Journal of Virology*, Ago. 1996, 70(8):pp. 5701-5705.
- Kim D, *et al.*, *Cell Biol Int.* 2005 Ago;29(8):638-46.
- Counter CM, *et al.*, 1998 *Oncogene* 16:1217-1222.
- 5 Zuckermann FA, Zsak L, Mettenleiter TC, Ben-Porat T. *Pseudorabies virus glycoprotein gIII is a major target antigen for murine and swine virus-specific cytotoxic T lymphocytes.* *J Virol.* 1990 Feb;64(2):802-12.
- Lowe JE *et al.*, 2005; *J Am Vet Med Assoc* 226:1707-11.
- Meier W *et al.*, 2000, *Vet Res.* 31:41.
- Meier WA *et al.*, 2003, *Viol.* 309:18-31.
- Meier WA *et al.*, 2004, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102:299-314.
- 10 Mengeling WL *et al.*, 1999, *Am J Vet Res* 60:796-801.
- Mengeling WL *et al.*, 1996, *Am J Vet Res* 57:834-9.
- Osorio FA, 1998, Allen D. *Leman Swine Conference* 25:176-182.
- Sanchez-Torres C *et al.*, 2003, *Arch Virol.* 148:2307-23.
- Sanchez C *et al.*, 1999, *J Immunol* 162:5230-7.
- 15 Neumann EJ *et al.*, 2005, *J Am Vet Med Assoc.* Ago 1 ;227(3):385-92
- Vincent AL *et al.*, *Viral Immunol.* 2005;18(3):506-12.
- Bautista EM *et al.*, *J Vet Diagn Invest.* 1993 Apr;5(2):163-5.
- Kwon B *et al.*, *Vaccine.* 30 Nov 2006;24(49-50):7071-80. Epub 21 Jul 2006.
- 20 Zhang R, Yang H, Li M, Yao Q, Chen C. *Acceleration of endothelial-like cell differentiation from CD14+ monocytes in vitro.* *Exp Hematol* 2005 33:1554-63
- Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG. *Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions.* *Cardiovasc Res.* 2001 Feb 16;49(3):671-80.
- Mayani y Lansdorp, *Blood.* 1 May 1994;83(9):2410-7.
- 25 Bridell *et al*, *Blood.* 15 Jun 1992;79(12):3159-67.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Célula macrófaga alveolar porcina fetal aislada capaz de reproducir el virus del PRRS, donde la célula es ZMAC-1, un depósito en la American Type Culture Collection designado como depósito de patente ATCC N.º PTA-8764 o un derivado del mismo, o una variante de célula inmortalizada o un derivado de dicha célula, donde dicha célula derivada de la misma, variante o derivado es capaz de reproducir el virus del PRRS.
- 2.** Método para generar progenie de un virus del PRRS que comprende:
- 10 a) proporcionar una célula macrófaga alveolar porcina fetal aislada o purificada capaz de replicar el virus del PRRS, donde dicha célula se cultiva durante al menos 5 pases, donde dicha célula se obtiene opcionalmente de un animal individual;
- b) exponer dicha célula a dicho virus del PRRS; y
- c) permitir que el virus del PRRS se replique en la célula;
- generando de esta manera progenie del virus del PRRS.
- 3.** Método para producir una vacuna contra el PRRS, que comprende proporcionar una cepa de virus vivo modificado (MLV) del PRRSV, y desarrollar dicha cepa de MLV en una célula macrófaga alveolar porcina fetal aislada o purificada capaz de replicar dicha cepa de MLV del PRRSV, donde dicha célula es una célula primaria, una población celular, una línea celular o una variante o un derivado de la misma y donde dicha célula o variante o derivado es capaz de reproducir el virus del PRRS.
- 15 **4.** Método de conformidad con la reivindicación 2 o 3, donde la célula está representada por la célula de conformidad con la reivindicación 1.
- 5.** Método para desarrollar un virus del PRRS, que comprende:
- 20 (a) aislar una célula macrófaga de un pulmón fetal porcino, donde dicho aislamiento comprende por etapas proporcionar un sujeto fetal porcino; obtener de dicho sujeto una muestra de lavado broncoalveolar que contenga células, y separar un componente celular de dicha muestra;
- (b) cultivar dicha célula; y
- 25 (c) poner en contacto dicha célula con dicho virus para permitir la replicación viral;
- desarrollando de esta manera el virus.
- 6.** Método de conformidad con la reivindicación 5, donde dicho cultivo comprende pasar dicha célula durante al menos 5 pases y/o desarrollar dicha célula durante al menos 10 días de cultivo continuo.
- 7.** Composición que comprende un virus del PRRS desarrollado en una célula macrófaga alveolar porcina fetal aislada capaz de reproducir el virus del PRRS, donde la célula se obtiene de un animal individual y se cultiva durante al menos 5, 10, 20 o 50 pases.
- 30 **8.** Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones de la 2 a la 6, que comprende además poner en contacto dicha célula con una composición de factor de crecimiento.
- 9.** Método de conformidad con la reivindicación 8, donde dicha composición de factor de crecimiento comprende un factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF) o un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GMCSF).
- 35 **10.** Vacuna producida a partir del desarrollo de un virus que es un virus del PRRS, una cepa de vacuna del virus del PRRS o un virus vivo modificado del PRRS en una célula del depósito de patente ATCC N.º PTA-8764 o una célula derivada del mismo, donde dicha célula o célula derivada del mismo es capaz de reproducir el virus del PRRS.
- 40 **11.** Composición de conformidad con la reivindicación 7, donde el virus del PRRS se desarrolla en la célula de conformidad con la reivindicación 1.

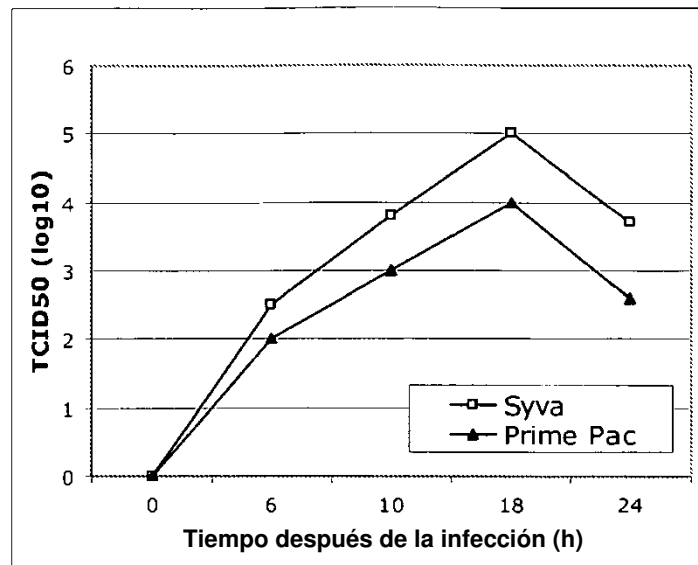


FIG. 1

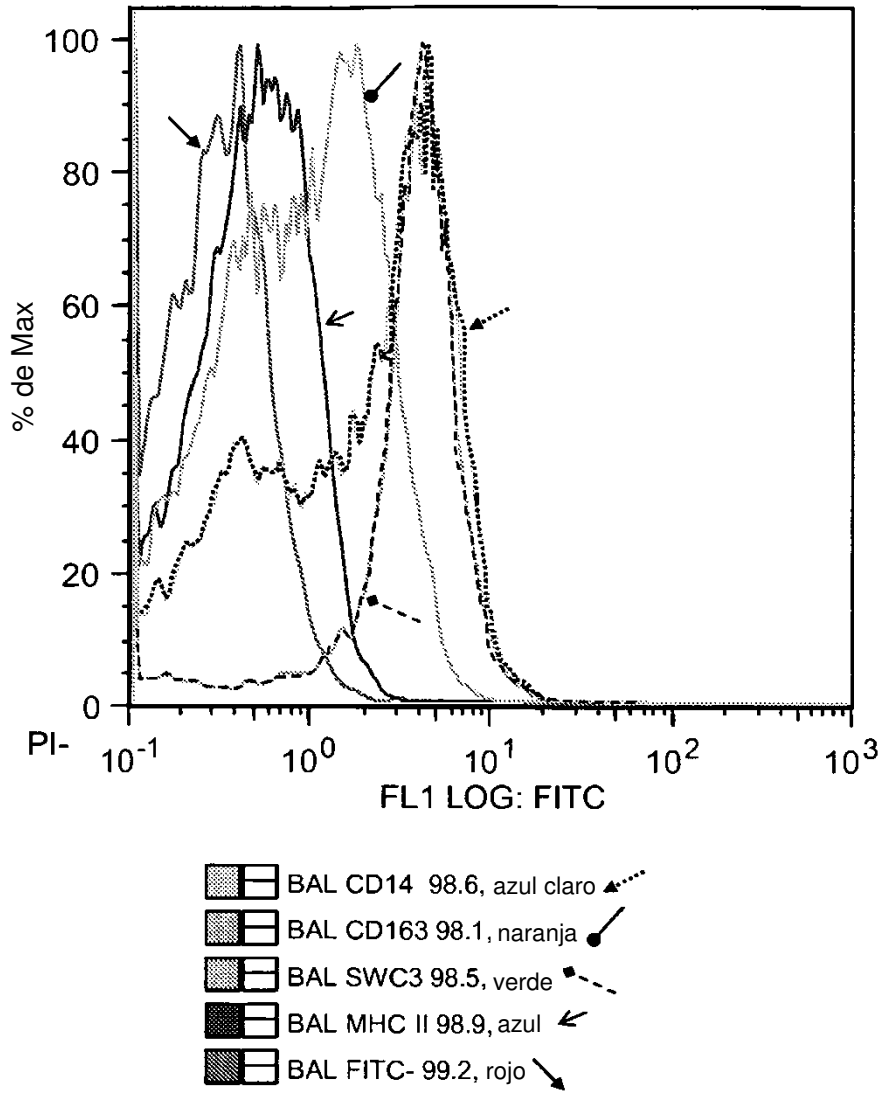


FIG. 2

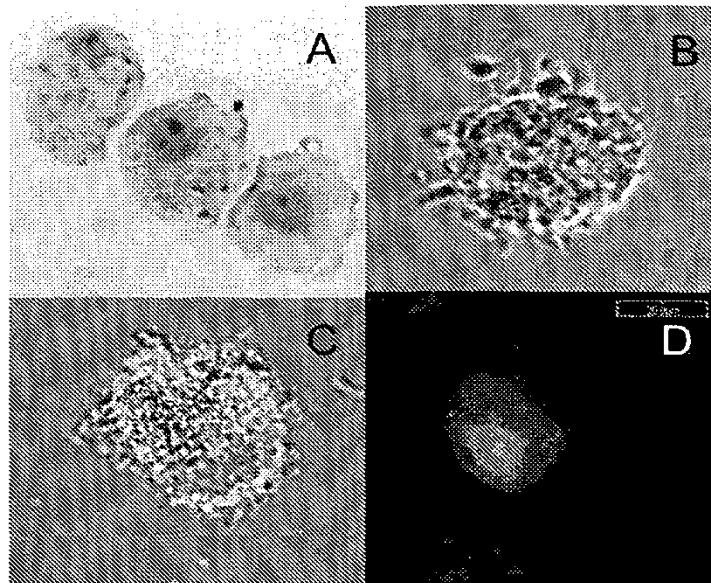


FIG. 3

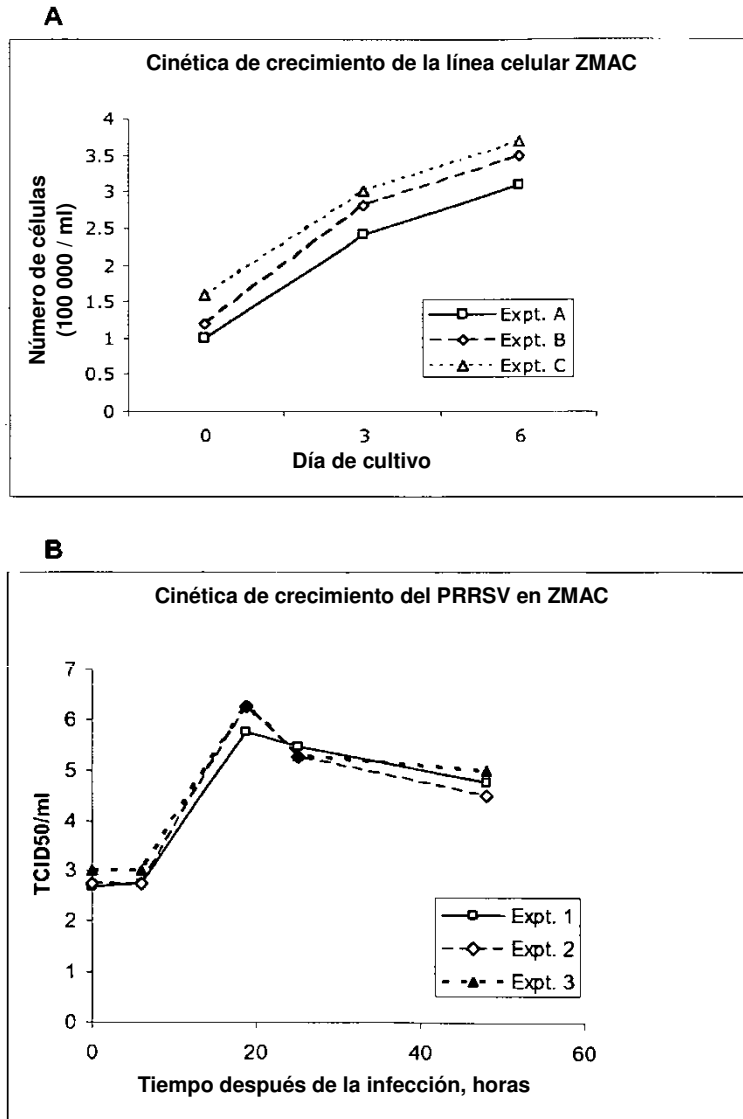


FIG. 4

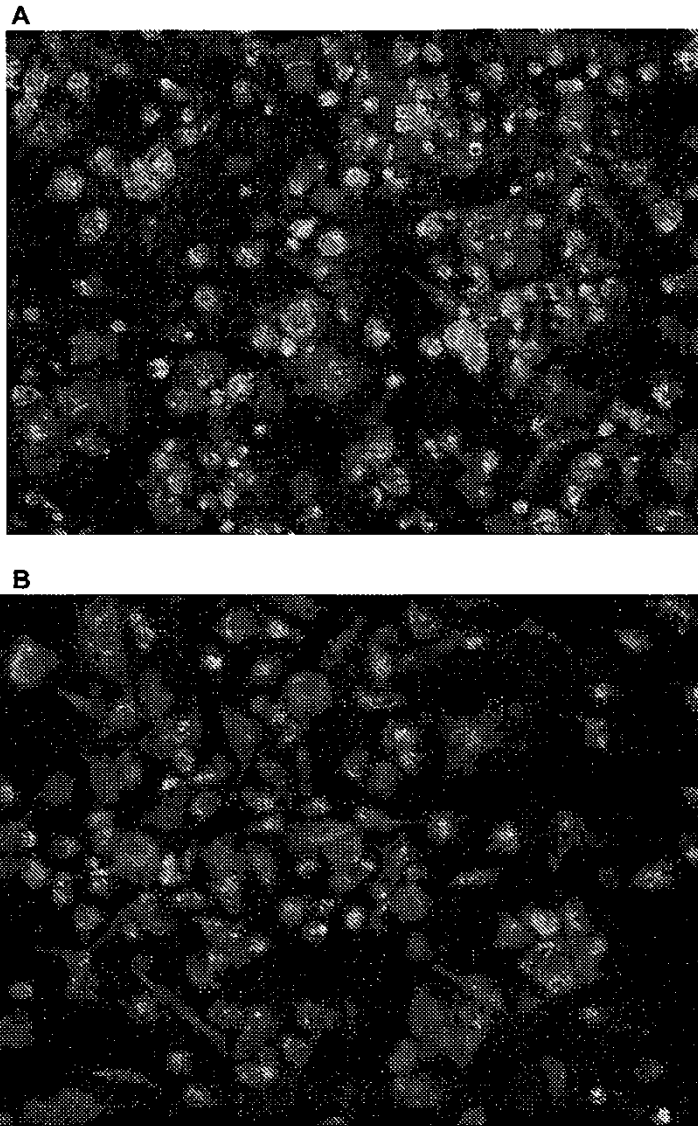


FIG. 5

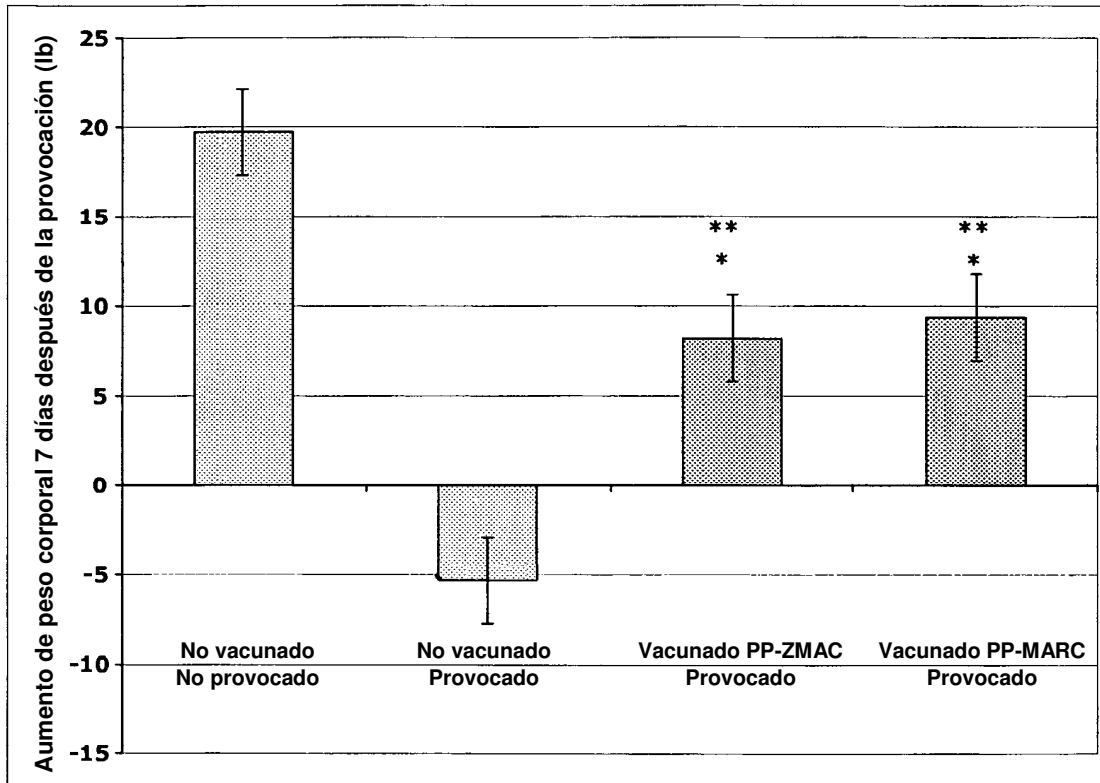


FIG. 6

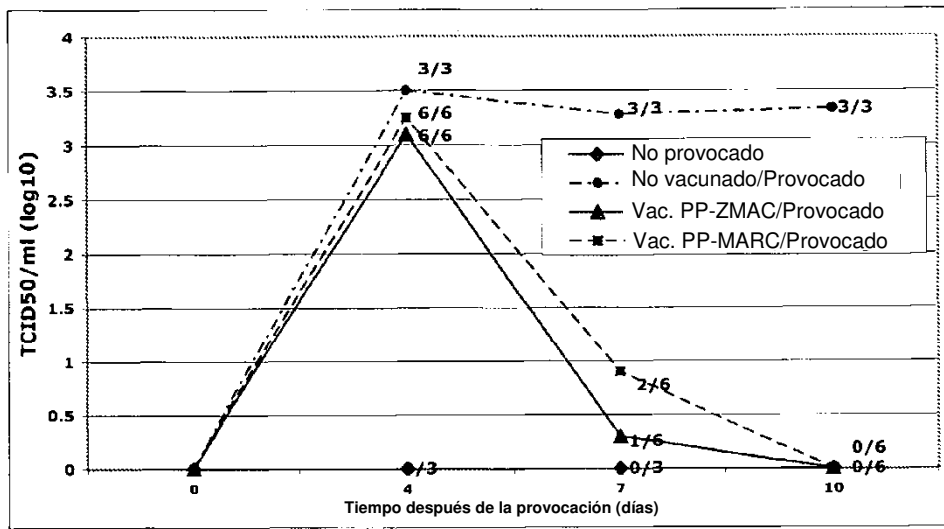


FIG. 7

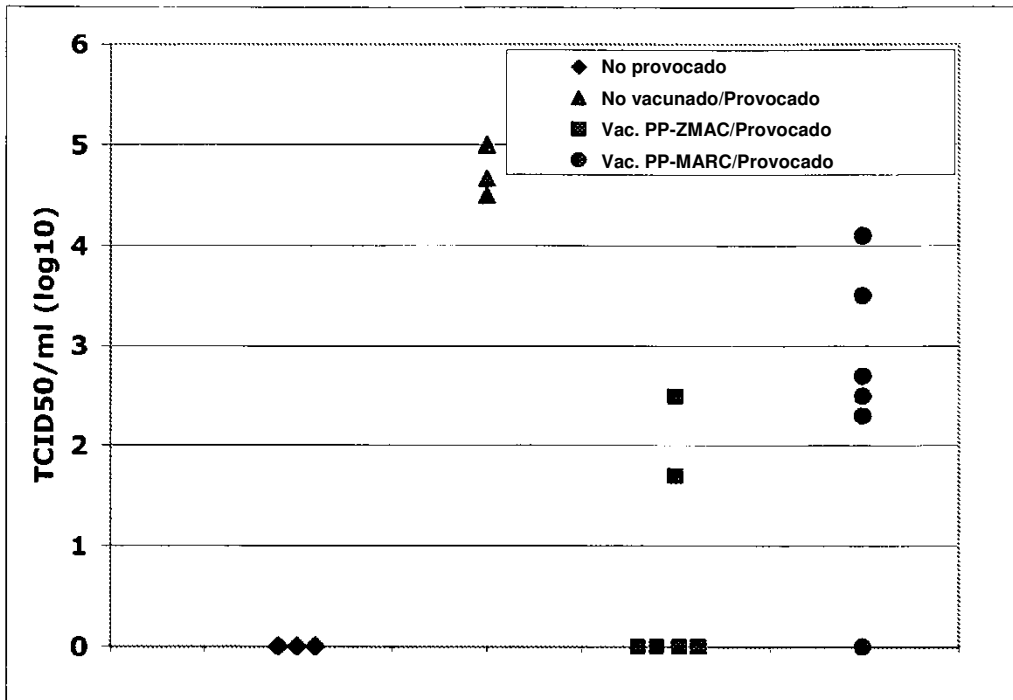


FIG. 8

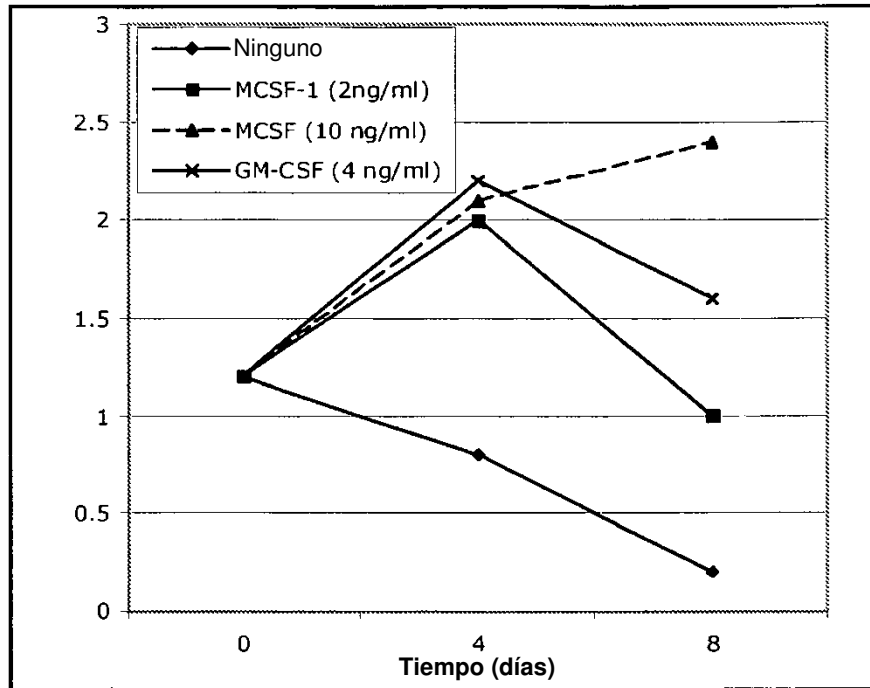


FIG. 9