

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 202**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2009** **E 09715326 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015** **EP 2257808**

54 Título: **Método para determinar la antigenicidad de un virus PRRSV inactivado**

30 Prioridad:

29.02.2008 GB 0803779

19.06.2008 GB 0811276

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

18.03.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE

72 Inventor/es:

DELPUTTE, PETER;
NAUWYNCK, HANS;
DELRUE, IRIS y
VANHEE, MERIJN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 564 202 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

Método para determinar la antigenicidad de un virus PRRSV inactivado

Campo del invento

5 El invento se refiere en términos generales al campo de la virología. Más particularmente, el presente invento se refiere a unos métodos para determinar el efecto de un proceso de inactivación viral sobre la antigenicidad del virus inactivado. En particular, para un virus que es un miembro de la familia de los Arteriviridae, en particular para el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (con el acrónimo PRRSV del término en inglés).

El invento proporciona además unos métodos para determinar la antigenicidad de un virus inactivado así como unos métodos para escrutar compuestos antivirales usando uno cualquiera de los métodos más arriba mencionados.

10 Antecedentes del invento

La "enfermedad misteriosa de los cerdos" surgió en las década de los 1980, y está presente desde entonces en la industria porcina causando un daño económico importante en todo el mundo (Neumann y colaboradores, 2005). El agente causante, que se designa como el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV), fue aislado por primera vez en los Países Bajos en 1991 y poco después dello en los Estados Unidos de América (EE.UU.). Él es un pequeño virus de ARN de hebras positivas envuelto, que ha sido clasificado en el orden de los *Nidovirales*, la familia de los *Arteriviridae*, y el género de los *Arterivirus*, conjuntamente con los virus de la arteritis equina, un virus que eleva a la lactato deshidrogenasa y un virus de la fiebre hemorrágica de los simios, basándose en una morfología, una organización genómica, una estrategia de replicación y una composición de proteínas similares. Por añadidura, él comparte un muy estrecho tropismo hacia los anfitriones y un marcado tropismo para células del linaje de macrófagos-monocitos (Plagemann & Moennig, 1992). Más específicamente, *in vivo*, el PRRSV infecta a unas subpoblaciones de macrófagos diferenciados, siendo los macrófagos alveolares unas células diana mayoritarias, aunque en verracos infectados se ha mostrado también que las células germinales testiculares permiten una replicación del PRRSV (Sur y colaboradores, 1997).

25 El PRRSV es reconocido mundialmente como la enfermedad viral de los cerdos más importante económicamente. El virus causa graves pérdidas de producción en las cerdas y una infección de los cerditos jóvenes está implicada en el complejo de enfermedades respiratorias porcinas (Rossow 1998). Los actuales tratamientos por vacunación están basados en unas vacunas de virus vivos modificados (con el acrónimo MLV del término en inglés) y unas vacunas de virus muertos (con el acrónimo KV), pero ninguno de estos métodos es plenamente satisfactorio en el tratamiento del PRRSV del término en inglés. Los MLV inducen una respuesta inmunitaria que protege contra una infección homóloga causada por el PRRSV, pero ellos no son plenamente seguros para el uso.

30 En primer lugar, los MLV pueden diseminarse en algunos casos por intermedio de la placenta y causan trastornos reproductivos en las cerdas (Dewey y colaboradores, 1999). En segundo lugar, los virus de vacunas se pueden derramar por intermedio del semen y reducen la calidad de este semen después de una vacunación (Nielsen y colaboradores, 1997). En tercer lugar, es posible que los virus de vacunas reviertan a virus virulentos (Nielsen y colaboradores 1997). Un problema final consiste en que el PRRSV es un virus de ARN que muestra una gran cantidad de variación genética (Meng 2000). Como una consecuencia de todo esto, las vacunas de MLV no siempre protegen suficientemente contra unas cepas de virus que son genéticamente diferentes con respecto de la cepa del virus de la vacuna (Meng 2000).

40 Las vacunas de virus muertos, también conocidas como vacunas de virus inactivados, son seguras y más fáciles de ajustar a los virus circulantes, pero las actuales vacunas existentes en el mercado no proporcionan una suficiente protección virológica contra el PRRSV. Nilubol y colaboradores, en 2004 examinaron el efecto de una vacuna de PRRSV muerta. Una primera observación consistió en que la magnitud y la duración de la viremia no eran diferentes entre los cerdos vacunados y los cerdos testigos. Una segunda observación consistió en que los títulos de anticuerpos neutralizadores de suero (con el acrónimo SN del término en inglés) eran más altos que los de los cerdos testigos.

45 La ineficiencia de las presentes vacunas de PRRSV inactivadas está relacionada parcialmente con el hecho de que actualmente no hay ningún control cualitativo del antígeno viral después de una inactivación, tal como se observa por ejemplo en el desarrollo de las vacunas de HIV (el virus de la inmunodeficiencia humana) y de influenza. Para unas vacunas de PRRSV inactivadas, se ensaya la cantidad de un antígeno, pero no la capacidad de dicho antígeno para inducir la producción de anticuerpos neutralizadores del PRRSV. Se mostró, en unos estudios anteriores, que unos anticuerpos neutralizadores del PRRSV bloquean una infección, bloqueando la interacción con el receptor de la internalización del PRRSV en las células dianas antes mencionadas (Delputte y colaboradores, 2004). Esto sugiere que unos epítopos neutralizadores se sitúan probablemente dentro de unos ligandos virales que están implicados en esta interacción. Correspondientemente, ha de esperarse que unos procesos de inactivación que solamente tienen una influencia sobre el genoma, serán los métodos más eficientes para inactivar al PRRSV al mismo tiempo que ellos preservan a los epítopos neutralizadores y, por lo tanto, serán los métodos más apropiados para desarrollar una vacuna de PRRSV muerto.

Un objetivo del presente invento es proporcionar los métodos para realizar el control cualitativo del virus inactivado.

Sumario del invento

El presente invento está basado en el hallazgo de que la antigenicidad de un virus inactivado, es decir un virus muerto que ha perdido la capacidad de replicarse en un anfitrión permisivo, puede ser determinada basándose en la capacidad de dicho virus inactivado para fijarse a e internalizarse dentro de una célula anfitriona apropiada.

Un requisito esencial para una vacuna que tiene como meta inducir una respuesta a anticuerpos Neutralizadores de Virus (con el acrónimo VN del término en inglés) es que unos epítopos para neutralizar anticuerpos estén presentes en el virus de vacuna. Por esta razón, el uso de un ensayo cualitativo para neutralizar epítopos en virus inactivados puede contribuir de gran manera al desarrollo de nuevas y efectivas vacunas de virus inactivados. Ha sido un objeto del presente invento proporcionar dicho ensayo cualitativo, es decir para la conservación de epítopos neutralizadores en un virus inactivado, y en particular en el desarrollo de vacunas de Arteriviridea o Nidovirales inactivadas; más particularmente en el desarrollo de vacunas de PRRSV inactivado.

Tal como se subraya con más detalle aquí seguidamente, el ensayo cualitativo del presente invento está basado en el conocimiento de que unos anticuerpos VN inhiben la replicación del PRRSV en macrófagos alveolares porcinos (con el acrónimo PAM del término en inglés), que es el tipo de célula anfitriona *in vivo* para el virus, bloqueando la conexión con y la internalización en la célula (Delputte P.L. y colaboradores, 2004). Por lo tanto, los dominios situados en la partícula de virus, que están implicados en una internalización, pueden contener epítopos neutralizadores. Si para un cierto método de inactivación la partícula del virus inactivado todavía puede internalizarse en unos PAM, se puede esperar que unos epítopos neutralizadores situados en el virus se hayan conservado, implicando que el método de inactivación es un buen candidato para el desarrollo de una efectiva vacuna de PRRSV. Mediante el uso de este ensayo cualitativo, se optimizaron dos procesos de inactivación para inactivar al PRRSV sin perjudicar a la capacidad de la partícula de virus para internalizarse en unos PAM, es decir el tratamiento con radiación ultravioleta (UV) y el tratamiento con etilenimina binaria (con el acrónimo BEI del término en inglés).

Se encontró, de manera sorprendente, que una vacunación con un PRRSV que ha sido inactivado de acuerdo con estos procesos, podría inducir una respuesta inmunitaria protectora en unos cerditos que son negativos para el PRRSV y daría como resultado una reducción de la viremia después de la infección, que es dependiente de anticuerpos, que era más fuerte que la inducida por una vacuna comercial del PRRSV inactivado.

Correspondientemente, un primer objetivo del presente invento es proporcionar un método *in vitro* para determinar la antigenicidad de un virus inactivado, comprendiendo dicho método:

- poner en contacto un célula anfitriona con el virus inactivado que se ha de ensayar; y
- determinar la fijación a y la internalización de dicho virus inactivado dentro de la célula anfitriona;
- en el que la capacidad de dicho virus inactivado para fijarse a y/o entrar en, la anfitriona es indicativa de la antigenicidad de dicho virus inactivado.

Tal como se usa en los métodos de acuerdo con el invento, el virus inactivado es un miembro de los Arteriviridea o Nidovirales; en particular un virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), y la célula anfitriona se selecciona entre el conjunto que se compone de macrófagos, monocitos, dendrocitos, granulocitos, células anfitrionas recombinantes y células de riñón de mono verde Africano.

En una forma de realización particular, el virus inactivado es el PRRSV y las células anfitrionas son unos macrófagos alveolares o unas células anfitrionas recombinantes tales como células de Ovario de Hámster Chino (con el acrónimo CHO del término en inglés) que han sido transfectadas para expresar la sialoadhesina de receptores específicos para el PRRSV, y CD163. Por lo tanto en una forma realización particular el presente invento proporciona un método *in vitro* para determinar la antigenicidad de un virus del PRRS inactivado, comprendiendo dicho método;

- poner en contacto unos macrófagos, en particular un cultivo celular de macrófagos, con el virus del PRRS inactivado que se ha de ensayar;
- determinar la fijación a y/o la internalización de dicho virus del PRRS inactivado dentro de dichos macrófagos;

en el que la capacidad de dicho virus del PRRS inactivado para fijarse a y/o entrar en dichos macrófagos, es indicativa de la antigenicidad de dicho virus del PRRS inactivado.

La fijación a y/o la internalización del virus inactivado en los métodos del invento, se determina usando unos métodos de visualización directa o indirecta.

Los métodos de visualización indirecta, como los que se usan en el presente contexto, se componen típicamente de un método inmunológico que comprende unos anticuerpos que son específicos para el virus inactivado. En una forma de realización, los anticuerpos son específicos para unas proteínas estructurales del virus inactivado, incluyendo por ejemplo unas glicoproteínas o proteínas de la cápside, que son específicas para el virus.

5 Tal como se establece con más detalle en los ejemplos dados aquí a continuación, en una forma de realización particular, la fijación a y/o la internalización de, el virus inactivado se determina usando un método inmunológico, que comprende unos anticuerpos que son específicos para por lo menos una proteína estructural de PRRSV seleccionada entre el conjunto que se compone de las proteínas virales, GP2a (ORF2a), E (ORF2b), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4), GP5 (ORF5), M (ORF6) y N (ORF7).

10 En otro aspecto adicional, el presente invento proporciona un método para determinar el efecto de un proceso de inactivación viral sobre la antigenicidad del virus inactivado que se ha obtenido de esta manera, comprendiendo dicho método:

- inactivar al virus con el proceso de inactivación que se ha de ensayar, y
- determinar la antigenicidad del virus inactivado que se ha obtenido de esta manera, usando un método

15 de acuerdo con el invento;

en el que un proceso capaz de inactivar al virus sin afectar a la capacidad del virus que ha sido inactivado de esta manera para fijarse a y/o entrar en el anfitrión, es indicativa de un proceso de inactivación que proporciona un virus inactivado, no afectado antigénicamente.

20 En todavía un aspecto adicional, el presente invento proporciona un método para identificar a unos compuestos antivirales, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula anfitriona tal como se proporciona en el presente contexto, con un compuesto que se ha de ensayar, en la presencia y la ausencia de un virus inactivado; y determinar la capacidad de dicho compuesto para prevenir o reducir la fijación a y/o la internalización de dicho virus inactivado en dicha anfitriona; en donde un compuesto capaz de prevenir o reducir la internalización de dicho virus inactivado se identifica como un compuesto antiviral.

25 En un aspecto final, el presente invento proporciona el uso de los métodos del presente invento para llegar a e identificar a unos procesos de inactivación que proporcionan unos virus inmunogénicos e inactivados, y el uso subsiguiente de los virus inmunogénicos e inactivados que se han obtenido de esta manera, en la producción de una vacuna; en particular en la producción de una vacuna destinada al tratamiento o la prevención de una infección causada por el PRRSV en un individuo.

30 Aunque no esté de acuerdo con el invento tal como se reivindica; el presente invento podría proporcionar una vacuna que comprenda un virus inmunogénico e inactivado que ha sido identificado usando los métodos de acuerdo con el invento.

Breve descripción de los dibujos

35 **Figura 1:** El efecto de diferentes métodos de inactivación sobre la inactivación del PRRSV. Un LV de tipo silvestre o un LV inactivado se tituló para determinar la presencia del virus infeccioso en las muestras.

Figura 2: El efecto de diferentes métodos de inactivación sobre la internalización del PRRSV. Unos macrófagos fueron inactivados con un LV de tipo silvestre o con un LV inactivado y a la 1 hpi se determinó la internalización de las partículas del PRRSV inactivado mediante una microscopía confocal.

40 **Figura 3A:** El efecto de diferentes métodos de inactivación sobre las proteínas del PRRSV. Un análisis por bórñ de transferencia Western de un LV de tipo silvestre o de un LV inactivado en circunstancias reductoras. El experimento se realizó dos veces.

Figura 3B: El efecto de diferentes métodos de inactivación sobre las proteínas del PRRSV. Un análisis por bórñ de transferencia Western de un LV de tipo silvestre o de un LV inactivado en circunstancias reductoras. El experimento se realizó dos veces.

45 **Figura 4:** El efecto del tratamiento con UV, con la BEI y la irradiación con rayos gamma sobre una internalización de PRRSV en células de CHO^{Sn} para determinar la ruta de internalización. Unas células de CHO o unas células de CHO que expresaban sialoadhesina (CHO^{Sn}) fueron incubadas con un LV de tipo silvestre o un LV inactivado por tratamiento con UV, con la BEI o por irradiación con rayos gamma y se investigó la internalización por medio de una microscopía confocal a la 1 hpi.

50 **Figura 5:** El efecto de diferentes métodos de inactivación sobre el ciclo de replicación viral. Unos macrófagos fueron incubados con un LV inactivado o un LV de tipo silvestre durante 0, 1, 5 o 10 h. por medio de una microscopía

confocal se midieron, a la 0 hpi la fijación, a la 1 hpi la internalización, a las 5 hpi la fusión y a las 10 hpi la replicación.

Figura 6: Internalización de un virus no inactivado, inactivado por tratamiento con UV e inactivado por la BEI en unos PAM. Unos PAM fueron incubados durante 1 h a 37°C en la presencia de un virus no inactivado (n.i.), inactivado por tratamiento con UV o inactivado por la BEI. Unas células fueron fijadas con metanol y unas partículas de un virus internalizado fueron visualizadas por medio de una tinción con inmunofluorescencia para la proteína de la nucleocápside del PRRSV. El número de partículas del virus internalizado se recontó en cinco células para cada condición y el número medio de partículas del virus internalizado por célula en la condición del testigo no inactivado se ajustó como 100 %. Las barras representan los porcentajes medios de internalización por célula en relación con la condición del testigo no inactivado y las barras de error representan el error típico de la media. No se podrían detectar diferencias significativas entre las diferentes condiciones.

Figura 7: Títulos de anticuerpos específicos para el PRRSV después de una vacunación para el grupo A (testigo con adyuvante), B (vacuna inactivada comercial), C (virus inactivado por tratamiento con UV) y D (virus inactivado con la BEI). Los títulos de anticuerpos específicos para el PRRSV (en log₂) en un suero fueron determinados por medio de IPMA en diferentes momentos de tiempo después de una primovacuna (①), una vacunación de refuerzo (②) y un desafío (↑). Los símbolos representan a unos animales individuales y las líneas representan a unos títulos medios de IPMA para cada grupo. La línea de puntos indica el límite de detección para el IPMA.

Figura 8: Títulos de anticuerpos específicos para el PRRSV después de un desafío para el grupo A (testigo con adyuvante), B (vacuna inactivada comercial), C (virus inactivado por tratamiento con UV) y D (virus inactivado con la BEI). Los títulos de anticuerpos específicos para el PRRSV (en log₂) en un suero fueron determinados con un ensayo de SN en diferentes momentos de tiempo después del desafío (↑). Los símbolos representan a unos animales individuales y las líneas representan a unos títulos medios de anticuerpos SN para cada grupo. La línea de puntos indica el límite de detección para el ensayo de SN.

Figura 9: Títulos de virus en suero después de un desafío para el grupo A (testigo con adyuvante), B (vacuna inactivada comercial), C (virus inactivado por tratamiento con UV) y D (virus inactivado con la BEI). Los títulos de virus en suero (en log₁₀ TCID₅₀/ml) fueron determinados en diferentes momentos de tiempo después del desafío (↑) mediante una titulación de los virus en PAM, seguido por una tinción con inmunoperoxidasa para la proteína de la nucleocápside del PRRSV. Los símbolos representan animales individuales y las líneas representan títulos medios de virus en cada grupo. La línea de puntos indica el límite de detección para la titulación del virus.

Descripción del invento

Tal como ya se ha mencionado aquí con anterioridad, un objetivo del presente invento es el de proporcionar unos métodos *in vitro* que permitan el control cualitativo de la antigenicidad de unos virus inactivados.

La antigenicidad de un virus inactivado, tal como se usa en el presente contexto, se refiere a la capacidad de dicho virus inactivado para inducir una respuesta inmunitaria específica para el virus en un sujeto expuesto / inoculado / inyectado / inmunizado con él. Puesto que es un objeto del presente invento proporcionar un método *in vitro* para controlar la calidad de unas vacunas de virus inactivados, la respuesta inmunitaria inducida por el virus inactivado debería ser preferiblemente una respuesta inmunitaria protectora para el sujeto después de la infección con el correspondiente virus activo, es decir que el virus inactivado debería inducir la producción de anticuerpos neutralizadores que bloqueasen la replicación de los virus en un sujeto infectado con ellos. Dichos anticuerpos neutralizadores, inducidos por el virus inactivado, previenen la fijación o la fijación junto con la internalización de los virus para las células anfitrionas naturales.

Los métodos del invento son particularmente útiles para un virus que es un miembro de la familia de las Arteriviridae, en particular para el Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV). En esta forma de realización, las células anfitrionas naturales se componen de unas células que se identifican como permisivas, es decir unas células que soportan la replicación de dichos virus, en particular del PRRSV. En una forma de realización, dichas células se componen de las conocidas subpoblaciones de células diferenciadas del linaje de monocitos/macrófagos, en particular de los macrófagos alveolares que son las células dianas primarias de un virus que es un miembro de la familia de las Arteriviridae, en particular una infección causada por el PRRSV.

Por lo tanto, en una forma particular de realización, el presente invento proporciona un método *in vitro* para determinar la antigenicidad de un virus del PRRS inactivado, comprendiendo dicho método;

- poner en contacto unas células anfitrionas permisivas para el PRRSV, con el virus del PRRS inactivado que se ha de ensayar; y
- determinar la fijación a y/o la internalización de dicho virus del PRRS inactivado en las células anfitrionas permisivas para PRRSV;

en el que la capacidad de los virus del PRRS inactivado para fijarse a y entrar en las células anfitrionas permisivas para el PRRSV, es indicativa de la antigenicidad de dicho virus del PRRSV inactivado.

En un aspecto adicional de esta forma de realización, las células anfitrionas permisivas para el PRRSV se seleccionan entre el conjunto que se compone de: macrófagos; macrófagos alveolares; y unas células tales como células de los testículos de cerdos (ST), células de riñones de cerdos (p.ej. PK15 (CCL-33), SK-RST(CRL-2842)), cultivos de células epiteliales, queratinocitos cutáneos (p.ej. HEK001 (CRL-2404), CCD1102 (CRL-2310)), células Vero (CCL-81), fibroblastos de pulmones fetales humanos (p.ej. HFL1 (CCL-153)), células de pulmones embrionarios humanos (p.ej. HEL299 (CCL-137)), células de ovarios de hámster chinos (CHO) o células de riñones embrionarios humanos (HEK) que expresan sialoadhesina y opcionalmente CD163.

En otro objetivo del presente invento, las células anfitrionas permisivas para el PRRSV, tal como se usan en los métodos del presente invento, se componen de unas células que expresan por lo menos una de las sustancias CD163 y sialoadhesina, incluyendo unas células anfitrionas recombinantes (tales como unas células transfectadas con un ADN exógeno usando unos procesos conocidos en la especialidad, para proporcionar la expresión de CD163 y/o sialoadhesina), expresar CD163 y/o la sialoadhesina, así como unas células a las que se hace expresar CD163 y/o sialoadhesina por un tratamiento exógeno con unos métodos que son conocidos por inducir la expresión de CD163 y/o sialoadhesina en dichas células.

Por ejemplo, la expresión de CD163 puede ser inducida por medio de un tratamiento químico. Los ésteres de forbol, especialmente el miristil acetato de forbol (PMA), activan a una o más isozimas del receptor de membrana ubicuo, la proteína cinasa C (PKC) y son unos medios particularmente preferidos para aumentar la expresión de CD163. Se consideran también otros métodos para la movilización del calcio intracelular.

Acerca de la sialoadhesina, se ha informado de que el interferón alfa (IFN- α) aumenta y es capaz incluso de inducir la expresión de sialoadhesina en el linaje de células de monocitos-macrófagos. Así, el tratamiento con el IFN- α es un medio alternativo de aumentar / inducir la expresión de sialoadhesina en una célula.

Como se estipula en los ejemplos dados a continuación, en una forma particular de realización, las células anfitrionas permisivas para el PRRSV son un cultivo de macrófagos alveolares o de células anfitrionas recombinantes, es decir unas células de CHO que expresan sialoadhesina; alternativamente unas células de CHO que expresan sialoadhesina y CD163. En una forma de realización, las células anfitrionas permisivas para el PRRSV se componen de una de las células de CHO que expresan sialoadhesina y CD163 que han sido depositadas el 14 de Mayo de 2008 en las Colecciones Coordinadas Belgas de Microorganismos como CHO^{S_n/CD163} IC5; CHO^{S_n/CD163} ID9 y CHO^{S_n/CD163} IF3 con los respectivos números de acceso LMBP 6677CB; LMBP 6678CB y LMBP 66779 CB respectivamente.

Unos métodos para obtener los virus muertos, es decir inactivados, que se usan en los métodos más arriba mencionados son conocidos por un profesional experto e incluyen, por ejemplo, un tratamiento de los virus cosechados con formalina, beta propiolactona (BPL), etilenimina binaria (BEI), o una irradiación con rayos gamma.

La inactivación por formalina se realiza mezclando la suspensión viral con formaldehído al 37 % hasta llegar a una concentración final de formaldehído de 0,05 %. La mezcla de virus y formaldehído es mezclada por agitación constante durante aproximadamente 4 horas a una temperatura de 37°C. El formaldehído es retirado después de esto desde la muestra de virus mediante una ultracentrifugación. La mezcla del virus inactivado es luego ensayada para detectar la existencia de virus vivos residuales investigando para detectar el crecimiento en un linaje celular apropiado.

La inactivación por la BEI se realiza mezclando la suspensión viral del presente invento con BEI 0,1 M (2-bromo-etilamina en NaOH 0,175 N) hasta llegar a una concentración final de BEI de 1 mM. La mezcla de virus y BEI es mezclada por agitación constante durante aproximadamente 24 horas a 37°C, lo que es seguido por la adición de tiosulfato de sodio 1,0 M hasta llegar a una concentración final de 0,1 mM. La mezcladura se continúa durante dos horas adicionales. La mezcla del virus inactivado es ensayada para detectar virus vivos residuales investigando para detectar el crecimiento en un linaje celular apropiado.

Por sí mismos, los métodos de inactivación no son un objetivo del presente invento, pero usando los métodos del presente invento se ha hecho posible ahora identificar el método de inactivación para un virus, que da como resultado un virus inactivado que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica para el virus en un sujeto inmunizado con él.

Ensayo de escrutinio y aplicación terapéutica

Por lo tanto, en un objetivo adicional, el presente invento estipula el uso de uno cualquiera de los métodos más arriba mencionados para determinar el efecto de un proceso de inactivación viral sobre la antigenicidad del virus inactivado que se ha obtenido de esta manera, así como el uso de dicho virus inactivado en la producción de una

vacuna. En particular, una vacuna que comprende una cepa de PRRSV inactivada que se ha obtenido por medio de los métodos del invento. La vacuna inactivada es producida por unos métodos bien conocidos en la especialidad.

El virus inactivado es mezclado típicamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina y, opcionalmente un adyuvante. Unos ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, el hidróxido de aluminio, unas emulsiones de los tipos de aceite en agua y de agua en aceite, AMPHIGEN, unas saponinas tales como QuilA, y unos adyuvantes polipeptídicos que incluyen interleucinas, interferones y otras citocinas.

Aunque no es de acuerdo con el invento tal como se reivindica, una vacuna se podría usar de acuerdo con el invento ventajosamente proporcionada en una formulación apropiada. Son preferidas tales formulaciones con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esto comprende, p.ej., sustancias auxiliares, tampones, sales y agentes conservantes.

Basándose en lo dicho anteriormente, aunque no es de acuerdo con el invento tal como se reivindica es también posible usar el presente invento para proporcionar unos métodos (y un ensayo *in vitro*) para identificar unos compuestos antivirales, comprendiendo dicho método: aplicar los métodos de acuerdo con el invento en la presencia y en la ausencia del compuesto que se ha de ensayar, y determinar si dicho compuesto es capaz de prevenir y/o reducir la fijación y/o la internalización del virus inactivado en las células anfitrionas que se usan.

En una forma particular de realización, el presente invento podría estipular un método para identificar unos compuestos antivirales que sean capaces de prevenir y/o reducir la fijación y/o la internalización de un virus del PRRS inactivado, comprendiendo dicho método,

- poner en contacto una célula anfitriona permisiva para el PRRSV, tal como se proporciona en el presente contexto, con un virus del PRRS inactivado, en la presencia y en la ausencia del compuesto que se ha de ensayar; y
- determinar la capacidad de dicho compuesto para prevenir y/o reducir la fijación y/o la internalización del virus del PRRS inactivado en las células anfitrionas permisivas para el PRRSV: en donde un compuesto capaz de prevenir y/o reducir la fijación y/o la internalización de dicho virus del PRRS inactivado en dicha anfitriona permisiva para el PRRSV es identificado como un compuesto antiviral, en particular como un compuesto anti-PRRSV.

El concepto de "compuestos", tal como se usa en el presente contexto, incluye, pero no se limita a: unas pequeñas moléculas que incluyen unas moléculas tanto orgánicas como inorgánicas con un peso molecular de menos que 2.000 Daltons; unas proteínas; unos péptidos; unos oligonucleótidos antisentido; unos siRNAs; unos anticuerpos, incluyendo unos anticuerpos tanto policlonales como monoclonales; unas ribozimas; etc.

En otro aspecto, este invento incluye unas composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos que se han identificado usando los métodos del presente invento.

Las composiciones farmacéuticas del presente invento se pueden preparar por cualquier método conocido o eficaz de otro modo para formular o producir la forma de producto seleccionada. Unos métodos para preparar las composiciones farmacéuticas de acuerdo con el presente invento se pueden encontrar en la obra de "Remington's Pharmaceutical Sciences" [Ciencias farmacéuticas de Remington], Mid.Publishing Co., Easton, Pa., EE.UU.

Por ejemplo, los compuestos se pueden formular juntamente con unos excipientes, diluyentes o vehículos corrientes y se pueden conformar a la forma de tabletas orales, cápsulas, formulaciones para pulverización, enjuagues bucales, pastillas rómbicas, substratos tratados (p.ej., unas esponjas de hilas orales o tópicas, unas almohadillas, o un substrato no digestible desechable que ha sido tratado con las composiciones del presente invento); unos productos líquidos orales (p.ej. unas suspensiones, unas soluciones o unas emulsiones), unos polvos, o cualquier otra apropiada forma de dosificación.

Unos ejemplos no limitativos de apropiados excipientes, diluyentes y vehículos se pueden encontrar en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients" [Manual de excipientes farmacéuticos], Segunda Edición, American Pharmaceutical Association, 1994, e incluyen: unos materiales de carga y de relleno y unos agentes extendedores tales como un almidón, unos azúcares, el manitol y unos derivados silícicos; unos agentes aglutinantes tales como una carboximetil celulosa y otros derivados de celulosa, unos alginatos, una gelatina, y una poli(vinil pirrolidona); unos agentes hidratantes tales como el glicerol; unos agentes desintegrantes tales como el carbonato y el bicarbonato de sodio; unos agentes para retardar la disolución tales como una parafina; unos agentes aceleradores de la resorción tales como unos compuestos de amonio cuaternarios; unos agentes activos superficialmente o tensioactivos, tales como el alcohol acetílico, el monoestearato de glicerol; unos agentes adsorbentes, tales como un caolín y una bentonita; unos vehículos tales como el propilen glicol y el alcohol etílico, y unos agentes lubricantes tales como un talco, el calcio y el estearato de magnesio, y unos poli(etilen glicoles) sólidos.

Fijación y/o internalización

En uno cualquiera de los métodos de acuerdo con el invento, la antigenicidad del virus inactivado es evaluada determinando la fijación y/o internalización de dicho virus inactivado en la célula anfitriona.

- En principio, se puede usar en los métodos del invento cualquier técnica de visualización que permita una visualización de partículas virales. Estas técnicas son conocidas por una persona experta en la especialidad e incluyen, por ejemplo, unas herramientas de visualización directa, tales como una microscopía electrónica o el uso de unos virus marcados de una manera detectable; así como unas herramientas de visualización indirecta, tales como unos métodos inmunológicos, que comprenden unos anticuerpos que son específicos para el virus.
- Tal como se estipula con más detalle en los ejemplos dados a continuación, en una forma particular de realización del presente invento, el método inmunológico está basado en la aplicación de unos anticuerpos que son específicos para las proteínas estructurales del virus, es decir unas glicoproteínas o unas proteínas de la cápside del virus.
- En el caso del PRRSV, las proteínas estructurales se seleccionan entre el conjunto que se compone de GP2a (ORF2a), E (ORF2b), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4), GP5 (ORF5), M (ORF6) y N (ORF7). Unos anticuerpos particulares en los métodos inmunológicos del invento se estipulan en los ejemplos dados a continuación e incluyen unos anticuerpos monoclonales de ratón primarios contra una de las proteínas de LV; M (126.3) (Meulenberg y colaboradores 1995), N (P3/27) (Wieczorek-Krohmer y colaboradores 1996), GP5 (4BE12) (Rodríguez y colaboradores 2001), GP4 (122.29) (Meulenberg y colaboradores 1997), GP3 (P9A3-20) (Intervet) o unos anticuerpos policlonales de ratón contra las proteínas más arriba mencionadas.
- Los ensayos inmunológicos para la detección de las proteínas estructurales virales comprenderán de manera típica:
- poner en contacto una muestra que ha estado en contacto con el virus, tal como por ejemplo unas células recientemente cosechadas, o unos materiales lisados de células que han sido incubados en un cultivo celular, ii) en la presencia de un anticuerpo que se fija de una manera específica o selectiva a dicha proteína estructural viral, p.ej. un anticuerpo marcado de una manera detectable, que es capaz de identificar a una proteína estructural del virus del PRRS, seleccionada entre GP2a (ORF2a), E (ORF2b), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4), GP5 (ORF5), M (ORF6) y N (ORF7), iii) y detectar el anticuerpo fijado por medio de una cualquiera de un cierto número de técnicas bien conocidas en la especialidad (p.ej. un borrón de transferencia Western, un ELISA o un FACS). Alternativamente la fijación de los anticuerpos específicos virales es determinada usando un anticuerpo marcado secundario, tal como un anticuerpo entero que es específico para una especie biotinilada con Ig anti-ratón de cordero en donde el anticuerpo primario es un anticuerpo monoclonal o policlonal de ratón que es específico para una de las proteínas estructurales virales.
- Los anticuerpos que se usan en los diferentes métodos del presente invento pueden ser marcados de una manera detectable, engarzando los mismos a una enzima y usando el anticuerpo marcado en un ensayo inmunológico con enzimas (EIA) (véase Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" [El ensayo de un inmunosorbente enlazado a una enzima], 1978, Diagnostic Horizons 2: 1, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD) ; Voller, A. y colaboradores, 1978, J. Clin. Pathol. 31: 507-520; Butler, J. E., 1981, Meth.E4Zy7n01. 73: 482; Maggio, E. (ed.), 1980, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL; Ishikawa, E. y colaboradores, (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay, Kaku Shoin, Tokio). La enzima que está fijada al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, preferiblemente el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina, la ficocianina, la alofocianina, el o-ftaldehído y la fluorescamina.
- El anticuerpo puede también ser marcado detectablemente usando unos metales que emiten fluorescencia tales como el ¹⁵²Eu, u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales son fijados a un anticuerpo usando unos grupos quelantes de metales tales como el ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) o el ácido etilendiaminatetraacético (EDTA). Los fluorocromos típicamente usados son la Fluoresceína, el Rojo de Texas u otros fluorocromos tales como los de la serie Alexa Fluor.
- El anticuerpo puede también ser marcado detectablemente acoplándolo con un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado con un compuesto quimioluminiscente se detecta por una luminiscencia que surge en el curso de una reacción química. Ejemplos de unos compuestos marcadores quimioluminiscentes particularmente útiles son el luminol, el isoluminol, un éster de acridinio teromático, el imidazol, una sal de acridinio o un éster oxalato.
- De manera similar, un compuesto bioluminiscente se puede usar para marcar el anticuerpo del presente invento. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que es encontrada en unos sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficiencia de una reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente es determinada detectando una luminiscencia. Unos importantes compuestos bioluminiscentes para las finalidades de marcación son la luciferina, la luciferasa y la aequorina.

Cuando se consideran la fijación y/o la internalización de los virus inactivados, aparecen dos posibles formas de realización del presente invento.

5 En una primera forma de realización, o bien se sabe poca cosa acerca de las moléculas implicadas en la primera etapa del ciclo viral, es decir la fijación y la internalización del virus en su célula anfitriona, o ha de esperarse una compleja interacción del virus con las células anfitrionas. Esto último sucede típicamente cuando se usan las células anfitrionas naturales en los métodos del presente invento, tales como por ejemplo el de usar unos macrófagos alveolares porcinos con el PRRSV inactivado, para lo que es conocido que una pluralidad de receptores de macrófagos, decir sialoadhesina, sulfato de heparano y CD163, se implican en una infección causada por el PRRSV (Delputte PL, Costers S, Nauwynck HJ. (2005) J Gen Virol. 86(Pt 5):1441-5).

10 En dicha forma de realización, la antigenicidad del virus inactivado se determina midiendo tanto la fijación como la internalización de dicho virus inactivado, usando uno cualquiera de los métodos que se han mencionado más arriba.

15 En una segunda forma de realización, hay una información específica acerca de las moléculas que están implicadas en la primera etapa del ciclo viral, es decir la fijación y la internalización del virus en su célula anfitriona. En dicho caso, se pueden usar unas células anfitrionas recombinantes que expresan por lo menos una de dichas moléculas en lugar de ella y en principio es suficiente determinar la fijación del virus inactivado a dichas células anfitrionas recombinantes.

20 Las células anfitrionas usadas típicamente en esta segunda forma de realización incluyen unas células tales como células de testículos de cerdos (ST), células de riñones de cerdos (p.ej. PK15 (CCL-33), SK-RST(CRL-2842)), cultivos de células epiteliales, queratinocitos cutáneos (p.ej. HEK001 (CRL-2404), CCD1102 (CRL-2310)), células Vero (CCL-81), fibroblastos de pulmones fetales humanos (p.ej. HFL1 (CCL-153)), células de pulmones embrionarios humanos (p.ej. HEL299 (CCL-137)), células de ovarios de hámster chinos (CHO) o células de riñones embrionarios humanos (HEK). Dichas células son transformadas para expresar por lo menos una de las moléculas que están implicadas en la fijación y la internalización del virus en su anfitriona natural.

25 Por ejemplo, en el caso del PRRSV inactivado, las moléculas implicadas en la fijación y la internalización dentro de los macrófagos, consisten en sialoadhesina, sulfato de heparano, CD163 y vimentina. Por lo tanto, una cualquiera de las células antes mencionadas, que expresan por lo menos un compuesto escogido entre sialoadhesina, sulfato de heparano, CD163 y vimentina, se puede usar para la determinación de la antigenicidad de un virus PRRSV inactivado, avaluando la capacidad de dicho virus de PRRSV inactivado para fijarse a dicha célula. En una forma particular de realización las células se componen de unas células de CHO que expresan sialoadhesina.

30 El invento se comprenderá mejor haciendo referencia a los Detalles Experimentales que siguen, pero los expertos en la especialidad apreciarán con facilidad que éstos son solamente ilustrativos del invento tal como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen después de este texto. Adicionalmente, a lo largo de esta solicitud se citan diversas publicaciones.

EJEMPLOS

35 Los siguientes Ejemplos ilustran el invento.

EJEMPLO 1: ANÁLISIS IN VITRO DEL EFECTO DE UNOS PROCESOS DE INACTIVACIÓN DE VIRUS SOBRE EPÍTOPOS DEL PRRSV QUE ESTÁN IMPLICADOS EN LA ENTRADA DEL VIRUS

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Células y virus

40 El virus de Lelystad cepa Europea (con el acrónimo LV del término en inglés) de PRRSV (Wensvoort y colaboradores 1991) que se había dejado crecer en el seno de células MARC-145 (en la 5ª pasada) se usó para realizar la inactivación. Unas células MARC-145 cultivadas en un medio mínimo de Eagle (MEM) con 5 % de FCS, 1 % de glutamina, 1 % de penicilina-estreptomicina y 1 % de kanamicina se usaron para la producción del LV y la titulación del virus inactivado. La fijación y la internalización del virus inactivado se investigó en unos macrófagos que
45 se habían cultivado en un medio que contenía el RPMI 1640, 10 % de FCS, 1 % de penicilina-estreptomicina, 1 % de kanamicina, 1 % de gentamicina, 1 % de tilosina, 1 % de glutamina, 1 % de unos aminoácidos no esenciales y 1 % de piruvato de sodio durante 24 horas antes de la inoculación. Cuando se usaron unas células de CHO, dichas células se cultivaron en F12 con 10 % de FCS, 1 % de penicilina-estreptomicina, 1 % de kanamicina, 1 % de glutamina y 1 % de piruvato de sodio y fueron transfectadas con sialoadhesina. Al igual que los macrófagos, las células
50 de CHO se cultivaron también durante 24 horas antes de la inoculación.

1.2. Concentración y purificación del PRRSV

El virus de Lelystad cepa Europea (LV) del PRRSV se dejó crecer en el seno de células MARC-145. El virus se purificó por filtración a través de un filtro de 0,45 µm y luego se ultra-centrifugó durante 2 h a 112.000 g con un rotor del tipo 35 a 4°C. El sedimento del virus resuspendido se centrifugó durante 10 minutos a 16.000 g. La etapa de purificación final consistía en una ultracentrifugación a través de una almohadilla de sacarosa al 30 % durante 3 h a 100.000 g con un rotor Sw41Ti a 4°C.

1.3. Métodos de inactivación

Para una inactivación del virus con el formaldehído, el virus purificado (10^7 TCID₅₀/ml) se incubó durante 4 h a 37°C con diferentes concentraciones (0 - 0,01 - 0,1 - 1,0 - 10 o 100 ng/ml) del formaldehído. (Sigma) (Rossio y colaboradores 1998; Darnell y colaboradores 2004). Luego el formaldehído se retiró por ultracentrifugación. Una inactivación con el glutaraldehído se realizó con el virus purificado (10^7 TCID₅₀/ml) que se había incubado durante 4 h a 37°C con diferentes concentraciones (0 - 0,005 - 0,05 - 0,5 - 5 o 50 ng/ml) del glutaraldehído (de Sigma) (Darnell y colaboradores 2004). El glutaraldehído se retiró posteriormente por ultracentrifugación. Para una inactivación con la 2,2-ditiodipiridina (AT-2), el virus purificado (10^7 TCID₅₀/ml) se incubó durante 4 h a 37°C con diferentes concentraciones (0 - 10 - 30 - 100 - 300 o 1000 µM) de la AT-2 (Aldrich) (Rossio y colaboradores 1998; Chertova y colaboradores 2003). Después de ello, se retiró la AT-2 por ultracentrifugación. Para una inactivación por cambio del pH, el pH fue ajustado con HCl al 32 % a un pH de 2 y con NaOH a un pH de 12. El virus purificado (10^7 TCID₅₀/ml) se incubó durante varias horas a un pH de 2 o a un pH de 12. Después de una incubación, el pH se neutralizó (Darnell y colaboradores 2004). Para la inactivación del PRRSV a una cierta temperatura, el virus purificado (10^7 TCID₅₀/ml) se incubó durante varias (0 - 6 - 12 - 24 - 48 o 72) horas a 37°C (Darnell y colaboradores 2004; Maheshwari y colaboradores 2004). La inactivación del PRRSV con una irradiación con rayos gamma se realizó con el virus purificado (10^7 TCID₅₀/ml) que se irradió con diferentes dosis de una radiación gamma (0 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 o 10 Rad) con un acelerador de electrones (Darnell y colaboradores 2004). La inactivación con radiación ultravioleta (UV) se realizó con un medio reticulante con UV (UVP, Inc). El virus purificado (10^7 TCID₅₀/ml) se irradió con luz UV en diferentes dosis (0 - 100 - 1.000 - 2.000 - 3.000 o 4.000 mJ/cm²) (Darnell y colaboradores 2004). La inactivación con etilenimina binaria (BEI) se realizó incubando el virus purificado (10^7 TCID₅₀/ml) con 1 mM de BEI (de Aldrich) durante varias (0 - 6 - 12 - 24 - 48 o 72) horas a 37°C. La reacción se detuvo con 0,1 mM de tiosulfato de sodio (Mondal y colaboradores 2005; Berhane y colaboradores 2006).

1.4. Análisis de una inactivación completa por titulación del virus

La titulación del virus se realizó en una placa de 96 pocillos con una monocapa confluyente de células MARC-145. Las muestras tratadas de PRRSV se diluyeron a 10 veces desde 10^0 hasta 10^{-7} . Las MARC-145 se inocularon con 50 µl/pocillo de cada una de las diluciones. Después de una incubación durante 3 hasta 5 días a 37°C, se investigó el acontecimiento de un efecto citopático (CPE) y se podría calcular la dosis infecciosa en un cultivo de tejido de 50 % (TCID₅₀).

1.5 Análisis de la fijación y la internalización de los PRRSV vivos e inactivados por tinción inmunitaria

Unos macrófagos o unas células de CHO (incluyendo unas células de CHO que expresan sialoadhesina y CD163 que han sido depositadas el 14 de Mayo de 2008 en las Colecciones Coordinadas Belgas de Microorganismos como CHO^{Sn/CD163} IC5; CHO^{Sn/CD163} ID9 y CHO^{Sn/CD163} IF3 con los respectivos números de acceso LMBP 6677CB; LMBP 6678CB y LMBP 66779 CB respectivamente.) se incubaron durante 1 h a 37°C con el PRRSV tratado y se fijaron con metanol. Luego la proteína de la cápside se tiñó con un anticuerpo primario P3/27 y con un anticuerpo secundario de cabra anti-FITC de ratón. Un análisis confocal se realizó para determinar la cantidad del PRRSV internalizado.

Los macrófagos, unas células de CHO^{Sn} o CHO^{Sn/CD163} se sembraron a razón de 200.000 células/ml en una placa de 24 pocillos provista de un inserto. Después de 2 días, las células se inocularon con el virus de Lelystad (LV) de tipo silvestre que se había dejado crecer en el seno de unas células MARC-145 y con el LV inactivado que se había dejado crecer en el seno de unas células MARC-145. Las células se fijaron con metanol después de 1 hora a 4°C (fijación; a 0 hpi), de 1 hora a 37°C (internalización), de 5 horas a 37°C (fusión; la disminución en el número de partículas de virus muestra el número de procesos de fusión / eliminación del revestimiento del virus, si el número de partículas de virus permanece idéntico al que se presenta a la 1 hpi, es decir el virus no se ha fusionado), de 12 horas a 37°C (infección) y de 24 horas a 37°C (infección). El virus se tiñó con un anticuerpo primario P3/27 (anti-cápside) y un anticuerpo secundario de cabra anti-FITC de ratón. Las partículas de virus se contaron con un microscopio confocal.

1.6 Ensayos de seguridad para confirmar una inactivación completa

En un primer ensayo, 10^7 partículas de virus/ml se inactivaron y la dosis completa se dispuso en el seno de unas células MARC-145 durante 2 pasadas. El segundo ensayo fue igual que el que el primer ensayo pero 10^8 partículas de virus/ml se activaron y colocaron en el seno de células MARC-145 durante 2 pasadas. Las células MARC-145 se investigaron cada semana para detectar el CPE. El ensayo final fue un bioensayo, en el que una dosis de PRRSV inactivado se inyectó en un cerdo. El suero se comprobó cada semana para detectar la viremia durante 8 semanas.

1.7 Análisis del patrón de proteínas de PRRSV vivos e inactivados por medio de una SDS-PAGE y una transferencia de bórñ Western

Unos PRRSV purificados e inactivados se separaron en una SDS-PAGE al 12 % en condiciones reductoras o no reductoras. Las proteínas se transfirieron luego como un bórñ sobre una membrana de PVDF. Las membranas se tiñeron durante 1 hora con un anticuerpo monoclonal de ratñ primario contra una de las proteínas de LV M (126.3) (Meulenberg y colaboradores 1995), N (P3/27) (Wieczorek-Krohmer y colaboradores 1996), GP5 (4BE12) (Rodríguez y colaboradores 2001), GP4 (122.29) (Meulenberg y colaboradores 1997), GP3 (P9A3-20) (Intervet) o un anticuerpo monoclonal de ratñ. Una segunda etapa de incubación durante 1 hora con un anticuerpo entero específico de una especie, biotinilado con Ig de cordero anti-ratñ secundaria (Amersham Biosciences). La última etapa de incubación durante 1 hora se realizó con un complejo de peroxidasa de rábano rusticano biotinilada con estreptavidina (Amersham Biosciences). Finalmente las proteínas se detectaron con quimioluminiscencia (ECL). Intensificada.

RESULTADOS

2.1 Visión de conjunto de los métodos de inactivación que se usaron

	Tipo	Mecanismo
Formaldehído	Agente reticulante	- Influencia sobre el genoma puesto que él monohidroximetiliza a la adenina (Alderson 1964) - Reticulación del ARN para dar proteínas de la cápside (Ma y Harris 1988; Feron y colaboradores 1991; Kuykendall y Bogdanffy 1992), que causa un bloqueo de la lectura del genoma (Permana y Snapka 1994) - Reticulación de proteínas por formación de puentes de metileno inter- e intramoleculares entre aminas hidroximetiladas (Fraenkel-Conrat 1954)
Glutaraldehído	Agente reticulante	- Reticulación de proteínas por el mismo mecanismo que el del formaldehído que se ha descrito más arriba (Cheung y Nimni 1982).
AT-2	Agente reticulante	- Oxidación de grupos S-H y causando de este modo la formación de puentes de S-S que reticulan a las proteínas y dan como resultado una modificación covalente y una inactivación funcional de proteínas virales internas que contienen S-H (Chertova y colaboradores 2003).
pH	Agente de desnaturalización	- Desnaturalización de proteínas, la conformación de proteínas espiga de coronavirus hace posible por ejemplo una fusión del virus con la célula anfitriona por cambios a un pH de 8 (Weismiller y colaboradores 1990).
Temperatura	Agente de desnaturalización	- A alta temperatura desnaturaliza a proteínas. Como un resultado de ello, La conformación de las proteínas virales que están implicadas en la fijación y replicación en una célula anfitriona puede haber cambiado (Lelie y colaboradores 1987; Schlegel y colaboradores 2001).
Irradiación gamma	Radiación	- Los virus son inactivados principalmente por daño directo, por intermedio de una disrupción del genoma (Grieb y colaboradores 2002). - Formación de radicales libres que daña a las proteínas (Grieb y colaboradores 2002)
Luz UV	Radiación	- Inducción de la formación de un dímero entre uracilos adyacentes en un ARN (Miller y Plagemann 1974; Sinha y Hader 2002). La formación de un dímero conduce a presión y rotura de la cadena principal de un azúcar. Esto causa un bloqueo de la lectura del genoma.. - Con más lentitud, el tratamiento con UV causa también unas modificaciones estructurales de las proteínas de la cápside dando como resultado la formación de unos fotoproductos grandes y pequeños (Subasinghe y Loh 1972; Miller y Plagemann 1974).
BEI	Agente alquilante	- Alquilación del ARN. Es posible que la lectura del genoma sea bloqueada por la alquilación de guanina o adenina por medio de la BEI (Broo y colaboradores 2001; Gates y colaboradores 2004)

2.2 Efecto de diferentes tratamientos sobre la inactivación

Con el fin de ensayar el potencial de los diferentes tratamientos para inactivar al PRRSV, un virus purificado (10^7 /ml) se trató en primer lugar con formaldehído, glutaraldehído, AT-2, pH, a 37°C , irradiación con rayos gamma, luz UV o BEI para diferentes concentraciones, momentos de tiempo (duraciones) y dosis. El PRRSV tratado se valoró para determinar una curva de inactivación (Fig. 1). No se detectó ningún virus infeccioso con la concentración más baja de 10 pg/ml de formaldehído (Fig. 1A). Para el glutaraldehído (Fig. 1B) la cantidad de virus infeccioso disminuyó en función de la concentración y no se podría detectar ningún virus infeccioso si se usase una concentración de 0,5 ng/ml de glutaraldehído o más. El PRRSV era todavía infeccioso después de una incubación durante 4 horas a 37°C con la concentración más alta de 2 mM de AT-2 (Fig. 1C). La curva de inactivación del PRRSV tratado con pH (Fig. 1D), muestra que no se detectó ningún virus infeccioso después de una incubación durante 1 hora a un pH de 2 y a un pH de 12, en el primer momento de tiempo investigado. Para un tratamiento a 37°C la cantidad del virus infeccioso disminuyó de una manera dependiente del tiempo y no se detectó ningún virus infeccioso después de una incubación durante 48 horas a 37°C (Fig. 1E). El PRRSV irradiado con rayos gamma no mostró ningún virus infeccioso con la dosis de irradiación más baja de 0,5 kGy (Fig. 1F). No se detectó ningún virus infeccioso cuando el PRRSV se sometió a tratamiento con UV usando una dosis de irradiación de 100 mJ/cm^2 de UV o más (Fig. 1G). Para la BEI no se detectó ningún virus infeccioso después de una incubación durante 6 horas a 37°C con una concentración de 1 mM de BEI, en el primer momento de tiempo investigado (Fig. 1H).

2.3. Efecto de diferentes procesos de inactivación sobre la internalización en macrófagos

Con el fin de investigar la conservación de los epítomos neutralizadores del PRRSV tratado, se realizó una tinción inmunitaria para determinar si todavía era posible una internalización del PRRSV inactivado en los macrófagos. Estos experimentos de internalización se muestran en la Fig. 2 y en la Fig. 5. Un PRRSV inactivado con 0,1 ng/ml de formaldehído o con 50 ng/ml de glutaraldehído ya no era capaz de internalizarse en macrófagos (Fig. 2A, B y Fig. 5). Esto indica que no fueron conservados los epítomos neutralizadores que estaban implicados en la internalización. Un PRRSV tratado o bien a un pH de 2 o a un pH de 12 no podría internalizarse en macrófagos después de una incubación durante 1 hora, lo que sugiere que los epítomos virales neutralizadores no fueron conservados en ningún caso (Fig. 2D y Fig. 5). Tomados conjuntamente, estos resultados indican que los tratamientos con formaldehído, glutaraldehído y pH son unos procesos ineficaces para inactivar al PRRSV si los epítomos virales neutralizadores necesitan ser conservados, puesto que el PRRSV inactivado no puede internalizarse en macrófagos. Por lo tanto, es probable que suceda una inducción de anticuerpos neutralizadores por inmunización de cerdos con dicho virus inactivado.

Los experimentos de internalización con un PRRSV inactivado por la AT-2 (Fig. 2C y Fig. 5) mostraron que el PRRSV tratados con todas las concentraciones de la AT-2 podrían todavía internalizarse en macrófagos, pero esto se tenía que esperar puesto que los virus eran todavía infecciosos incluso con la concentración más alta de AT-2. La inactivación del PRRSV con la AT-2 no es un método eficiente de inactivación, puesto que el virus es todavía infeccioso, incluso en una concentración de 2 mM de AT-2. La experimentos de internalización para una inactivación a 37°C (Fig. 2E y Fig. 5) mostraron que los PRRSV incubados a 37°C para todos los momentos de tiempo investigados podrían todavía internalizarse en macrófagos, lo que sugiere que los epítomos virales neutralizadores se habían conservado. Un PRRSV tratado con todas las dosis de rayos gamma o luz UV examinadas podría todavía internalizarse en macrófagos, lo que sugiere que los epítomos neutralizadores se habían conservado, pero la internalización era dependiente de la dosis para un PRRSV inactivado con rayos gamma (Fig. 2F, G y Fig. 5). Finalmente, la Fig. 2H y la Fig. 5 mostraron que el PRRSV tratado con 1 mM de BEI podría todavía internalizarse en macrófagos para todos los momentos de tiempo investigados, lo cual indica que los epítomos neutralizadores se habían conservado.

Estos resultados demuestran que los tratamientos con temperatura, irradiación con rayos gamma, luz UV y BEI son unos métodos eficientes para inactivar al PRRSV si los epítomos virales neutralizadores necesitan haberse conservado, puesto que el virus se ha inactivado, mientras que todavía se produce una internalización en macrófagos. Puesto que nosotros podemos suponer que los epítomos virales neutralizadores se conservan, el PRRSV inactivado será capaz con la máxima probabilidad de inducir la producción de anticuerpos neutralizadores en cerdos. Esto sugiere que unos métodos de inactivación que solamente afectan al genoma y conservan a los epítomos virales neutralizadores, tal como se evalúa observando la capacidad de fijación e internalización del PRRSV inactivado, son útiles para el desarrollo de una satisfactoria vacuna de virus inactivado contra el PRRSV.

Los resultados observados en las células de CHO^{Sn} y CHO^{Sn-CD163} (Tabla 1), están en concordancia con las observaciones hechas en la anfitriona natural del PRRSV, es decir macrófagos alveolares, y que correspondientemente ellas se pueden usar como una alternativa en el control cualitativo para descubrir unos candidatos para el desarrollo de vacunas inactivadas.

Tabla 1 Fijación, internalización, fusión e infección de un LV (testigo) y un LV inactivado en tres diferentes linajes celulares CHO^{Sn-CD163} (IC5, ID9 y IF3)

	Testigo (no inactivado)			BEI			UV		
	IC5	ID9	IF3	IC5	ID9	IF3	IC5	ID9	IF3
Fijación (partículas contadas a la 0 hpi)	14	12	7	18	9	10	5	6	5
Internalización (partículas contadas a la 1 hpi)	41	31	31	38	34	25	35	23	24
Fusión (partículas contadas a las 5 hpi)	3	2	2	1	1	2	0	0	0
Infección a las 12 hpi (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infección a las 24 hpi (%)	5	2	2	0	0	0	0	0	0
	Formaldehído			Glutaraldehído					
	IC5	ID9	IF3	IC5	ID9	IF3			
Fijación (partículas contadas a la 0 hpi)	0	2	1	1	0	2			
Internalización (partículas contadas a la 1 hpi)	0	0	0	0	0	0			
Fusión (partículas contadas a las 5 hpi)	0	0	1	0	0	1			
Infección a las 12 hpi (%)	0	0	0	0	0	0			
Infección a las 24 hpi (%)	0	0	0	0	0	0			

Un LV inactivado con BEI y por tratamiento con UV muestra una fijación, una internalización y una fusión similares a las del LV no inactivado, pero no hay ninguna infección, por lo que estos métodos son unos buenos candidatos para el desarrollo de una vacuna. El formaldehído y el glutaraldehído no muestran ninguna infección pero ya no hay ninguna internalización más, por lo que podemos sacar la conclusión de que se han destruido los epítomos que están implicados en la entrada del virus.

2.4 Efecto de los diferentes métodos de inactivación sobre el ciclo viral

Un PRRSV inactivado con formaldehído, glutaraldehído y a un pH no es capaz de internalizarse en macrófagos, que es la primera etapa en el ciclo viral. Puesto que no se realiza una internalización, tampoco se realizarán la eliminación del revestimiento, la replicación, el ensamble y la liberación del virus (Fig. 5). Un PRRSV inactivado por 37°C, irradiación con rayos gamma, tratamiento con UV y con BEI puede todavía internalizarse en macrófagos, de manera tal que es capaz de realizar la primera etapa del ciclo viral. Después de 5 horas, se realizó la eliminación del revestimiento de manera tal que también se puede realizar la segunda etapa del ciclo viral. El virus inactivado, sin embargo, no es capaz de replicarse y por lo tanto es bloqueado en la última etapa del ciclo (Fig. 5).

2.5 Ruta de entrada del PRRSV inactivado

Unos métodos que inactivan al PRRSV, pero que no afectan a la entrada del virus dentro de los macrófagos fueron examinados adicionalmente para determinar la ruta de entrada del virus dentro de las células. Los autores del invento hemos investigado si el PRRSV inactivado se internalizaba por intermedio de sialoadhesina, tal como se ha descrito para un PRRSV infeccioso (Vanderheijden y colaboradores 2003), o si simplemente era asimilado por fagocitosis. Por lo tanto, se usaron unas células de CHO que por defecto no expresan sialoadhesina y se creó un linaje de células de CHO que expresa establemente sialoadhesina. Nosotros hemos usado entonces estas células y sus contrapartidas no transformadas para comparar una internalización de virus tratados y no tratados. Para un PRRSV que había sido inactivado con 37°C, irradiación con rayos gamma, tratamiento con UV y con BEI nosotros hemos encontrado que él se internalizaba en las células usando sialoadhesina y que la internalización no era el resultado de una fagocitosis (Fig. 4).

2.6 Ensayo de seguridad para confirmar una inactivación completa

Los métodos de irradiación con rayos gamma, de tratamiento con UV y con BEI parecen ser unos métodos útiles para el desarrollo de vacunas de PRRSV muertos, puesto que ellos se fijan e internalizan en macrófagos de una manera similar a la del virus virulento. Por lo tanto se realizaron algunos ensayos de seguridad para confirmar que el virus inactivado estaba completamente inactivado. En primer lugar, se inactivaron 10⁷ partículas del virus/ml y se inocularon unas células MARC-145 por 2 pasadas con el virus inactivado. Este ensayo indicó que un virus inactivado con 100 mJ/cm² de UV o durante 6 horas con BEI estaba completamente inactivado. Para estar seguros de que el virus estaba inactivado, se seleccionaron 1.000 mJ/cm² de UV o 24 horas con BEI como métodos seguros para inactivar al PRRSV. El virus inactivado por irradiación con rayos gamma, sin embargo, no estaba completamente inactivado y por lo tanto no era útil para el desarrollo de vacunas. Para el tratamiento con UV y con BEI se realizó un

segundo ensayo. Por lo tanto se inactivaron 10 veces más cantidad del virus, 10^8 partículas de virus/ml, y se inocularon unas células MARC-145 por 2 pasadas con el virus inactivado. Los resultados demuestran que por tratamiento con 1.000 mJ/cm^2 de UV o durante 24 horas con BEI se podría inactivar todavía por completo 10 veces más cantidad del virus. Como un ensayo final, un virus que había sido inactivado con 1.000 mJ/cm^2 de UV o durante 24 horas con BEI se inyectó en cerdos. Los resultados no mostraron ninguna viremia en cerdos, lo que sugiere que el virus inactivado estaba completamente inactivado y era seguro usarlo en cerdos para efectuar el desarrollo de vacunas.

2.7 Análisis del patrón de proteínas del PRRSV inactivado

El experimento de internalización con un PRRSV inactivado con formaldehído, glutaraldehído y pH, indicó que los epítomos neutralizadores no estaban presentes y unos experimentos con un PRRSV inactivado con AT-2, 37°C , rayos gamma, UV y BEI indicaron que los epítomos neutralizadores se habían conservado. Esto se demuestra adicionalmente analizando el patrón de proteínas del virus antes y después de una inactivación por transferencia de borrón Western (Fig. 3A y B, Tabla 2.). En circunstancias reductoras, todas las proteínas virales estaban presentes después de una inactivación con formaldehído así como en circunstancias no reductoras, pero en una extensión menor que el PRRSV no tratado (Fig. 3A y B, Tabla 2.).

Tabla 2 Densidad de borrones de transferencia Western de los experimentos (media de experimentos duplicados)

	/	UV	BEI	37°C	Gamma	form.	glut.	AT2	pH2
N	100	48	103	85	83	30	6	26	82
M	100	14	65	46	48	23	6	23	40
GP5	100	56	95	87	56	42	1	50	75
GP4	100	73	93	91	50	50	13	28	83
GP3	100	47	94	95	39	83	5	83	94
dímero N	100	45	83	92	66	43	0	43	31
MGP5	100	58	87	92	80	73	0	63	67

Esto es debido con la máxima probabilidad a una reticulación de proteínas por el formaldehído. Para el glutaraldehído, en condiciones reductoras todas las proteínas virales desaparecieron después de una inactivación, así como en unas condiciones no reductoras (Fig. 3A y B, Tabla 2). Esto es debido probablemente a unos sucesos de reticulación entre proteínas por el glutaraldehído, de manera tal que los enormes complejos formados ya no son detectables más. Como se muestra en las Fig. 3A y B, todas las proteínas virales estaban presentes después de una inactivación con cambios del pH así como en unas circunstancias no reductoras. Los complejos tales como el dímero N y el M-GP5 fueron más degradados en comparación con el virus no tratado (Tabla 2), lo que es probablemente la consecuencia de una desnaturalización. Para la AT-2, tanto en condiciones reductoras como en condiciones no reductoras, estaban presentes todas las proteínas virales, pero menos que en los virus no tratados (Fig. 3A y B, Tabla 2). Esto es debido probablemente a unos sucesos de reticulación.

En circunstancias reductoras, todas las proteínas virales estaban presentes después de una inactivación con 37°C así como en unas circunstancias no reductoras (Fig. 3A y B, Tabla 2). En unas condiciones reductoras todas las proteínas virales estaban presentes después de una inactivación por irradiación con rayos gamma, así como en unas condiciones no reductoras, pero en una menor extensión que en el virus no tratado (Fig. 3A y B, Tabla 2). Esto es debido con suma probabilidad a la formación de unos radicales libres que destruyen a las proteínas.

Comparando el patrón de proteínas del virus antes y después de una inactivación por irradiación con UV mediante una transferencia de borrón Western, nosotros hemos obtenido evidencia de que una irradiación por tratamiento con UV dañaba a las proteínas virales (Fig. 3A y B, Tabla 2). Para la BEI, en circunstancias reductoras todas las proteínas virales estaban presentes después de la inactivación, al igual que en unas circunstancias no reductoras (Fig. 3A y B, Tabla 2). Los PRRSV inactivados con formaldehído, glutaraldehído, pH, AT-2, rayos gamma y tratamiento con UV no tienen el mismo patrón de proteínas que el virus no tratado. Estos resultados indican que los PRRSV inactivados con estos procesos de inactivación no se asemejan al PRRSV infeccioso y probablemente no serán útiles para el desarrollo de vacunas, después de todo.

Los PRRSV inactivados con 37°C y con BEI mostraron el mismo patrón de proteínas que el virus no tratado. Estos resultados indican que los PRRSV inactivados con 37°C y con BEI se asemejan al PRRSV infeccioso y pueden ser útiles para el desarrollo de vacunas

El problema principal para el desarrollo de una vacuna de PRRSV es que la inducción de anticuerpos neutralizadores es retardada cuando se inmunizaba con las vacunas de PRRS muertas actualmente usadas o después de la infección con un virus del PRRSV infeccioso (Yoon y colaboradores 1995). Las vacunas de PRRSV muertas actualmente usadas también se tropiezan con el problema de que ellas no protegen completamente contra una infección causada por el PRRSV puesto que la vacuna no puede inducir una producción de anticuerpos

neutralizadores. En nuestro laboratorio hemos encontrado que unos anticuerpos contra unos epítomos virales que son esenciales para la entrada del virus en macrófagos están impidiendo la infección (Delputte y colaboradores 2004). De esta manera nosotros queríamos investigar diferentes métodos de inactivación para el PRRSV y su efecto sobre los epítomos virales que son importantes para una entrada en macrófagos. Idealmente, un método de inactivación debería de inactivar al virus, al mismo tiempo que conservar a los epítomos neutralizadores, es decir retener la capacidad del virus inactivado para fijarse a e internalizarse dentro de unas células que son permisivas para el PRRSV.

De acuerdo con la bibliografía, el formaldehído y el glutaraldehído tienen un efecto similar sobre las proteínas, puesto que ellos son capaces de inducir la reticulación de las proteínas (Fraenkel-Conrat 1954; Cheung y Nimni 1982). Sin embargo, una reticulación de unos epítomos virales que están implicados en la fijación y la internalización del PRRSV pueden interferir con la subsiguiente presentación de epítomos virales a unas células del sistema inmunitario adaptativo. Nuestros experimentos con estos agentes sugieren desde luego que los epítomos neutralizadores son modificados por el formaldehído y el glutaraldehído, puesto que el virus ya no puede fijarse e internalizarse en macrófagos. Por lo tanto, nosotros podemos sacar la conclusión de que el formaldehído y el glutaraldehído no son unos métodos efectivos para inactivar al PRRSV mientras que conservan a los epítomos virales neutralizadores.

Otro agente de reticulación que se usó para la inactivación del HIV-1 (Chertova y colaboradores 2003), la AT-2, no mostró ningún efecto observable sobre el PRRSV en nuestras manos, puesto que el virus permanecía activo. Incluso después de la aplicación de 20 veces la cantidad usada para una inactivación satisfactoria del HIV-1, el PRRSV permanecía activo. Puesto que parece que el PRRSV no es sensible para la AT2, no podemos usar este producto con el fin de inactivar al PRRSV para el desarrollo de una vacuna muerta.

Otro grupo de agentes que se usan para una inactivación viral se compone de unos compuestos desnaturalizadores. Unos agentes de los que se ha demostrado documentalmente que inactivan a unos virus por desnaturalización son unas variaciones del tratamiento a un pH y a una temperatura (Lelie y colaboradores 1987; Schlegel y colaboradores 2001). Como ocurre con la reticulación de proteínas, la desnaturalización de proteínas virales puede también destruir al o a los epítomo(s) neutralizador(es) de PRRSV, pero nuestros resultados son inequívocos en este asunto: una variación del pH impedía que el PRRSV se fijase e internalizase en macrófagos, mientras que un modesto aumento de la temperatura no afecta a la fijación ni a la internalización del virus. Nuestros resultados indican por lo tanto que el cambio del pH no es un proceso útil para desarrollo de una vacuna de PRRSV muerta, puesto que los epítomos para la fijación y la internalización del virus en macrófagos son destruidos probablemente por desnaturalización de los epítomos. Puesto que un tratamiento durante 48 horas a 37°C no impide una replicación viral, pero todavía permite una fijación y una internalización, el recurso de aumentar la temperatura sería una interesante opción para generar una vacuna de PRRSV muerta. Sin embargo, no recomendaríamos usar este método para inactivar al PRRSV para el desarrollo de vacunas, puesto que se desconoce el mecanismo de la inactivación, ya que una temperatura de 37°C es demasiado baja para desnaturalizar a las proteínas virales.

Puesto que una irradiación con rayos gamma tiene principalmente un efecto sobre el genoma, podría suponerse que éste sería un método efectivo para inactivar al PRRSV. Después de una tinción con IPMA de unas células MARC-145 inoculadas con el PRRSV inactivado por irradiación con rayos gamma hemos encontrado que el margen entre una inactivación completa y una conservación de epítomos neutralizadores es demasiado pequeño para usar este método en una vía segura para el desarrollo de vacunas. Una tinción con IPMA mostró que el PRRSV inactivado con una dosis de 1,5 kGy era todavía infeccioso, mientras que el PRRSV inactivado con una dosis de 2 kGy ya no podría internalizarse completamente en macrófagos nunca más, lo que sugiere que los epítomos neutralizadores no se conservan a una alta dosis, del modo más probable debido a la formación de unos radicales libres que dañan a las proteínas, lo que también se observa al realizar un análisis de transferencia de bórón Western. Podemos sacar la conclusión de que una irradiación con rayos gamma no es un método efectivo para inactivar al PRRSV si los epítomos virales neutralizadores necesitan ser conservados. Hay todavía una internalización en macrófagos incluso con una dosis de 0,5 kGy y más, incluso aunque ya no se detectan más virus infecciosos con estos niveles de irradiación, pero el análisis por bórón de transferencia Western mostró una degradación de las proteínas virales. Estos resultados sugieren que una inducción de anticuerpos neutralizadores será probablemente difícil si se usa una irradiación con rayos gamma para inactivar al PRRSV.

De todos los métodos ensayados, los métodos más prometedores para inactivar al PRRSV para el desarrollo de una vacuna de virus muerta son los tratamientos con UV y con BEI, puesto que ellos solamente tienen un efecto sobre el nivel en el genoma y conservan a los epítomos virales neutralizadores tal como se muestra por una internalización del virus inactivado en macrófagos. Estos métodos no interfieren con la internalización normal del PRRSV en macrófagos, tal como se muestra por la presencia del PRRSV tratado en unas células de CHO que poseen sialoadhesina y por su ausencia en células de CHO que son deficitarias en sialoadhesina. Esto indica que los epítomos que son esenciales para la fijación y la internalización del PRRSV en macrófagos se han conservado y por lo tanto la inducción de anticuerpos neutralizadores se realizará con la máxima probabilidad puesto que los tratamientos con UV y con BEI no destruyen a los conocidos epítomos virales neutralizadores que se usan para la entrada en los macrófagos (Delputte y colaboradores 2004). Sin embargo, para el tratamiento con UV se ha informado acerca de la destrucción de proteínas de la cápside (Miller y Plagemann 1974). Aunque hemos observado una degradación de proteínas virales en un análisis de bórón de transferencia Western, el virus inactivado con UV

era todavía capaz de internalizarse en macrófagos a pesar de las dosis de irradiación de 100 mJ/cm² y más altas. Este resultado sugiere que se conservan los epítomos virales neutralizadores.

En conclusión, los resultados de nuestro estudio acerca de métodos de inactivación sugieren que los métodos de tratamiento con UV, con BEI y de irradiación con rayos gamma, que tienen principalmente un cierto efecto sobre el genoma, podrían ser unos métodos interesantes para inactivar al PRRSV para el desarrollo de vacunas, puesto que el virus tratado es todavía capaz de internalizarse, pero ya no se replica. Por otro lado unos métodos que también tienen un cierto efecto sobre las proteínas virales, tales como el de formaldehído, el de glutaraldehído y el cambio del pH no son unos candidatos tan buenos para la inactivación del virus, puesto que el virus inactivado ya no se internaliza en macrófagos.

Este estudio reveló también que una exposición del PRRSV a una temperatura aumentada era un método eficiente de inactivación viral, pero el mecanismo de acción todavía requiere más investigación.

EJEMPLO 2: RESULTADOS DE UNA INACTIVACIÓN CON BEI (0 – 90 mM)

Introducción

En el Ejemplo anterior nosotros hemos investigado si la BEI podría inactivar al PRRSV con conservación de los epítomos virales neutralizadores en el desarrollo de vacunas. Por lo tanto, el PRRSV fue inactivado con 1 mM de BEI durante diferentes períodos de tiempo (0-6-12-24-48 y 72 h). Los resultados mostraron que la BEI podría inactivar al PRRSV con conservación de epítomos neutralizadores puesto que el virus inactivado podría todavía fijarse e internalizarse en macrófagos, que constituyen la célula diana del PRRSV.

Meta

En el presente estudio, hemos querido investigar si el PRRSV que ha sido tratado con unas concentraciones más altas de BEI podría todavía fijarse e internalizarse en macrófagos y en células de CHO que expresan sialoadhesina (CHO^{Sn}). Si unas concentraciones más altas bloquearían la fijación y la internalización de PRRSV, esto podría proporcionar una prueba adicional de la necesidad de una técnica que evalúe el efecto de una inactivación con BEI y permita una optimización.

Material y métodos

El virus de Lelystad (LV), que es el tipo europeo del PRRSV, se trató con diferentes concentraciones de BEI (0-1-3-10-30 y 90 mM) durante 24 horas a 37°C tal como se ha descrito con anterioridad (en un borrador manuscrito). Unos macrófagos o unas células de CHO^{Sn} se inoculaban con el LV inactivado. Después de 0-1-5 y 10 horas a continuación de la inoculación (hpi) las células fueron fijadas y se realizó una tinción inmunitaria para tefir al virus.

Resultados

Tabla 3 Análisis de la entrada del virus de Lelystad y de la replicación en macrófagos después de un tratamiento del virus con la BEI.

	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	90 mM
Fijación (0 hpi)	Sí	Sí	Sí	Sí	Menos	Muy poca
Internalización (1 hpi)	82 partículas	80 partículas	42 partículas	44 partículas	21 partículas	6 partículas
Fusión (5hpi)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No ?
Replicación (10 hpi)	Sí	No	No	No	No	No

Para un LV que no había sido tratado con BEI se observó la fijación (a la 0 hpi), la internalización (a la 1 hpi), la fusión (a las 5 hpi) y la replicación (a las 10 hpi) del virus en macrófagos. La fijación y la internalización del LV tratado con BEI disminuía en función de la concentración de la BEI usada. No podría haberse detectado una replicación para todos los LV tratados con BEI (Tabla 3).

Unos resultados similares se obtuvieron con unas células de CHO^{Sn} (datos no mostrados).

Conclusión

Los resultados sugieren que si el LV es tratado con una alta concentración de BEI, los epítomos neutralizadores virales son destruidos, puesto que el virus ya no puede fijarse e internalizarse en macrófagos más. Tampoco unas células de CHO^{Sn} pueden internalizar a un LV que ha sido tratado con una alta concentración de BEI. Considerado conjuntamente, se puede sacar la conclusión de que el método de tratamiento con BEI es un método efectivo para inactivar al PRRSV con conservación de los epítomos neutralizadores virales y la concentración es optimizada usando nuestra metodología. En nuestros sistemas experimentales, la concentración óptima para inactivar al PRRSV con conservación de epítomos neutralizadores específicos está situada entre 1 y 10 mM de BEI.

EJEMPLO 3: VACUNACIÓN DE CERDITOS INGENUOS**MATERIALES Y MÉTODOS***Producción y purificación del virus*

La cepa del virus de Lelystad (LV) del PRRSV, propagada en células Marc-145, se usó para la preparación de una vacuna (Wensvoort G.C. y colaboradores 1991). El material sobrenadante de un cultivo celular en la quinta pasada fue filtrado a través de un filtro de 0,45 µm y el virus se concentró a partir del material sobrenadante mediante una ultracentrifugación a 112.000 g durante 2 horas usando un rotor del Tipo 35 (de Beckman Coulter). Subsiguientemente, el virus se semi-purificó por ultracentrifugación a 100.000 g durante 3 horas a través de una almohadilla de sacarosa al 30 %, usando un rotor SW41Ti (de Beckman Coulter), se resuspendió en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se almacenó a -70°C. Antes de la inactivación, el virus se diluyó en un RPMI 1640 hasta una dosis infecciosa en un cultivo de tejido de 50 % (TCID₅₀) de 10⁸ por ml. Un virus de desafío consistía en el material sobrenadante de un cultivo celular en la quinta pasada de la cepa de LV del PRRSV, propagada en unos macrófagos alveolares porcinos (PAM), que se derivan de unos cerditos gnotobióticos.

Inactivación del virus

La Inactivación del PRRSV con la etilenimina binaria (BEI) se realizó tal como ha sido descrito por Bahnemann H.G. 1990. Una existencia de reserva de BEI 0,1 M se preparó por ciclización de la 2-bromo-etilamina en NaOH 0,175 M durante 1 h a 37°C y se almacenó a 4°C. El virus se inactivó por incubación con 1 mM de BEI durante 24 h a 37°C y la BEI se neutralizó por incubación con 0,1 mM de tiosulfato de Na durante 2 h a 37°C. La inactivación del PRRSV con una radiación ultravioleta (UV) se realizó irradiando la suspensión de virus con 1.000 mJ/cm², usando un agente reticulante por UV (UVP, Inc.). El virus inactivado se almacenó a -70°C.

Análisis de una inactivación completa

Para verificar si el virus estaba completamente inactivado, unas muestras de las suspensiones del virus inactivado fueron sometidas a dos pasadas por unas células Marc-145 que fueron analizadas para detectar el efecto citopático (CPE). Subsiguientemente, unos cultivos de células fueron fijados con metanol al 100 % a -20°C y se realizó una tinción con inmunoperoxidasa con el anticuerpo monoclonal P3/27 contra la proteína de la nucleocápside del PRRSV con el fin de detectar células infectadas (Wieczorek-Krohmer M.F., y colaboradores, 1996).

Análisis de la internalización del virus en macrófagos

La internalización viral de un virus vivo o inactivado en PAM se realizó como control cualitativo para neutralizar epítomos en el virus. Dicho brevemente, unos PAM fueron inoculados con las suspensiones de virus e incubados durante 1 h a 37°C con CO₂ al 5 % (Delrue y colaboradores). Las células fueron lavadas con el fin de retirar las partículas de virus no fijadas, fueron fijadas con metanol al 100 % a -20°C y las partículas de virus fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal de ratón P3/27 contra la proteína de la nucleocápside del PRRSV y con el anticuerpo anti-ratón de cabra marcado con FITC. La cantidad de partículas de virus internalizado en los PAM fue determinada con un sistema confocal espectral de barrido con rayos láser Leica TCS SP2 (de Leica Microsystems).

Diseño experimental

Veinticuatro cerditos derivados de una granja negativa para el PRRS se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos de tratamiento. Un primer grupo (el grupo A) sirvió como el grupo testigo con adyuvante y recibió 1 ml de RPMI 1640 en 1 ml del adyuvante Incompleto de Freund (IFA) en los momentos de tiempo de vacunación. Los otros tres grupos se vacunaron por vía intramuscular a las 6 y 10 semanas de edad. El grupo B se vacunó con 2 ml de una vacuna comercial de PRRSV inactivado de tipo europeo (Progressis[®], Merial).. El grupo C recibió 1 ml de un virus inactivado con UV en 1 ml de IFA y el grupo D recibió 1 ml de un virus inactivado con BEI en 1 ml de IFA. A las cuatro semanas después de la segunda vacunación, todos los cerdos fueron desafiados por una inoculación intranasal de 10⁶ TCID₅₀ de LV. Se extrajo sangre semanalmente después de la vacunación y a los 0, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 35 días después del desafío. El suero se aisló con respecto de la sangre y se almacenó a -70°C.

Detección de anticuerpos y titulación del virus

Los títulos de anticuerpos en un suero específico para el PRRSV fueron determinados por un ensayo de monocapa con inmunoperoxidasa (IPMA) y los títulos de anticuerpos neutralizadores de virus (VN) fueron determinados por un ensayo de neutralización de suero (SN) en unas células Marc-145 tal como se ha descrito con anterioridad (Labarque G.G. y colaboradores, 2000). Los títulos de virus en suero fueron determinados por titulación del virus en unos PAM, seguida por una tinción con inmunoperoxidasa con el anticuerpo monoclonal P3/27 contra la proteína de la nucleocápside del PRRSV (Labarque G.G. y colaboradores, 2000).

Análisis estadístico

La internalización en macrófagos fue analizada mediante el análisis de la varianza de una sola vía. Los títulos de anticuerpos y de virus fueron analizados mediante el análisis de la varianza de una sola vía, seguido por el ensayo de múltiples comparaciones de Bonferroni con el fin de determinar las diferencias entre grupos en diferentes momentos de tiempo. La correlación entre los títulos de SN y los títulos de virus fue determinada por un análisis de correlación de Pearson en un lado. El área bajo la curva de la viremia (log₁₀ de TCID₅₀/ml) fue analizada con un

ensayo t en un lado no emparejado. $P < 0,05$ se tomó como el nivel de la significancia estadística. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el GraphPad Prism versión 5.

RESULTADOS

Inactivación del virus y control de la internalización

- 5 Una suspensión viral de PRRSV con un título de 10^8 TCID₅₀/ml fue inactivada o bien con una radiación UV o con la BEI. La inactivación completa fue confirmada mediante dos pasadas por un cultivo de células Marc-145 seguidas por una tinción inmunitaria para la proteína de la nucleocápside del PRRSV con el fin de detectar células infectadas. Con el fin de determinar si la inactivación había influido sobre la capacidad del virus para internalizarse en PAM, se realizó un experimento de internalización con suspensiones del virus inactivado y también con una suspensión del virus no inactivado como el testigo positivo. El número de partículas del virus internalizado por célula no difiere significativamente entre los virus inactivados por tratamiento con UV, inactivados con BEI y no inactivados (Fig. 6).

Anticuerpos específicos para el virus

- 15 Unos anticuerpos específicos para el PRRSV no podrían ser detectados mediante una IPMA en ninguno de los cerdos del grupo testigo con adyuvante (grupo A) antes del desafío (Fig 7). De los cerdos que fueron vacunados con la vacuna inactivada comercial (grupo B), un cerdo mostró transitoriamente un título de anticuerpos positivo para IPMA después de la vacunación y otro cerdo se había seroconvertido en el día del desafío mientras que los otros cerdos permanecían seronegativos hasta el momento de la infección. En contraste, todos los cerdos que habían sido vacunados con un virus inactivado con UV (grupo C) o inactivado con BEI (grupo D) ya mostraron títulos de anticuerpos positivos a las tres semanas después de la primera vacunación y después de la segunda vacunación los títulos de anticuerpos subieron hasta unos valores tan altos como los que normalmente se observan después de la infección con PRRSV en cerdos ingenuos (12). Después del desafío, todos los cerdos se habían seroconvertido en el día 10 y los títulos de anticuerpos fueron significativamente más altos en todos los grupos vacunados (grupos B, C y D) en comparación con el grupo testigo con adyuvante (grupo A).

Anticuerpos VN

- 25 Antes del desafío, ninguno de los cerdos mostró anticuerpos VN, excepto un cerdo del grupo D que mostró un título de anticuerpos SN de $1 \log_2$ a las 2 semanas después de la segunda vacunación y en el día del desafío (datos no mostrados). Después del desafío, un cerdo del grupo A mostró un título de anticuerpos SN transitorio en el día 10, pero para todos los otros cerdos testigos con adyuvante no se podrían detectar anticuerpos VN más temprano que tres semanas después del desafío y un cerdo permaneció negativo durante todo el experimento (Fig. 8). Solamente cuatro cerdos del grupo B mostraron anticuerpos VN, de ellos dos comenzando a partir de los 10 días, uno a las cuatro semanas y otro a las cinco semanas después del desafío y los títulos medios de anticuerpos VN no difieren entre los grupos A y B en ningún momento de tiempo. En contraste, todos los cerdos de los grupos C y D mostraron anticuerpos VN después de un desafío. Un cerdo del grupo C se volvió positivo a los cinco días después del desafío, dos de ellos a los diez días, otros dos a las semanas y otro a las cinco semanas. Los títulos medios de anticuerpos VN fueron significativamente más altos en el grupo C en comparación con el grupo A, a las dos semanas después del desafío. En el grupo D, un cerdo ya tenía anticuerpos VN antes del desafío y comenzando a partir de una semana después del desafío todos los cerdos de este grupo mostraron un título de anticuerpos SN positivo, excepto un animal que se volvió positivo una semana más tarde. Los títulos medios de anticuerpos VN fueron significativamente más altos en el grupo D en comparación con el grupo A en los 7, 14, 21 y 28 después del desafío.

Viremia

- El virus no se podría detectar en el suero a la una semana después de cada inmunización y en el día del desafío, confirmando que no se había inducido ninguna infección por cualquiera de las vacunas. Después del desafío, todos los animales mostraron una viremia y la figura 9 representa los títulos de virus ($\log_{10}$ TCID₅₀/ml) después del desafío para cada grupo. En el grupo A, un título medio máximo de virus de $3,47 \log_{10}$ TCID₅₀/ml se alcanzó en el día 5 después del desafío y un segundo título máximo de virus de $3,11 \log_{10}$ TCID₅₀/ml se observó en el día 10, seguido por un declive hasta que todos los cerdos fuesen negativos para el virus a las cuatro semanas después del desafío. Una viremia en el grupo B seguida por un patrón similar al existente en el grupo A, pero a los 10 días después del desafío, el título medio de virus en este grupo era significativamente más baja ($2,04 \log_{10}$ TCID₅₀/ml) en comparación con el grupo testigo con adyuvante. Como una medida de la carga viral total a lo largo de toda la duración de la viremia se calculó el área bajo la curva (AUC) para cada animal individual. El AUC media para el grupo B se redujo significativamente con 53 % en comparación con el grupo A. Sin embargo, no existía ninguna correlación entre los títulos de anticuerpos VN y los títulos de virus en ningún momento para este grupo. El título medio de virus para el grupo C era de $2,73 \log_{10}$ TCID₅₀/ml a los 5 días y de $2,49 \log_{10}$ TCID₅₀/ml a los 10 días después del desafío, pero no era significativamente diferente del título medio de virus en el grupo A en ningún momento de tiempo. No obstante, el AUC para el grupo C se redujo significativamente con 54 % en comparación con el grupo A y además había una significativa correlación negativa entre los títulos de anticuerpos VN y los títulos de virus para el grupo C a los 10 días después del desafío (valor de R -0,836). Finalmente, el título medio de virus para el grupo D fue de $2,63 \log_{10}$ TCID₅₀ a los 5 días después del desafío y se había reducido significativamente a $1,36 \log_{10}$ TCID₅₀ en el día 10, en comparación con el grupo A. El AUC media se redujo con 59 % y existía una significativa correlación negativa entre

los títulos de anticuerpos VN y los títulos de virus en el día 10 y en el día 14 (con unos respectivos valores de R - 0,84 y -0,673).

Un ensayo cualitativo para neutralizar epítomos en un PRRSV inactivado se desarrolló en nuestro laboratorio y existe en el análisis de internalización de partículas de virus inactivado en unos PAM, que son el tipo de células anfitrionas *in vivo* para el virus (Delrue y colaboradores, resultados no publicados). Puesto que los anticuerpos VN pueden bloquear la internalización de los PRRSV en PAM, el grado de internalización puede ser una medida para la conservación de epítomos neutralizadores después de una inactivación (Delputte y colaboradores, 2004). Basándose en este ensayo, dos métodos de inactivación fueron optimizados para el PRRSV, los cuales no perjudican a la capacidad del virus para internalizarse en PAM pero pierden la capacidad de replicarse en la anfitriona, y por lo tanto pueden conservar epítomos neutralizadores en las partículas de virus. En el presente contexto, hemos examinado si la vacunación de cerditos ingenuos con el PRRSV, que ha sido inactivado por estos métodos, pudiera inducir unos anticuerpos específicos para el virus y neutralizadores del virus y pudiera proteger contra una viremia después de la infección, y hemos comparado la eficacia de las vacunas experimentales con esta vacuna comercial de PRRSV inactivado de tipo europeo. Hemos mostrado que una vacunación con un virus inactivado tanto con UV como con BEI inducía sólidamente unos anticuerpos específicos para el virus en todos los animales. En contraste con ello, una vacunación con la vacuna comercial apenas induce anticuerpos específicos para el virus, pero da como resultado una respuesta a anticuerpos intensificada y elevada después del desafío. Estos resultados son similares a los de un estudio, realizado por Zuckermann y colaboradores, que muestra que una vacunación con esta vacuna comercial solamente daba como resultado una respuesta inmunitaria humoral anamnésica después del desafío (Zuckermann, F. A., y colaboradores, 2007). Los títulos de anticuerpos específicos para el virus, tal como se miden por medio de IPMA o de un ELISA, sin embargo, no se correlacionan con los títulos de anticuerpos VN y por lo tanto no proporcionan ninguna información acerca de una inmunidad protectora contra el PRRSV (Yoon, I.J., y colaboradores, 1994).

En nuestro experimento, la respuesta a anticuerpos VN después de la infección en animales testigos con adyuvante fue retrasada y débil, en comparación con la respuesta a anticuerpos específicos para virus, lo cual no es sorprendente puesto que se ha mostrado que es perjudicada la respuesta a anticuerpos VN contra el PRRSV (Yoon, K.J., y colaboradores, 1995). Una vacunación con la vacuna comercial de PRRSV inactivado no ejerce influencia sobre la respuesta a anticuerpos VN después de la infección.

Una vacunación con un virus inactivado con UV o con BEI dio como resultado una respuesta a anticuerpos VN más temprana y fuertemente intensificada después de la infección. Una inactivación del PRRSV con radiación UV o con BEI no ejerce influencia sobre la capacidad del virus inactivado para internalizarse en PAM y por lo tanto nosotros esperamos que los epítomos neutralizadores se conserven. El fuerte cebado de la respuesta a anticuerpos VN por medio de una vacunación con un virus inactivado con UV o con BEI confirma la presencia de unos epítomos neutralizadores intactos en el virus de la vacuna. Aunque la respuesta a anticuerpos VN era cebada por una vacunación con un virus inactivado con UV o con BEI, no se podrían inducir unos anticuerpos VN por una vacunación por sí sola, excepto para un cerdo que había sido vacunado con el virus inactivado con BEI. A pesar de la presencia de epítomos neutralizadores en los virus inactivados con UV y con BEI, parece ser que la inmunogenicidad de estos epítomos es débil, lo cual está de acuerdo con la baja inmunogenicidad de los epítomos neutralizadores en el virus. Unos anticuerpos VN aparecieron más temprano en unos animales que habían sido vacunados con el virus inactivado con BEI, en comparación con los que habían sido vacunados con el virus inactivado con UV, y también existía más variación en los títulos de anticuerpos VN en el último grupo. Incluso aunque la capacidad de internalizarse en PAM no hubiera sido perjudicada para ambos métodos de inactivación, parece ser que existe una diferencia en el potencial de inducir anticuerpos VN entre unos virus inactivados con UV y con BEI. Delrue y colaboradores mostraron que unas proteínas virales del PRRSV, detectadas por un análisis de transferencia de bórñon Western, podrían ser afectadas por una inactivación con UV, mientras que esto no ocurre para una inactivación con BEI. Por lo tanto, algunos epítomos neutralizadores, que no están implicados en una internalización en PAM, pueden haber sido afectados por la inactivación con una radiación de UV, lo que explica la diferencia en cuanto la respuesta a anticuerpos VN entre unos animales que son vacunados con el PRRSV inactivado con UV o con BEI. Por lo tanto, un análisis de las proteínas virales por medio del análisis por transferencia de bórñon Western puede ser útil como un control cualitativo suplementario del PRRSV inactivado, por añadidura a un análisis de la internalización en PAM.

Unos anticuerpos VN pueden bloquear por completo a una infección con el PRRSV de unos PAM *in vitro* (Delputte P.L., y colaboradores, 2004), pero el cometido de estos anticuerpos en una protección *in vivo* contra el PRRSV es una cuestión de debate (recopilado por (Lopez O.J. y Osorio F.A., 2004)). Se ha mostrado que una viremia después de la infección puede ser despejada en ausencia de unos niveles detectables de anticuerpos VN en suero y de lo contrario una viremia puede algunas veces persistir a pesar de la presencia de anticuerpos VN. Por otro lado, Labarque y colaboradores mostraron que el despeje de virus desde los pulmones y el suero coincide con la aparición de anticuerpos VN en el suero y en un fluido de lavado bronquio-alveolar (Labarque y colaboradores, 2003). Por lo demás, unos experimentos en los que se realiza una transferencia pasiva de anticuerpos VN antes de una infección con el PRRSV muestran que estos anticuerpos pueden proteger completamente a unos cerdos contra una viremia y un fracaso reproductivo (Lopez O.J. y colaboradores, 2007). Estos datos indican que aunque otro mecanismo puede estar implicado en una protección contra el PRRSV, la presencia de cantidades suficientes de anticuerpos VN contribuye a un despeje de la viremia, puede proteger contra un fracaso reproductivo e incluso puede ser suficiente para impedir la infección.

En nuestro estudio, el virus fue despejado a partir de la sangre en animales testigos con adyuvante entre las dos y las cuatro semanas después de la infección cuando casi no estaba presente ningún anticuerpo VN, indicando que el despeje viral en este grupo tuvo lugar de una manera que era independiente de los anticuerpos. Unos animales que fueron vacunados con la vacuna de PRRSV inactivada comercial tampoco desarrollaban de una manera consistente anticuerpos VN después de la infección aunque se observó una reducción en la viremia en comparación con animales testigos. Piras y colaboradores, mostraron recientemente que la vacuna comercial que se usó en nuestro estudio puede inducir una respuesta al IFN- γ que es específica para el virus y que puede contribuir al despeje viral (Piras F.S. y colaboradores, 2005). Otro estudio, sin embargo, mostró que una mayoría de las respuestas al IFN- γ inducida por esta vacuna no son específicas para el PRRSV y son inducidas probablemente por un componente no viral de la vacuna (Zuckermann F.A., y colaboradores, 2007). Por añadidura, también aparece una respuesta espontánea a la IL-10 después de una vacunación con esta vacuna, que puede contrarrestar el efecto protector del IFN- γ (Zuckermann F.A., y colaboradores, 2007). Por lo tanto, la reducción en la viremia que nosotros podríamos detectar en unos animales que habían sido vacunados con la vacuna inactivada comercial es probablemente el resultado de una respuesta al IFN- γ que es específica para el virus. En contraste con ello, el temprano declive en los títulos de virus que se observaron en unos animales que habían sido vacunados con el virus inactivado con UV o con BEI se correlacionaba con la aparición de anticuerpos VN comenzando a partir de los 10 días después de la infección. El área bajo la curva (AUC) de la viremia (en $\log_{10}$ TCID₅₀/ml) se calculó como una medida de la carga viral total en un suero durante todo el período de tiempo que duró la viremia y que el AUC se redujo significativamente para todos los grupos vacunados en comparación con el grupo testigo con adyuvante. La fuerte reducción en el AUC se observó para el grupo de animales que habían sido vacunados con el virus inactivado con BEI que es también el grupo en donde hemos observado el cebado más fuerte de anticuerpos VN.

Hemos examinado la eficacia de dos vacunas de PRRSV inactivadas experimentales, basándonos en unos métodos de activación que han sido optimizados, basándonos en un nuevo ensayo cualitativo para epítomos neutralizadores. Hemos mostrado que una vacunación de cerdos ingenuos con el PRRSV inactivado con UV o con BEI cebaban fuertemente la respuesta a anticuerpos VN y daban como resultado una reducción de la viremia después de la infección, dependiente de los anticuerpos, que era más fuerte que la inducida por una vacuna de PRRSV inactivada comercial.

Referencias

Alderson, T. (1964). "El mecanismo de mutagénesis inducida por formaldehído. La reacción de monohidroximetilación del formaldehído con el ácido adenílico como la condición necesaria y suficiente para la mediación de la actividad mutagénica del formaldehído". *Mutat Res* **106**: 77-85.

Bahnemann, H. G. 1990. "Inactivación de antígenos virales para la preparación de vacunas con referencia particular a la aplicación de la etilenimina binaria". *Vaccine* **8**:299-303.

Berhane, Y., J. D. Berry, C. Ranadheera, P. Marszal, B. Nicolas, X. Yuan, M. Czub y H. Weingartl (2006). "Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra el virus Nipah inactivado con etilenimina binaria". *J Virol Methods* **132**(1-2): 59-68.

Broo, K., J. Wei, D. Marshall, F. Brown, T. J. Smith, J. E. Johnson, A. Schneemann y G. Siuzdak (2001). "Movilidad de la cápside viral: un conducto dinámico para una inactivación". *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2274-7.

Chertova, E., B. J. Crise, D. R. Morcock, J. W. Bess, Jr., L. E. Henderson y J. D. Lifson (2003). "Sitios, mecanismo de acción y falta de reversibilidad de la inactivación de los lentivirus de primates por una modificación covalente preferente de proteínas internas de viriones". *Curr Mol Mod* **3**(3): 265-72.

Cheung, D. T. y M. E. Nimni (1982). "Mecanismo de reticulación de proteínas por el glutaraldehído II. Reacción con colágeno monomérico y polimérico". *Connect Tissue Res* **10**(2): 201-16.

Darnell, M. E., K. Subbarao, S. M. Feinstone y D. R. Taylor (2004). "Inactivación del coronavirus que induce un grave síndrome respiratorio agudo, SARS-CoV". *J Virol Methods* **121**(1): 85-91".

Delputte, P. L., P. Meerts, S. Costers y H. J. Nauwynck (2004). "Efecto de anticuerpos específicos para el virus sobre la fijación, la internalización y infección del virus del síndrome reproductivo y respiratorio de porcino en macrófagos primarios". *Vet Immunol Immunopathol* **102**(3): 179-88.

Delputte, P.L., S. Costers, H.J. Nauwynck. (2005) "Análisis de la fijación y la internalización del virus del síndrome reproductivo y respiratorio de porcino: cometidos distintivos para el sulfato de heparano y la sialoadhesina." *J Gen Virol* **86**(Pt 5):1441-5.

- Dewey, C. E., S. Wilson, P. Buck y J. K. Leyenaar** (1999). "El rendimiento reproductivo de unas cerdas después de una vacunación contra el PRRS depende del estadio de gestación". *Prev Vet Med* **40**(3-4): 233-41.
- Feron, V. J., H. P. Til, F. de Vrijer, R. A. Woutersen, F. R. Cassee y P. J. van Bladeren** (1991). "Aldehídos: aparición, potencial carcinogénico, mecanismo de acción y comprobación del riesgo". *Mutat Res* **259**(3-4): 363-85.
- 5 **Fraenkel-Conrat, H.** (1954). "Reacción de un ácido nucleico con el formaldehído". *Biochim Biophys Acta* **15**(2): 307-9.
- Gates, K. S., T. Nooner y S. Dutta** (2004). "Reacciones químicas biológicamente relevantes de residuos de N7-alquilguanina en un ADN". *Chem Res Toxicol* **17**(7): 839-56.
- 10 **Grieb, T., R. Y. Forng, R. Brown, T. Owolabi, E. Maddox, A. McBain, W. N. Drohan, D. M. Mann y W. H. Burgess** (2002). "Uso efectivo de una erradicación con rayos gamma para la inactivación con patógenos de preparaciones de anticuerpos monoclonales". *Biologicals* **30**(3): 207
- Kuykendall, J. R. y M. S. Bogdanffy** (1992). "Eficiencia de una reticulación con ADN-histona que ha sido inducida por aldehídos saturados e insaturados in vitro". *Mutat Res* **283**(2): 131-6.
- 15 **Labarque, G. G., H. J. Nauwynck, K. Van Reeth, y M. B. Pensaert.** 2000. Efecto de cambios celulares y del comienzo de la inmunidad humoral sobre la replicación del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino en los pulmones de cerdos. *J Gen Virol* **81**:1327-34.
- Labarque, G., S. Van Gucht, K. Van Reeth, H. Nauwynck, y M. Pensaert.** 2003. Protección del tracto respiratorio después de un desafío de cerdos vacunados con unas vacunas del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino atenuado. *Vet Microbiol* **95**:187-97.
- 20 **Lelie, P. N., H. W. Reesink y C. J. Lucas** (1987). "Inactivación de 12 virus por medio de unas etapas de calentamiento aplicadas durante la producción de una vacuna contra la hepatitis B." *J Med Virol* **23**(3): 297-301.
- Lopez, O. J., y F. A. Osorio.** 2004. Cometido de anticuerpos neutralizadores en una inmunidad protectora con el PRRSV. *Vet Immunol Immunopathol* **102**:155-63.
- 25 **Lopez; O. J., M. F. Oliveira, E. A. Garcia, B. J. Kwon, A. Doster, y F. A. Osorio.** 2007. La protección contra una infección causada por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) mediante una transferencia pasiva de anticuerpos neutralizadores del PRRSV es dependiente de la dosis. *Clin Vaccine Immunol* **14**:269-75.
- Ma, T. H. y M. M. Harris** (1988). "Recopilación de la genotoxicidad con el formaldehído". *Mutat Res* **196**(1): 37-59.
- Maheshwari, G., R. Jannat, L. McCormick y D. Hsu** (2004). "Inactivación térmica de un adenovirus del tipo 5". *J Virol Methods* **118**(2): 141-6.
- 30 **Meng, X. J.** (2000). Heterogeneidad del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, implicaciones para la eficacia de vacunas actuales y para el desarrollo de vacunas futuras". *Vet Microbiol* **74**(4): 309-29.
- Meulenbergh, J. J., A. Petersen-den Besten, E. P. De Kluyver, R. J. Moormann, W. M. Schaaper y G. Wensvoort** (1995). "Caracterización de proteínas codificadas por los ORFs 2 hasta 7 del virus de Lelystad". *Virology* **206**(1): 155-63."
- 35 **Meulenbergh, J. J., A. P. van Nieuwstadt, A. van Essen-Zandbergen y J. P. Langeveld** (1997). "Tratamiento e identificación posterior a la traducción de un dominio de neutralización de la proteína GP4 codificada por el ORF4 del virus de Lelystad". *J Virol* **71**(8): 6061-7.
- Miller, R. L. y P. G. Plagemann** (1974). "Efecto de la luz ultravioleta sobre los mengovirus: formación de dímeros de uracilo, inestabilidad y degradación de la cápside y enlace covalente de una proteína con un ARN viral". *J Virol* **13**(3): 729-39.
- 40 **Mondal, S. K., M. Neelima, K. Seetha Rama Reddy, K. Ananda Rao y V. A. Srinivasan** (2005). "Validación de la etilenimina binaria inactivadora para inactivar al virus de la rabia para la producción de vacunas veterinarias contra la rabia". *Biologicals* **33**(3): 185-9.
- 45 **Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., Nielsen, T. L., J. Nielsen, P. Have, P. Baekbo, R. Hoff-Jorgensen y A. Botner** (1997). "Examen del derramamiento de virus en

- un semen procedente de verracos vacunados y de otros previamente infectados después de un desafío experimental con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino". *Vet Microbiol* **54**(2): 101-12.
- 5 **Nilubol, D., K. B. Platt, P. G. Halbur, M. Torremorell y D. L. Harris** (2004). "El efecto de un tratamiento con una vacuna del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) vivo sobre el derrame de virus en unos cerdos previamente infectados con el PRRSV". *Vet Microbiol* **102**(1-2): 11- 8.
- Permana, P. A. y R. M. Snapka** (1994). "Unas reticulaciones de un ADN proteínico inducidas por aldehídos rompen estadios específicos de una replicación del ADN del SV40". *Carcinogenesis* **15**(5): 1031-6.
- 10 **Piras, F., S. Bollard, F. Laval, F. Joisel, G. Reynaud, C. Charreyre, C. Andreoni, y V. Juillard**. 2005. Respuestas de células T (+) frente al interferón gamma que son específicas para el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) después de una infección causada por el virus del PRRS o de una vacunación con una vacuna contra el PRRS inactivada. *Viral Immunol* **18**:381-9.
- Plagemann, P. G. 8 Moennig, V.** (1992). Virus elevador de la lactato deshidrogenasa, virus de la arteritis equina, y virus de la fiebre hemorragia de simios: un nuevo grupo de virus de ARN de hebras positivas. *Adv Virus Res* **41**, 99-192.
- 15 **Rodriguez, M. J., J. Sarraseca, J. Fominaya, E. Cortes, A. Sanz y J. I. Casal** (2001). "Identificación de un epítipo inmunodominante en el terminal de C de la glicoproteína 5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino". *J Gen Virol* **82**(Pt 5): 995-9.
- 20 **Rossio, J. L., M. T. Esser, K. Suryanarayana, D. K. Schneider, J. W. Bess, Jr., G. M. Vasquez, T. A. Wiltout, E. Chertova, M. K. Grimes, Q. Sattentau, L. O. Arthur, L. E. Henderson y J. D. Lifson** (1998). "Inactivación de la ineficacia del virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1 con conservación de la integridad conformacional y funcional de proteínas de la superficie de viriones". *J Virol* **72**(10): 7992-8001.
- Rossow, K. D.** (1998). "Síndrome reproductivo y respiratorio porcino". *Vet Pathol* **35**(1): 1-20
- Schlegel, A., A. Immelmann y C. Kempf** (2001). "Inactivación de virus de proteínas derivadas de plasma por pasterización en la presencia del hidrocloreto de guanidina." *Transfusion* **41**(3): 382-9.
- 25 **Sinha, R. P. y D. P. Hader** (2002). "Daño y reparación de un ADN, que se han inducido por UV: una recopilación". *Photochem Photobiol Sci* **1**(4): 225-36.
- Subasinghe, H. A. y P. C. Loh** (1972). "Citotoxicidad de los reovirus: algunas propiedades de los reovirus irradiados con UV y sus proteínas de la cápside". *Arch Gesamte Virusforsch* **39**(1): 172-89.
- 30 **Sur, J. H., Doster, A. R., Christian, J. S., Galeota, J. A., Wills, R. W., Zimmerman, J. J. & Osorio, F. A.** (1997). El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino se replica en células germinales testiculares, altera a la espermatogénesis, e induce la muerte de células germinales por apoptosis. *J Virol* **71**, 9170-9179.
- Vanderheijden, N., P. L. Delputte, H. W. Favoreel, J. Vandekerckhove, J. Van Damme, P. A. van Woensel y H. J. Nauwynck** (2003). "Implicación de la sialoadhesina en la entrada del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino dentro de macrófagos alveolares porcinos". *J Virol* **77**(15): 8207-15.
- 35 **Weismiller, D. G., L. S. Sturman, M. J. Buchmeier, J. O. Fleming y K. V. Holmes** (1990). "Anticuerpos monoclonales para la glicoproteína peplómera del virus de la hepatitis de ratón con coronavirus identifican dos subunidades y detectan un cambio conformacional en la subunidad liberada en condiciones alcalinas débiles". *J Virol* **64**(6): 3051-5.
- 40 **Wensvoort, G., C. Terpstra, J. M. Pol, E. A. ter Laak, M. Bloemraad, E. P. de Kluyver, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, F. Wagenaar y colaboradores** (1991). "La enfermedad misteriosa de los cerdos en los Países Bajos: el aislamiento del virus de Lelystad." *Vet Q* **13**(3): 121-30.
- 45 **Wieczorek-Krohmer, M., F. Weiland, K. Conzelmann, D. Kohl, N. Visser, P. van Woensel, H. J. Thiel y E. Weiland** (1996). "El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): unos anticuerpos monoclonales detectan epítopos comunes en dos proteínas virales de materiales aislados en Europa y en los EE.UU". *Vet Microbiol* **51**(3-4): 257-66.

Yoon, I. J., H. S. Joo, S. M. Goyal, y T. W. Molitor. 1994. Un ensayo de neutralización de un suero modificado para la detección de un anticuerpo contra el virus del síndrome reproductivo y porcino en sueros de cerdos. *J Vet Diagn Invest* **6**:289-92.

5 **Yoon, K. J., J. J. Zimmerman, S. L. Swenson, M. J. McGinley, K. A. Eernisse, A. Brevik, L. L. Rhinehart, M. L. Frey, H. T. Hill y K. B. Platt** (1995). "Caracterización de la respuesta inmunitaria humoral a una infección con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS)". *J Vet Diagn Invest* **7**(3): 305-12.

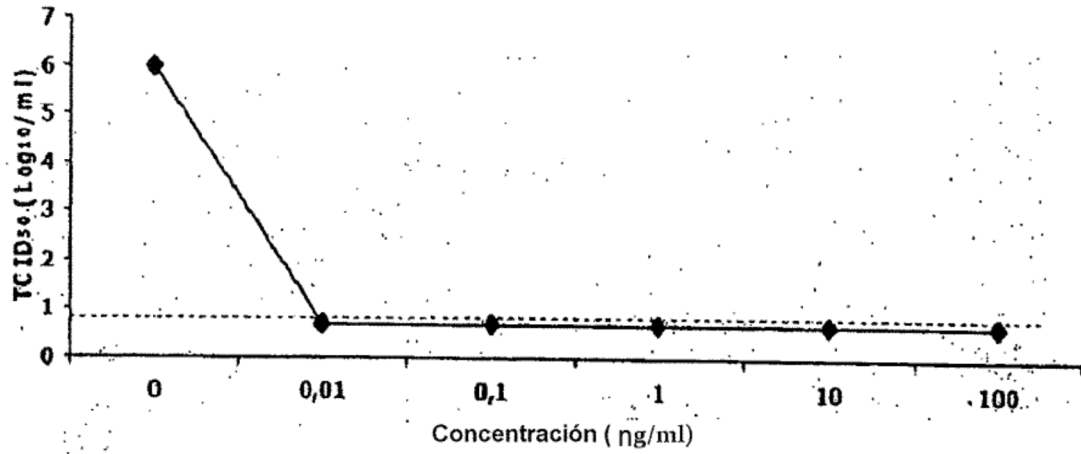
10 **Zuckermann, F. A., E. A. Garcia, I. D. Luque, J. Christopher-Hennings, A. Doster, M. Brito, y F. Osorio.** 2007. Evaluación de la eficacia de unas vacunas del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) basadas en el desarrollo de una respuesta serológica, la frecuencia de células productoras de IFN gamma y parámetros virológicos de protección después de un desafío. *Vet Microbiol* **123**:69-85.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la antigenicidad de un virus inactivado en el que el virus inactivado es un virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) u otro miembro de la familia de los Arteriviridae o del orden de los Nidovirales, comprendiendo dicho método:
 - 5 - poner en contacto una célula anfitriona que expresa por lo menos una de las sustancias CD163 y sialoadhesina con el virus inactivado que se ha de ensayar; y
 - determinar la fijación a y la internalización dentro de la célula anfitriona de dicho virus inactivado; en el que la capacidad de dicho virus inactivado para fijarse a y/o entrar en la anfitriona, es indicativa de la antigenicidad de dicho virus inactivado.
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula anfitriona se selecciona entre el conjunto que se compone de macrófagos, monocitos, células dendríticas, granulocitos, células anfitrionas recombinantes y células de riñón de mono verde africano.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la célula anfitriona es una célula anfitriona recombinante que consiste en macrófagos alveolares o células de Ovario de Hámster Chino (CHO) que expresan sialoadhesina; o
- 15 de células de CHO que expresan sialoadhesina y CD163.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 en el que la fijación y/o la internalización se determinan usando unos métodos de visualización directa o indirecta.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el método de visualización directa es un método inmunológico que comprende unos anticuerpos que son específicos para el virus.
- 20 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dichos anticuerpos son específicos para ciertas proteínas estructurales del virus inactivado.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que las proteínas estructurales se seleccionan entre glicoproteínas o proteínas de la cápside que son específicas para el virus.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las proteínas estructurales se seleccionan entre el
- 25 conjunto que se compone de las proteínas virales, GP2a (ORF2a), E (ORF2b), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4), GP5 (ORF5), M (ORF6) y N (ORF7).
9. Un método para determinar el efecto de un proceso de inactivación de virus sobre la antigenicidad del virus inactivado que se ha obtenido de esta manera, comprendiendo dicho método:
 - 30 - inactivar al virus con el proceso de inactivación que se ha de ensayar, y
 - determinar la antigenicidad del virus inactivado que se ha obtenido de esta manera usando un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 8; en el que un proceso capaz de inactivar a los virus sin afectar a la capacidad del virus inactivado de esta manera para fijarse y/o entrar en la anfitriona, es indicativo de un proceso de inactivación que proporciona un virus inactivado inmunogénico.
- 35 10. Un método para identificar compuestos antivirales contra los Arteriviridae o Nidovirales, comprendiendo dicho método: poner en contacto una célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 2, con un virus inactivado, en el que el virus inactivado es un virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) u otro miembro de la familia de los Arteriviridae o el orden de los Nidovirales, en la presencia y en la ausencia de un compuesto que se ha de ensayar; y determinar la capacidad de dicho compuesto para prevenir o reducir la fijación y/o la internalización de dicho virus inactivado en dicha anfitriona; en el que un compuesto capaz de prevenir o reducir la fijación y/o la
- 40 internalización de dicho virus inactivado es identificado como un compuesto antiviral.
11. El uso de un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 10.

Fig.1

Curva de inactivación con formaldehído



Curva de inactivación con AT-2

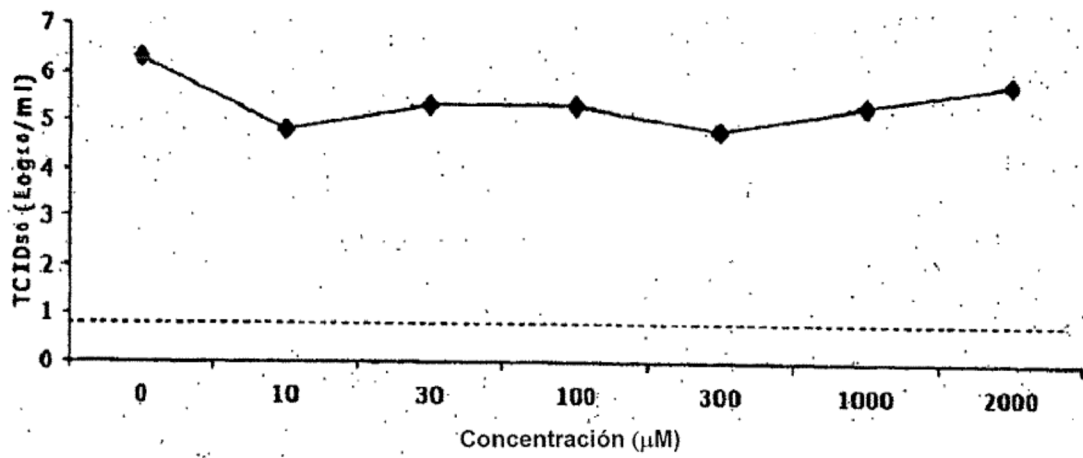
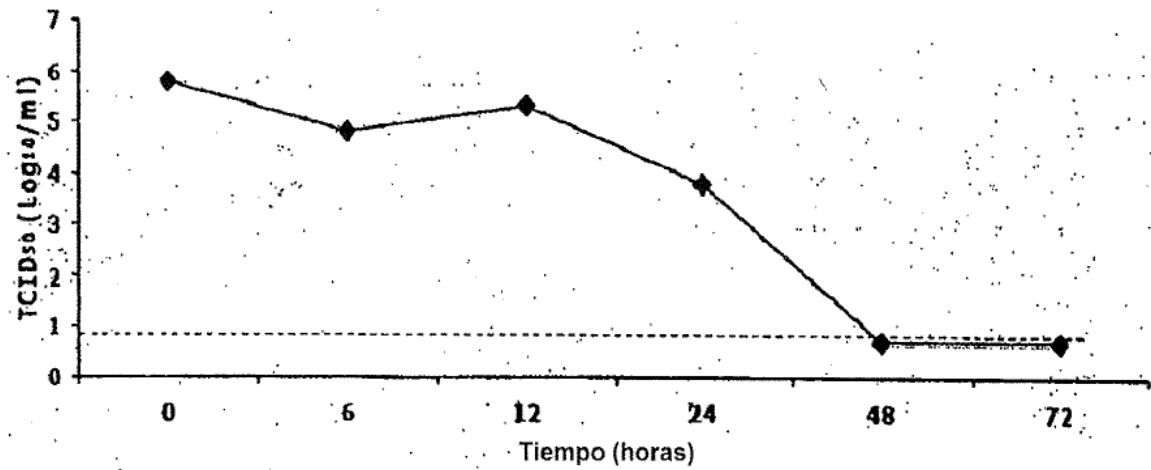


Fig 1 Cont.

Curva de inactivación a 37°C



Curva de inactivación con UV

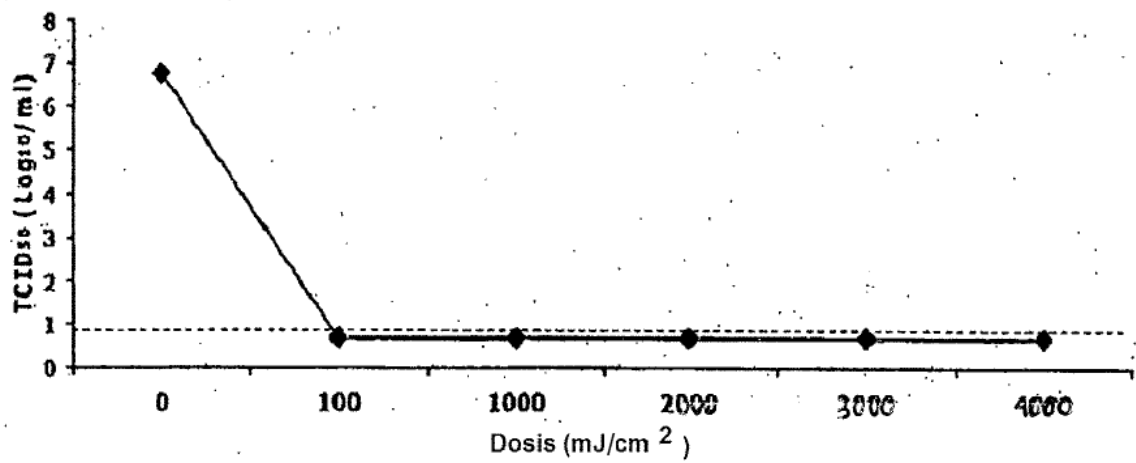
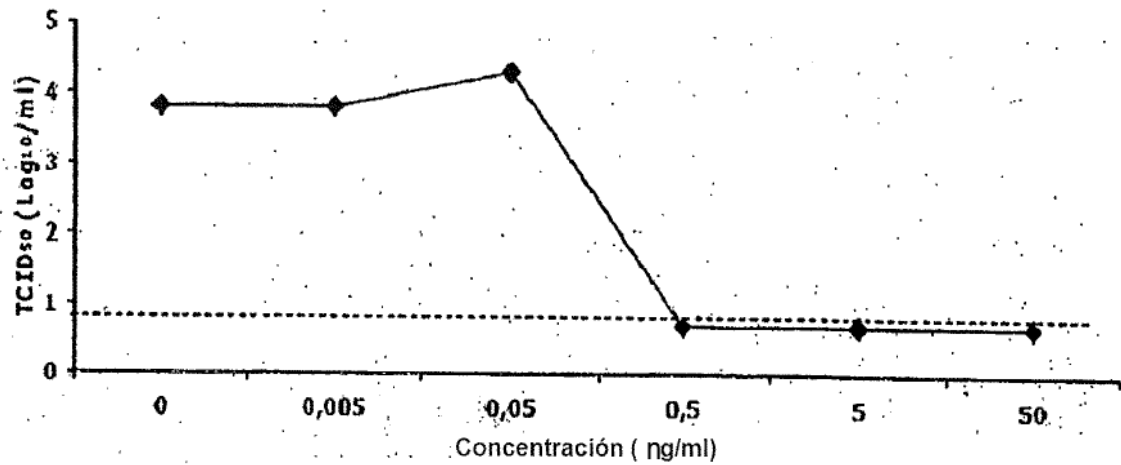


Fig 1 Cont.

Curva de inactivación con glutaraldehído



Curva de inactivación con un pH de 2

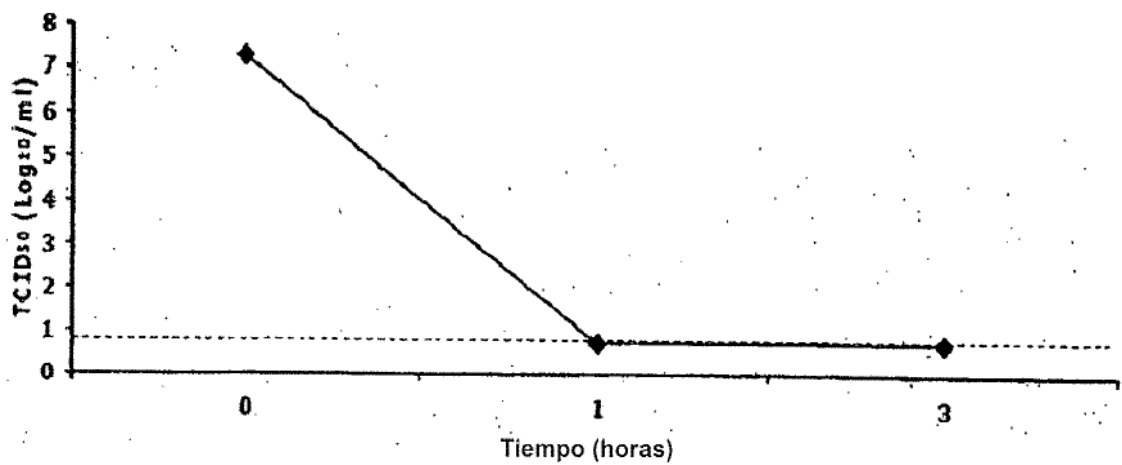
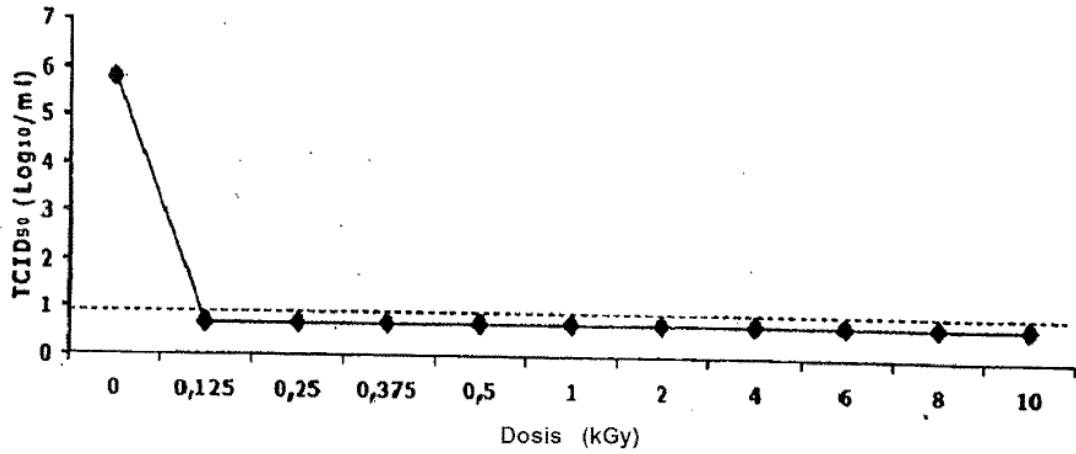


Fig 1 Cont.

Curva de inactivación por irradiación con rayos gamma



Curva de inactivación con la BEI

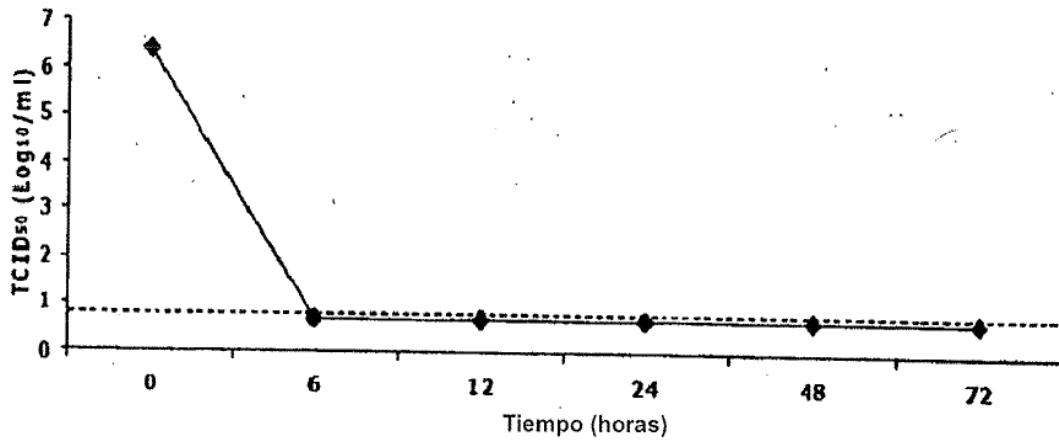


Fig. 2

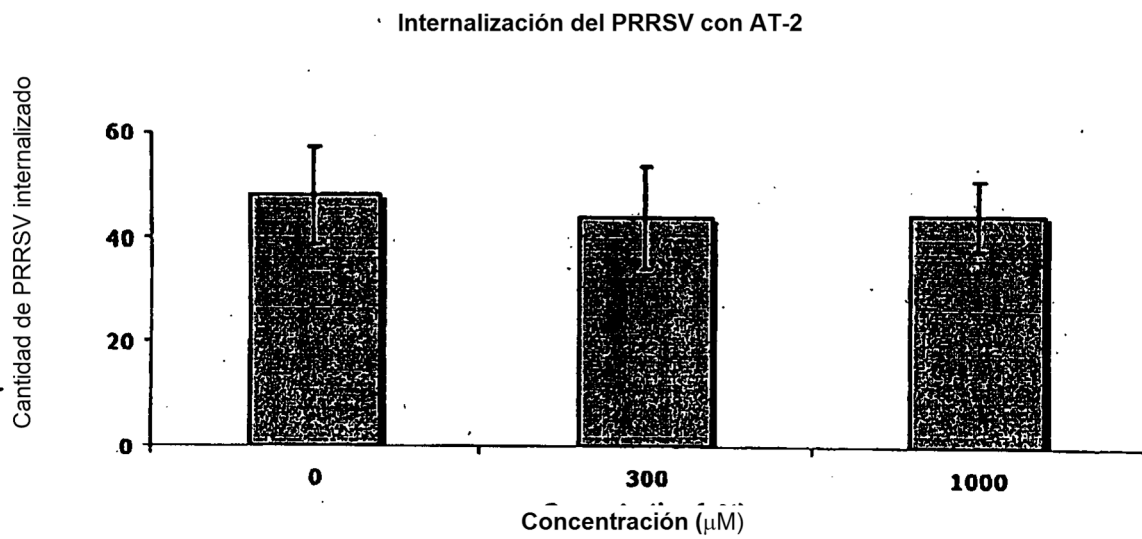
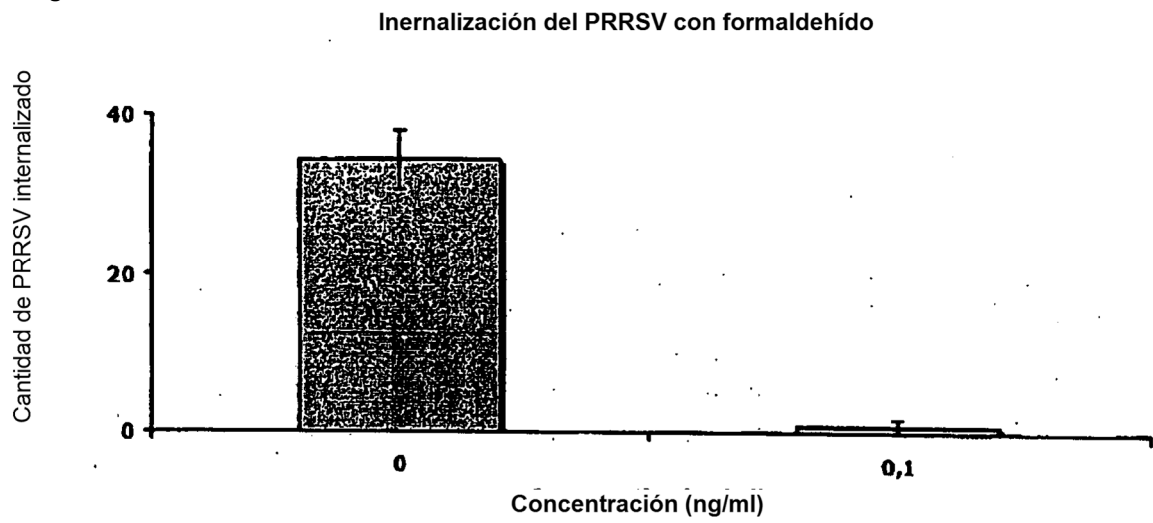


Fig 2 Cont.

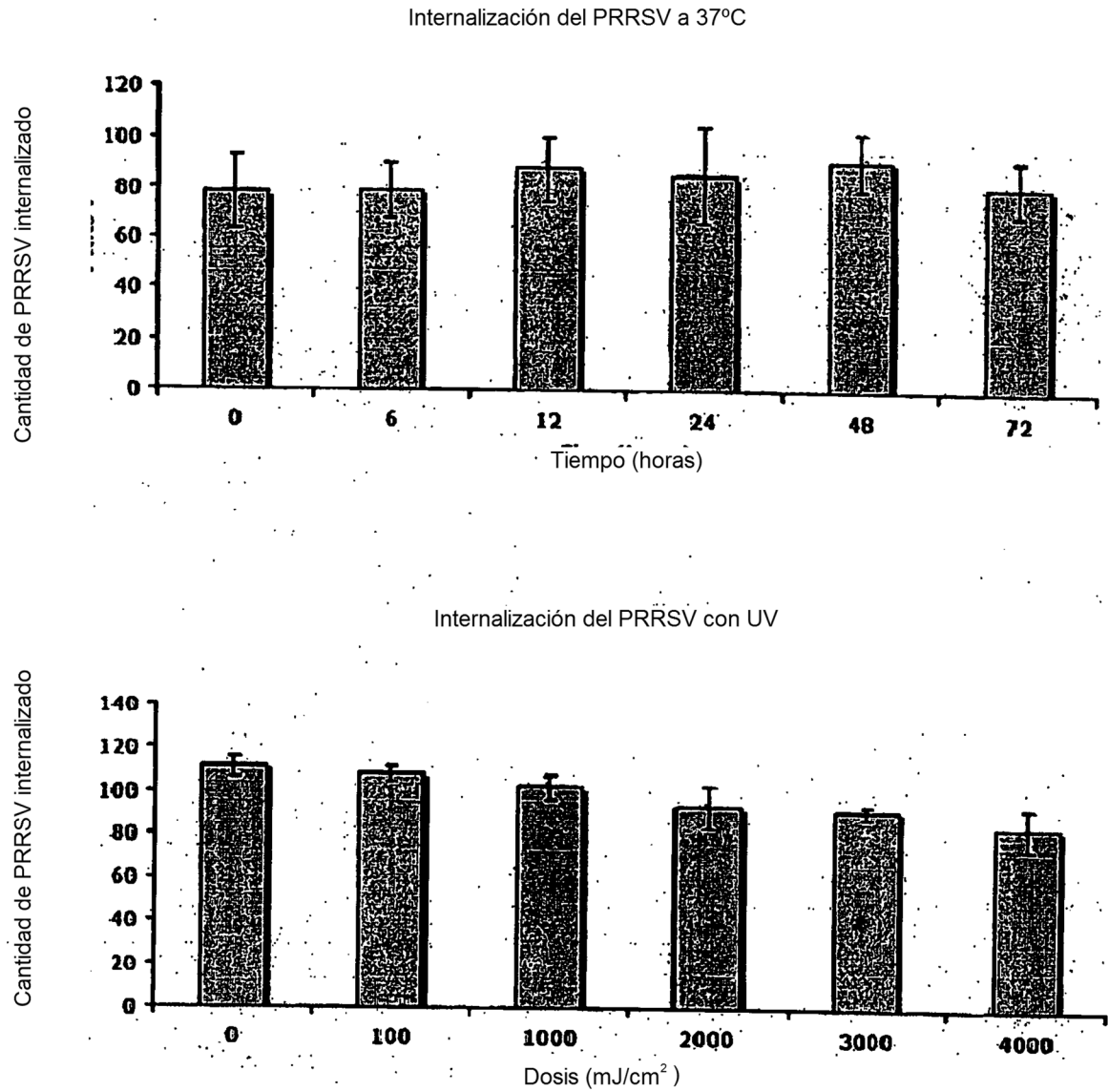
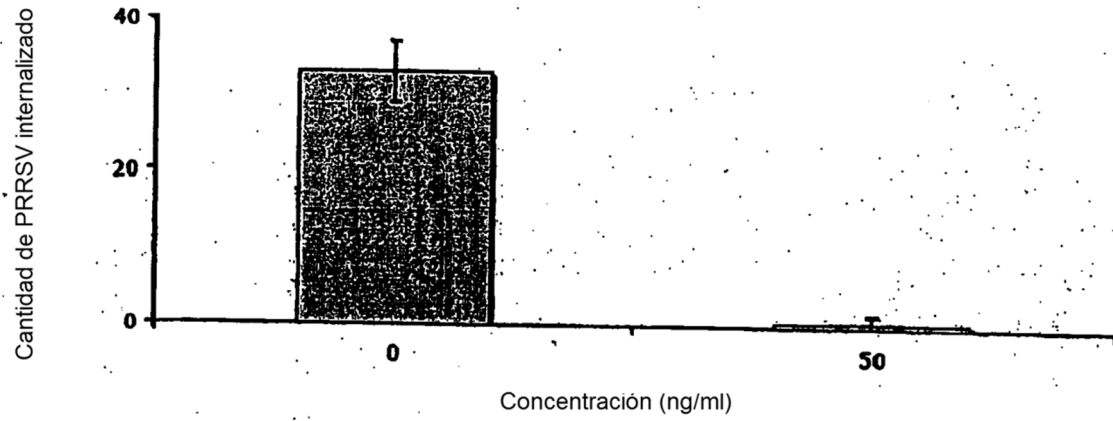


Fig 2 Cont.

Internalización del PRRSV con glutaraldehído



Internalización del PRRSV a un pH de 2

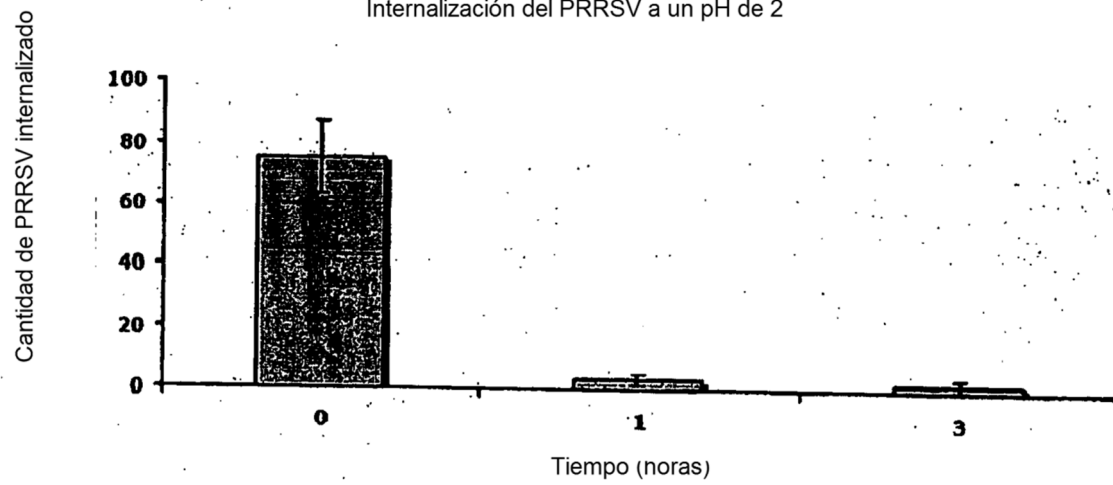
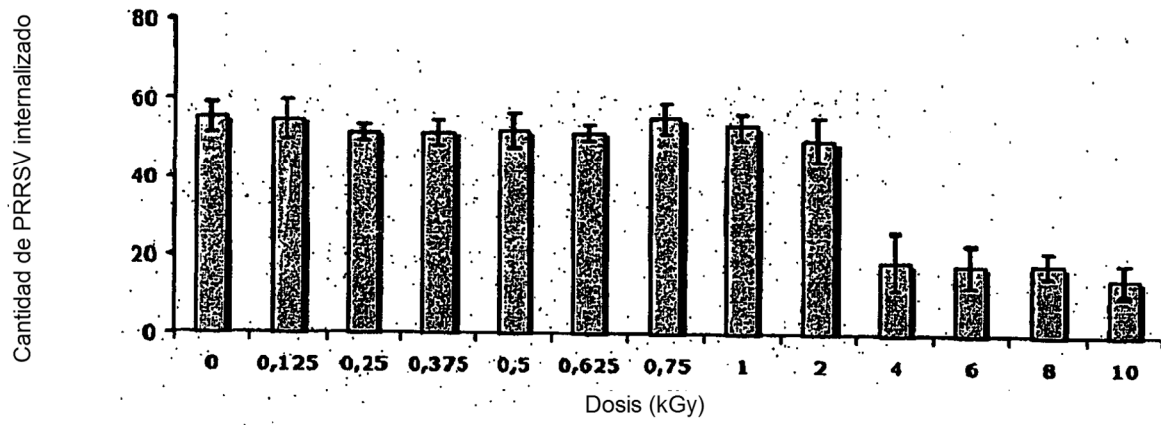


Fig 2 Cont.

Internalización del PRRSV por irradiación con rayos gamma



Internalización del PRRSV con la BEI

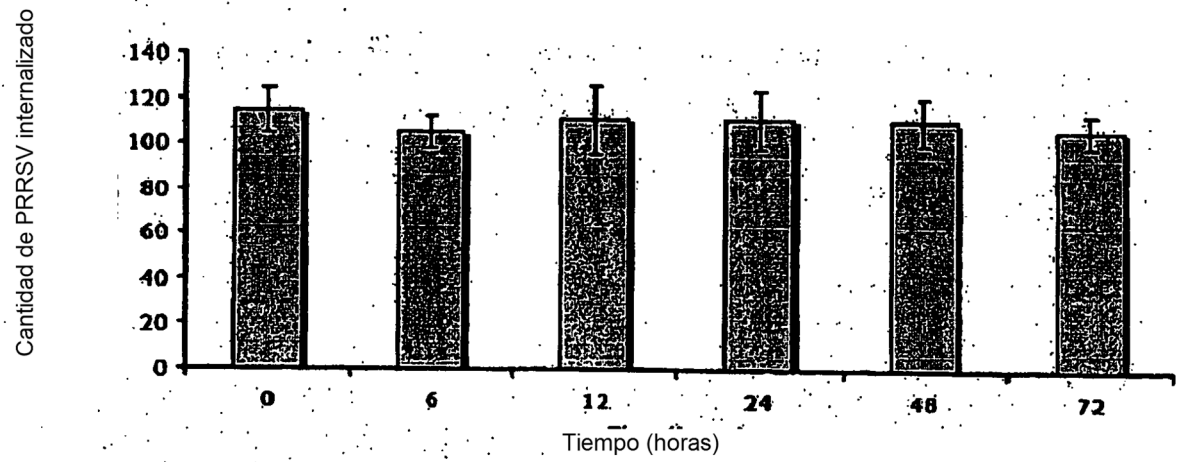


Fig.3A

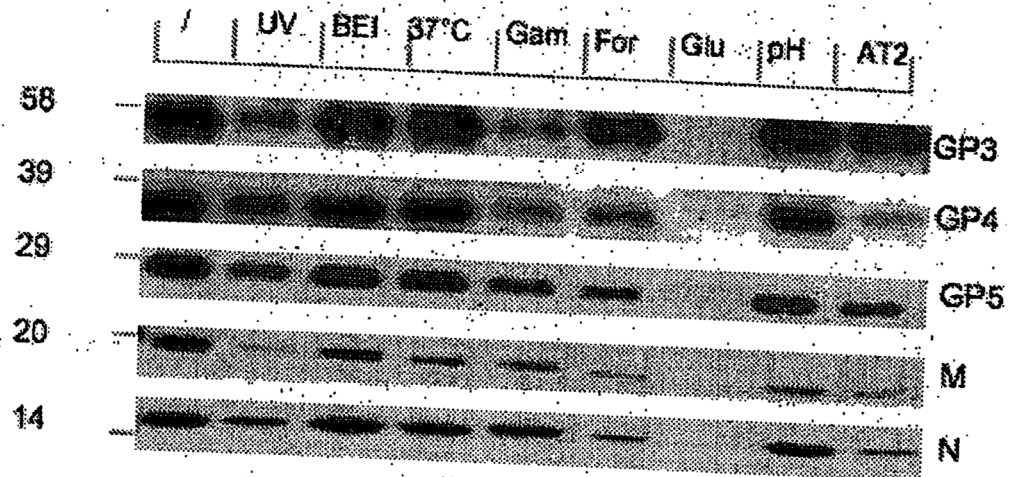


Fig.3B

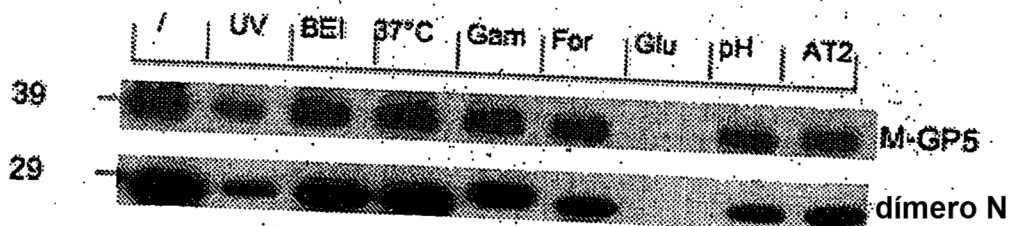


Fig.4

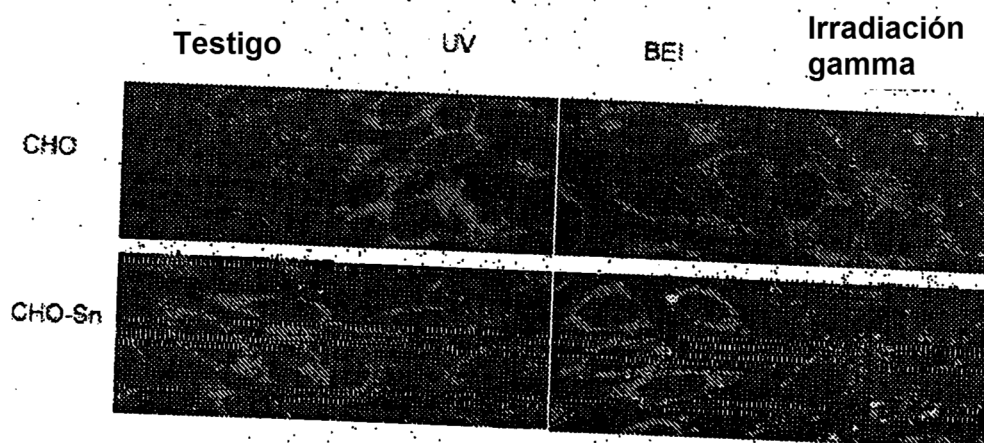


Fig.5

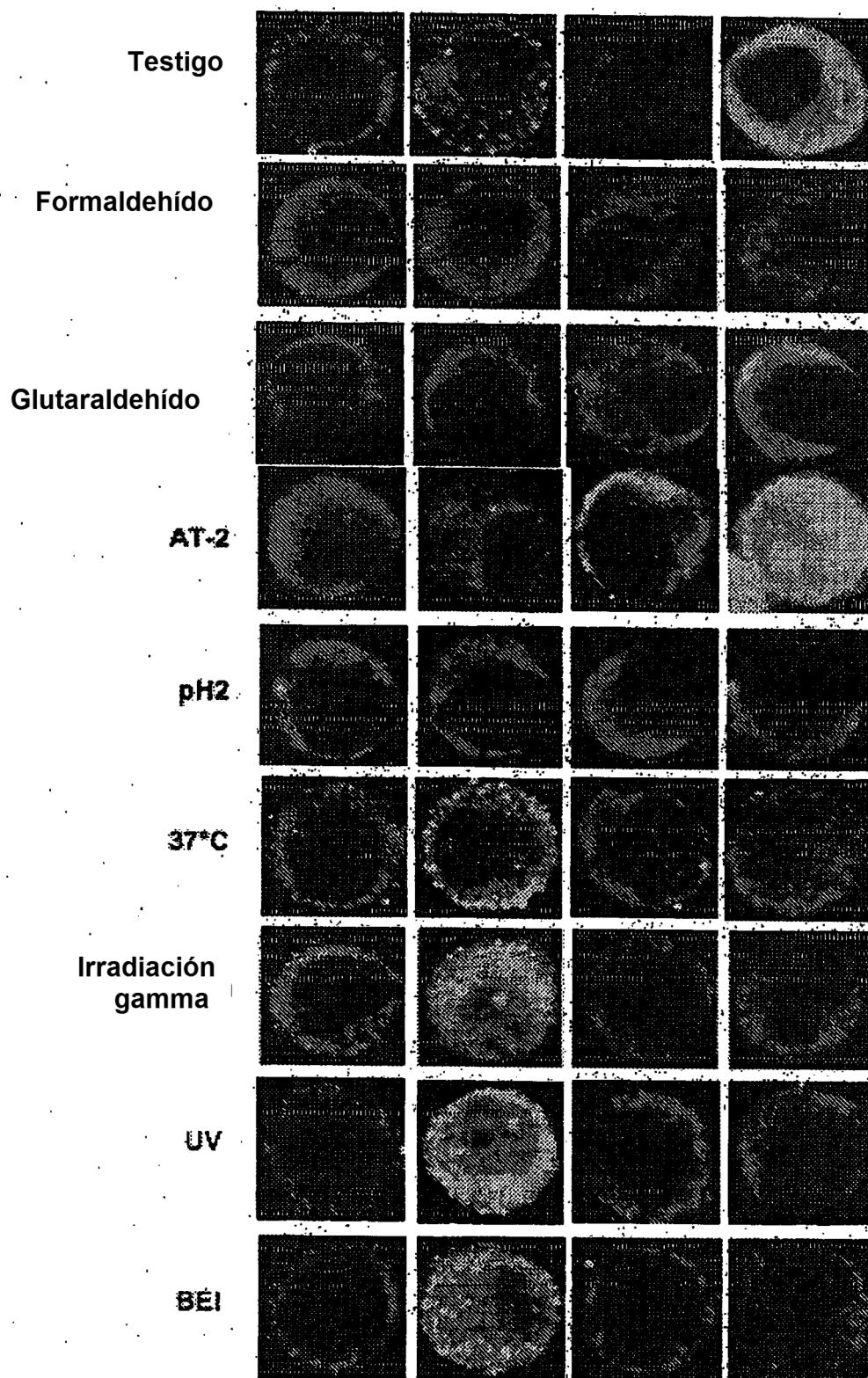


Fig.6

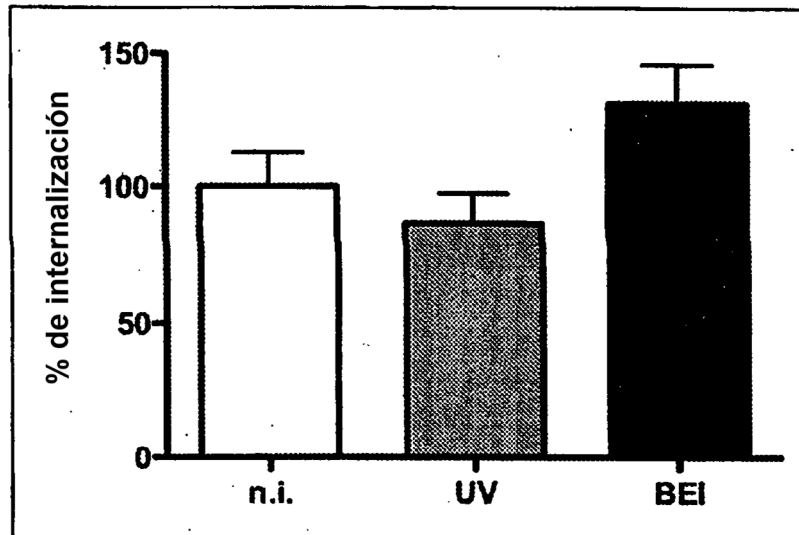
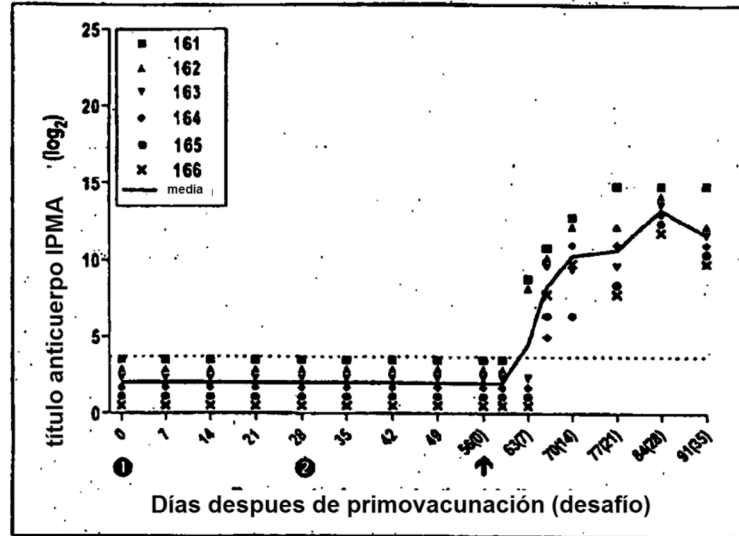


Fig.7

Grupo A



Grupo B

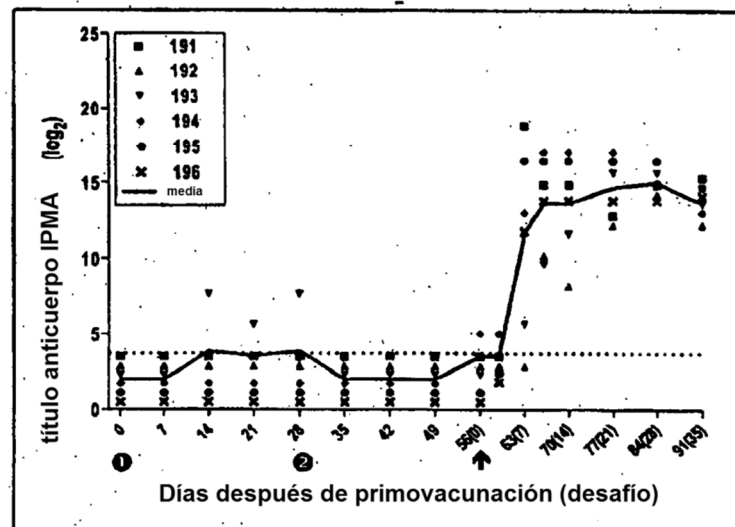
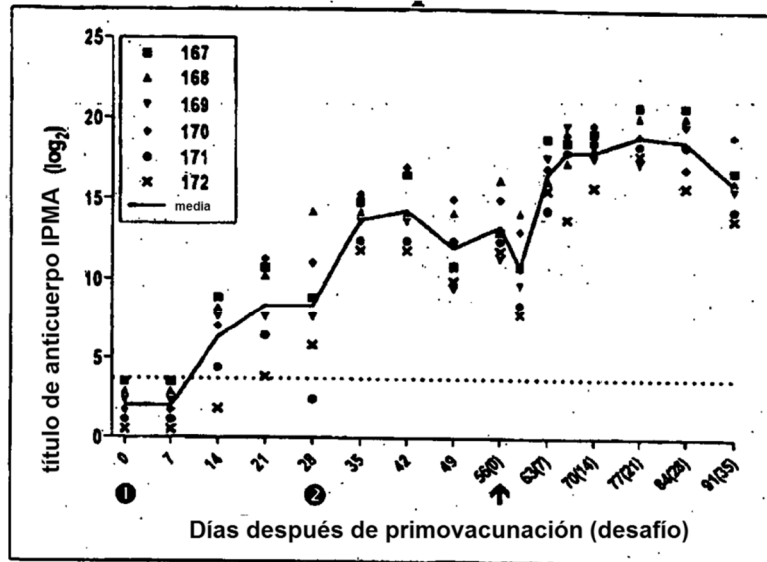


Fig. 7 Cont.

Grupo C



Grupo D

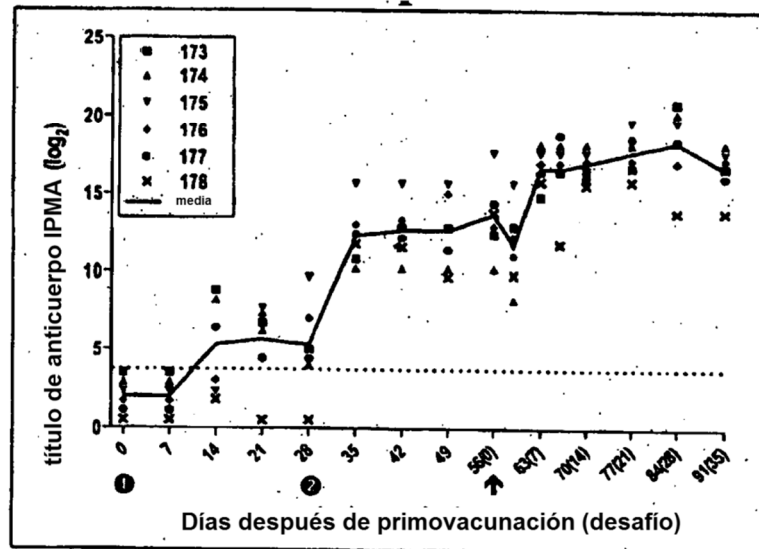
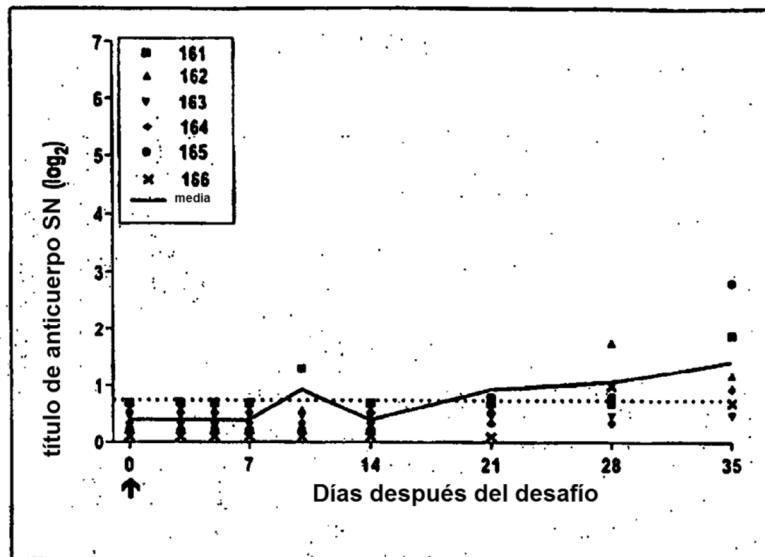


Fig.8

Grupo A



Grupo B

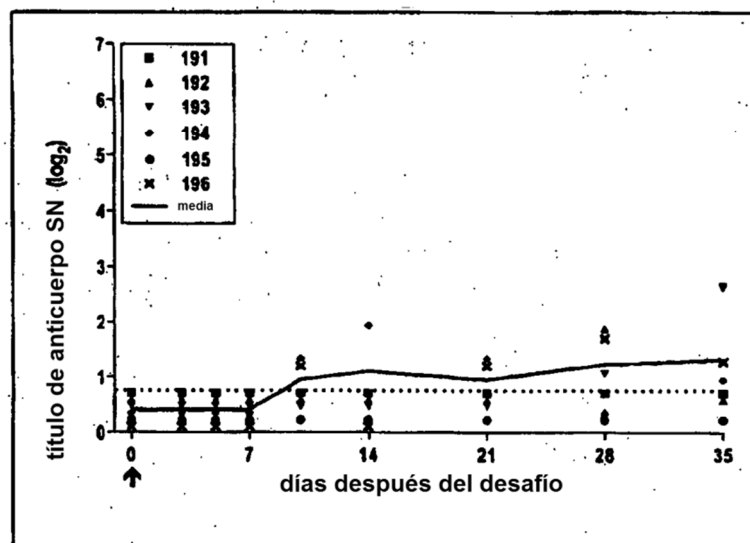
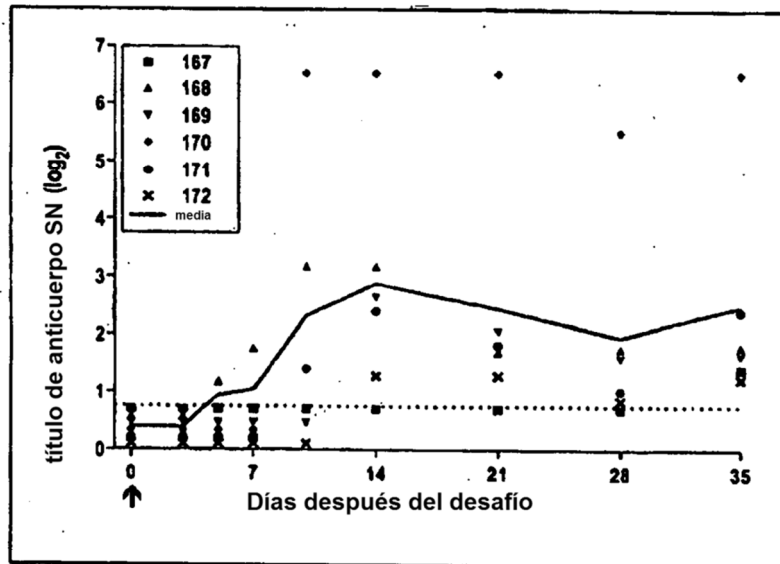


Fig. 8 Cont.

Grupo C



Grupo D

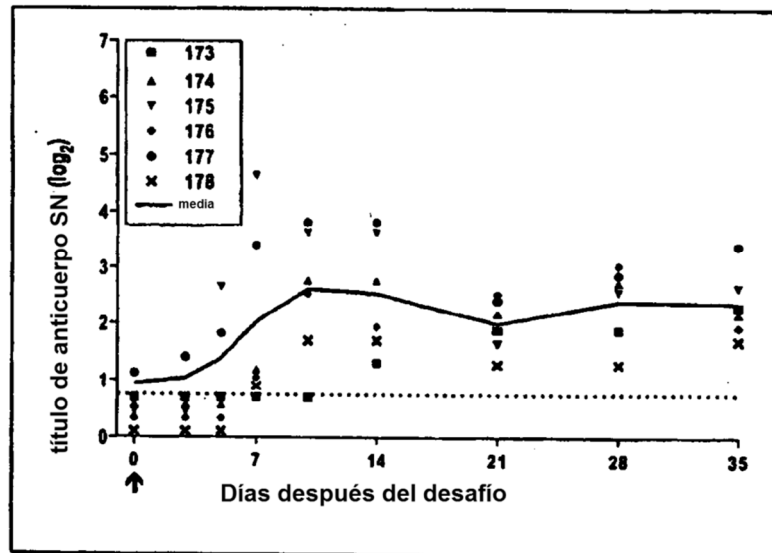
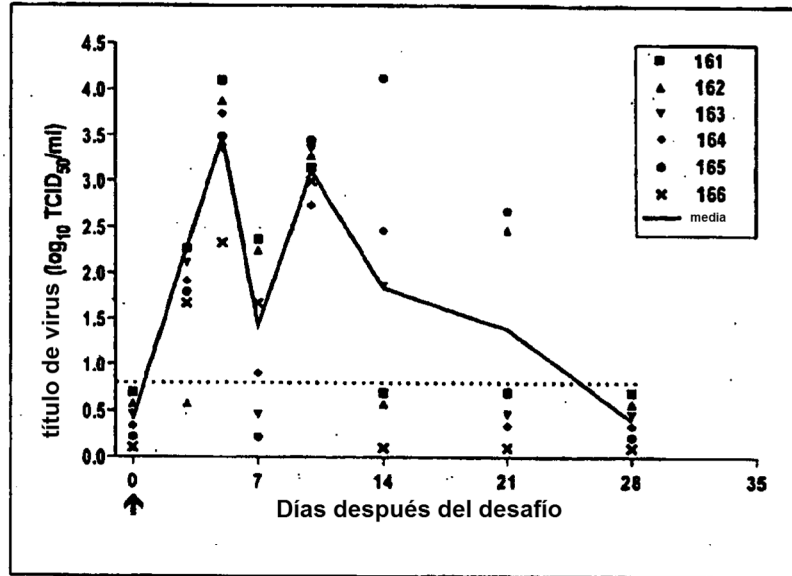


Fig.9

Grupo A



Grupo B

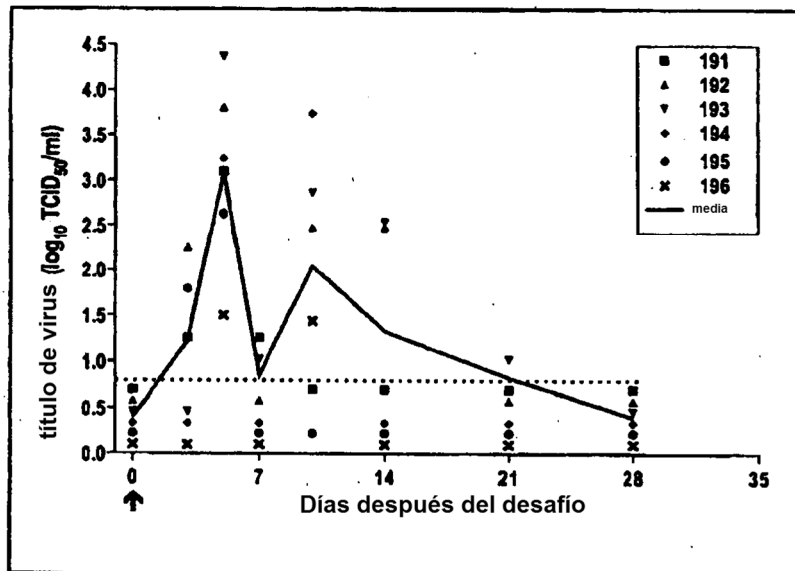
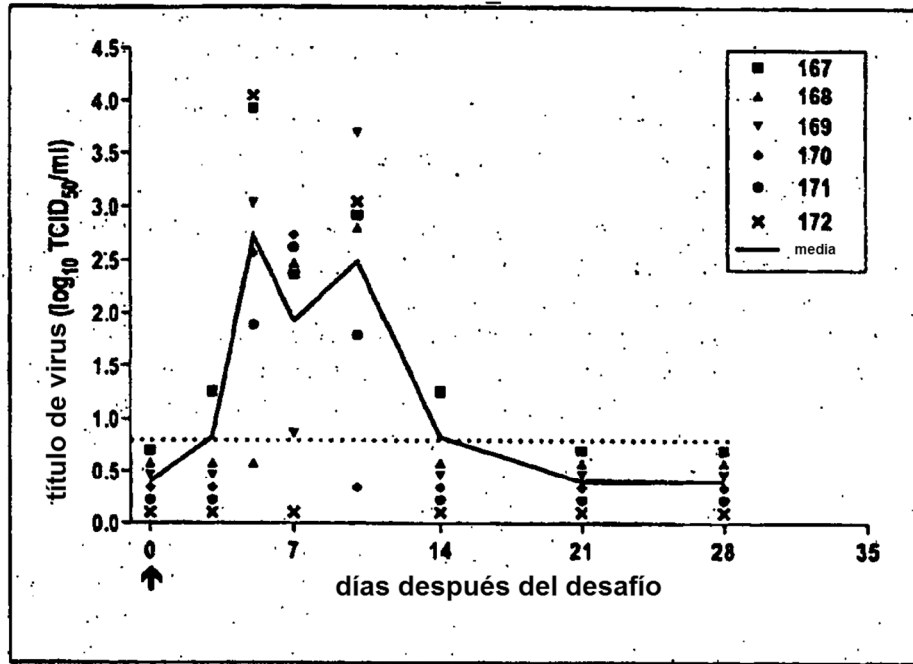


Fig. 9 Cont.

Grupo C



Grupo D

