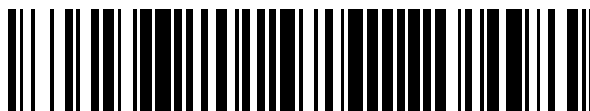


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 057**

51 Int. Cl.:

C07K 14/165 (2006.01)

A61K 39/215 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2010 PCT/GB2010/001293**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11004146**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2010 E 10734527 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2451827**

54 Título: **Proteína quimérica**

30 Prioridad:

07.07.2009 GB 0911794

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

08.11.2016

73 Titular/es:

**THE PIRBRIGHT INSTITUTE (100.0%)
Ash Road Pirbright Woking
Surrey GU24 0NF, GB**

72 Inventor/es:

**BRITTON, PAUL;
BICKERTON, ERICA y
ARMESTO, MARIA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 589 057 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

Proteína quimérica

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una proteína S de IBV quimérica. En particular una proteína S de IBV quimérica que, cuando se usa para producir un virus, provoca que el virus tenga tropismo tisular extendido. La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que codifican dicha proteína quimérica; partículas virales que comprenden dicha proteína quimérica y su uso en una vacuna para prevenir y/o tratar una enfermedad.

Antecedentes de la invención

15 Virus de la bronquitis infecciosa (IBV)

El virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) es un patógeno altamente infeccioso y contagioso de las aves domésticas que se replica principalmente en el tracto respiratorio pero también en células epiteliales del intestino, riñón y oviducto. El IBV es un miembro de los *Coronaviridae* y coronavirus genéticamente muy similares provocan enfermedad en pavos y faisanes.

20 Las señales clínicas de BI incluyen estornudos, estertores traqueales, descarga nasal y sibilación. Las aves de tipo cárnico tienen aumento de peso reducido, mientras que las aves ponedoras ponen menos huevos. La infección respiratoria predispone a los pollos a infecciones bacterianas secundarias que pueden ser letales en polluelos. El virus también puede provocar daño permanente en el oviducto, especialmente en polluelos, lo que conduce a una producción y una calidad de huevos reducidas; y en el riñón, lo que conduce en ocasiones a enfermedad renal que puede ser letal.

25 Se usan en la actualidad vacunas tanto vivas como atenuadas en la vacunación de BI. Hasta la fecha, las vacunas más eficaces son virus atenuados vivos producidos de forma empírica después de pases repetidos con ocultación a través de huevos embrionados.

30 Un problema con este enfoque es que, tras el pase en serie, la inmunogenicidad del virus se reduce. Es necesario conseguir un equilibrio entre un grado aceptable de atenuación para hacer al virus seguro, y una pérdida aceptable de inmunogenicidad de modo que la vacuna del virus aún sea eficaz. Este "equilibrado" de la atenuación es un enfoque de ensayo y error, que hace el resultado del proceso de atenuación incierto.

35 Ya que la atenuación por pase en serie es en la práctica un acontecimiento aleatorio, la vacuna resultante está genéticamente mal definida ya que la base molecular de la atenuación se desconoce. Cada lote de virus atenuado será diferente, haciendo difícil conseguir uniformidad de la vacuna resultante y reproducibilidad del efecto protector/terapéutico *in vivo*.

40 Una desventaja adicional es que los huevos embrionados son caros y no pueden usarse como una fuente prolongada de virus.

45 El cultivo del virus en huevos embrionados es un proceso incómodo ya que cada huevo debe esterilizarse, mirarse al trasluz, inocularse con virus e incubarse antes de recoger volúmenes pequeños de líquido alantoideo de cada huevo y agrupar antes de la purificación. La falta de progresiones fiables de huevos de alta calidad da como resultado limitaciones en la cantidad de vacuna que puede producirse, particularmente en una situación de emergencia.

50 Además de estos problemas logísticos y de provisiones, los huevos embrionados tienen otras limitaciones como un sistema hospedador para la producción de vacuna. Por ejemplo, hay preocupaciones crecientes acerca de la presencia de virus adventicios, particularmente retrovirus en huevos, que comprometerían la producción de vacunas virales atenuadas vivas.

55 Existe por lo tanto la necesidad de vacunas de IBV alternativas y métodos para su producción que no padezcan las desventajas anteriormente mencionadas.

Coronavirus

60 Los coronavirus son virus con envoltura que se replican en el citoplasma celular y contienen un genoma de ARN con sentido positivo, monocatenario de 27 a 32 kb.

65 Todas las envolturas lipídicas de coronavirus contienen al menos tres proteínas de membrana: la glucoproteína spike (S), proteína integral de membrana (M) y proteína pequeña de membrana (E). La proteína S de coronavirus es una glucoproteína de tipo I que oligomeriza en el retículo endoplásmico y se ensambla en membranas de viriones mediante interacciones no covalentes con la proteína de membrana. Después de la incorporación en partículas de

coronavirus, la proteína S es responsable de la unión con el receptor de célula diana y fusión de las membranas viral y celular. La glucoproteína S consiste en cuatro dominios: una secuencia señal que se escinde durante la síntesis; el ectodominio, que está presente en el exterior de la partícula del virión; la región transmembrana responsable del anclaje de la proteína S en la bicapa lipídica de la partícula de virión; y la cola citoplasmática.

5 La proteína S de IBV (1.162 aminoácidos) se escinde en dos subunidades, S1 (535 aminoácidos; 90 kDa) que comprende la mitad N terminal de la proteína S, y S2 (627 aminoácidos; 84 kDa) que comprende la mitad C terminal de la proteína S.

10 La subunidad de proteína S2 se asocia de forma no covalente con la subunidad S1 y contiene los dominios transmembrana y de cola citoplasmática C terminal.

Se ha indicado ampliamente que la subunidad S1 comprende la actividad de unión a receptor de la proteína S.

15 Por ejemplo, se ha mostrado para el coronavirus de serogrupo I, coronavirus humano HCoV 229E, que de tres variantes que tienen truncamiento en el dominio N terminal de S1, dos eran incapaces de unirse con el receptor, lo que implica que la región entre los aminoácidos 417 y 547 son importantes para la unión al receptor (Bonavia *et al* (2003) *J. Virol* 77: 2530-2538).

20 Los primeros 330 aminoácidos de la subunidad S1 de 769 restos de la proteína S del virus de la hepatitis de ratón (MHV) son suficientes para unirse con el receptor de MHV (Kubo *et al* (1994) *J. Virol.* 68: 5403-5410). De forma similar, un fragmento de 193 aminoácidos de la proteína S de SARS (restos 318-510) se une con el receptor y bloquea la infección mediada por proteína S (Wong *et al* (2004) *J. Biol. Chem.* 279: 3197-3201).

25 También se ha indicado que los aminoácidos 1-510 de la glucoproteína S de SARS-CoV representa un dominio que contiene el sitio de unión a receptor (aminoácidos 270-510) análogo de la subunidad S1 de otras glucoproteínas S de coronavirus (Babcock *et al* (2004) *J. Virol.* 4552-4560).

30 La proteína S es un determinante del tropismo celular del virus (Casias *et al* (2003) *J. Virol.* 77: 9084-9089). Se ha mostrado que sustituciones de aminoácidos en la región N terminal de la proteína S1 están asociadas con el intervalo de hospedador extendido de una variante viral del virus de la hepatitis murina (MHV) (Thackray y Holmes (2004) *Virology* 324: 510-524). Además, se cree en general que la especificidad de especie de la infección se debe a la especificidad de la interacción de virus-receptor (Compton *et al* (1992) *J. Virol.* 7420-7428; Gagneten *et al* (1995) *J. Virol.* 69: 889-895).

35 Hasta la fecha, se ha supuesto ampliamente que el tropismo celular es una propiedad del dominio S1 de la proteína S de coronavirus.

Sumario de la invención

40 La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

45 Los presentes inventores han mostrado sorprendentemente que el tropismo celular de coronavirus se determina por la proteína S2, y que la sustitución de la proteína S2 con todo o parte de otro coronavirus puede alterar (extender o reducir) el tropismo celular del virus, dependiendo del tropismo celular del virus del que derivó la proteína S2. Esto significa que pueden inducirse vacunas de virus inmunogénicas que son incapaces de crecer en líneas celulares para hacerlo por sustitución de todas o parte de sus proteínas S2.

50 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una proteína S de virus de bronquitis infecciosa (IBV) quimérico que se basa en una proteína S de una cepa de IBV con tropismo tisular restringido a infección de células primarias, pero que comprende al menos parte de la subunidad S2 de una cepa de IBV con tropismo tisular extendido que, además de ser capaz de infectar células primarias, es capaz de infectar una o más líneas celulares, de modo que un IBV que comprende la proteína S quimérica es capaz de crecer en una línea celular.

55 La proteína S quimérica puede comprender toda o parte de la subunidad S2 de la cepa de IBV con tropismo tisular extendido. Por ejemplo, una proteína S de virus de bronquitis infecciosa (IBV) quimérica puede comprender una parte de la secuencia de S2 que comprende la secuencia XBBXBX en la parte de la proteína S2 correspondiente a entre los restos 686 y 691 de la secuencia proporcionada como SEQ ID No. 1, en la que B es un resto de aminoácido básico y X es cualquier aminoácido.

60 La secuencia de XBBXBX puede, por ejemplo, ser la secuencia SRRKRS o SRRRRS. La proteína S quimérica puede comprender la secuencia SRRKRLIE o SRRRRSVIE en la parte de la proteína S2 correspondiente a entre los restos 686 y 694 de la secuencia proporcionada como SEQ ID No. 1.

65 El coronavirus es virus de bronquitis infecciosa (IBV).

La cepa de IBV con tropismo tisular extendido puede ser IBV Beaudette.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína S quimérica de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

5 La invención también proporciona un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

10 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una partícula viral que comprende una proteína S quimérica de acuerdo con el primer aspecto de la invención y/o una secuencia de nucleótidos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

La partícula viral puede ser un virus de vaccinia recombinante (rVV) o un IBV.

15 La partícula de IBV puede ser capaz de crecer en una línea celular tal como células Vero.

La infección de células Vero por una partícula de IBV de acuerdo con el tercer aspecto de la invención puede bloquearse por heparina soluble.

20 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una partícula viral de acuerdo con el tercer aspecto de la invención que comprende las siguientes etapas:

- 25 (i) transfectar un plásmido como se ha descrito en la sección previa en una célula hospedadora;
(ii) infectar la célula hospedadora con un virus recombinante que comprende el genoma de la cepa de IBV con tropismo tisular restringido, que carece de al menos parte de la subunidad S2;
(iii) permitir que se produzca recombinación homóloga entre las secuencias del gen S en el plásmido y las secuencias correspondientes en el genoma de virus recombinante para producir un gen S quimérico; y
(iv) seleccionar virus recombinantes que comprenden el gen S quimérico.

30 El virus recombinante puede ser virus vaccinia.

Para generar una partícula de coronavirus recombinante, puede usarse el ADN de virus de la etapa (iv) para generar ARN de coronavirus in situ usando un sistema genético inverso.

35 El método anterior incluye por lo tanto opcionalmente la etapa:

- (v) recuperar IBV recombinante que comprende el gen S quimérico del ADN del virus recombinante de la etapa (iv).

40 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una célula que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con el segundo aspecto y que es capaz de producir una partícula viral de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención. La célula puede, por ejemplo, ser una célula, tal como una célula de riñón de polluelo primaria, capaz de producir virus recombinante usando un sistema de genética inversa, o una célula infectada con una partícula viral de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención.

45 La célula infectada con una partícula viral de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención puede ser derivable de una línea celular, tal como una célula Vero.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una partícula viral del cuarto aspecto de la invención.

50 Aspectos adicionales de la invención proporcionan:

- (i) una vacuna de acuerdo con el sexto aspecto de la invención para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un sujeto;
55 (ii) un método para producir una vacuna de acuerdo con el sexto aspecto de la invención, que comprende la etapa de infectar células Vero con una partícula viral de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención;
(iii) un método para alterar el tropismo celular de un IBV que comprende la etapa de sustitución de al menos una parte de la proteína S2 con la proteína S2, o parte correspondiente de la misma, de una cepa de IBV diferente; y
60 (iv) un cultivo celular que comprende una célula o una población de células de acuerdo con el quinto aspecto de la invención.

El tropismo celular extendido conferido al virus por la presencia del gen quimérico significa que puede producirse reserva de virus para producción de vacuna cultivando en líneas celulares, en lugar de huevos embrionados o células primarias.

65

El uso de líneas celulares tales como células Vero tiene muchas ventajas:

- (i) se ha validado previamente para el cultivo de virus y fines de diagnóstico;
- (ii) las células (y por lo tanto virus) pueden cultivarse en suspensión, en lugar de lechos planos; y
- (iii) es posible conseguir rendimientos uniformes.

Descripción de las figuras

Figura 1 - diagrama esquemático de la proteína S de IBV. La proteína S funcional está glucosilada y está presente como un homotrímero en la membrana del virión. La forma trimérica de las subunidades S1 constituye el dominio de unión a receptor.

Figura 2 - diagrama esquemático que muestra las proteínas S de Beaudette (Beau-R) y M41 y las proteínas S quiméricas BeauR M1B2(S), BeauR-B1M2(S), Beau-S-M41-M41 y Hep-S- Beau-Hep. El dominio transmembrana (TM) y el dominio de cola citoplasmática (cito) de todas las proteínas S quiméricas derivan de la proteína S de Beaudette. La posición del sitio de unión a heparán sulfato en la subunidad de S2 se indica como HSBS.

Figura 3 - generación de plásmidos que contienen genes de glucoproteína S quiméricos. Las subunidades S1 y S2 de Beau-R y M41 se amplificaron a partir de dos plásmidos, pGPT-M41S y pGPT-IBV-StuI-BamHI, por PCR usando cebadores localizados en el gen de replicasa, a través del punto de unión S1/S2 y el gen 3. Se usó PCR solapante para combinar las subunidades, formando los genes S quiméricos, que después se cortaron con NsiI (sitio de restricción localizado en el gen de replicasa) y BspEI (sitio de restricción localizado en el gen 3). El plásmido receptor, pGPT-IBV-StuI-BamHI, también se cortó con NsiI y BspEI y el gen S de Beaudette se retiró por extracción en gel. Los genes S quiméricos se ligaron a la cadena principal de pGPT-IBV-StuI-BamHI restante que contenía el gen de guanina xantina fosforribosiltransferasa (GPT) de *E. coli*.

Figura 4 - diagramas de pGPT-IBV-StuI-BamHI y pGPT-M41 S.

Los plásmidos pGPT-IBV-StuI-BamHI y pGPT-M41S se usaron para amplificar las subunidades S1 y S2 de Beau-R y M41 por PCR. El gen de replicasa y el gen 3 que rodean a los genes S derivan de Beaudette. El extremo C terminal del gen S de M41 en pGPT-M41S se ha intercambiado por el extremo C del gen S de Beau-R debido a que esta es el área que interacciona con la proteína M. Los extremos C terminales de las proteínas S de M41 y Beau-R son muy diferentes entre sí para permitir la interacción de la proteína S quimérica con las otras proteínas estructurales de Beau-R, se decidió mantener el extremo C terminal del gen S de Beau-R. El gen S de Beau-R se retiró de pGPT-IBV-StuI-BamHI y los genes S quiméricos se insertaron en su lugar para crear los plásmidos pGPT-S1_{M41}S2_{Beau} y pGPT-S1_{Beau}S2_{M41}.

Figura 5 - el sistema de genética inversa de IBV.

Se construye un vector plasmídico que contiene *gpt* del gen S quimérico y partes de los genes adyacentes en el genoma de IBV. El plásmido se transfecta en células Vero infectadas con rVV que contiene el genoma de IBV menos el gen S. Se llevan a cabo tres ciclos de purificación en placas en presencia de componentes de selección de *gpt* y tres ciclos en ausencia para seleccionar rVV que contiene el gen S quimérico. Se preparan grandes reservas de virus en células BHK-21 de las que se purifica virus y se extrae ADN. Se transfecta ADNc de IBV recombinante dentro del genoma de VV y un plásmido que expresa la proteína N de IBV a células CK infectadas con rFPV-T7. El sobrenadante se filtra y se usa para pase en células CK y rIBV con el gen S quimérico se recupera.

Figura 6 - células Vero infectadas 48 horas después de la infección con diversos IBV.

Figura 7 - microscopía confocal de crecimiento de rIBV en células Vero. Las células Vero se infectaron con rIBV y se fijaron 24 horas después de la infección y se inmunomarcaron con anti ARNbc de ratón, anticuerpo secundario AlexaFluor 488 de cabra anti ratón (verde, Invitrogen) para detectar células infectadas por IBV. Los núcleos de todas las células se marcaron con DAPI (azul).

Figura 8 - cinética de crecimiento de rIBV en células Vero. Las células Vero se infectaron con Beau-R, M41-CK, BeauR-M41 (S), BeauR-M1B2 (S), BeauR-B1M2 (S), Beau-S-M41-Hep y M41-S-Beau-Hep a una multiplicidad de infección de 0,1. El sobrenadante se recogió a 1, 12, 24, 48 y 72 horas después de la infección y se valoró en células CK. Se realizaron tres repeticiones y se tomaron los promedios. Las barras de error indican el error típico de la media.

Figura 9 - ensayo de reducción de placas en células Vero de IBV pretratado con cantidades crecientes de heparina soluble.

Figura 10 - gráfico de barras que compara el efecto de la heparina soluble en el porcentaje de células Vero infectadas por IBV. Las cepas de IBV Beau-R y BeauR-M1B2 (S) se incubaron con PBS (-) o heparina soluble, 15 mg/ml (+) durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de infectar células Vero. Las células se fijaron 24 horas después de la infección, después se inmunomarcaron con α -ARNbc de ratón, anticuerpo secundario de cabra α -IgG

de ratón (verde, Invitrogen) y se tiñeron núcleos en azul con DAPI. Se analizaron diez campos de visión por muestra mediante microscopía confocal a aumento 40x y se calculó el porcentaje de células infectadas.

5 Figura 11 - alineamiento entre Beaudette (Beau-R), M41, teniendo Beaudette el sitio de unión a heparán sulfato modificado para la secuencia de M41 correspondiente (BEAUS-M41-Hep) y teniendo M41 el sitio de unión a heparán sulfato de Beaudette (M41-S-Beau-Hep).

Figura 12 - comparación de a) secuencias de proteínas S y b) región de S2 de Beaudette y M41.

10 Figura 13 - diferencias de aminoácidos entre proteínas S de M41 y Beaudette.

Figura 14 - diferencias de aminoácidos entre regiones S2 de M41 y Beaudette.

Descripción detallada

15 La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

Coronavirus

20 El coronavirus es un género de virus animal que pertenece a la familia *Coronaviridae*. Los coronavirus son virus con envoltura con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo y una simetría helicoidal. El tamaño genómico de coronavirus varía de aproximadamente 27 a 32 kilobases, que es el tamaño más largo para cualquier virus de ARN conocido.

25 Los coronavirus infectan principalmente el tracto respiratorio superior y gastrointestinal de mamíferos y aves. De cuatro a cinco diferentes cepas actualmente conocidas de coronavirus infectan a seres humanos. El coronavirus humano más publicitado, SARS-CoV, que provoca SDRA, tiene una patogénesis única porque provoca infecciones tanto del tracto respiratorio superior como inferior y también puede provocar gastroenteritis. Se cree que los coronavirus provocan un porcentaje significativo de todos los resfriados comunes en adultos humanos. Los coronavirus también provocan una serie de enfermedades en animales de granja y mascotas domesticadas, algunas de las cuales pueden ser graves y son un peligro para la industria agraria. Los coronavirus económicamente significativos de animales de granja incluyen virus de la bronquitis infecciosa (IBV), que provoca principalmente enfermedad respiratoria en pollos y afecta gravemente a la industria de las aves de corral en todo el mundo; coronavirus porcino (gastroenteritis transmisible, TGE) y coronavirus bovino, que dan como resultado ambos diarrea en animales jóvenes. El coronavirus felino tiene dos formas, el coronavirus entérico felino es un patógeno de importancia clínica menor, pero la mutación espontánea de este virus puede dar como resultado peritonitis infecciosa felina (FIP), una enfermedad asociada con una alta mortalidad. También hay dos tipos de coronavirus canino (CCoV), uno que provoca enfermedad gastrointestinal leve y uno que se ha descubierto que provoca enfermedad respiratoria. El virus de la hepatitis de ratón (MHV) es un coronavirus que provoca una enfermedad murina epidémica con una alta mortalidad, especialmente entre colonias de ratones de laboratorio.

Los coronavirus se dividen en tres grupos, como se muestra a continuación:

Grupo 1

- 45
- Coronavirus canino (CCoV)
 - Coronavirus felino (FeCoV)
 - Coronavirus humano 229E (HCoV-229E)
 - Virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV)
 - 50 • Virus de gastroenteritis transmisible (TGEV)
 - Coronavirus humano NL63 (NL o New Haven)

Grupo 2

- 55
- Coronavirus bovino (BCoV)
 - Coronavirus respiratorio canino (CRCoV) - Común en el sureste de Asia y Micronesia
 - Coronavirus humano OC43 (HCoV-OC43)
 - Virus de la hepatitis de ratón (MHV)
 - Virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina (HEV)
 - 60 • Coronavirus de rata (VN). El coronavirus de rata es bastante prevalente en este de Australia donde, hasta marzo/abril de 2008, se ha descubierto entre colonias de roedores nativas y silvestres.
 - Coronavirus de pavo (TCoV)
 - (Sin ningún nombre común aún) (HCoV-HKU1)
 - Coronavirus de síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV)
- 65

Grupo 3

- Virus de la bronquitis infecciosa (IBV)
- Coronavirus de pavo (virus de enfermedad de Bluecomb)

5

El virus de la presente invención es un IBV.

IBV

10

La bronquitis infecciosa (IB) aviar es una enfermedad respiratoria aguda y altamente contagiosa de pollos que provoca pérdidas económicas significativas. La enfermedad se caracteriza por señales respiratorias incluyendo jadeos, tos, estornudos, estertores traqueales y descarga nasal. En pollos jóvenes, puede producirse dificultad respiratoria grave. En ponedoras, son comunes dificultad respiratoria, nefritis, reducción de la producción de huevo y pérdida de calidad interna de huevo y calidad de cáscara de huevo.

15

En pollos de engorde, son señales clínicas comunes la tos y crepitación, que se propagan rápidamente en todas las aves de la instalación. La morbilidad es 100 % en bandadas no vacunadas. La mortalidad varía dependiendo de la edad, la cepa del virus y las infecciones secundarias pero puede ser de hasta el 60 % en bandadas no vacunadas.

20

El primer serotipo de IBV identificado fue Massachusetts, pero en los Estados Unidos están en circulación en la actualidad varios serotipos, incluyendo Arkansas y Delaware, además del tipo Massachusetts identificado originalmente.

25

La cepa de IBV Beaudette se derivó después de al menos 150 pases en embriones de polluelos. IBV Beaudette ya no es patógeno para aves adultas, pero mata rápidamente los embriones.

La Figura 12 y la Tabla 1 muestran las diferencias de aminoácidos entre IBV Beaudette y M41.

30

H120 es una cepa de vacuna de serotipo Massachusetts de IBV viva comercial, atenuada por aproximadamente 120 pases en huevos de pollos embrionados. H52 es otra cepa de Massachusetts, y representa un virus de pase anterior y ligeramente más patógeno (pase 52) durante el desarrollo de H120. Se usan habitualmente vacunas basadas en H120 y H52.

35

Proteína S

40

La proteína S de coronavirus comprende un ectodominio muy glucosilado, grande, que puede escindirse durante la biosíntesis en dos subunidades (S1 y S2) por una enzima de tipo furina en el aparato de Golgi. No todos los coronavirus se escinden, pero incluso sin escisión la estructura básica de subunidad de la proteína S se conserva. S1 comprende el dominio de unión al receptor (Li *et al* (2005), Science 309: 1864-1868) y S2 comprende el dominio de fusión. La proteína S de IBV se escinde completamente en el límite S1/S2, especialmente en sistemas de embrión de pollo.

45

El dominio S2 contiene cinco dominios o regiones funcionales, como se muestra en la Figura 1: dos dominios, HR1 y HR2, forman estructuras helicoidales que dan como resultado la estructura de tallo de la proteína; un dominio transmembrana responsable de anclar la proteína en la membrana de virión; un dominio citoplasmático rico en cisteína responsable de interactuar con otras proteínas estructurales de virus y un quinto dominio, el péptido de fusión, responsable de fusión virus-célula o fusión entre células.

50

Las diferencias de aminoácidos entre las proteínas S de M41 y Beaudette y las regiones S2 se muestran en las Figuras 13 y 14, respectivamente.

Tropismo tisular

55

Los coronavirus muestran fuerte tropismo de especie y tisular. De forma similar, los aislados clínicos de IBV muestran tropismo definido tanto *in vivo* como en cultivo celular.

60

La cepa M41 se ha adaptado para crecimiento en células de riñón de polluelo primarias (CK) y se restringe a infección de células de pollo primarias, y por lo tanto es necesario cultivarla en huevos embrionados o células CK.

Se sabe que la cepa Beaudette, por otro lado, es capaz de infectar una serie de células en cultivo, incluyendo células Vero y células de riñón de cría de hámster (BHK).

65

Un coronavirus con tropismo tisular restringido es capaz de infectar un número menor de tipos celulares que un coronavirus con tropismo tisular extendido.

Un coronavirus con tropismo tisular restringido puede, por ejemplo, restringirse a infección de células primarias, mientras que un coronavirus con tropismo tisular extendido puede (además de ser capaz de infectar células primarias) ser capaz de infectar una o más líneas celulares.

5 Un coronavirus con tropismo tisular extendido puede, por ejemplo, tener la capacidad de infectar células Vero.

El linaje celular Vero se aisló en 1962 de células epiteliales de riñón extraídas de un mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Las células Vero se usan para muchos fines experimentales y clínicos, incluyendo su acción como células hospedadoras para cultivar virus.

10 El linaje celular Vero es continuo porque puede replicarse a través de muchos ciclos de división y no se convierte en senescente.

15 El linaje celular Vero se ha autorizado para su uso en la fabricación de vacunas y se usa actualmente para la producción de vacunas de la polio y rabia.

20 La cepa con tropismo tisular restringido puede ser inmunogénica y capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica *in vivo*. La cepa con tropismo tisular restringido puede, por ejemplo, ser una cepa usada en la actualidad para producción de vacunas. Para IBV, esto incluye cepas tales como: H52, H120, Ma5, 4/91, D41, D274 y W93. La cepa con tropismo tisular restringido puede ser o derivar de un aislado "del campo" tal como BJ1, BJ2 o BJ3 (Li y Yang (2001) Avian Pathol 30: 535-541).

25 Para IBV, la cepa con tropismo tisular extendido puede, por ejemplo, ser IBV Beaudette, de modo que la proteína quimérica de la invención comprende toda o parte de la proteína S2 de IBV Beaudette.

30 Puede establecerse tropismo celular experimentalmente simplemente exponiendo un tipo celular dado a infección por un virus. Después puede analizarse el efecto citopático (cpe) y el grado de formación de sincitios tras un cierto número de pases, como se describe en los Ejemplos. El cambio de morfología de las células infectadas puede analizarse usando microscopía.

Proteína quimérica

35 La presente invención se refiere a una proteína S de virus de bronquitis infecciosa (IBV) quimérica que se basa en una proteína S de una cepa de IBV con tropismo tisular restringido a infección de células primarias, pero que comprende al menos parte de la subunidad S2 de una cepa de IBV con tropismo tisular extendido que, además de poder infectar células primarias, es capaz de infectar una o más líneas celulares, de modo que un IBV que comprende la proteína S quimérica es capaz de crecer en una línea celular.

40 La expresión "basado en" indica que al menos el dominio S1 deriva o puede derivar de la cepa con tropismo tisular restringido. La proteína quimérica también puede comprender una parte del dominio S2 de la cepa con tropismo tisular restringido. Por ejemplo, los dominios transmembrana y/o citoplasmático pueden derivar o ser derivables de la cepa con tropismo tisular restringido.

45 La proteína quimérica puede comprender toda o una parte de la subunidad S2 de la cepa de coronavirus con tropismo tisular extendido.

La proteína quimérica puede comprender el sitio de unión a heparán sulfato localizado dentro de la subunidad S2 de, por ejemplo, IBV Beaudette.

50 Una proteína S de virus de bronquitis infecciosa (IBV) quimérico puede comprender, por ejemplo, las secuencias XB-BXB en la parte de la proteína S2 correspondiente a entre los restos 686 y 691 de la secuencia proporcionada como SEQ ID No. 1 (secuencia BEAU-CK de la Figura 12A), en la que B es un resto de aminoácido básico y X es cualquier aminoácido.

55 Por ejemplo, la proteína puede comprender la secuencia SRRKRS o SRRRRS en la parte de la proteína S2 correspondiente a entre los restos 686 y 691 de la secuencia proporcionada como SEQ ID No. 1.

60 Por ejemplo, la proteína puede comprender la secuencia SRRKRSLIE o SRRRRSVIE en la parte de la proteína S2 correspondiente a entre los restos 686 y 694 de la secuencia proporcionada como SEQ ID No.1.

65 La proteína quimérica puede comprender sustancialmente toda la parte de secuencia de S2 que está en sentido N terminal del dominio HR1 de la cepa con tropismo tisular extendido. La proteína quimérica puede comprender la parte de secuencia de S2 que está en sentido N terminal del dominio HR1, junto con el dominio HR1 de la cepa con tropismo tisular extendido. La proteína quimérica puede comprender la parte de secuencia de S2 que está en sentido N terminal del dominio HR1, el dominio HR1 y la parte de secuencia entre los dominios HR1 y HR2 de la cepa con tropismo tisular extendido. La proteína quimérica puede comprender la parte de secuencia de S2 que está

en sentido N terminal del dominio HR1, el dominio HR1, la parte de secuencia entre los dominios HR1 y HR2 y el dominio HR2 de la cepa con tropismo tisular extendido.

5 La proteína quimérica puede comprender sustancialmente toda la subunidad S2 de la cepa de coronavirus con tropismo tisular extendido.

10 La proteína quimérica puede comprender uno o más de los diecinueve cambios de aminoácidos de la región S2 mostrada en la Tabla 1 y la Figura 14. En particular la proteína quimérica puede comprender un resto de arginina en la posición 687, y un resto de lisina en la posición 689. La proteína quimérica también puede comprender un resto de leucina en la posición 692.

15 La expresión “sustancialmente todo” significa que la proteína quimérica comprende al menos 95 % de la parte correspondiente de la secuencia de tipo silvestre. Los aminoácidos ausentes pueden situarse en cualquier parte dentro de la secuencia y pueden agruparse entre sí (de modo que falte una sección pequeña de secuencia) o separarse.

20 Cuando una parte de la proteína quimérica puede derivar de una proteína S para una cepa dada, esa parte puede tener la misma secuencia de aminoácidos que la parte correspondiente de la secuencia de tipo silvestre, o puede tener una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en comparación con la secuencia de tipo silvestre siempre que la función original de esa parte de la secuencia se conserve.

La expresión “tipo silvestre” se usa para indicar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos primaria que es idéntica a la proteína nativa (es decir, la proteína viral).

25 Una secuencia mutante también puede surgir de forma natural o puede crearse artificialmente (por ejemplo por mutagénesis dirigida). El mutante puede tener al menos 70, 80, 90 o 95 % de identidad de secuencia con la parte correspondiente de la secuencia de tipo silvestre. El mutante puede tener menos de 20, 10 o 5 mutaciones sobre la parte correspondiente de la secuencia de tipo silvestre.

30 Pueden realizarse comparaciones de identidad a la vista, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias disponibles fácilmente. Estos programas informáticos disponibles en el mercado pueden calcular el % de identidad entre dos o más secuencias. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, Estados Unidos; Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research 12: 387). Los ejemplos de otros software que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999 misma referencia - Capítulo 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y el conjunto GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel *et al.*, 1999 misma referencia, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere usar el programa GCG Bestfit. También está disponible una nueva herramienta, denominada BLAST 2 Sequences para comparar secuencia proteica y de nucleótidos (véase FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

45 La secuencia puede tener una o más supresiones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una molécula funcionalmente equivalente. Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos siempre que la actividad se conserve. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos de grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

50 Pueden realizarse sustituciones conservativas, por ejemplo de acuerdo con la Tabla posterior. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna y preferentemente en la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

55

| | | |
|------------|-------------------|----------------|
| ALIFÁTICOS | No polares | G A P I L V |
| | Polares sin carga | C S T M N Q |
| | Polares con carga | D E K R |
| AROMÁTICOS | | H F W Y |

La presente invención también proporciona un método para alterar el tropismo celular de un coronavirus que comprende la etapa de sustitución de al menos parte de la proteína S2 con la proteína S2 o parte correspondiente

de la misma de una cepa diferente. Pueden intercambiarse partes de secuencia por métodos conocidos en la técnica, tales como por escisión y ligamiento.

5 Por "parte correspondiente" se entiende, cuando la secuencia de la proteína S de la cepa con tropismo tisular restringido se alinea con la secuencia de la proteína S con tropismo tisular extendido (como se muestra, por ejemplo, en la Figura 12A y 12B) la parte de una secuencia que se alinea con la otra.

10 Un alineamiento entre proteínas S de diferentes cepas es sencillo porque los coronavirus comparten una estructura de dominio común y, entre cepas, deberían tener un nivel de identidad de secuencia relativamente alto. Puede usarse software de alineamiento tal como el paquete BLAST™ descrito anteriormente.

Secuencia de nucleótidos

15 La presente invención también proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica del primer aspecto de la invención.

20 La secuencia de nucleótidos puede ser natural, sintética o recombinante. Puede ser mono o bicatenaria, puede ser de ADN o ARN o combinaciones de los mismos. Puede ser, por ejemplo, ADNc, producto de PCR, secuencia genómica o ARNm.

25 La secuencia de nucleótidos puede optimizarse con respecto a codones para la producción en el hospedador/la célula hospedadora elegido.

Puede estar aislada o como parte de un plásmido, virus o célula hospedadora.

Plásmido

30 Un plásmido es una molécula de ADN extracromosómica separada del ADN cromosómico que es capaz de replicar independientemente del ADN cromosómico. Son habitualmente circulares y bicatenarios.

35 Los plásmidos, o vectores (como se conocen en ocasiones), pueden usarse para expresar una proteína en una célula hospedadora. Por ejemplo, una célula hospedadora bacteriana puede transfectarse con un plásmido capaz de codificar una proteína particular, para expresar esa proteína. El término también incluye cromosomas artificiales de levadura y cromosomas artificiales de bacterias que son capaces de acomodar partes más largas de ADN.

40 El plásmido de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el gen S quimérico. También puede comprender una o más secuencias de nucleótidos de coronavirus adicionales o secuencias de nucleótidos capaces de codificar una o más proteínas de coronavirus tales como el gen de replicasa y/o gen 3. El plásmido también puede comprender un marcador de resistencia, tal como el gen de guanina xantina fosforribosiltransferasa (*gpt*) de *Escherichia coli*, que confiere resistencia a ácido micofenólico (MPA) en presencia de xantina e hipoxantina y se controla por el promotor temprano/tardío de virus vaccinia P_{7.5}.

Partícula viral

45 La presente invención también se refiere a una partícula viral que comprende una proteína S quimérica de acuerdo con el primer aspecto de la invención y/o una secuencia de nucleótidos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

50 La partícula viral puede ser un virus vaccinia recombinante (rVV) o un coronavirus.

La partícula viral puede ser recombinante.

55 La partícula viral puede prepararse usando un sistema de genética inversa, tal como un sistema de genética inversa basado en virus vaccinia.

A este respecto, la presente invención también proporciona un método para preparar una partícula viral de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención:

- 60 (i) transfectando un plásmido como se ha descrito en la sección anterior a una célula hospedadora;
- (ii) infectando la célula hospedadora con un virus recombinante que comprende el genoma de la cepa de coronavirus con tropismo tisular restringido, que carece de al menos parte de la subunidad de S₂;
- (iii) permitiendo que se produzca recombinación homóloga entre las secuencias del gen S en el plásmido y las secuencias correspondientes en el genoma de virus recombinante para producir un gen S quimérico;
- (iv) seleccionando virus recombinantes que comprenden el gen S quimérico.

65

El genoma de la cepa de IBV con tropismo tisular restringido puede carecer de la parte de la proteína S2 correspondiente a la parte proporcionada por el plásmido, de un modo que se forme una proteína quimérica.

5 El virus recombinante es uno adecuado para permitir la recombinación homóloga entre su genoma y el plásmido. El virus vaccinia es particularmente adecuado ya que se usa habitualmente recombinación homóloga para insertar y suprimir secuencias para el genoma de virus vaccinia.

El método anterior incluye opcionalmente las etapas:

10 (v) recuperación de IBV recombinante que comprende el gen S quimérico del ADN del virus recombinante de la etapa (iv).

Se conocen en la técnica métodos para recuperar IBV recombinante (véase Britton *et al* (2005) véase página 24).

15 Por ejemplo, el ADN del virus recombinante de la etapa (iv) puede insertarse en un plásmido y usarse para transfectar células que expresan ARN polimerasa T7 citoplasmática. (Las células pueden, por ejemplo, preinfectarse con un virus de la viruela aviar que expresa ARN polimerasa T7). El IBV recombinante puede después aislarse, por ejemplo, del medio de cultivo.

20 Cuando el plásmido se inserta en el genoma de virus vaccinia, se forma un intermedio inestable. Pueden seleccionarse recombinantes que comprenden el plásmido por ejemplo usando un marcador de resistencia en el plásmido.

25 Después puede verificarse que los recombinantes positivos contienen el gen S quimérico, por ejemplo, mediante PCR y secuenciación.

Pueden cultivarse grandes reservas del virus de recombinación incluyendo el gen S quimérico (por ejemplo virus vaccinia recombinante, rVV) y extraerse el ADN para llevar a cabo la etapa (v).

30 Se conocen en la técnica sistemas de genética inversa adecuados (Casais *et al* (2001) J. Virol 75: 12359-12369; Casais *et al* (2003) J. Virol. 77: 9084-9089; Britton *et al* (2005) J. Virological Methods 123: 203-211; Armesto *et al* (2008) Methods in Molecular Biology 454: 255-273).

Célula

35 La partícula viral puede usarse para infectar una célula.

Ya que la partícula viral que comprende el gen S quimérico tiene tropismo tisular extendido, la célula puede ser derivable de o una parte de una línea celular.

40 La célula puede ser, por ejemplo, una célula de riñón de cría de hámster (por ejemplo BHK-21) o una célula Vero.

La célula puede usarse para producir la partícula viral.

45 Por lo tanto la presente invención también proporciona un método para producir una partícula viral que comprende las siguientes etapas:

(i) infección de una célula con una partícula viral de acuerdo con el sexto aspecto de la invención;

(ii) permitir que el virus se replique en la célula; y

50 (iii) recoger el virus descendiente.

La célula puede ser de o parte de una línea celular, tal como una célula Vero. Las partículas virales pueden recogerse, por ejemplo del sobrenadante por métodos conocidos en la técnica, y opcionalmente purificarse.

55 La presente invención también proporciona una célula capaz de producir una partícula viral recombinante de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención usando un sistema de genética inversa. Por ejemplo, la célula puede comprender un genoma de virus recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos capaz de codificar el gen S quimérico.

60 La célula puede ser capaz de producir virus de recombinación recombinantes (por ejemplo virus vaccinia) que contiene el gen S quimérico. La célula puede ser una célula Vero.

Como alternativa la célula puede ser capaz de producir coronavirus recombinante por un sistema de genética inversa. La célula puede expresar o inducirse para expresar polimerasa T7 para rescatar la partícula viral recombinante. La célula puede ser una célula CK.

65

Vacuna

La partícula viral puede usarse para producir una vacuna.

5 La vacuna puede ser una forma atenuada viva de la partícula viral.

La presente invención también se refiere a un método para producir dicha vacuna que comprende la etapa de infectar células, por ejemplo células Vero, con una partícula viral que comprende una proteína química de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

10 Método de vacunación

La partícula viral de la presente invención puede usarse para tratar y/o prevenir una enfermedad.

15 "Tratar" significa administrar la vacuna a un sujeto que tiene una enfermedad existente para disminuir, reducir o mejorar al menos un síntoma asociado con la enfermedad y/o para ralentizar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad.

20 "Prevenir" significa administrar la vacuna a un sujeto que aún no ha contraído la enfermedad y/o que no muestra ningún síntoma de la enfermedad para evitar o alterar la causa de la enfermedad (por ejemplo infección) o para reducir o prevenir el desarrollo de al menos un síntoma asociado con la enfermedad.

La enfermedad puede ser bronquitis infecciosa (IB).

25 La vacuna puede administrarse a polluelos eclosionados o pollos, por ejemplo por colirio o administración intranasal. Aunque son precisos, estos métodos pueden ser caros por ejemplo para bandadas de pollos de engorde grandes. Las alternativas incluyen inoculación por pulverización o administración al agua para beber pero puede ser difícil asegurar la aplicación de vacuna uniforme usando dichos métodos.

30 La vacuna puede proporcionarse en una forma adecuada para su administración, tal como un colirio para uso intraocular.

35 La vacuna puede administrarse por la inoculación en el huevo, por ejemplo mediante inyección de huevos embrionados. La vacunación en el huevo tiene la ventaja de que proporciona una resistencia de estadio temprano a la enfermedad. También facilita la administración de una dosis uniforme por sujeto, a diferencia de la inoculación por pulverización y administración mediante agua para beber.

40 La vacuna puede administrarse a cualquier compartimento adecuado del huevo, incluyendo fluido alantoideo, saco vitelino, amnios, celda de aire o embrión. Puede administrarse debajo de la membrana de la cáscara (celda de aire) y membrana corioalantoidea.

45 Habitualmente la vacuna se inyecta a huevos embrionados durante los estadios tardíos del desarrollo embrionario, generalmente durante el último trimestre del periodo de incubación, tal como 3-4 días antes de eclosionar. En los pollos, la vacuna puede administrarse entre el día 15 y el 19 del periodo de incubación de 21 días, por ejemplo al día 17 o 18.

El proceso puede automatizarse usando un proceso de inyección robótico, tal como el descrito en el documento WO 2004/078203.

50 La vacuna puede administrarse junto con una o más vacunas distintas, por ejemplo, vacunas para otras enfermedades, tales como virus de enfermedad de Newcastle (NDV). La presente invención también proporciona una composición de vacuna que comprende una vacuna de acuerdo con la invención junto con uno o más vacunas adicionales. La presente invención también proporciona un kit que comprende una vacuna de acuerdo con la invención junto con una o más vacunas distintas para administración separada, secuencial o simultánea.

55 La vacuna o composición de vacuna de la invención pueden usarse para tratar un sujeto aviar. Por ejemplo, el sujeto puede ser un polluelo o pollo.

60 Típicamente, un médico o veterinario determinará la dosis real que será más adecuada para un sujeto individual o grupo de sujetos y variará con la edad, el peso y la respuesta del sujeto o los sujetos particulares.

65 La composición puede comprender opcionalmente un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección de vehículo farmacéutico, excipiente o diluyente puede seleccionarse con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como (o además de) el vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante, lubricante, agente de

suspensión, agente de recubrimiento, agente de solubilización y otros agentes vehículos adecuados que pueden ayudar o aumentar el suministro o la inmunogenicidad del virus.

5 La invención se describirá ahora por medio de ejemplos, que se pretende que sirvan para ayudar a un experto habitual en la materia a llevar a cabo la invención y no se pretende de ninguna manera que limiten el alcance de la invención, que se define más bien por las reivindicaciones.

Ejemplos

10 Ejemplo 1 - Producción de genes S quiméricos compuestos de (i) la subunidad S1 de IBV de M41 y la subunidad S2 de Beaudette (M1B2); y (ii) la subunidad S1 de Beaudette y la subunidad S2 de M41 (B1M2)

15 Se usó una estrategia de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) solapante para crear dos genes S quiméricos, uno con la subunidad S1 de M41 y la subunidad S2 de Beaudette (M1B2), y el otro con la subunidad S1 de Beaudette y la subunidad S2 de M41 (B1M2; véase Figuras 2 y 3). Los genes S de Beau-R (un clon molecular de Beaudette) y M41 están contenidos dentro de los plásmidos pGPT-IBV-StuI-BamHI y pGPT-M41S respectivamente (véase Figura 4). Los cebadores dentro del gen de replicasa y gen 3 se diseñaron cercanos a sitios de restricción ya contenidos dentro del genoma de IBV para hacer más fácil recuperar los genes S quiméricos de los plásmidos pGPT-S1_{M41}S2_{Beau} (M1B2) y pGPT-S1_{Beau}S2_{M41} (B1M2). La secuencia del gen S es idéntica entre Beau-R y M41 en el sitio de escisión S1/S2 de modo que también se diseñaron cebadores a través de esta localización. Alrededor de 20 500 nucleótidos se dejaron a uno de los lados del gen S para permitir la fácil manipulación.

25 Los genes S quiméricos se clonaron en plásmidos que contenían el gen de guanina xantina fosforribosiltransferasa (*gpt*) de *Escherichia coli*, que confiere resistencia a ácido micofenólico (MPA) en presencia de xantina e hipoxantina y está controlado por el promotor temprano/tardío de virus vaccinia P7.5.

Ejemplo 2 - Rescate de rIBV que expresan la proteína S quimérica B1M2 o M1B2 y que establece si pueden crecer en células Vero.

30 Se utilizó un sistema de genética inversa basado en virus vaccinia para crear IBV recombinante (rIBV) con un gen S quimérico (véase Figura 5). Los plásmidos pGPT-S1_{M41}S2_{Beau} (M1B2) y pGPT-S1_{Beau}S2_{M41} (B1M2) se transfectaron en células Vero infectadas con un virus vaccinia recombinante (rVV) que contiene el genoma de ADNc de IBV de longitud completa menos el gen S. El plásmido se insertó en el genoma de virus vaccinia creando un intermedio inestable. Tres ciclos de purificación de placas en presencia de ácido micofenólico, xantina e hipoxantina 35 seleccionaron recombinantes positivos para *gpt*. Después se seleccionaron los recombinantes de GPT negativo por purificación en placas tres veces en ausencia de medio de selección de *gpt*.

40 Se exploraron recombinantes BeauR-M1B2(S) y BeauR-B1M2(S) mediante PCR y secuenciación para determinar que la secuencia del gen S quimérico se había insertado con éxito en el genoma de rVV. Se cultivaron grandes reservas del rVV que contenía genoma de IBV con el gen S quimérico en células de riñón de cría de hámster (BHK-21) hasta que se observó el efecto citopático (cpe). El virus vaccinia se purificó y se extrajo el ADN.

45 Se recuperaron dos aislados de rIBV BeauR-M1B2(S) y BeauR-B1M2(S), con el fondo genómico de Beau-R y la subunidad S1 o S2 de M41. Se transfectaron células CK infectadas con virus de la viruela aviar recombinante que expresaba ARN polimerasa T7 (rFPV-T7), con el ADN rW y se incubaron a 37 °C. Una vez que se hubo observado cpe de ~60 %, el medio de cultivo se retiró y se filtró para retirar cualquier rFPV-T7. El medio de cultivo que contenía el rIBV se pasó tres veces sobre células CK. El ARN celular total se aisló y se analizó con respecto a la presencia de ARN de IBV por RT-PCR. Se secuenció el gen S.

50 Después de tres pases en células CK, se pasaron rIBV BeauR-M1B2(S) y BeauR-B1M2(S) tres veces en células Vero. Se han tomado fotografías de células Vero infectadas por rIBV BeauR-M1B2(S) y BeauR-B1M2(S) mediante microscopía de campo claro (Figura 6) y mediante microscopía confocal con inmunofluorescencia (Figura 7). Los virus recombinantes se valoraron en células CK y se investigó la cinética de crecimiento en células Vero (Figura 8).

55 BeauR-B1M2(S) no formó CPE en células Vero y se observaron muy pocas células Vero infectadas por microscopía confocal con inmunofluorescencia indirecta. La curva de crecimiento indica que BeauR-B1M2(S) es incapaz de replicar en células Vero. BeauR-M1B2(S) provocó cpe extensiva en células Vero después de un pase y se pasó adicionalmente en células Vero hasta el pase 7, formando sincitios de pase 5. La curva de crecimiento indica que BeauR-M1B2(S) es capaz de replicar en células Vero.

60 Como se muestra en las Figuras 6 - 8, las células Vero no apoyan el crecimiento de M41, BeauR-M41(S), el rIBV derivado de Beaudette pero que expresa la proteína S de M41 o BeauR-B1M2(S), la morfología de las células infectadas con estas cepas de IBV es similar a células infectadas con simulación. Sin embargo, las células Vero infectadas con BeauR-M1B2(S) mostraron la misma morfología que las infectadas con Beaudette (Beau-R). Estos resultados indican que la subunidad S2 está implicada en la infecciosidad de células Vero.

65

Ejemplo 3 - La heparina soluble es capaz de bloquear la infección de células Vero usando rIBV Beau-R y BeauR-M1B2(S)

5 Se llevaron a cabo ensayos de reducción de placas en los que se han incubado aislados de Beau-R y los dos BeauR-M41(S1) en presencia de sal sódica de heparina soluble a diversas concentraciones 0-20 mg/ml antes de llevar a cabo ensayos de placas en células Vero. El número de placas producido se ha analizado para descubrir si la presencia de heparina tiene algún efecto en la capacidad de los virus para crecer en células Vero (Figura 9).

10 Se han incubado aislados de Beau-R y los dos de BeauR-M1B2(S) en presencia de sal sódica de heparina a 15 mg/ml y en ausencia antes de infectar células Vero. Se usó microscopía confocal e inmunofluorescencia indirecta para observar el efecto de la heparina en el número de células infectadas presentes (Figura 10). Se analizaron diez campos de visión por muestra por microscopía confocal a aumento x40 y se calculó el porcentaje de células infectadas.

15 La Figura 9 muestra un ensayo de reducción de placas en células Vero de IBV pretratado con cantidades crecientes de heparina soluble. La línea verde representa Beaudette y las líneas azul y roja representan los dos rIBV que expresan la proteína S de M1B2 quimérica. La Figura 10 muestra un diagrama de barras que compara el efecto de heparina soluble en el porcentaje de células Vero infectadas por IBV, medido por microscopía confocal con inmunofluorescencia indirecta. Estos resultados indican que la heparina soluble tiene el mismo efecto, el bloqueo de la infección, en los rIBV que en Beaudette.

Ejemplo 4 - Introducción del sitio de unión a heparán sulfato en la subunidad S2 del gen S de M41 en BeauR-M41(S) y reemplazo del sitio de unión a heparán sulfato en la proteína S de Beau-R con la región correspondiente de la proteína S de M41.

25 Se han diseñado dos plásmidos, uno con una sección del gen Beau-R S con el sitio de unión a heparán sulfato localizado con la subunidad S2 intercambiada por la secuencia correspondiente de M41 (Beau-S-M41-Hep), y el otro con una sección del gen S de M41 con el sitio de unión a heparán sulfato de Beau-R (M41-S-Beau-Hep). Ambos plásmidos contienen el gen de *gpt* para selección.

30 Los sistemas de genética inversa como se ha descrito en el ejemplo 2 y en la Figura 5 se han usado para crear dos rIBV quiméricos, Beau-S-M41-M41 y Hep-S-Beau-Hep (Figuras 2 y 11). Se pasaron dos recombinantes adecuados de cada uno tres veces en células CK, después se analizaron sus características de crecimiento en células Vero por microscopía de campo claro para evaluar si los rIBV provocan cpe (Figura 6), microscopía confocal de células infectadas (Figura 7) y cinética de crecimiento (Figura 8).

35 Como se muestra en las Figuras 6-8, las células Vero no apoyan el crecimiento de M41, M41-BeauR(S), BeauR-B1M2(S) o Beau-S-M41-Hep. La morfología de las células infectadas con estas cepas de IBV es similar a las células infectadas con simulación y se observaron muy pocas células infectadas por microscopía confocal con inmunofluorescencia indirecta. Sin embargo, las células Vero infectadas con M41-S-Beau-Hep muestran la misma morfología que las infectadas con Beaudette (Beau-R) y BeauR-M1B2(S). Las curvas de crecimiento en células Vero mostraron que la retirada del sitio de unión a heparán sulfato de Beau-R eliminó su capacidad para crecer en células Vero y la introducción del sitio de unión a heparán sulfato en la proteína S de BeauR-M41(S) permitió el crecimiento en células Vero. Estos resultados indican que el sitio de unión a heparán sulfato dentro de la subunidad S2 de Beaudette está implicado en la infecciosidad de células Vero.

40 A lo largo de la presente memoria descriptiva, a no ser que el contexto requiera otra cosa, debería entenderse que la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento o número entero indicado o grupo de elementos o números enteros pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupos de elementos o números enteros. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas preferidas, debería entenderse que la invención como se reivindica no debería estar limitada indebidamente a dichas realizaciones específicas.

50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína S de virus de bronquitis infecciosa (IBV) quimérica que se basa en una proteína S de una cepa de IBV con tropismo tisular restringido a infección de células primarias, pero que comprende al menos parte de la subunidad S2 de una cepa de IBV con tropismo tisular extendido que, además de ser capaz de infectar células primarias, es capaz de infectar una o más líneas celulares, de modo que un IBV que comprende la proteína S quimérica es capaz de crecer en una línea celular.
- 10 2. Una proteína S quimérica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende sustancialmente toda la subunidad S2 de la cepa de IBV con tropismo tisular extendido.
- 15 3. Una proteína S quimérica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende las secuencias de XBBXBX en la parte de la proteína S2 correspondiente a entre los restos 686 y 691 de la secuencia proporcionada como Beau-CK en la Figura 12A, en la que B es un resto de aminoácido básico y X es cualquier aminoácido.
- 20 4. Una proteína S quimérica de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la cepa de IBV con tropismo tisular extendido es IBV Beaudette.
5. Una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína S quimérica de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
- 25 6. Un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Una partícula viral que comprende una proteína S quimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y/o una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 5.
- 30 8. Una partícula viral de acuerdo con la reivindicación 7, que es capaz de crecer en células Vero.
9. Un método para preparar una partícula viral de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, que comprende las siguientes etapas:
- 35 (i) transfectar un plásmido de acuerdo con la reivindicación 6 a una célula hospedadora;
- (ii) infectar la célula hospedadora con un virus recombinante que comprende el genoma de la cepa de IBV con tropismo tisular restringido, que carece de al menos parte de la subunidad S2;
- (iii) permitir que se produzca recombinación homóloga entre las secuencias del gen S en el plásmido y las secuencias correspondientes en el genoma de virus recombinante para producir un gen S quimérico; y
- (iv) seleccionar virus recombinantes que comprenden el gen S quimérico.
- 40 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, que también incluye la etapa:
- (v) recuperar IBV recombinante que comprende el gen S quimérico del ADN del virus recombinante de la etapa (iv).
- 45 11. Una célula que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 5 y que es capaz de producir una partícula viral de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.
- 50 12. Una célula Vero de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Una vacuna que comprende una partícula viral de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.
- 55 14. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 13 para uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad en un sujeto.
15. Un método para producir una vacuna de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende la etapa de infectar células Vero con una partícula viral de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.

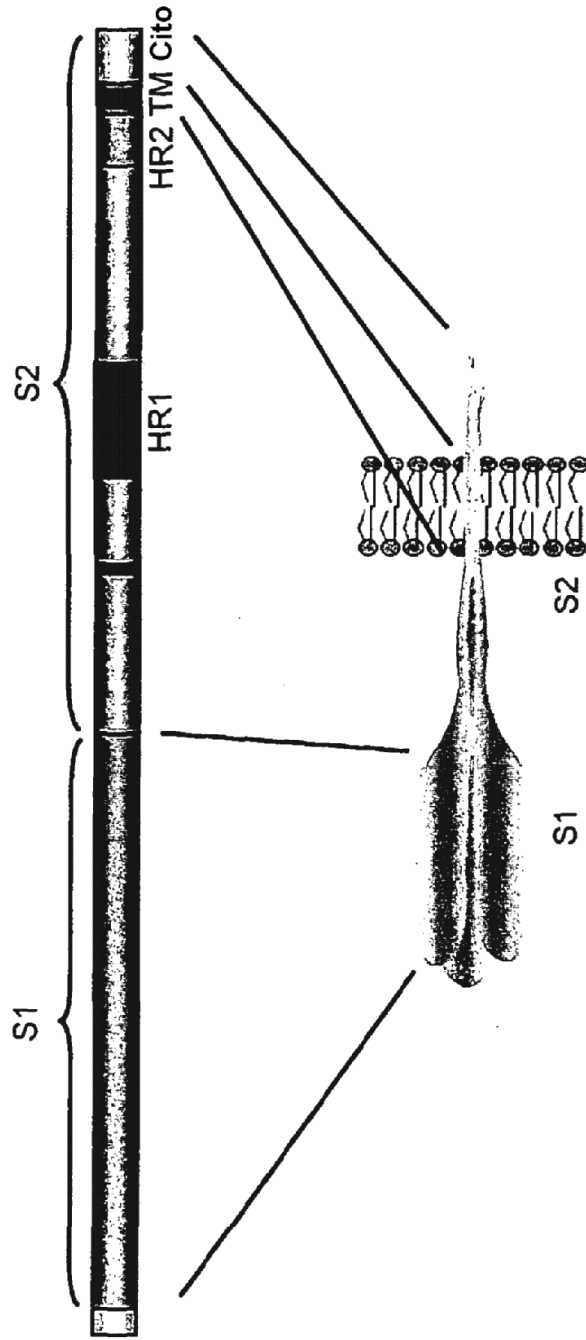


FIG. 1

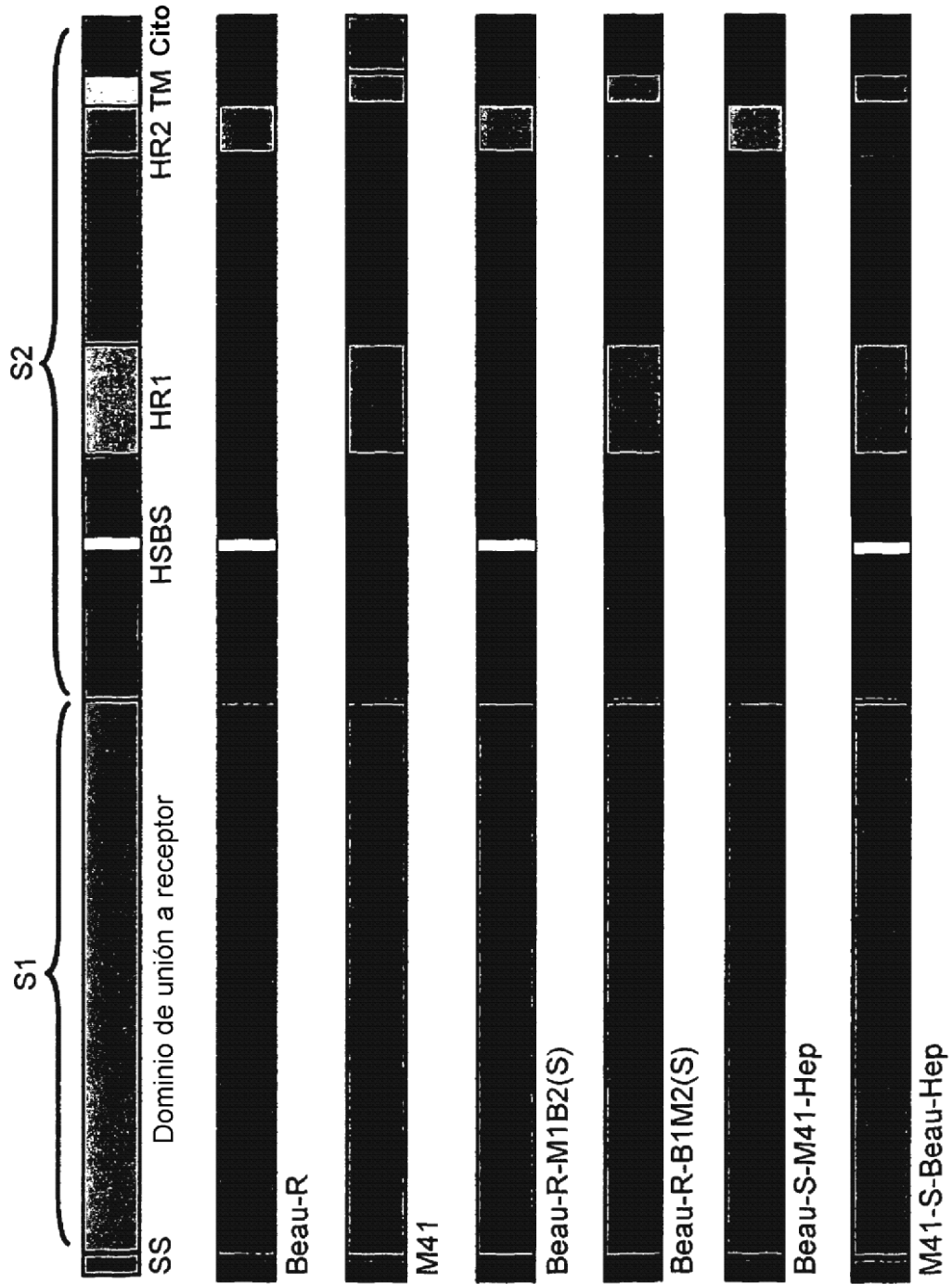


FIG. 2

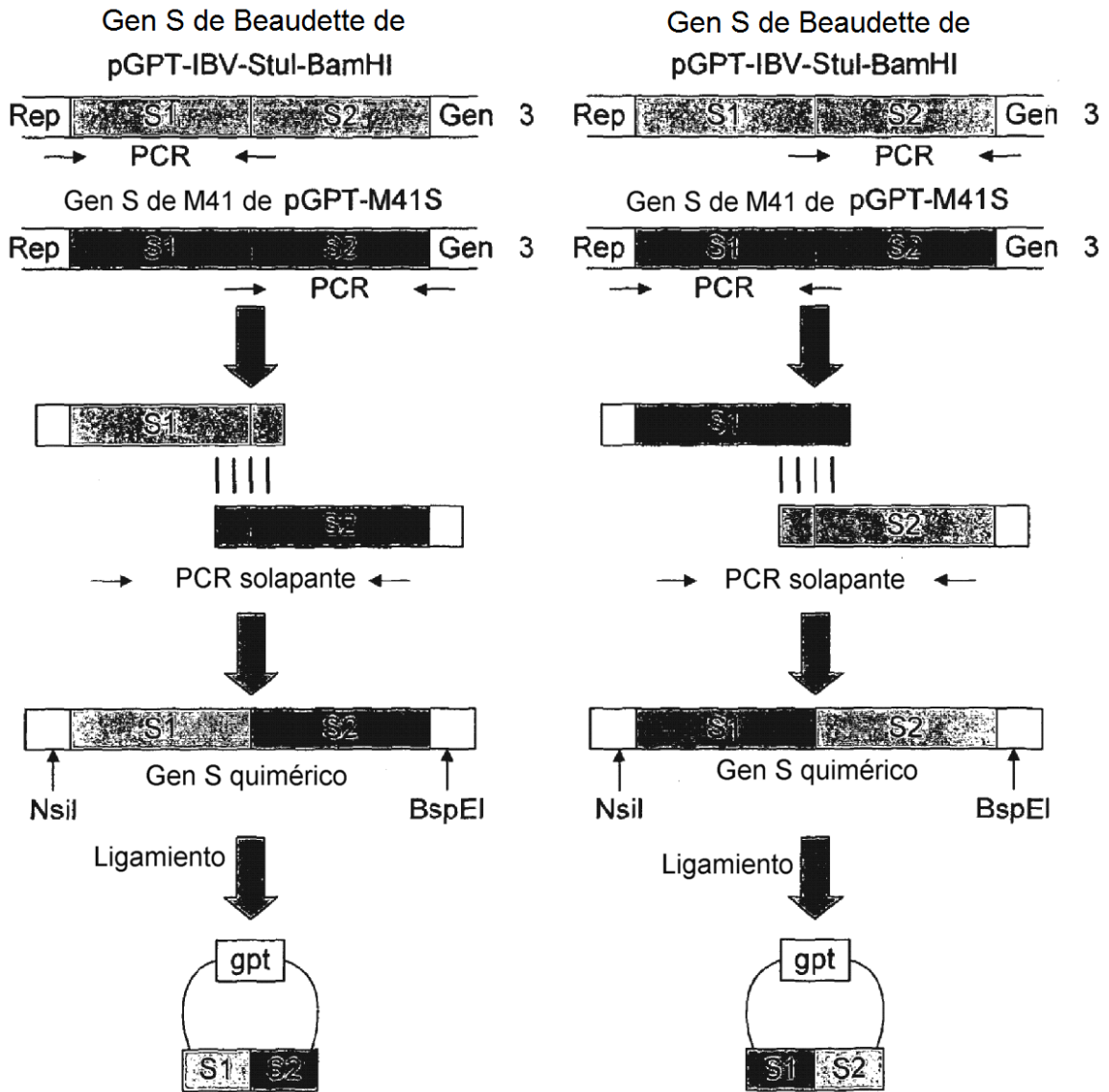


FIG. 3

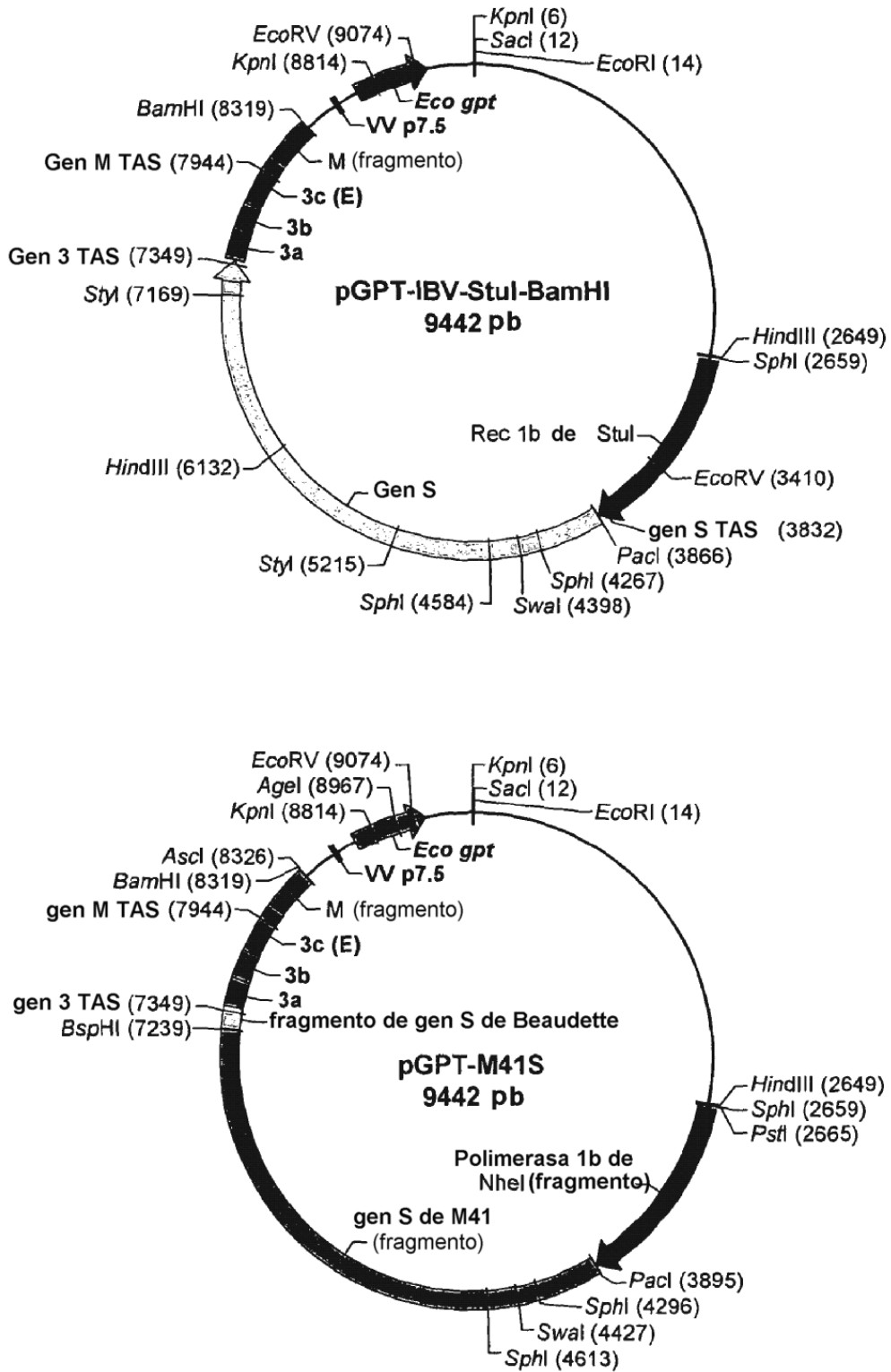


FIG. 4

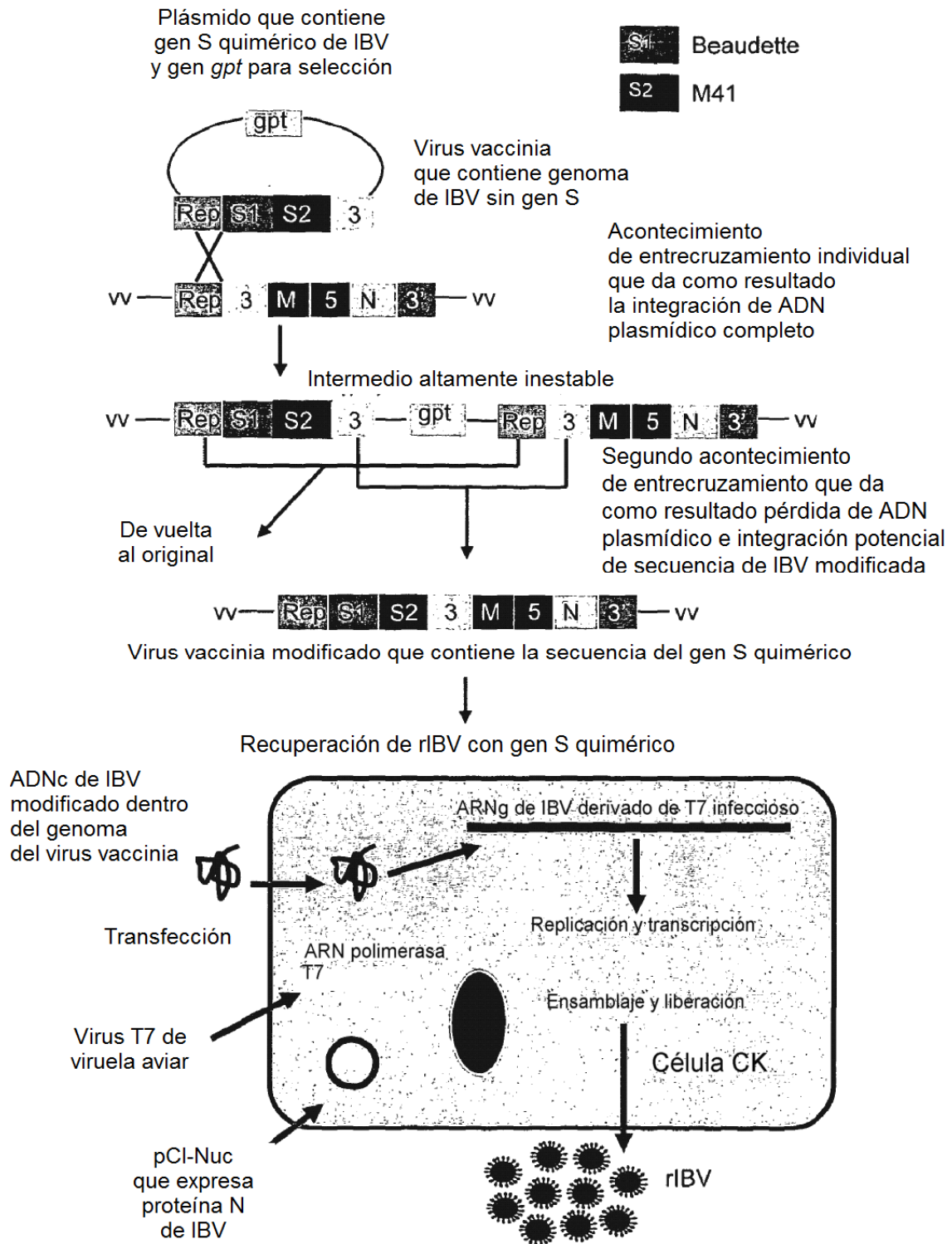


FIG. 5

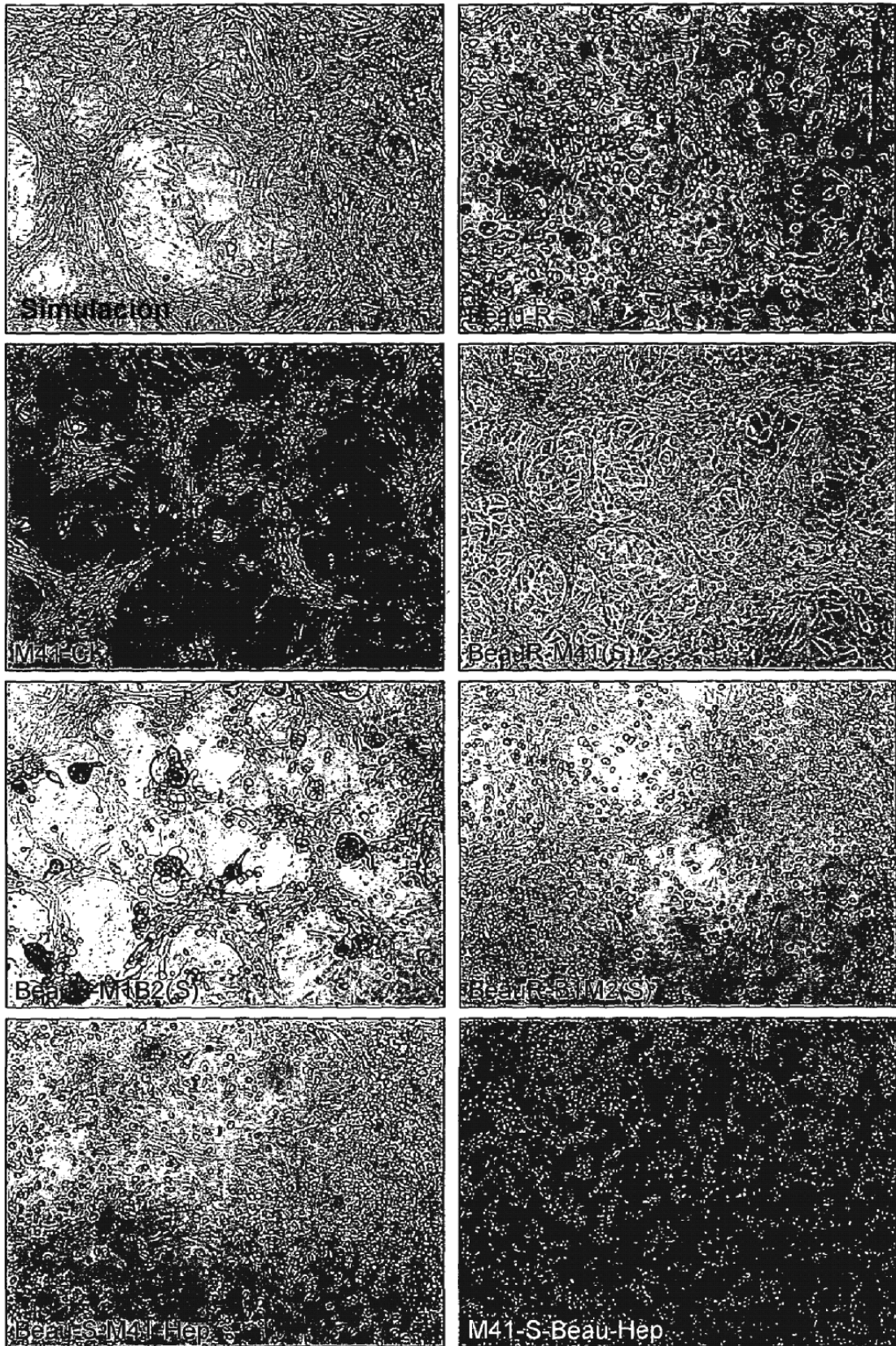


FIG. 6

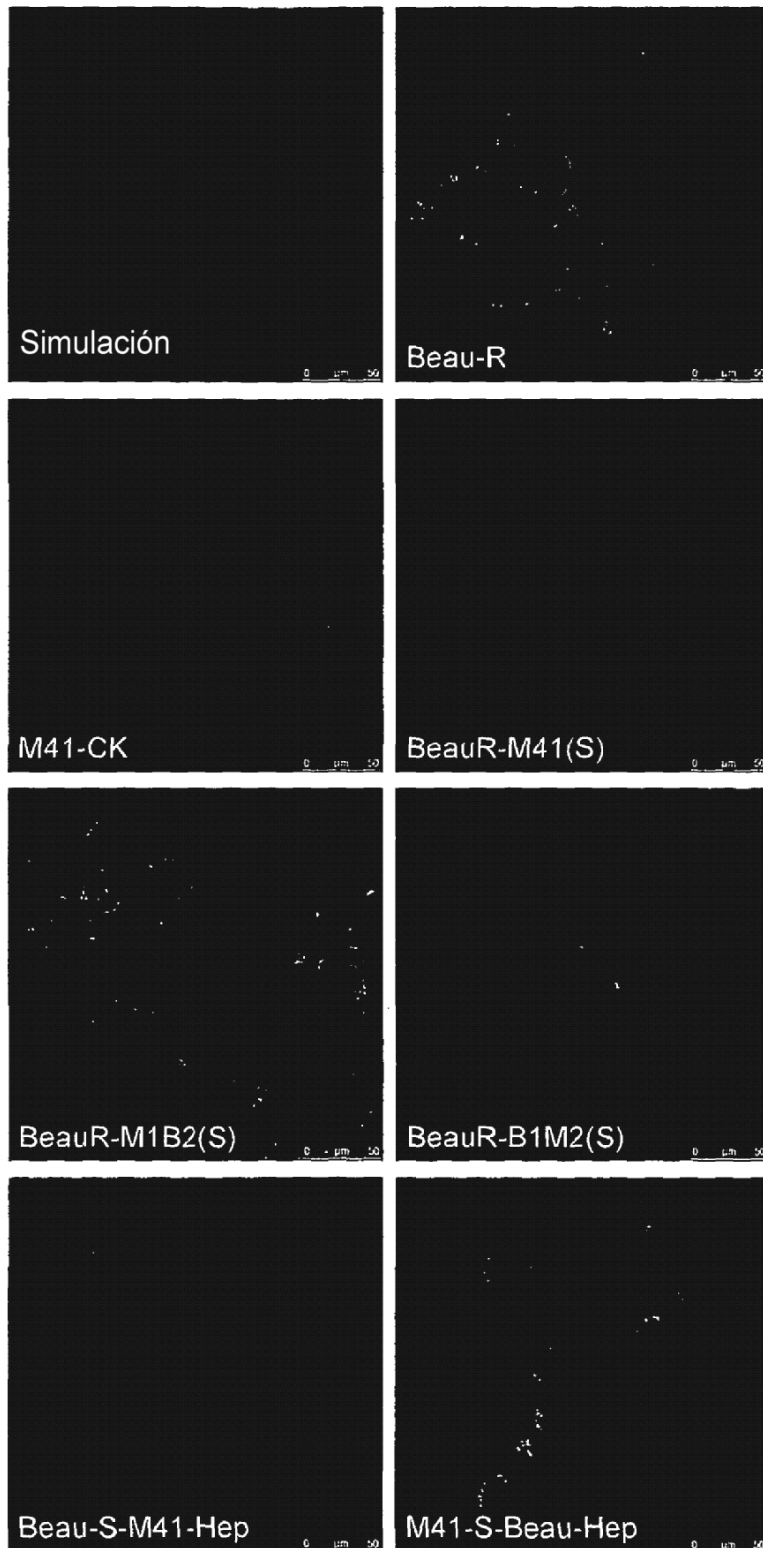


FIG. 7

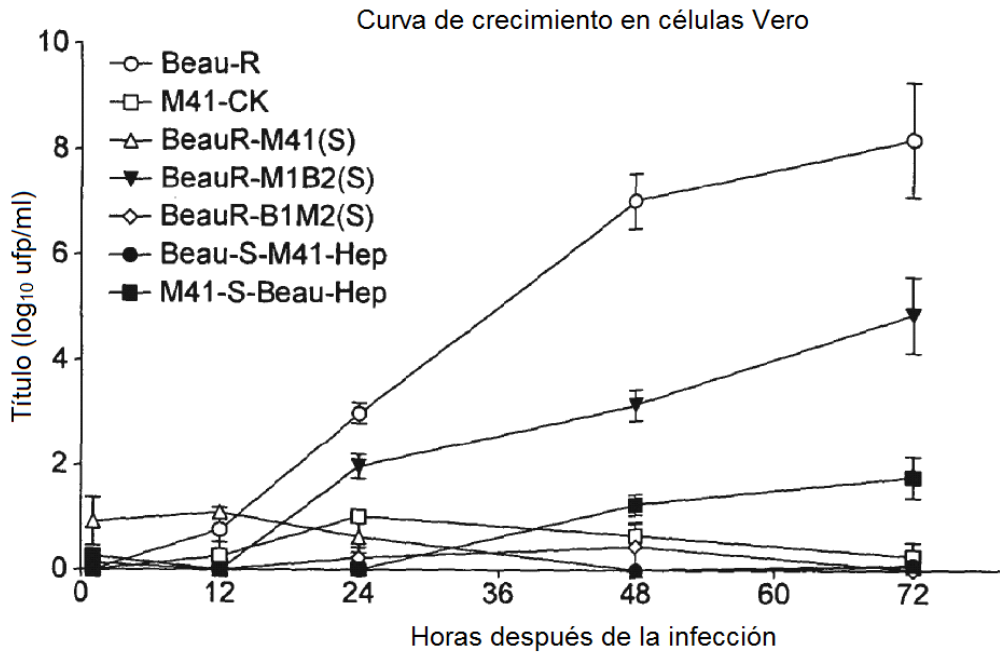


FIG. 8

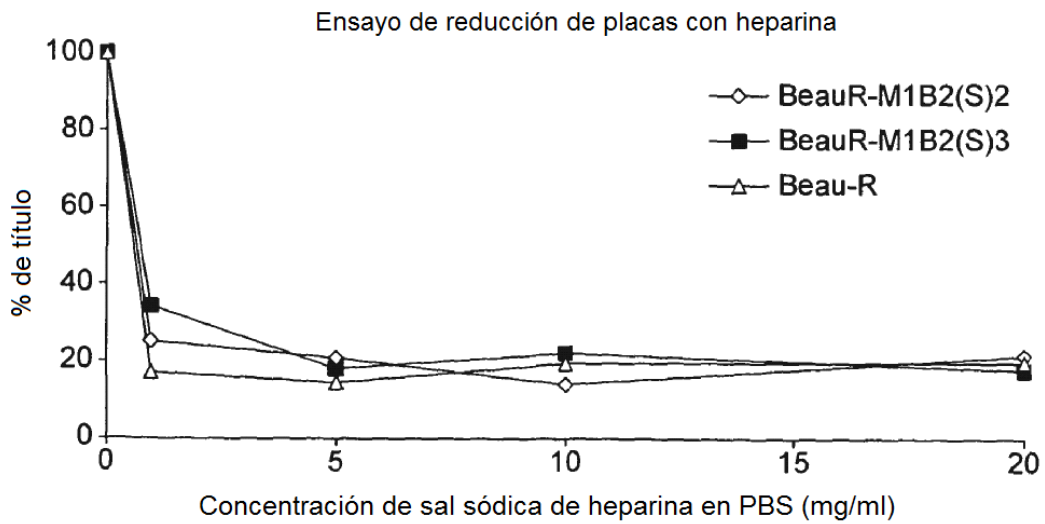


FIG. 9

Comparación de porcentaje de células infectadas con y sin heparina por microscopia confocal

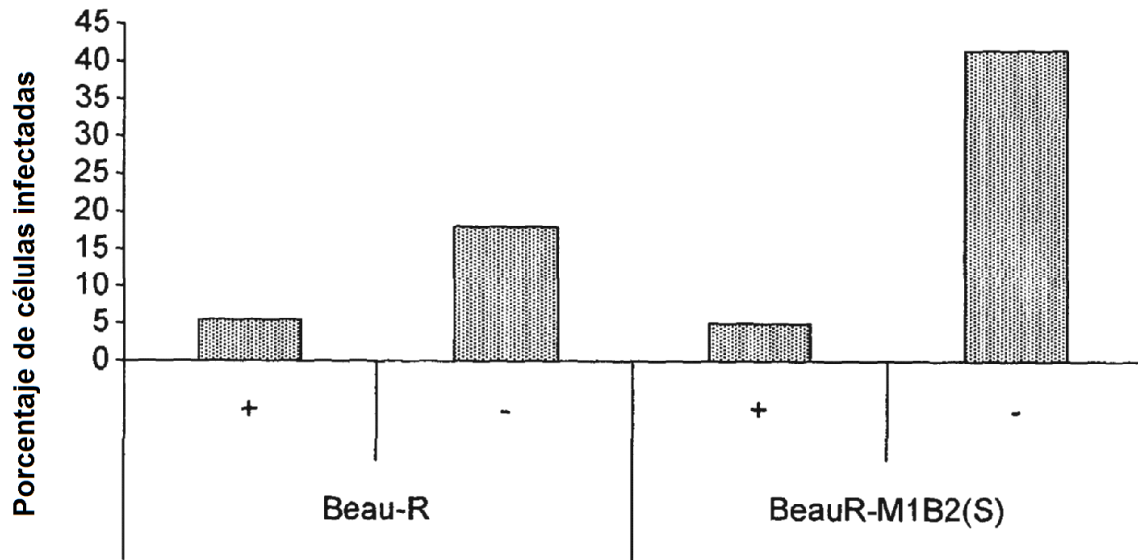


FIG. 10

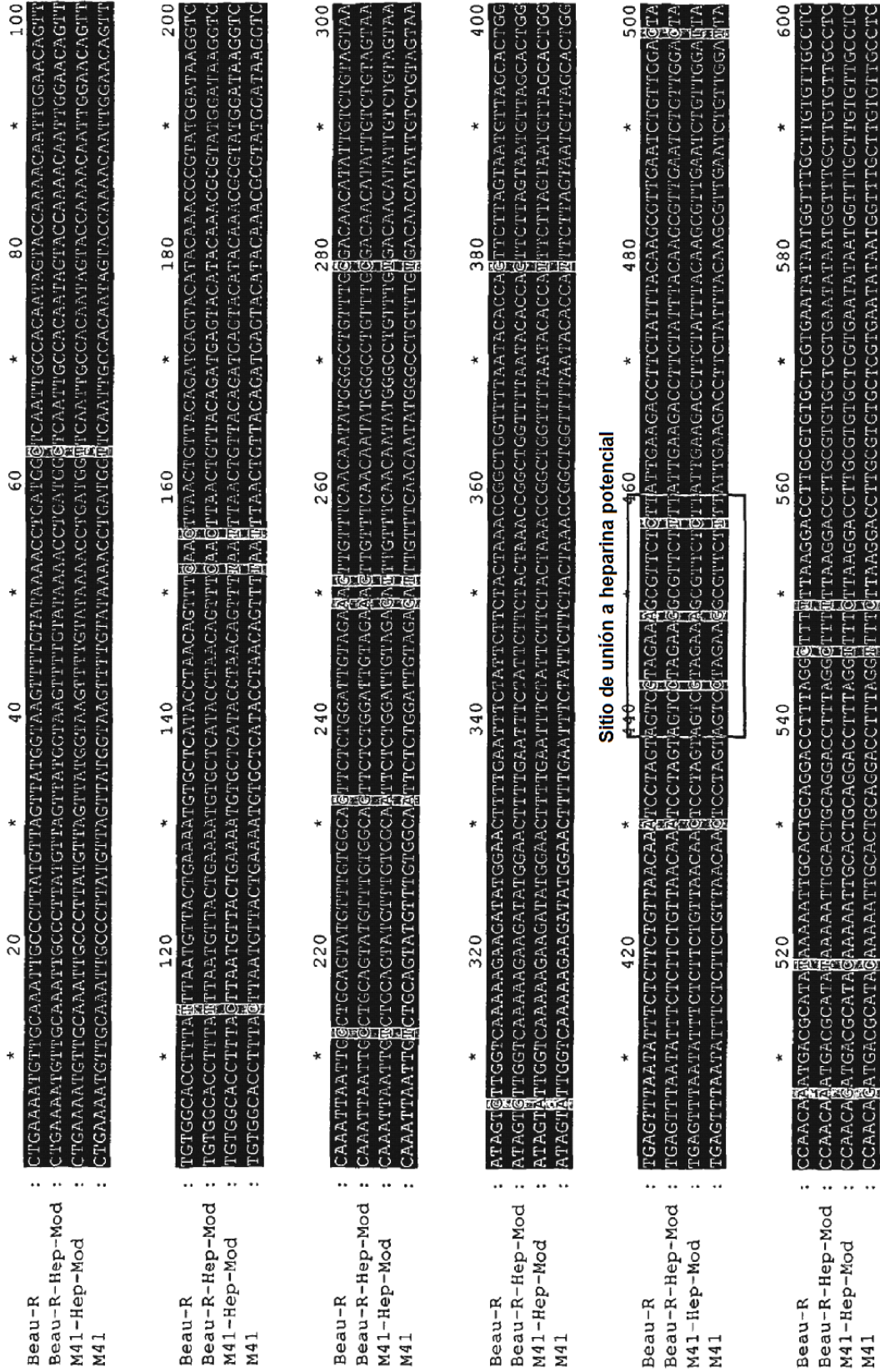
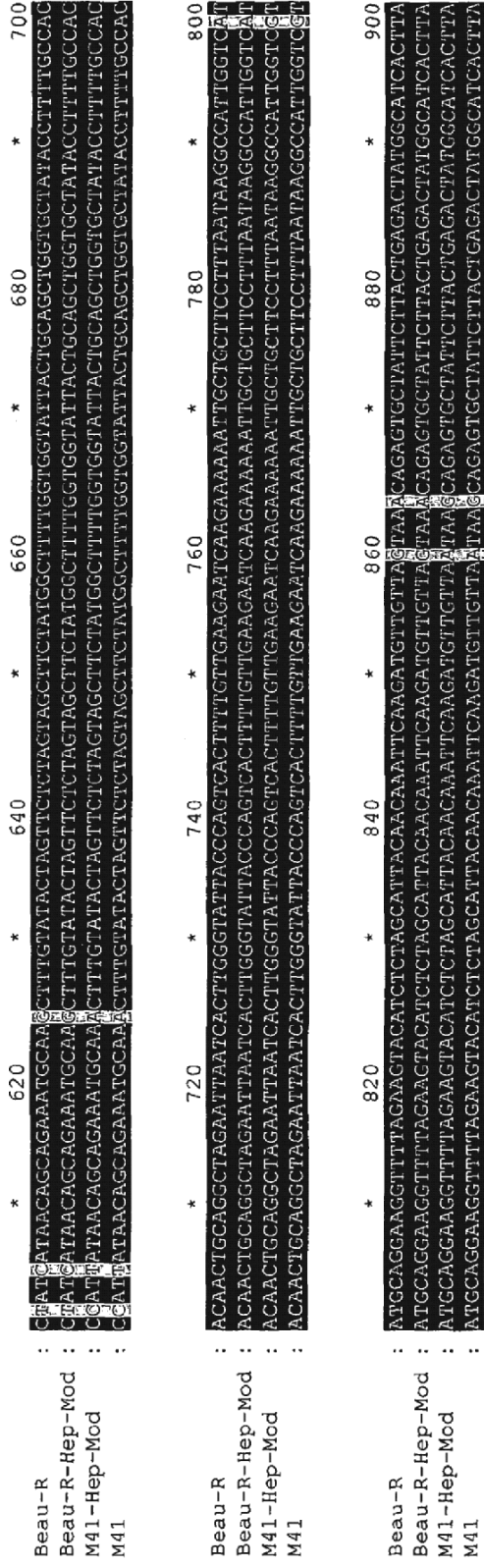


FIG. 11



Obsérvese por favor. -

Beau-R corresponde a Beaudette que crece en células Vero y que tiene el sitio de unión a heparán sulfato potencial
M41 no crece en células Vero y no tiene el sitio de unión a heparán sulfato potencial
Beau-R-Hep-Mod tiene la secuencia modificada que tiene sitio de unión a heparán sulfato potencial modificado para la secuencia de M41 correspondiente
M41-Hep-Mod tiene la secuencia modificada que tiene sitio de unión a heparán sulfato potencial de Beaudette introducido en la secuencia de M41

FIG. 11 CONTINUACIÓN

ES 2 589 057 T3

```

                *           20           *           40           *           60           *           80
Beau-CK : MLVTPLLLVTLCLCSAMLYDSSSYVYVYQSAFRPPSGHHLGGAYAVVNISSEFNAGSSSGCTVGLIHGGRVNVASS
M41-CK : MLVTPLLLVTLCLCSAALYDSSSYVYVYQSAFRPPNGWHLHGAYAVVNISSEFNAGSSSGCTVGLIHGGRVNVASS

                *           100          *           120          *           140          *           160
Beau-CK : IAMTAPSSGMAMSSSQFCTAHCNFSDTTVFVTHCYKHGGCPLTGMLOQLIRVSAMKNGQLFYNLTVSVAKYPTFRSFCQ
M41-CK : IAMTAPSSGMAMSSSQFCTAHCNFSDTTVFVTHCYKYDGCPLTGMLOQLIRVSAMKNGQLFYNLTVSVAKYPTFRSFCQ

                *           180          *           200          *           220          *           240
Beau-CK : VNNLTSVYLNGLDLYVTSNETIDVTSAGVYFKAGGPIITYKVMREVKALAYFVNGTAQDVLCDGSPRGLLACOYNTGNFSE
M41-CK : VNNLTSVYLNGLDLYVTSNETIDVTSAGVYFKAGGPIITYKVMREVKALAYFVNGTAQDVLCDGSPRGLLACOYNTGNFSE

                *           260          *           280          *           300          *           320
Beau-CK : GFYPTINSSLVKQKFIIVYRENSVNTTCTLHNFIHFHNETGAMPNPSGVQNIQTYQTKTAQSGYYNFNFSFLSSFVYKESNF
M41-CK : GFYPTINSSLVKQKFIIVYRENSVNTTCTLHNFIHFHNETGAMPNPSGVQNIQTYQTKTAQSGYYNFNFSFLSSFVYKESNF

                *           340          *           360          *           380          *           400
Beau-CK : MYGSYHPSCKFRLETINGLWFNSLSVSIAYGPLQGCKQSVFKGRATCCYAYSYGGPSLCKGVYSGELDHFECGLLVY
M41-CK : MYGSYHPSCKFRLETINGLWFNSLSVSIAYGPLQGCKQSVFKGRATCCYAYSYGGPSLCKGVYSGELDHFECGLLVY

                *           420          *           440          *           460          *           480
Beau-CK : VTKSGCSRIGTATEPPVITQNNYNNITLNTCVDYNIYGRTGQGFITNVTD SAVSYNYLADAGLAILDTSGSDIFVVOQE
M41-CK : VTKSGCSRIGTATEPPVITRHNNYNNITLNTCVDYNIYGRTGQGFITNVTD SAVSYNYLADAGLAILDTSGSDIFVVOQE

                *           500          *           520          *           540          *           560
Beau-CK : YGIIYYKYVPCEDVNQQFVVS GGKLVGILTSRNETGSQLEENQFYIKITNGTRFRFRSITENVANC PYVSYGKFCIKPDG
M41-CK : YGLIYYKYVPCEDVNQQFVVS GGKLVGILTSRNETGSQLEENQFYIKITNGTRFRFRSITENVANC PYVSYGKFCIKPDG

                *           580          *           600          *           620          *           640
Beau-CK : SIATIVPKQLEQFVAPLQNVTVNVLIPNSFNLTVTDEYIQTRMDKQVQINCLQYVCGSSLDCKKLFQOYGPVCDNLSVNV
M41-CK : SIATIVPKQLEQFVAPLQNVTVNVLIPNSFNLTVTDEYIQTRMDKQVQINCMQYVCGSSLDCKRDLFQOYGPVCDNLSVNV

                *           660          *           680          *           700          *           720
Beau-CK : SVGQKEDMELLNFYSSTKPGAFNTPVLSNVSTGEFNISLTLTPSSRRKRSLEDDLFTSVESVGLPTNDAYKNCITAGPI
M41-CK : SIGQKEDMELLNFYSSTKPGAFNTPVLSNVSTGEFNISLTLTPSSRRKRSLEDDLFTSVESVGLPTNDAYKNCITAGPI

                *           740          *           760          *           780          *           800
Beau-CK : GFLKDIACAREYNGLLVLPPIITAEMQALYSSSLVASMFCGITAAGAI PFATQLQARINHLGITQSLLLKNQEKIASE
M41-CK : GFLKDIACAREYNGLLVLPPIITAEMQALYSSSLVASMFCGITAAGAI PFATQLQARINHLGITQSLLLKNQEKIASE

                *           820          *           840          *           860          *           880
Beau-CK : NKAIGRMQEGFRSTSLALQOIQDVVSKOSAILTETMASLNKNFGAISSMVIQEIYQCFDAIQANAQVDRILITGRLSLSLVL
M41-CK : NKAIGRMQEGFRSTSLALQOIQDVVSKOSAILTETMASLNKNFGAISSMVIQEIYQCFDAIQANAQVDRILITGRLSLSLVL

                *           900          *           920          *           940          *           960
Beau-CK : ASAKQAEYIRVSCQRELATQKINECVKSQSI RYSFCGNGRHVLTIPONAPNGIVFIHFSYTPDSFVNVTAVGFCVVKPAN
M41-CK : ASAKQAEYIRVSCQRELATQKINECVKSQSI RYSFCGNGRHVLTIPONAPNGIVFIHFSYTPDSFVNVTAVGFCVVKPAN

                *           980          *           1000         *           1020         *           1040
Beau-CK : ASOYAIVPANGRGIFIQVNGSYIITARDNYMPRAITAGDVTTLTSCQANYVSVNKTIVITTFVNDNDDFDNDELSKWRNDT
M41-CK : ASOYAIVPANGRGIFIQVNGSYIITARDNYMPRAITAGDVTTLTSCQANYVSVNKTIVITTFVNDNDDFDNDELSKWRNDT

                *           1060         *           1080         *           1100         *           1120
Beau-CK : KHELPDFDFKFNYPVILDIDSEIDRIQGVIQGLNDSLIDLEKLSILKTYIKWPWYVWLAIAFATIFILILGWVFFMTGC
M41-CK : KHELPDFDFKFNYPVILDIDSEIDRIQGVIQGLNDSLIDLEKLSILKTYIKWPWYVWLAIAFATIFILILGWVFFMTGC

                *           1140         *           1160
Beau-CK : CGCCCGCFGIMPLMSKCGKKSSYYTTFDNDVVT EQYRPKKS V
M41-CK : CGCCCGCFGIMPLMSKCGKKSSYYTTFDNDVVT -----
    
```

FIG. 12a

ES 2 589 057 T3

```

                *      20      *      40      *      60      *      80
Beau-CK : FRRSITENVANCPYVSYGKFCIKPDGSIATIVPKOLEQFVAPLENVTEENVLIPNSFNLTVTDEYIQTRMDKVQINCLQYV
M41-CK : FRRSITENVANCPYVSYGKFCIKPDGSIATIVPKOLEQFVAPLENVTEENVLIPNSFNLTVTDEYIQTRMDKVQINCMQYV

                *      100     *      120     *      140     *      160
Beau-CK : CGSILDCRDLFQQYGPVCDNILSVVNSVGQKEDMELLNFYSSTKPAGFNTFVLSNVSTGEFNISLLLTNPSSRKRKRSLE
M41-CK : CGSILDCRDLFQQYGPVCDNILSVVNSVGQKEDMELLNFYSSTKPAGFNTFVLSNVSTGEFNISLLLTNPSSPERRSFIE

                *      180     *      200     *      220     *      240
Beau-CK : DLLFTSVESVGLPTNDAYKNCTAGPLGFFKDLACAREYNGLLVLPPIITAEMQALYTSLLVASMAGFGITPAAGAIFFATC
M41-CK : DLLFTSVESVGLPTNDAYKNCTAGPLGFLKDLACAREYNGLLVLPPIITAEMQALYTSLLVASMAGFGITPAAGAIFFATC

                *      260     *      280     *      300     *      320
Beau-CK : LQARINHLGITQSLLLRNQEKIAASFNKAICRHWQEGFRSTSLALQQIQDVVSKQSAILTETWASLNKNFGAISSMIQEIV
M41-CK : LQARINHLGITQSLLLRNQEKIAASFNKAICRHWQEGFRSTSLALQQIQDVVSKQSAILTETWASLNKNFGAISSMIQEIV

                *      340     *      360     *      380     *      400
Beau-CK : QCFDAIQANAQVDRLLITGRLLSSLSVLASAKQAEHTRVSOQRELATQKINECVKSQSIKYSFCGNGRHLVLTIPQNA PNGIV
M41-CK : QCFDAIQANAQVDRLLITGRLLSSLSVLASAKQAEHTRVSOQRELATQKINECVKSQSIKYSFCGNGRHLVLTIPQNA PNGIV

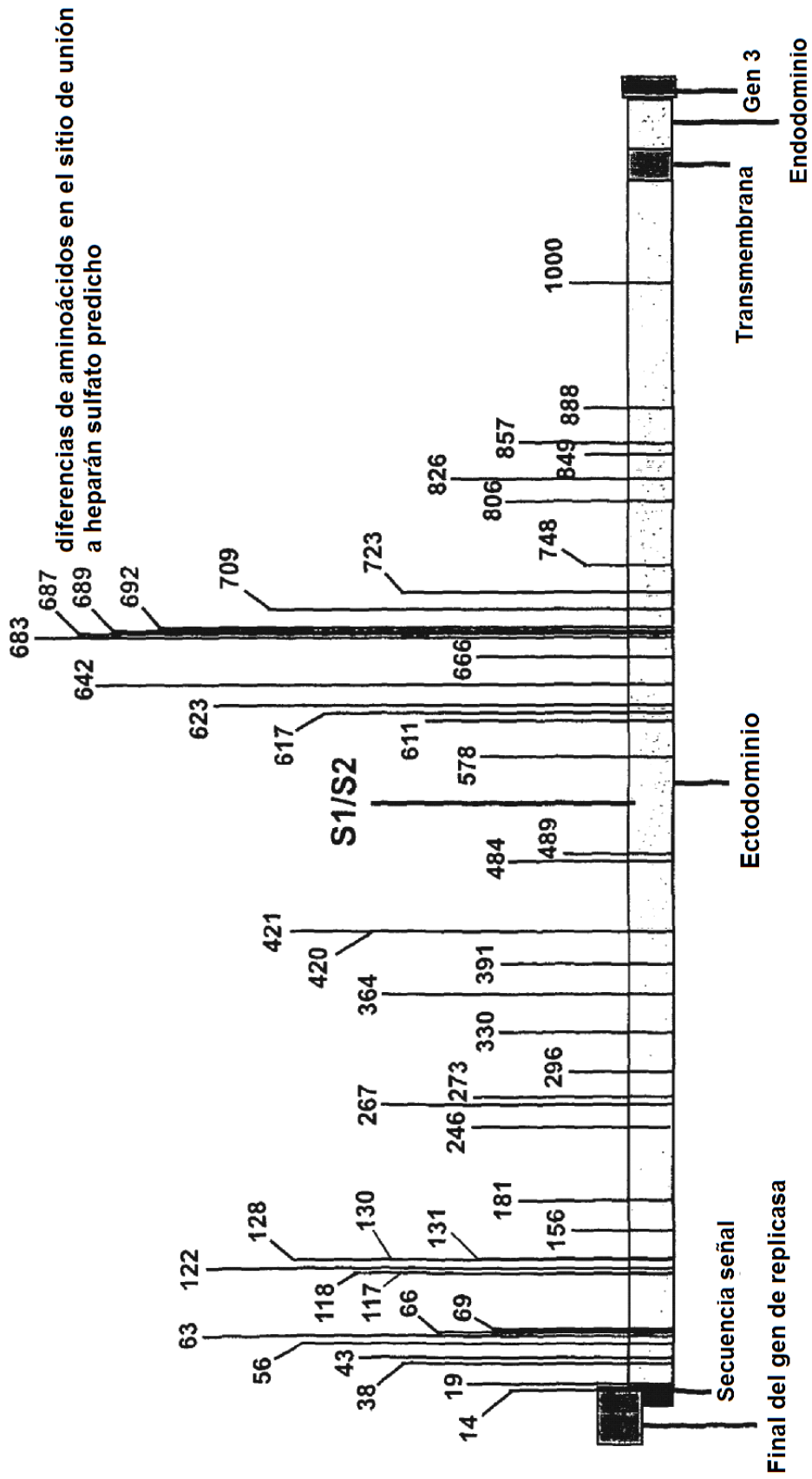
                *      420     *      440     *      460     *      480
Beau-CK : FIHFSYTPDSFVNVTAIIVGFCVKPANASQYAIVPANGRGIFIQVNGSYYITARDMYNPRAITAGDIIVTLTSCQANYVSVN
M41-CK : FIHFSYTPDSFVNVTAIIVGFCVKPANASQYAIVPANGRGIFIQVNGSYYITARDMYNPRAITAGDIIVTLTSCQANYVSVN

                *      500     *      520     *      540     *      560
Beau-CK : KTVITTFVDNDDDFDNDELKSKWVNDTKHELPDFDKFNVTVPILDIDSEIDRIQGVIOGLNDSLIDLEKLSILKTYIKWPW
M41-CK : KTVITTFVDNDDDFDNDELKSKWVNDTKHELPDFDKFNVTVPILDIDSEIDRIQGVIOGLNDSLIDLEKLSILKTYIKWPW

                *      580     *      600     *      620
Beau-CK : YVWLAIAPATIIIFILILGWVFFMTGCCGCCCGFGIMPLMSKCGKKSSYYTTFDNDVVTEQYRPKKSIV
M41-CK : YVWLAIAPATIIIFILILGWVFFMTGCCGCCCGFGIMPLMSKCGKKSSYYTTFDNDVVTEQYRPKKSIV-----

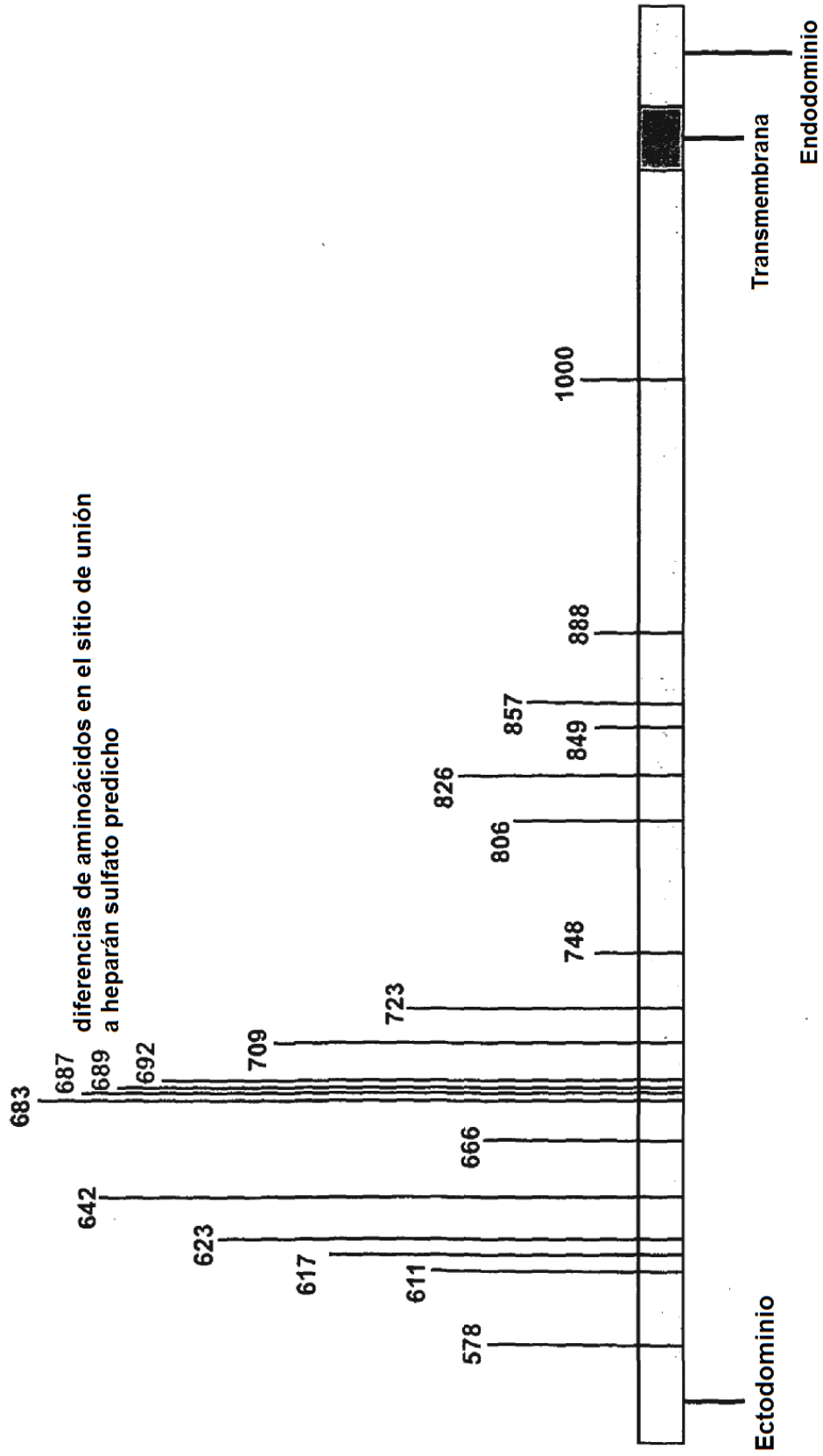
```

FIG. 12b



Los números se refieren a la posición de las diferencias de aminoácidos

FIG. 13



Los números se refieren a la posición de las diferencias de aminoácidos

FIG. 14