

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 928**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2006** **PCT/US2006/014068**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2006** **WO06113435**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2006** **E 06750177 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** **EP 1869471**

54 Título: **Procedimiento para la producción de circovirus porcino**

30 Prioridad:

13.04.2005 US 670892 P

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

17.11.2016

73 Titular/es:

MERIAL, INC. (100.0%)
3239 Satellite Boulevard, Bldg. 500
Duluth, GA 30096 , US

72 Inventor/es:

ALLIBERT, PATRICE;
CUPILLARD, LIONEL PIERRE y
REYES, JEAN

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 589 928 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

Procedimiento para la producción de circovirus porcino

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

10 **[0001]** La presente invención se refiere a procedimientos de control durante el proceso del rendimiento viral durante procesos de producción por incubación discontinua utilizando análisis de clasificación de células con anticuerpos fluorescentes. La presente invención se refiere además a procedimientos de control durante el proceso y la recogida de cultivos celulares infectados con circovirus en un medio que puede carecer de un componente de suero.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 **[0002]** El síndrome del desmedro multisistémico post-destete (PMWS) es una enfermedad reconocida recientemente de cerdos jóvenes. El síndrome de PMWS detectado en Canadá, Estados Unidos y Francia está caracterizado clínicamente por una pérdida gradual de peso y por manifestaciones, tales como taquipnea, disnea e ictericia. Desde el punto de vista patológico, se manifiesta por infiltraciones linfocíticas o granulomatosas, linfadenopatías y, más raramente, por hepatitis y nefritis linfocítica o granulomatosa (Clark E.G. (1997) Proc Am Assoc Swine Prac 499-501; La Semaine veterinaire No. 26, suplemento de La Semaine veterinaire 1996 (834); La Semaine veterinaire 1997 (857): 54; Nayar et al (1997) Can Vet J. 38: 385-387). El tratamiento y prevención de esta enfermedad no están disponibles actualmente. Varias líneas de evidencia, sin embargo, apuntan al circovirus porcino como el agente etiológico de PMWS (Ellis et al (1998) Can Vet J. 39: 44-51). Los circovirus se han recuperado de los cerdos con PMWS y se ha demostrado anticuerpos para circovirus porcino en cerdos con la enfermedad.

25 **[0003]** Una familia de virus, llamada Circoviridae, que se encuentra en una gama de especies de plantas y animales, y comúnmente conocida como circovirus, se caracterizan por ser viriones redondos, no envueltos, con diámetros promedio de 17 a 23,5 nm que contienen ácido desoxirribonucleico de cadena simple circular (ssADN). El genoma de ssADN de los circovirus representa los replicones de ADN virales más pequeños conocidos. Como se ha descrito en el documento WO 99/45956, se han identificado al menos seis virus como miembros de la familia según el sexto informe del Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (Lukert et al., 1995, The Circoviridae, pág. 166-168. en Murphy, et al. (eds.) Virus Taxonomy, Sexto Informe del Comité Internacional de Taxonomía del Virus, Arch. Virol. 10 Supl.).

35 **[0004]** Los virus animales incluidos en la familia son el virus de la anemia del pollo (CAV); virus de la enfermedad del pico y las plumas (BFDV); circovirus porcino (PCV); y circovirus de paloma. El PCV se aisló originalmente de cultivos celulares de riñón porcino. El PCV se replica en el núcleo celular y produce grandes cuerpos de inclusión intranucleares. Véase Murphy et al. (1999, Circoviridae p. 357-361, Veterinary Virology, 3ª ed., Academic Press, San Diego). Actualmente hay dos tipos reconocidos de PCV, PCV tipo 1 (PCV1) y PCV tipo 2 (PCV2). El PCV1, aislado como contaminante persistente de la línea celular de riñón porcino continua, PK-15 (ATCC CCL31), no causa efectos citopáticos detectables en el cultivo celular y no produce la enfermedad clínica en cerdos después de la infección experimental (véase Allan G. (1995). Vet Microbiol 44: 49-64; Tischer et al (1982), Nature 295: 64-66; y Tischer et al (1986) Arch Virol 91: 271-276).

45 **[0005]** Sólo muy recientemente algunos autores han pensado que cepas de PCV podrían ser patógenas y estar asociadas con el síndrome de PMWS (Nayar et al (1997) Can Vet J. 38: 385-387 y Clark E.G. (1997) Proc. Am. Assoc. Swine Prac. 499-501). Nayar et al. han detectado ADN de PCV en cerdos que tienen el síndrome PMWS usando técnicas de PCR. PCV2, a diferencia de PCV1, está estrechamente asociado con el síndrome del desmedro multisistémico post-destete (PMWS) en cerdos destetados (véase Allan et al (1998) Eur J. Vet Diagn Invest. 10: 3-10; Ellis et al. (1998) Can Vet J. 39: 44-51 y Morozov et al (1998), J. Clin Microbiol 36: 2535-2541).

50 **[0006]** Las secuencias de nucleótidos para PCV1 se describen en Mankertz et al. (1997) J. Virol. 71: 2562-2566) y Meehan et al. (1997) J. Gen. Virol. 78: 221-227) y las secuencias de nucleótidos para PCV2 se describen en Hamel et al. (1998) J. Virol. 72: 5262-5267; Mankertz et al. (2000) Virus Res. 66: 65-77 y Meehan et al. (1998) J. Gen. Virol. 79: 2171-2179. Las cepas de PCV2 se dan a conocer en el documento WO 00/01409 y han sido depositadas en la Colección Europea de Cultivos Celulares, Centro de Microbiología Aplicada e Investigación, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Reino Unido e incluyen: N° de acceso V97100219; N° de acceso V970C218; N° de acceso V97100217; N° de acceso V98011608; y N° de acceso V98011609. El documento WO 00/77216 también describe PCV2.

60 **[0007]** Se han identificado hasta trece marcos de lectura abierta (ORF) en el genoma de PCV2. ORF1 (Meehan et al., (1998)), designado alternativamente como ORF4, comprende el nucleótido 398-1342 (GenBank N° de acceso AF055392) y tiene el potencial para codificar una proteína con un peso molecular predicho de 37,7 kD. ORF2 (Meehan et al, (1998); designado alternativamente como ORF13, comprende los nucleótidos 1381-1768 unidos a 1-314 (GenBank N° de acceso AF055392) y puede codificar una proteína con un peso molecular predicho de 27,8 kD. La descripción adicional del ORF 1 a 13 de PCV2 se puede hallar en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.368.601, 6.391.314, 6.660.272, 6.217.883, 6.517.843, 6.497.883, así como AU 764379, EP 1019510, MX 221,562,

MX 216996, RU 2237492 y NZ 505008.

[0008] *ORF1* de PCV2 es muy similar (86% de identidad) con el *ORF1* del aislado de PCV1 (Meehan et al., (1998)). La proteína *ORF1* de PCV1 se ha caracterizado parcialmente (Meehan et al, 1997; Mankertz et al, (1998) Virus genes 16: 267-276) y se ha demostrado que es esencial para la replicación del virus, más probablemente está implicada en la replicación del ADN viral.

[0009] La identidad de secuencia de proteína entre los respectivos *ORF2* fue menor (66% de identidad) que la existente entre los *ORF1*, pero cada uno de los *ORF2* compartía una región N-terminal básica muy conservada, similar a la observada en la región N-terminal de la principal proteína estructural del virus del circovirus aviar virus de la anemia de pollo (CAV) (Meehan et al., 1998). Recientemente, Mankertz et al., en (1998) J. Gen. Virol. 79: 381-384 ha sugerido que el *ORF2* del aislado con PCV1 (designado *ORF1* en Mankertz et al., 1998) codifica una proteína de la cápside. El análisis de la transcripción del genoma de PCV2 no se ha publicado todavía. Los datos recientes obtenidos con el aislado con PCV1 indicaron que la transcripción de *ORF2* está empalmado (Mankertz et al., 1998).

[0010] Los estudios publicados hasta la fecha sobre PCV2 utilizaron un homogeneizado de tejido o virus cultivados derivados de aislados del campo. Tischer et al ((1987) Arch Virol. 96: 39-57) describen que las células de riñón de cerdo son estimuladas para entrar en la fase S en el ciclo celular mediante tratamiento con D-glucosamina. Sin embargo, el tratamiento debe realizarse con precaución debido a que la D-glucosamina es tóxica para el cultivo celular (véase, Allan et al (2000) J. Vet Diagn Investigation 12: 3-14).

[0011] Gilpin et al. 2003 divulga la detección de antígeno de PCV2 en el citoplasma de los monocitos, macrófagos pulmonares y macrófagos derivados de monocitos expuestos al virus in vitro mediante análisis de inmunofluorescencia y el fenotipo de estas células se confirmó mediante detección los marcadores celulares de la superficie de células monocíticas utilizando citometría de flujo.

[0012] McNeilly et al (2001) describen la producción y caracterización de anticuerpos monoclonales para PCV2.

[0013] Meerts, P. et al. (2005) Arch. Virol. 150: 427-441 se refiere a un estudio in vitro de la cinética de replicación de circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en macrófagos alveolares porcinos (PAM), cardiomiocitos fetales (FCM) y células PK-15.

[0014] Existe aún la necesidad de procedimientos para el cultivo de circovirus incluyendo, por ejemplo, PCV1, PCV2 y otros circovirus, de manera que sea posible el circovirus con alto rendimiento. Dichos procedimientos serían ventajosos, en particular para la preparación, de antígenos de PCV2 como vacunas dirigidas contra PMWS. La presente invención aborda esta necesidad. La memoria se refiere a procedimientos para el crecimiento y la cuantificación de una cantidad infecciosa o antigénica y la determinación de anticuerpos contra el circovirus, en particular circovirus porcinos (PCV), que permiten un control durante el proceso del progreso de la producción del virus en el cultivo discontinuo.

[0015] A pesar de que los circovirus porcinos pueden detectarse como un agente contaminante en los cultivos de tejidos de cerdo, los cultivos discontinuos a gran escala con éxito del virus requieren ensayos rápidos para permitir el control continuo del progreso de la producción viral para obtener rendimientos óptimos. El objetivo de la presente memoria, por lo tanto, era desarrollar un procedimiento para el control del progreso del cultivo de un circovirus, tal como un circovirus porcino, in vitro para poder examinar la expresión cinética de los ORF. También se pretendía aumentar el rendimiento del virus de un cultivo celular para la producción de una vacuna que puede requerir PCV inactivado o una cepa de PCV no virulenta (por ejemplo, a través de la selección de una cepa de PCV no virulenta después de la adaptación a diferentes cultivos celulares y/o después del tratamiento de cultivos de células infectadas con mutágenos o después de la modificación genética del PCV) como vacuna viva. Además, el material antigénico obtenido a partir de circovirus porcinos desarrollados también se puede emplear para fines de diagnóstico. Existe la necesidad, por lo tanto, de poder controlar periódicamente y rápidamente el progreso de un cultivo celular discontinuo de un circovirus en condiciones que proporcionan partículas virales adecuadas para la vacuna o para otros fines. Existe la necesidad de procedimientos de control que pueden dar resultados rápidos, en lugar de los procedimientos que requieren mucho tiempo y trabajo empleados en la actualidad para tal objetivo.

[0016] La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no es una admisión de que dicho documento esté disponible como técnica anterior a la presente invención.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0017] En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de circovirus, que comprende:

sembrar un cultivo de células huésped con un cultivo de siembra de un circovirus;

incubar el cultivo de células huésped en ausencia de suero de ternera fetal;

controlar (i) la viabilidad de las células huésped, y (ii) la expresión de *ORF1* y *ORF2* por las células huésped; y

recoger el circovirus del cultivo de células huésped cuando la expresión de *ORF2* es aproximadamente la misma en

las células no adherentes y las células adherentes del cultivo de células huésped;
y en el que el circovirus es PCV2.

[0018] Esta memoria proporciona un procedimiento basado en FACS para el control durante el proceso y la determinación rápida del punto de recogida útil de un cultivo celular infectado con un circovirus, de manera que se puede obtener un rendimiento óptimo del virus. Los procedimientos abarcan proporcionar un cultivo de siembra de células huésped infectadas con circovirus e inocular un cultivo discontinuo con las mismas, incubar el cultivo de siembra, extraer partes alícuotas de las células cultivadas, separar las células sobrenadante y las células adherentes, liberar las células adherentes de su sustrato, determinar la viabilidad de las células huésped, y determinar el porcentaje de células positivas en ORF1 y ORF2 por FACS, determinando de este modo el punto de recogida del cultivo.

[0019] Un aspecto de la memoria proporciona un procedimiento basado en FACS para detectar la producción de antígeno de circovirus por un cultivo de células huésped, en el que el procedimiento puede comprender las etapas de obtener a partir de un cultivo de células huésped infectadas con un circovirus una muestra que comprende una población de células huésped no adherentes y una población de células huésped que se adhieren a un sustrato, aislar de la muestra las células huésped no unidas al mismo, aislar de la muestra las células huésped adherentes y el sustrato de las mismas y liberar las células huésped adherentes del sustrato, determinar la cantidad de ORF1 en las células huésped no adherentes y adherentes liberadas mediante el contacto de dichas células con un anticuerpo específico de ORF1, determinar el porcentaje de células infectadas en las células huésped no adherentes y adherentes liberadas mediante el contacto de dichas células con un anticuerpo específico de ORF2, y relacionar el porcentaje de células positivas en ORF1 y ORF2 en la muestra con la cantidad de circovirus en la muestra.

[0020] En diversas realizaciones del procedimiento, los circovirus pueden ser PCV2. En diversas realizaciones, la cepa de células huésped puede ser PK-15 u otras líneas celulares adecuadas. Se contempla, sin embargo, que los procedimientos de la memoria se pueden aplicar de manera útil para la detección y el control durante el proceso de la producción de cualquier circovirus cultivado en células huésped aisladas y para los que hay disponibles anticuerpos específicos del antígeno viral.

[0021] Otro aspecto de la memoria proporciona un procedimiento basado en FACS para el control durante el proceso de la producción de un circovirus a partir de células huésped cultivadas, que comprende las etapas de obtener a partir de un cultivo de células huésped infectadas con un circovirus una pluralidad de muestras dependiente del tiempo, comprendiendo cada muestra en la serie una población de células huésped no adherentes y una población de células huésped que se adhieren a un sustrato, aislar de cada muestra del cultivo celular las células no unidas al mismo, aislar de cada muestra de cultivo celular las células huésped adherentes y el sustrato de las mismas y liberar las células huésped adherentes del sustrato, determinar la viabilidad de las células huésped en las muestras mediante la medición de la captación de yoduro de propidio usando citometría de flujo, determinar el porcentaje de células positivas en ORF1 presentes en las células no adherentes y adherentes liberadas mediante la determinación de la cantidad de ORF1 en las células huésped no adherentes y adherentes liberadas mediante el contacto de dichas células con un anticuerpo específico de ORF1, determinar la cantidad de anticuerpo que se une a las células mediante FACS y relacionar la cantidad de anticuerpo unido a la cantidad de ORF1 presente en las células, determinar el porcentaje de células positivas en ORF2 presentes en las células no adherentes y adherentes liberadas mediante la determinación de la cantidad de ORF2 en las células huésped no adherentes y adherentes liberadas mediante el contacto de dichas células con un anticuerpo específico de ORF2, determinar la cantidad de anticuerpo que se une a las células mediante FACS y relacionar la cantidad de anticuerpo unido a la cantidad de ORF2 presente en las células, y representar los cambios en los niveles de viabilidad, ORF1 y ORF2, determinando, de este modo, la evolución con el tiempo de la producción del circovirus en el cultivo de células huésped.

[0022] En una realización de este procedimiento de la memoria, la viabilidad de las células se puede determinar con yoduro de propidio y citometría de flujo.

[0023] En las diversas realizaciones de este procedimiento de la memoria, el circovirus puede ser PCV2 y la cepa de células huésped puede ser PK-15, aunque los procedimientos no se deben interpretar como aplicables únicamente a esta combinación de cepa de circovirus/células huésped.

[0024] Sin embargo, otro aspecto de la memoria es un procedimiento de producción de circovirus con rendimiento que puede ser útil, por ejemplo, la preparación de una vacuna, que comprende las etapas de preparar un cultivo de siembra de un circovirus mediante el control durante el proceso de la expresión de ORF1 y sembrar un cultivo de células huésped con un cultivo de siembra de un circovirus, incubar el cultivo de células huésped en ausencia de suero de ternera fetal, controlar (i) la viabilidad de las células huésped, y (ii) la expresión de ORF1 y ORF2 por las células huésped y recoger el circovirus del cultivo de células huésped cuando la expresión de ORF2 es aproximadamente la misma en las células no adherentes y las células adherentes del cultivo de células huésped.

[0025] En diversas realizaciones de este aspecto de la memoria, el rendimiento de circovirus en el cultivo de siembra se puede determinar mediante el control de la expresión de antígenos de ORF1 y ORF2 de circovirus en células huésped sobrenadante utilizando un procedimiento basado en la clasificación de células con anticuerpos

fluorescentes (FACS), y en el que el cultivo de siembra se recoge cuando ORF2 es expresado por las células no adherentes.

[0026] En las diversas realizaciones de este aspecto de la memoria, se puede determinar la viabilidad de las células mediante la medición de la captación de yoduro de propidio usando citometría de flujo.

[0027] En las diversas realizaciones de este procedimiento de la memoria, el circovirus puede ser PCV2 y la cepa de las células huésped puede ser PK-15, aunque los procedimientos no se deben interpretar como aplicables únicamente a esta combinación de cepa de circovirus/célula huésped. Se contempla, sin embargo, que los procedimientos de la memoria se pueden aplicar de manera útil para la detección y el control durante el proceso de la producción de cualquier circovirus cultivado en células huésped aisladas y para los que hay disponibles anticuerpos específicos de antígeno viral.

[0028] Cabe indicar que en esta memoria y en particular en las reivindicaciones y/o párrafos, términos, tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares, pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y términos, tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en", tienen el significado que se le atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no citados explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

[0029] Estas y otras realizaciones se describen o son evidentes a partir de y están abarcadas por la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0030] La siguiente descripción detallada, proporcionada mediante ejemplos, pero que no pretende limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse mejor conjuntamente con los dibujos adjuntos en los que:

La figura 1 ilustra un esquema para la separación de sobrenadante y células PK-15 adherentes a partir de un cultivo de células y determinación de antígenos virales ORF1 y ORF2 en el mismo;
la figura 2 ilustra el recuento por citometría de flujo de las células PK-15 totales en una suspensión de células, incluyendo las células vivas y muertas;
la figura 3 ilustra la detección de la proporción de células muertas en una población de células PK-15 infectadas por PCV2 mediante el desplazamiento en la captación de yoduro de propidio y FACS;
la figura 4 ilustra la evolución con el tiempo de la viabilidad de un cultivo de siembra de trabajo de células PK-15 infectadas por PCV2 con suero de ternera fetal presente en todo el periodo de incubación;
la figura 5 ilustra la inmunodetección y medición de ORF1 por FACS;
la figura 6 ilustra la producción de los antígenos ORF1 y ORF2 virales de PCV2 durante el periodo de incubación de un cultivo de siembra de trabajo; y
la figura 7 ilustra la producción de los antígenos virales ORF1 y ORF2 en células PK-15 infectadas con virus PCV2 con la extracción de FCS del medio de cultivo después de 3 días.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0031] Varios documentos se citan en el texto siguiente, y varios documentos están referenciados o citados en los documentos citados en el texto siguiente. No hay ninguna admisión de que cualquiera de estos documentos sea de hecho técnica anterior para la presente invención.

[0032] El término "citómetro de flujo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier dispositivo que irradiará una partícula suspendida en un medio fluido con luz a una primera longitud de onda, y es capaz de detectar una luz a la misma o diferente longitud de onda, en el que la luz detectada indica la presencia de una célula o un indicador sobre la misma. El "citómetro de flujo" puede estar acoplado a un clasificador de células que es capaz de aislar la partícula o célula de otras partículas o células que no emiten la segunda luz. El indicador sobre la superficie celular puede ser un anticuerpo acoplado a un fluoróforo, tal como, pero no limitado a, FITC que proporciona la clasificación de células con anticuerpos fluorescentes (FACS).

[0033] El término "célula huésped", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula aislada que es un huésped para la infección y replicación de un virus, preferiblemente un circovirus.

[0034] Los términos "células adherentes", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a células animales cultivadas in vitro y que se han unido a un sustrato. El sustrato puede ser la superficie de un recipiente de cultivo o, como en cultivos celulares discontinuos, puede ser un soporte sólido particulado, tal como esferas CYTODEX® (Amersham Biosciences, Inc), o similares. Dichas células pueden extraerse del soporte sólido subyacente mediante procedimientos que requieren la digestión enzimática de la matriz subcelular, incluyendo la digestión en condiciones controladas utilizando una proteasa, tal como, pero no limitada a, tripsina. Por el contrario, el término "células no

adherentes" se refiere a aquellas células cultivadas que se han desprendido de un sustrato durante el transcurso del período de cultivo.

[0035] Tal como se utiliza en el presente documento, los loci de genes o transcripciones de los mismos tienen designaciones en cursiva; y las proteínas o polipéptidos expresados a partir de los mismos tienen designaciones no en cursiva.

[0036] Los términos "ORF1" y "ORF2", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a antígenos circovirales expresados a partir de los marcos de lectura abiertos *ORF1* y *ORF2* (tal como se ha designado por Meehan et al, (1998) J. Gen. Virol 78: 221 -227), respectivamente. *ORF1* se cree que es una replicasa de etapa temprana y *ORF2* un polipéptido que contribuye a la cápside viral. Se han identificado trece marcos de lectura abiertos (*ORF*) en el genoma de PCV2. Una descripción adicional de los *ORF* de PCV2 se puede encontrar en las patentes de Estados Unidos Nos. 6.368.601, 6.391.314, 6.660.272, 6.217.883, 6.517.843, 6.497.883, así como AU 764379, EP 1019510, MX 221,562, MX 216996, RU 2237492 y NZ 505008.

[0037] La correspondencia entre las diversas denominaciones asignadas a cada *ORF* de PCV2 se muestra en el Ejemplo 1 a continuación. Tal como se utiliza en el presente documento, *ORF1* y *ORF2* corresponden a *ORF4* y *ORF13* (tal como se han designado en las patentes mencionadas anteriormente), respectivamente.

[0038] El término "durante el proceso" se refiere al control de los parámetros que son característicos del cultivo celular y del virus, incluyendo un cultivo de células infectadas por virus, durante todo el período del cultivo. El control puede ser continuo, tal como el control del pH o del contenido de oxígeno del medio de cultivo, o puede ser un control periódico en el que las muestras se extraen del cultivo en los puntos de tiempo seleccionados, se detectan y miden parámetros, tales como la viabilidad o contenido de antígeno viral, y se representan los parámetros frente al tiempo del cultivo

[0039] El término "cultivo de siembra", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un cultivo de células huésped infectadas con un virus seleccionado, tal como un circovirus, y que se incubaba a continuación durante un período para permitir que el título del virus aumente. Normalmente, pero no necesariamente, el volumen de un cultivo de siembra es menor que el volumen del cultivo principal posterior o el medio de fermentación que recibe el cultivo de siembra.

[0040] Siguiendo la convención de la ley de hace mucho tiempo, los términos "un" y "una", tal como se utilizan en el presente documento, incluyendo las reivindicaciones, se entiende que significan "uno" o "más".

Abreviaturas: *ORF*, marco de lectura abierto; *ORF*, secuencia de nucleótidos que codifica un *ORF*; PK, riñón porcino; PCV, Circovirus Porcino; PK-15, células de riñón porcino; FACS, clasificación de células con anticuerpos fluorescentes; ELISA, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; Mab, anticuerpo monoclonal; FITC, isotiocianato de fluoresceína; IgG, inmunoglobulina G; PBS/BSA, solución salina tamponada con fosfato/albumina de suero bovino.

[0041] La presente memoria proporciona procedimientos para la determinación del rendimiento viral de un cultivo de células animales huésped infectadas con un circovirus, en particular un circovirus porcino. Los procedimientos de la memoria, sin embargo, son generalmente aplicables a cualquier otra cepa o tipo de circovirus que crezca en un cultivo celular, especialmente en los procedimientos de cultivos discontinuos. Los procedimientos de la invención son particularmente útiles para el control de la producción viral de cultivos discontinuos de la cepa de circovirus porcino PCV2.

[0042] Los procedimientos basados en FACS de la invención comprenden la determinación de la viabilidad de las células huésped en un sobrenadante del medio de cultivo celular y de las células que permanecen adheridas a un soporte sólido tal como, pero no limitado a, CYTODEX® (Amersham Biosciences, Inc). La carga viral de las células huésped cultivadas se mide mediante la determinación del porcentaje de células positivas en *ORF1* presentes en las células no adherentes y adherentes liberadas, la determinación del porcentaje de células positivas en *ORF2* presentes en las células no adherentes y células adherentes liberadas, en relación al porcentaje de células positivas en *ORF1* y *ORF2* en la muestra con respecto a la cantidad de circovirus en la muestra. El rendimiento del virus se establece mediante la detección y medición de ambos antígenos en las células del sobrenadante, por ejemplo 5 a 7 días desde cuando las células huésped se transfieren a un medio libre de suero.

[0043] Una realización de la memoria, por lo tanto, es un nuevo ensayo adecuado para la titulación de PCV2 basado en la inmunodetección de células huésped PK-15 de proteína viral por citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales específicos para cualquiera de *ORF1* o *ORF2*. Además, la cinética del crecimiento de células PK-15 también se puede controlar mediante citometría de flujo. La rapidez de los procedimientos de la invención permite la determinación de un punto de recogida óptimo para lograr altos rendimientos virales. Se puede seleccionar un punto de recogida que ofrece un rendimiento viral útil, por ejemplo, para la producción de una vacuna, a la vez que se minimiza el período de incubación de las células con la reducción de costes concomitantes. Los procedimientos de la invención producen rápidamente datos cuantitativos. Esto permite el control repetido de la producción viral a través del transcurso del período de incubación y la fácil selección del punto de recogida más apropiado.

[0044] Los procedimientos tradicionales de medición de títulos virales son mucho más lentos e implican un cultivo extenso de muestras de ensayo para formar placas contables. Los ensayos en placa convencional de virus que crecen en células PK-15 que se basan en la detección por inmunofluorescencia usando un ELISA basado en un anticuerpo monoclonal de ORF2 son lentos y con mucho trabajo, requiriendo varios días para obtener un resultado útil.

[0045] Un aspecto de la memoria es un procedimiento para determinar rápidamente las características de viabilidad de células huésped cultivadas durante el transcurso del tiempo de un cultivo discontinuo. Aunque el procedimiento es útil y adecuado para el control del cultivo de cualquier célula para la producción viral, los procedimientos son particularmente útiles para el control durante el proceso de cultivos celulares de células PK-15 para la producción de lotes de circovirus PCV2 para la producción de vacunas.

[0046] En este aspecto de los procedimientos según la memoria, y tal como se ilustra en la figura 1, las muestras de cultivos celulares discontinuos se dividen en una población de células sobrenadantes (no adherentes) y una población de células adherentes a un sustrato sólido. Un sustrato para utilizar en un cultivo de células huésped PK-15 es, por ejemplo, esferas CYTODEX® (Amersham Biosciences, Inc), aunque se puede seleccionar cualquier otro material adecuado conocido por los expertos en la técnica del cultivo de tejidos. Las esferas de sustrato densas se dejan sedimentar por gravedad y se extrae el medio de cultivo sobrenadante con las células no adherentes mediante cualquiera de una variedad de procedimientos, tales como aspiración, decantación, centrifugación y similares. Las células adherentes al sustrato pueden entonces liberarse del sustrato mediante, por ejemplo, tripsinización, controlándose el grado de la liberación de la digestión con un microscopio para establecer el punto de máxima liberación de las células del sustrato, con un daño mínimo a las propias células. Las células liberadas se recogen para producir la segunda de las dos poblaciones de células deseadas.

[0047] En el presente documento se describen procedimientos para la producción de los anticuerpos capaces de reconocer específicamente uno o más epítomos de la proteína ORF1 o ORF2 de un circovirus, tal como, pero no limitado a, PCV2. Dichos anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotipo (anti-ID) y fragmentos de unión a epítomo de cualquiera de los anteriores. Ventajosamente, los anticuerpos para su uso en la presente invención son anticuerpos monoclonales específicos para la proteína ORF1 u ORF2 expresada por los genes *ORF1* y *ORF2* de un circovirus. Lo más ventajosamente, las proteínas ORF1 u ORF2 se expresan por el circovirus PCV2.

[0048] Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos animales huésped mediante inyección con un polipéptido ORF1 u ORF2 aislado o un péptido inmunogénico de los mismos. Dichos animales huésped pueden incluir, pero no se limitan a, conejos, ratones y ratas, por nombrar unos pocos. Se pueden utilizar varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo, pero no limitados a, Freund (completo e incompleto), geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas de superficie, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Después de la terminación de las etapas de inmunización, se pueden recoger los antiseros reactivos con las proteínas ORF1 u ORF2 y, si se desea, anticuerpos policlonales anti-proteína ORF1 (o anti-proteína ORF2) aislados.

[0049] Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno, tal como un producto génico diana, o un derivado funcional antigénico del mismo. Para la producción de anticuerpos policlonales, los animales huésped, tales como los descritos anteriormente, se pueden inmunizar mediante inyección con las proteínas ORF1 u ORF2 suplementadas con adyuvantes como también se ha descrito anteriormente.

[0050] Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un antígeno particular, pueden obtenerse mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en un cultivo. Éstas incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497; y la patente de los Estados Unidos No. 4.376.110, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor et al (1983)), *Immunology Today* 4: 72; Cole et al (1983) *Proc Natl Acad Sci USA*. 80: 2026-2030, y la técnica de hibridoma de EBV (Cole et al. (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pág. 77-96). Brevemente, se recogen células del bazo de un ratón inmunizado y se fusionan con células inmortalizadas (es decir, células de mieloma) para producir hibridomas productores de anticuerpos. Los hibridomas se pueden cribar inmunoquímicamente para la producción de anticuerpos monoclonales específicamente reactivos con las proteínas ORF1 u ORF2. Las fuentes comerciales para la obtención de antiseros policlonales y anticuerpos monoclonales necesarios están también disponibles. Por ejemplo, HTI Bio-Products, Inc. (Ramona, California.) produce a medida anticuerpos, antiseros, líquido ascítico y líneas de hibridoma.

[0051] Los protocolos para la producción, aislamiento y purificación de anticuerpos convencionales y monoclonales pueden ser análogos a los descritos en Cassone et al. (1988) *J. Med. Microbiol.* 27: 233-238; Hancock y Evan *Production and Characterization of Antibodies against Synthetic Peptides*. Pág. 23-33 en *Immunochemical Protocols*

ed. MM Manson, (1992) (Humana Press, Totowa, NJ); Goding, JW, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2ª ed, (1986) (Academic Press Ltd., Londres) y Lam & Mutharia, "Antigen-Antibody Reactions," pág. 104-132 en Methods for General and Molecular Bacteriology, ed. P. Gerhardt, (1994) (ASM Press, Washington, DC).

[0052] Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de los mismos. El hibridoma que produce los MAb de la presente invención puede cultivarse in vitro o in vivo. La producción de títulos elevados de mAb in vivo hace de éste el procedimiento de producción preferido actualmente.

[0053] Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla, tales como, pero no únicamente, la patente de Estados Unidos No. 4.946.778; Bird (1988) Science 242: 423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5.879-5883; y Ward et al. (1989) Nature 334: 544-546, se pueden adaptar para producir los anticuerpos específicos de las proteínas ORF1 u ORF2. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena sencilla.

[0054] Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos pueden generarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero no se limitan a: fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse mediante la reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab (Huse et al (1989) Science 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

[0055] Un anticuerpo fabricado de acuerdo con la presente memoria se puede utilizar para detectar la proteína ORF1 (u ORF2) en o sobre las células, extractos celulares, o en otras preparaciones biológicas que pueden contener las proteínas ORF1 u ORF2. Además, dicho anticuerpo se puede marcar con una molécula detectora para permitir la detección de un complejo antígeno/anticuerpo. Los marcadores adecuados incluyen diversas enzimas, moléculas fluorescentes, marcadores radiactivos, moléculas quimioluminiscentes y similares. Por ejemplo, las enzimas útiles para marcar anticuerpos incluyen la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina. Los marcadores fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina.

[0056] La viabilidad de las dos poblaciones de células se determina, tal como se describe en el Ejemplo 2 a continuación, mediante la mezcla de alícuotas de las poblaciones de células aisladas con yoduro de propidio que se capta en los núcleos de las células solamente por las células no viables. Las células teñidas se analizan mediante citometría de flujo para obtener el total de células, tal como se muestra por ejemplo, en la figura 2, así como las proporciones de células vivas y muertas en la población de las muestras, tal como se muestra en la figura 3.

[0057] Además de las mediciones de la viabilidad de las células huésped, los procedimientos de la invención comprenden además las etapas de poner en contacto las poblaciones de células aisladas con anticuerpos específicos para los antígenos virales ORF1 y ORF2, también tal como se describe en el Ejemplo 2 a continuación. Las células se lavan posteriormente y se pueden poner en contacto con antisero anti-IgG marcado con un fluoróforo, tal como, pero no limitado a, FITC antes de medir la fluorescencia unida a célula mediante un citómetro de flujo, también tal como se describe en el Ejemplo 2.

[0058] Los resultados de viabilidad de ejemplo para el crecimiento del virus PCV2 en células PK-15 cultivadas en un cultivo discontinuo de litros con suero de ternera fetal en el medio se muestran en las figuras 2, 3 y 4. Por ejemplo, en un experimento después de cinco días de incubación, aproximadamente el 50% de la población total de células cultivadas se encuentra en el sobrenadante del medio y estaban predominantemente muertas. Esto contrastaba con el 50% restante de las células que eran adherentes al sustrato CYTODEX® (Amersham Biosciences, Inc) y que eran viables.

[0059] La medición de la producción viral en los cultivos discontinuos que contenían suero de ternera fetal mostró que ORF1 se expresó transitoriamente durante los días 1 y 2, y sólo en las células adheridas a sustrato. ORF1 se detectó en las células del sobrenadante (o no adherentes) sólo de los días 3 a 5, tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 6. El antígeno de la cápside viral ORF2 era detectable sólo en las células del sobrenadante, no adherentes, con un aumento continuo durante el período de incubación después del primer día de incubación, tal como se muestra en la figura 6.

[0060] El procedimiento de la invención permite la detección y el control de un circovirus y células infectadas mediante la detección de ORF1 y ORF2 expresadas en células del sobrenadante (y por lo tanto predominantemente muertas) hasta el punto de recogida. La rapidez con la que se obtienen estos datos permite el control periódico frecuente del progreso de la infección del cultivo celular. El cultivo puede entonces recogerse en un punto que proporciona un alto rendimiento de virus adecuados para la siembra de un gran cultivo discontinuo de células huésped para la producción final de virus de calidad y cantidad suficientes para su uso en, por ejemplo, el desarrollo y producción de vacunas.

[0061] Los cultivos de siembra desarrollados como resultado de la utilización de los procedimientos de la invención se pueden usar para sembrar cultivos de células de gran volumen, del orden de volúmenes de 100-1000 litros. En este procedimiento, el cultivo de siembra recogido en el día 5 u otro punto de tiempo, tal como se indica particularmente mediante la expresión de ORF2, tal como se determinó anteriormente, se inocula en un cultivo celular a gran escala que comprende medio de cultivo celular que contiene suero de ternera fetal. La viabilidad de las células huésped, tales como células PK-15, se controla a continuación de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 2 a continuación. Después de un período de incubación inicial que puede ser, pero no se limita a, aproximadamente 3 días, el medio de cultivo celular se puede intercambiar con medio que no incluye suero de ternera fetal, y se continúa la incubación, de nuevo con un muestreo y determinación periódicos durante el proceso, tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 7.

[0062] Otro aspecto, por lo tanto, de la memoria es el control durante el proceso de la producción de circovirus en cultivos de células huésped a gran escala mediante el control de la producción de ORF1 y ORF2 utilizando FACS. Usando los procedimientos de la invención, tal como se describen en el Ejemplo 2, los cultivos celulares se pueden controlar rápidamente y con más frecuencia en comparación con los procedimientos basados en cultivo convencionales, de manera que el cultivo se puede recoger una vez se ha conseguido un rendimiento viral deseado. Los cultivos se pueden controlar por la expresión de los antígenos virales específicos de ORF1 y ORF2, tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 7. Habitualmente, la producción de antígeno ORF1 y ORF2 total, tal como se muestra en la figura 7, imita el patrón de crecimiento de células huésped, tal como se ilustra en la figura 7. Por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 5 a continuación, los marcadores de ORF1 y ORF2 de PCV2 cultivado en células PK-15 aumentan linealmente desde el día 4 al día 7 y muestran patrones similares de aumento para las células adherentes unidas a un sustrato y para las células no adherentes en el sobrenadante del medio.

[0063] La extracción del suero del medio de cultivo reduce y retrasa el inicio de la expresión de antígeno viral, particularmente destacable si el cultivo se recoge en el día 5. La continuación del cultivo más allá del día 5 (tal como se determina desde el punto de la siembra del cultivo) puede, sin embargo, aumentar significativamente el rendimiento del antígeno ORF2, es decir, de las partículas virales maduras (véase la figura 7).

[0064] Esta memoria, por lo tanto, proporciona un procedimiento de FACS para el control durante el proceso y la determinación rápida del punto de recogida útil de un cultivo celular infectado con un circovirus, de manera que se puede obtener un rendimiento óptimo del virus. Los procedimientos comprenden proporcionar un cultivo de siembra de células huésped infectadas con circovirus e inocular un cultivo discontinuo con las mismas, incubar el cultivo de siembra, extraer partes alícuotas de las células cultivadas, separar las células del sobrenadante y las células adherentes, liberar las células adherentes de su sustrato, determinar la viabilidad de las células huésped, determinar el porcentaje de ORF1 y ORF2 en la muestra de células mediante FACS y determinar el punto de recogida del cultivo.

[0065] Un aspecto de la memoria proporciona un procedimiento basado en la clasificación de células con anticuerpos fluorescentes (FACS) para la detección de la producción de antígeno de circovirus mediante un cultivo de células huésped infectadas por virus, en el que la producción de antígeno de circovirus está relacionada con el porcentaje de células positivas en el marco de lectura abierto 1 (ORF1) y el marco de lectura abierto 2 (ORF2), que comprende aislar (i) células huésped no adherentes y (ii) células huésped adherentes liberadas del sustrato de una muestra que comprende una población de células huésped no adherentes y una población de células huésped que se adhieren a un sustrato de un cultivo de células huésped infectadas con un circovirus, y determinar (i) el porcentaje de células positivas en el marco de lectura abierto 1 (ORF1) y (ii) el porcentaje de células positivas en el marco de lectura abierto 2 (ORF2) presentes en las células huésped no adherentes aisladas y las células huésped adherentes liberadas del sustrato.

[0066] En diversas realizaciones de este aspecto del procedimiento, el circovirus puede ser PCV2. En diversas realizaciones, la cepa de células huésped puede ser PK-15. Se contempla, sin embargo, que los procedimientos de la memoria se pueden aplicar de manera útil para la detección y el control durante el proceso de la producción de cualquier circovirus cultivado en células huésped de mamífero aisladas y para los que hay disponibles anticuerpos específicos de antígeno viral.

[0067] Otro aspecto de la memoria proporciona un procedimiento basado en la clasificación de células con anticuerpos fluorescentes (FACS) para el control durante el proceso de la producción de un circovirus a partir de células huésped infectadas cultivadas, en el que los cambios en la representación en los niveles de viabilidad, ORF1 y ORF2, determina la evolución con el tiempo de la producción de circovirus en un cultivo de células huésped que comprende aislar (i) células huésped no adherentes y (ii) células huésped adherentes liberadas del sustrato de una muestra que comprende una población de células huésped no adherentes y una población de células huésped que se adhieren a un sustrato de un cultivo de células huésped infectadas con un circovirus, determinar la viabilidad de las células huésped no adherentes y de las células huésped adherentes, y determinar (i) el porcentaje de células positivas en el marco de lectura abierto 1 (ORF1) y (ii) el porcentaje de células positivas en el marco de lectura abierto 2 (ORF2) presentes en las células huésped no adherentes aisladas y las células huésped adherentes liberadas del sustrato.

[0068] En una realización de este procedimiento de la memoria, la viabilidad de las células se determina mediante la medición de la captación de yoduro de propidio usando citometría de flujo.

[0069] En las diversas realizaciones de este procedimiento de la memoria, el circovirus puede ser PCV2 y la cepa de células huésped puede ser PK-15, aunque los procedimientos no se deben interpretar como aplicables únicamente a esta combinación de cepa de circovirus/células huésped. Por ejemplo, los procedimientos de la memoria pueden ser aplicables, en general, al virus de la anemia del pollo o virus de la enfermedad del pico y las plumas y células huésped, tales como una célula huésped aviar adecuada y similares.

[0070] Aún otro aspecto de la memoria es un procedimiento de producción de circovirus en condiciones libres de suero y, por lo tanto, útiles para la preparación de una vacuna, que comprende las etapas de preparar un cultivo de siembra de un circovirus mediante el control durante el proceso de la expresión de ORF1 y la siembra de un cultivo de células huésped con un cultivo de siembra de un circovirus, incubar el cultivo de células huésped en ausencia de suero de ternera fetal, controlar (i) la viabilidad de las células huésped, y (ii) la expresión de ORF1 y ORF2 por las células huésped, y recoger el circovirus del cultivo de células huésped cuando la expresión de ORF2 es aproximadamente la misma en las células no adherentes y las células adherentes del cultivo de células huésped.

[0071] En diversas realizaciones de este aspecto de la memoria, el rendimiento de circovirus en el cultivo de siembra se puede determinar mediante el control de la expresión de los antígenos ORF1 y ORF2 de circovirus en células huésped del sobrenadante utilizando un procedimiento basado en la clasificación de células con anticuerpos fluorescentes (FACS), y en el que el cultivo de siembra se recoge cuando ORF2 se expresa por las células no adherentes.

[0072] En las diversas realizaciones de este aspecto de la memoria, la viabilidad de las células se puede determinar mediante la medición de la captación de yoduro de propidio usando citometría de flujo.

[0073] En las diversas realizaciones de este procedimiento de la memoria, la expresión de los antígenos ORF1 y ORF2 en un cultivo de células huésped infectadas con un virus puede controlarse usando un procedimiento basado en la clasificación de células con anticuerpos fluorescentes (FACS), en el que la producción de antígeno de circovirus está relacionada con el porcentaje de células positivas en el marco de lectura abierto 1 (ORF1) y el marco de lectura abierto 2 (ORF2).

[0074] En las diversas realizaciones de este procedimiento de la memoria, el circovirus puede ser PCV2 y la cepa de células huésped puede ser PK-15, aunque los procedimientos no se deben interpretar como aplicables únicamente a esta combinación de cepa de circovirus/células huésped. Se contempla, sin embargo, que los procedimientos de la memoria pueden ser aplicables de manera útil para la detección y el control durante el proceso de cualquier circovirus cultivado en células huésped de mamífero aisladas y para los que hay disponibles anticuerpos específicos de antígeno viral.

[0075] Debe entenderse que la presente invención no se limita a las composiciones, equipos o procedimientos específicos descritos en el presente documento y que cualquier composición que tiene una fórmula o etapas de procedimiento equivalentes a las descritas se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Las etapas del procedimiento para determinar el porcentaje de células infectadas en un cultivo celular son meramente de ejemplo para permitir que un experto ordinario en la técnica fabrique la composición y la utilice de acuerdo con el proceso descrito y sus equivalentes. También se entenderá que aunque la forma de la invención mostrada y descrita en el presente documento constituye las realizaciones preferidas de la invención, no se pretenden ilustrar todas las formas posibles de la invención. Las palabras usadas son palabras de descripción más que de limitación.

[0076] La invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos:

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Correspondencia entre las designaciones de ORF de circovirus PCV2

[0077] Los ORF de circovirus PCV2, sus designadores equivalentes, y las respectivas fuentes de los mismos, se muestran en la Tabla 1 a continuación. ORF1 y ORF2, tal como se describen por Meehan et al. (1997; 1998) han sido designados alternativamente como ORF 4 y 13, respectivamente.

Tabla 1: Numeración y equivalentes de ORF de PCV2

Fuente	Numeración de ORF	Designaciones alternativas	
	Meehan et al. J. Gen. Virol. 78: 221-227 (1997)	Solicitud de patente de Estados Unidos nº de serie 20020106639 de Wang et al.	Patentes de Estados Unidos nº de serie 6.368.601, 6.391.314, 6.660.272, 6.217.883, 6.517.843, 6.497.883.
	1	1	4
	2	6	13
	3	2	7
	4	3	10
	5	4	5
	6	5	3
	7		1
	8		2
	9		6
	10		8
	11		9
	12		11
	13		12

Ejemplo 2: Ensayo de viabilidad, detección de ORF1 y ORF2 en células PK-15 infectadas con PCV2*(A) Determinación de los recuentos de células y la viabilidad celular*

[0078] Se utilizó yoduro de propidio para evaluar la integridad de la membrana plasmática. El yoduro de propidio es un colorante vital fluorescente que tiñe el ácido nucleico. Las células muertas incorporan yoduro de propidio que se detectó como una mancha roja mediante citometría de flujo utilizando un citómetro Galaxy (se pueden utilizar otros modelos de citómetro de flujo que funcionan de manera similar). Este citómetro tiene la capacidad de diferenciar, detectar y contar las células que están sin teñir (viable) o están teñidas de yoduro de propidio (muertas). El número de células en un volumen de 200 µl se determina de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el modelo particular de citómetro utilizado.

[0079] Se preparó 1 ml de suspensión celular en PBS en un tubo específico para el citómetro Galaxy. La dilución de la suspensión celular se ajustó para tener entre aproximadamente 2×10^4 a aproximadamente 1×10^6 células por ml (correspondiente al valor de la linealidad del recuento del citómetro). A la suspensión celular se añadieron 5 µl de yoduro de propidio (50 µg/ml). La suspensión se mezcló a continuación en vórtex durante varios segundos y se analizó inmediatamente en el citómetro. La configuración típica para el citómetro fueron: Umbral en la escala de linaje de FSC; fluorescencia de las células detectada en escala logarítmica FL3 (correspondiente al canal de yoduro de propidio). El software del citómetro produjo los resultados de los recuentos automáticamente como gráficos de puntos, tales como los que se muestran en las figuras 2 y 3.

(B) Determinación del porcentaje de células infectadas mediante la medición de ORF1 y/o ORF2

[0080] Se requirieron aproximadamente 3×10^6 células para un único ensayo, se dividió en alícuotas de 1×10^6 para un control negativo, 1×10^6 para la detección de ORF1 y 1×10^6 para la detección de ORF2. Para una cantidad diferente de células, los volúmenes de los reactivos se adaptaron en consecuencia.

(i) *Fijación*: Se utilizó BD CytotfixCytoperm (BD Biosciences, ref. 554714). La fijación se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante del fijador. Brevemente, se centrifugaron 3×10^6 células durante 6 minutos a 400 g en un tubo cónico de 15 ml o 50 ml. Se desechó el sobrenadante, las células se resuspendieron con 750 µl de Cytotfix y se incubaron durante 20 minutos sobre hielo. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS que contenía BSA al 1% y se resuspendieron en 1 ml de PBS/BSA al 1%. Las muestras se almacenaron a 5°C durante hasta 15 días antes de la tinción.

(ii) *Tinción de ORF1 y ORF2*: Se centrifugaron las células fijadas durante 6 minutos a 400 g, se desechó el sobrenadante y se añadieron 300 µl de solución 1 X BD Perm/Wash. Se dispensaron 100 µl de células fijadas en 3 pocillos de placas de 96 micropocillos y se centrifugaron durante 6 minutos a 400 g. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de solución 1 X BD Perm/Wash. Se añadieron 5 µl de un anticuerpo (1 mg/ml) a cada pocillo. Habitualmente, 5 µg de anticuerpo monoclonal purificado Mab anti-PCV2 (ORF1) No 1991D3GA, Concentración inicial = 1 mg/ml o Mab purificado anti-PCV2 (ORF2) No 1903A8BC, Concentración inicial = 1 mg/ml fue suficiente para cada tinción. Mab purificado anti-clostridium No 101B9B o equivalente, concentración inicial = 1 mg/ml, se usó como control negativo.

[0081] Los pocillos se incubaron durante 30 minutos sobre hielo. Las células se lavaron dos veces con solución 1X

BD Perm Wash (200 µl/lavado/pocillo). A continuación, se añadieron 100 µl de solución 1X BD Perm Wash que contenían 1 µl de FITC anti-ratón (IgG anti-ratón conjugada con FITC (por ejemplo, Beckman, ref no. 115-095-146) o el equivalente de la misma) por pocillo y los pocillos se incubaron de nuevo durante 30 minutos sobre hielo. Las células se lavaron dos veces con solución 1X BD Perm Wash (200 µl/lavado/pocillo) y se resuspendieron en 200 µl de PBS/BSA al 1% por pocillo. (iii) *Detección mediante FCM*: los parámetros de configuración para el citómetro, tal como un citómetro Galaxy (Partec), fueron habitualmente: Umbral en la escala de linaje FSC; fluorescencia de las células detectada en escala logarítmica FL1 (correspondiente al canal de FITC).

[0082] Los histogramas representativos que muestran la actividad de fluorescencia debido a la detección de ORF1 en una población de células huésped PK-15 infectadas, en comparación con una población de células de control negativo, se muestran en la figura 3. Para calcular el porcentaje de células infectadas, se restó el porcentaje de células negativas del porcentaje de células ORF. En el histograma de la izquierda, había un 0% de células infectadas, mientras que en el ejemplo de la derecha de la figura 3, 88% de las células estaban infectadas.

[0083] Una distribución típica de células vivas y muertas, tal como se determina por granulometría se muestra en la figura 2 y un desplazamiento en la señal de fluorescencia del yoduro de propidio debido a la muerte de una población de células huésped infectadas se muestra en la figura 4. En este caso, el 80% de las células huésped estaban muertas.

Ejemplo 3: Recuento y viabilidad de PK-15 después de la inoculación de PCV2 en cultivos de siembra discontinuos

[0084] Tal como se muestra en la figura 3, en el día 5 del período de incubación de un cultivo de siembra discontinuo de virus PCV2 que crece en células PK-15, el 50% de las células huésped se encontraban en el sobrenadante y en su mayoría estaban muertas (73%). En cambio, el 50% de las células huésped se encontraban en el soporte del sustrato CYTODEX® (Amersham Biosciences, Inc) y casi en su totalidad eran una población viable (96%).

[0085] Se detectaron células PK-15 infectadas con PCV2 al final del cultivo en el día 5, pero sólo en las células del sobrenadante usando citometría de flujo para detectar ORF1 y ORF2. Tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 6, la cinética de la formación de antígeno específico del virus era dependiente del ORF: ORF1 se produjo temprano y a niveles bajos, mientras que ORF se produjo más tarde en el ciclo de incubación y a niveles cada vez mayores.

Ejemplo 4: Tinción total de ORF1 y ORF2

[0086] Tal como se muestra en la figura 6, para ORF1 no había señal en la membrana celular detectada durante la fase posterior del período de incubación del cultivo. La Tabla 2, a continuación, muestra que no se detectaron señales de membrana en las células adherentes a CYTODEX® (Amersham Biosciences, Inc). Las principales señales específicas de ORF fueron sobre células del sobrenadante de cultivo y fueron aumentando desde el día 2 al día 5. Los resultados fueron similares para las células vivas o muertas, con un máximo de 60% en el día 4.

Tabla 2

	Células del sobrenadante		Células adherentes	
% recuento (total/ml) de células totales	3,6 x 10 ⁵ 43%		4,7 x 10 ⁵ 57%	
Tinción	Membrana	Membrana + compartimentos intracelulares	Membrana	Membrana + compartimentos intracelulares
ORF1	< 3%	35%	< 3%	< 3%
ORF2	37%	60%	< LOQ	< LOQ

Ejemplo 5: Cultivo de circovirus PCV2 en células PK-15 en cultivo discontinuo a gran escala con la extracción de suero después de 3 días

[0087] Se sembró un fermentador de 300 litros con un cultivo de células PK-15 incubadas previamente durante 5 días con virus PCV2, de acuerdo con los documentos citados en el presente documento. Después de 3 días de cultivo, el medio se cambió por un medio de crecimiento que carecía de suero de ternera fetal. Las muestras tomadas cada día se analizaron para la viabilidad de PK-15 y la expresión de ORF1 y ORF2, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

[0088] La evolución con el tiempo de la expresión de los antígenos virales ORF1 y ORF2 se ilustra en la figura 7.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de circovirus, que comprende:
sembrar un cultivo de células huésped con un cultivo de siembra de un circovirus;
5 incubar el cultivo de células huésped en ausencia de suero de ternera fetal;
controlar (i) la viabilidad de las células huésped, y (ii) la expresión de ORF1 y ORF2 por las células huésped; y
recoger el circovirus del cultivo de células huésped cuando la expresión de ORF2 es aproximadamente la misma en
las células no adherentes y las células adherentes del cultivo de células huésped;
10 y en el que el circovirus es PCV2.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el rendimiento del circovirus en el cultivo de siembra se
determina mediante el control de la expresión de los antígenos ORF1 y ORF2 del circovirus en células huésped del
sobrenadante utilizando un procedimiento basado en la clasificación de células con anticuerpos fluorescentes
15 (FACS).
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en el que la expresión de los antígenos ORF1 y ORF2 en un cultivo
de células huésped infectadas por virus se controla utilizando un procedimiento basado en la clasificación de células
con anticuerpos fluorescentes (FACS), y en el que la producción de antígeno de circovirus está relacionada con el
20 porcentaje de células positivas en el marco de lectura abierto 1 (ORF1) y en el marco de lectura abierto 2 (ORF2).
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la viabilidad de las células se determina
mediante la medición de la captación de yoduro de propidio utilizando citometría de flujo.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la célula huésped es PK-15.

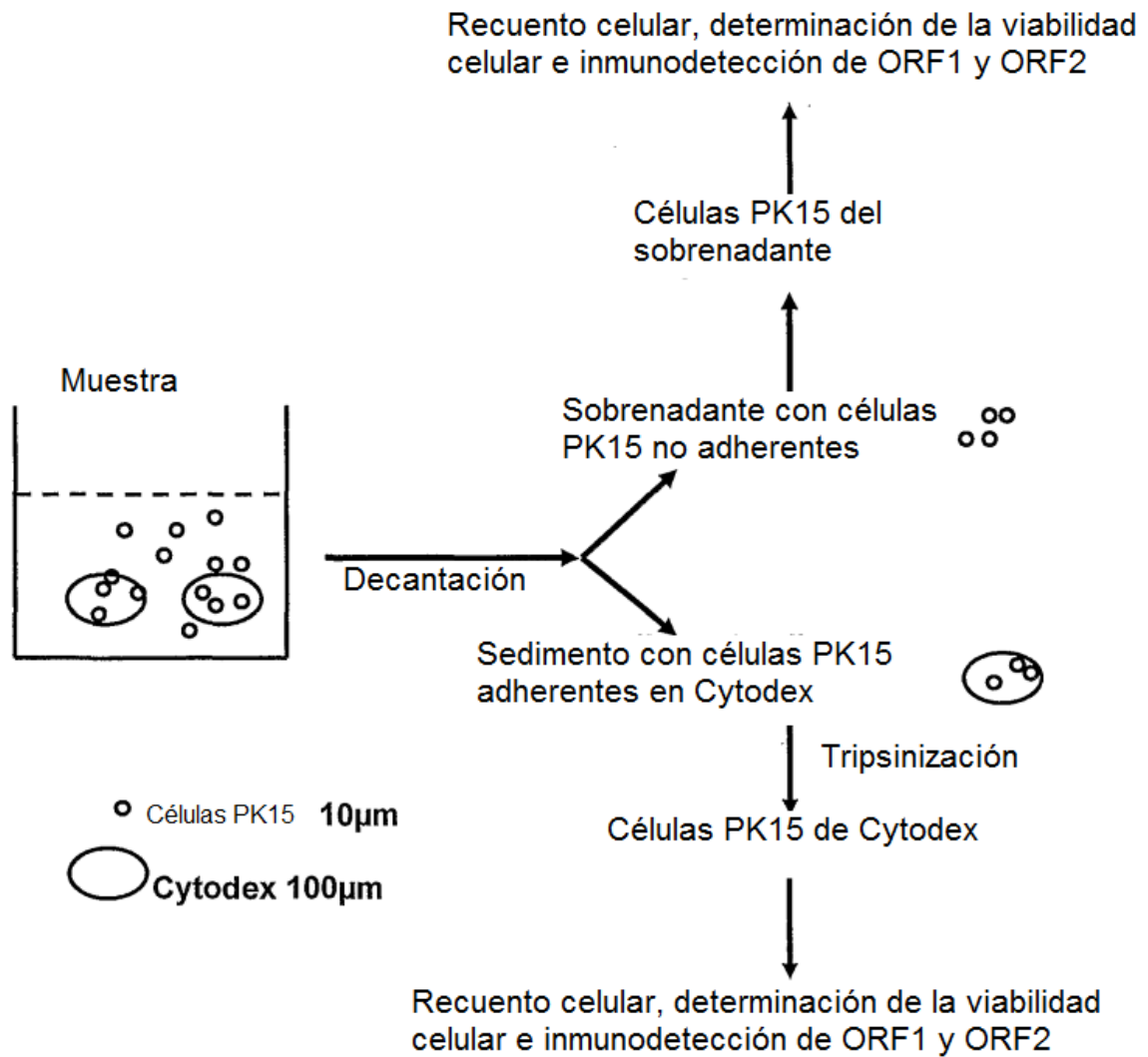


Figura 1

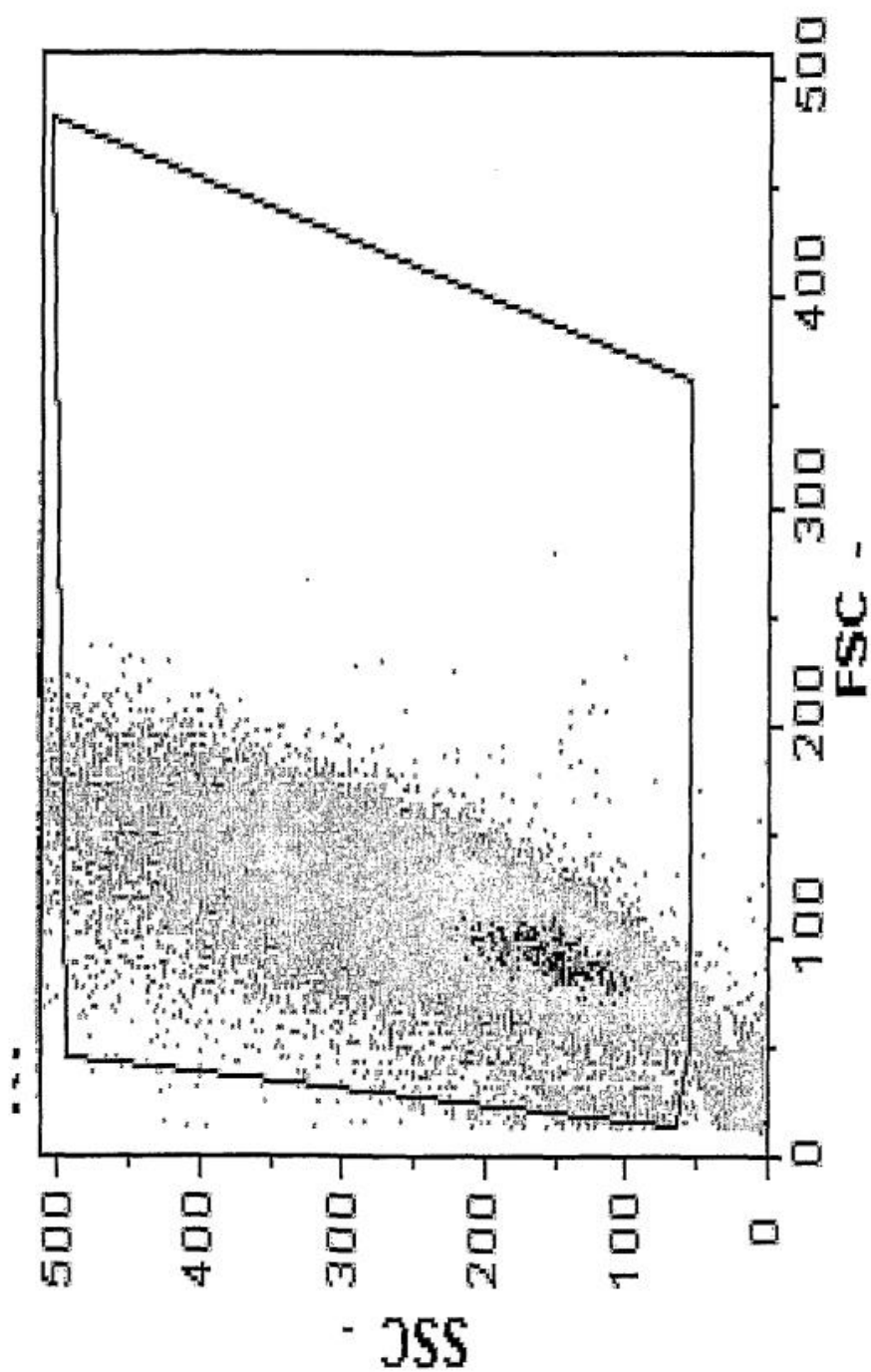


Figura 2

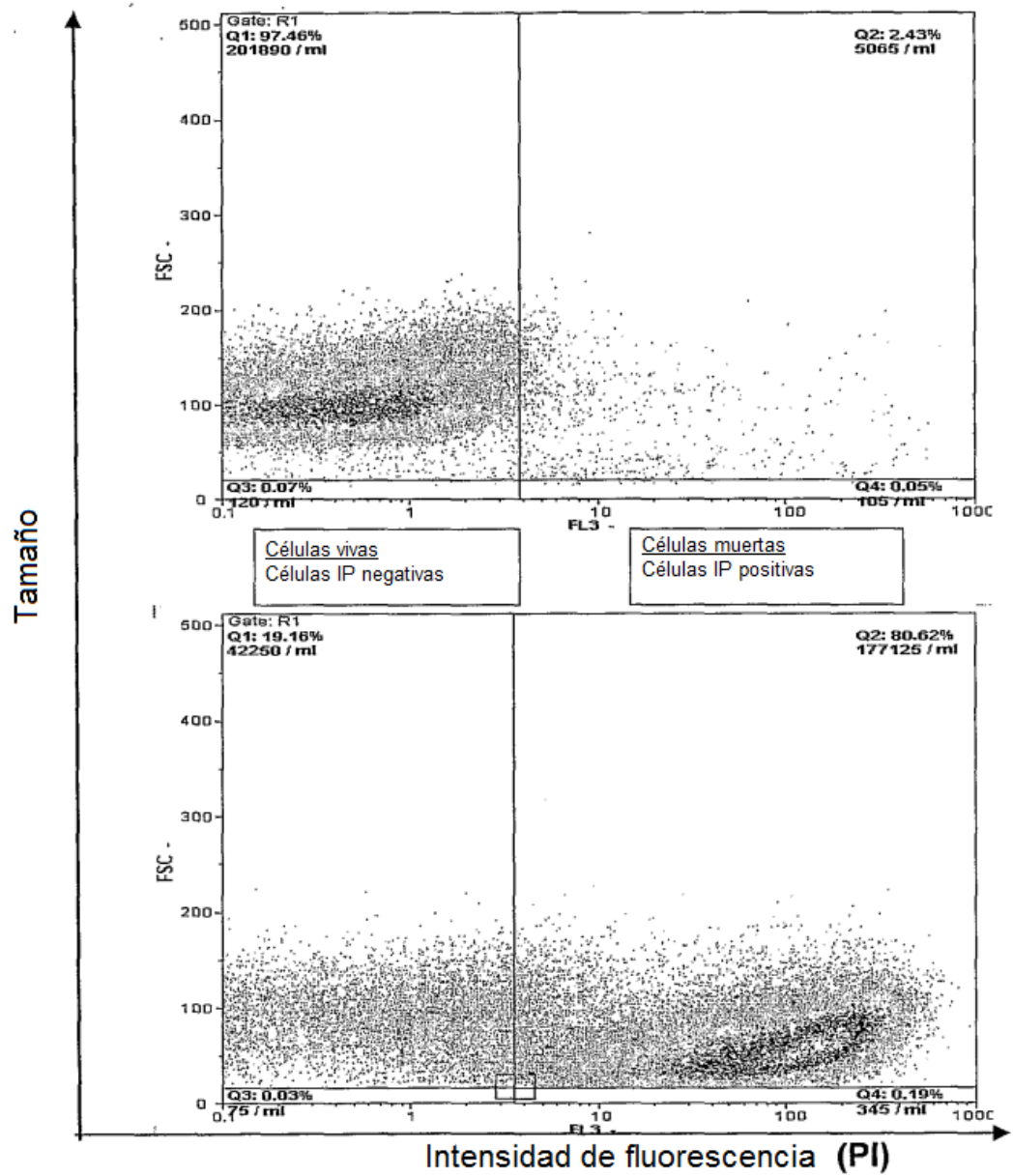


Figura 3

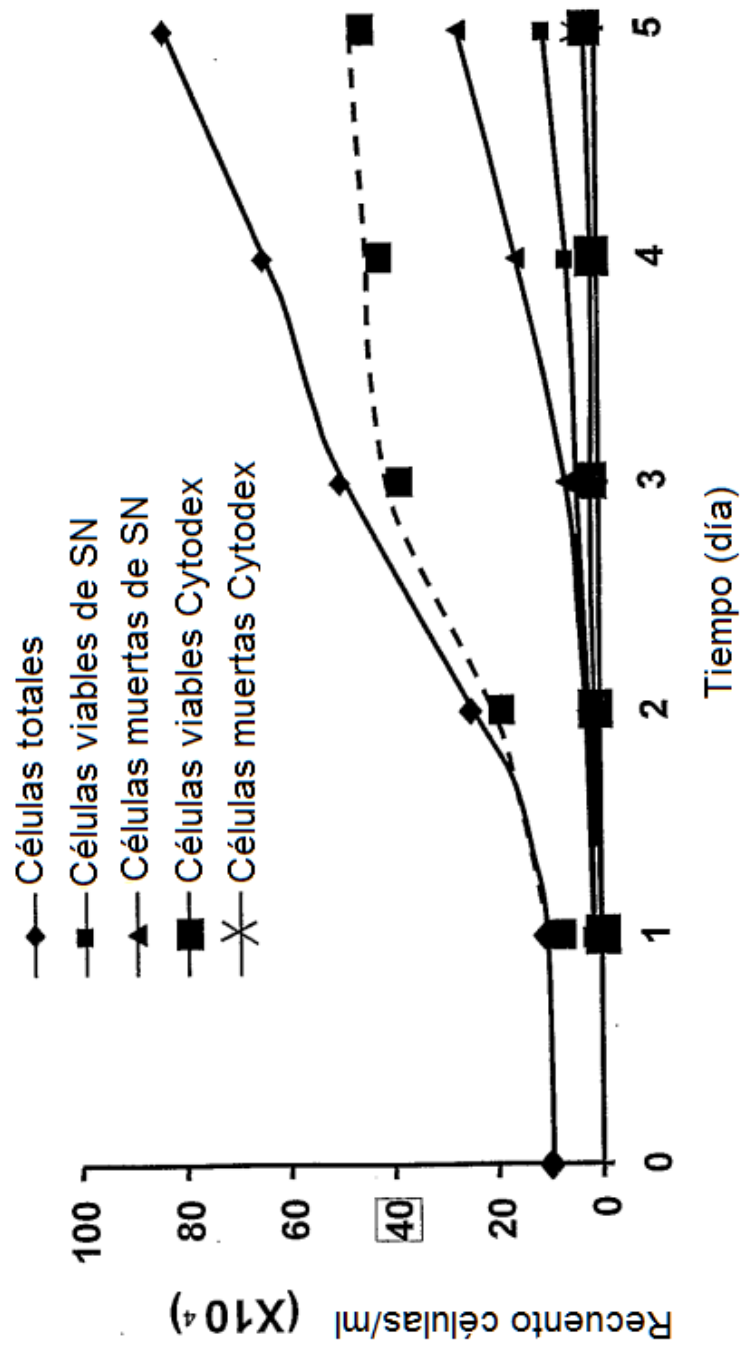


Figura 4

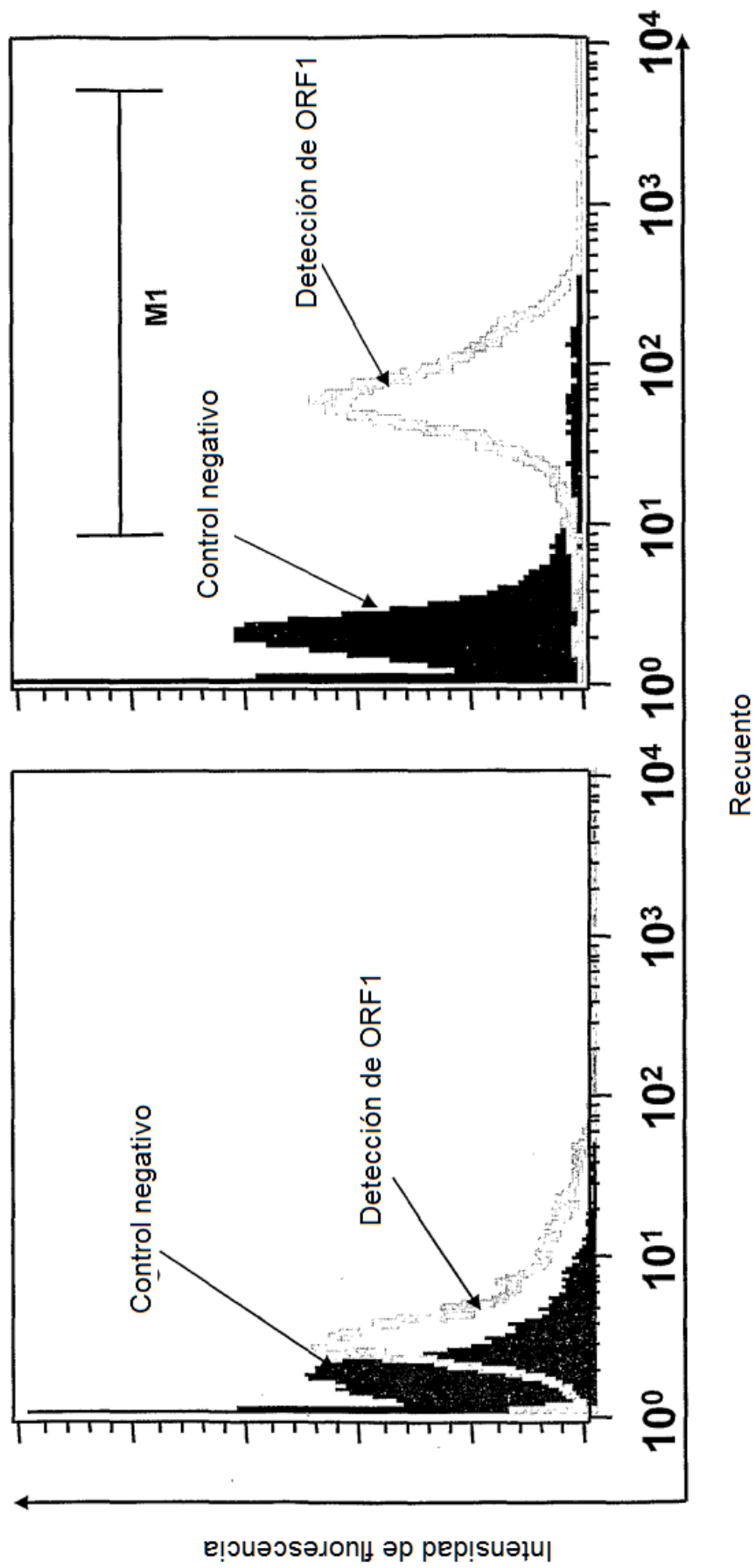
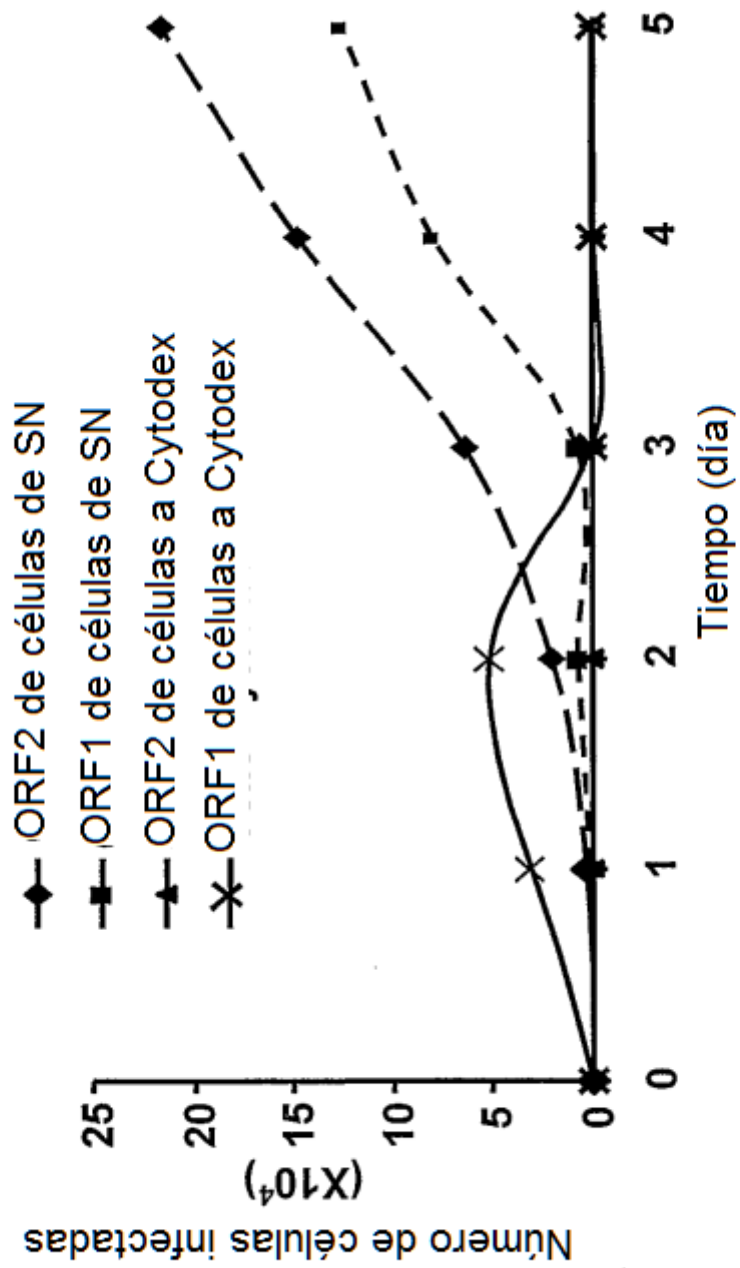


Figura 5

**Figura 6**

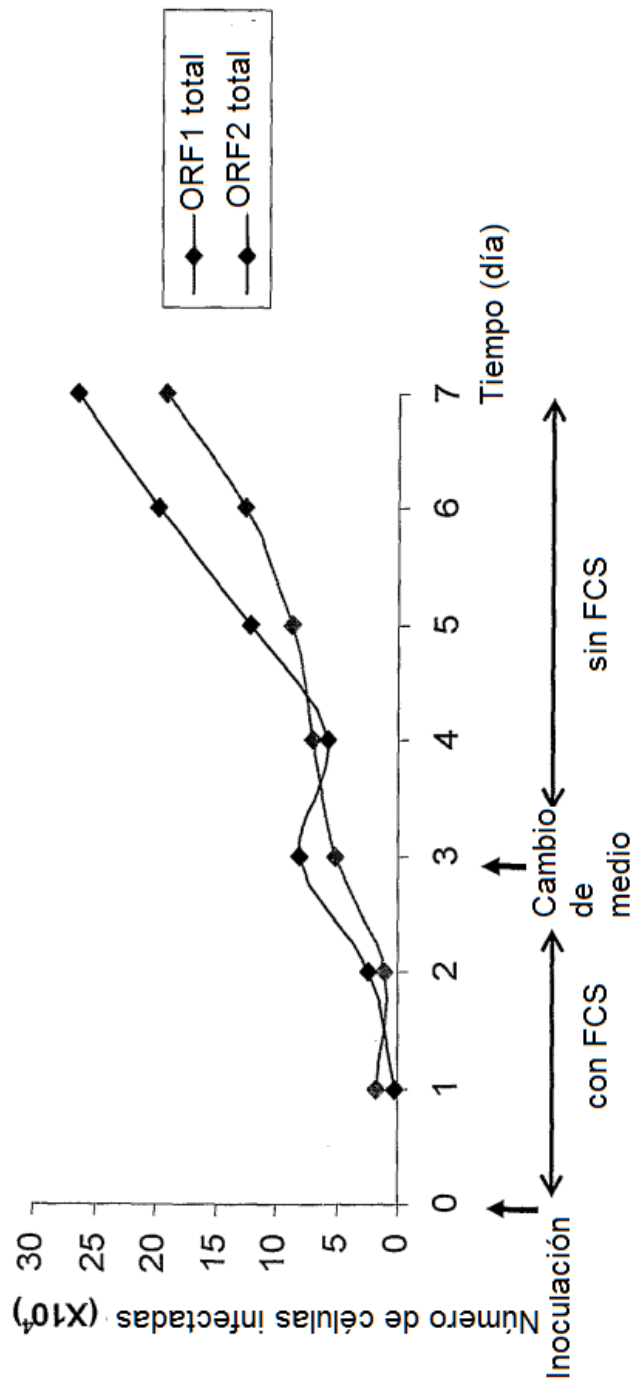


Figura 7