

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 535**

51 Int. Cl.:

C12N 5/16 (2006.01)

C12N 5/0786 (2010.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2014** **PCT/EP2014/077361**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015** **WO15086739**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2014** **E 14837100 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 3080249**

54 Título: **Macrófago alveolar porcino inmortalizado**

30 Prioridad:

12.12.2013 EP 13196834

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

30.05.2018

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)

Wim de Körverstraat 35

5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

KOOL, JAAP y

SCHRIER, CARLA CHRISTINA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 670 535 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

Macrófago alveolar porcino inmortalizado

5 La presente invención se refiere a macrófagos alveolares porcinos inmortalizados (PAM), a cultivos celulares que comprenden dichos PAM, a métodos para la inmortalización de PAM, a métodos de replicación de virus del PRRS en PAM inmortalizados y a métodos para la preparación de vacunas que comprenden el PRRSV.

10 El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) es, de lejos, el arterivirus más importante desde el punto de vista económico, al afectar a las industrias de ganado porcino en todo el mundo. La infección por este virus da como resultado un crecimiento lento, una disminución en la eficiencia de la alimentación, anorexia y fiebre en cerdos desde el destete hasta la etapa de madurez, abortos en cerdas gestantes y problemas respiratorios en cerdos jóvenes. Solo en los Estados Unidos, se han estimado unas pérdidas anuales asociadas con la infección por PRRSV de alrededor de 560 millones de dólares en 2005 y 664 millones de dólares en 2011. La infección por PRRSV se coloca en el puesto número uno de desafíos relacionados con la salud para la industria porcina. Considerando la aparición de cepas altamente virulentas de PRRSV en el sureste de Asia en 2006 y el hecho de que la industria porcina de Asia es la más grande del mundo, se puede asumir con seguridad que las pérdidas en esta parte del mundo son, incluso, considerablemente mayores que las documentadas en Europa y los Estados Unidos.

20 El PRRSV sigue siendo una amenaza importante para la industria porcina dado que la enfermedad asociada ha resultado ser difícil de controlar, a pesar de la disponibilidad de vacunas tanto de virus vivos atenuados como muertos frente a PRRSV.

25 Para la producción de vacunas de PRRSV, vivos atenuados o inactivados, el virus se debe replicar en células susceptibles. Uno de los problemas a los que se enfrenta la propagación de PRRSV es el tropismo celular altamente restringido del virus. Principalmente infecta macrófagos alveolares porcinos primarios (PAM). Dichos PAM son difíciles de obtener: se obtienen, normalmente, a través del lavado pulmonar de los lechones, generalmente de 6-12 semanas de edad (Wensvoort, G. et al., The Veterinary Quarterly 13: 121-130 (1991)). Este método es engorroso, costoso y conduce a lotes con una gran inconsistencia entre lotes. Además, los PAM primarios solo pueden mantenerse en cultivo celular durante una cantidad de tiempo muy limitada. Por tanto, aunque los PAM primarios son muy adecuados para el crecimiento de PRRSV, solo son útiles en, por ejemplo, estudios experimentales de infección y para fabricar vacunas experimentales. La producción de una vacuna comercial en PAM primarios no es económicamente factible.

35 Debido a este problema, los científicos han tratado de encontrar otras células o mejor, líneas celulares, que sean susceptibles a PRRSV. Solo se han identificado tres líneas celulares: línea celular de riñón de mono MA104 y dos derivados de MA104: células MARC-145 y CL2621 (Kumar Shanmukhappa et al., Virology Journal 2007, 4: 62). Estas líneas celulares se utilizan actualmente de manera comercial para la propagación de PRRSV.

40 Aunque es posible hacer crecer PRRSV a títulos relativamente altos en estas líneas celulares, dichas no PAM que ni siquiera son líneas celulares porcinas tienen una desventaja: dado que no son el hospedador natural del PRRSV, PRRSV tiene que adaptarse a estas líneas celulares antes de poder obtener títulos altos. Como consecuencia, ni MA104 ni MARC-145 o CL2621 serían la primera opción para la propagación de cepas de campo recientemente descubiertas. Para recoger nuevos aislados de campo de PRRSV, la célula hospedadora natural, el PAM, sería mucho más adecuado.

Se ha contemplado que una línea celular de PAM inmortalizados podría proporcionar una solución a los problemas identificados anteriormente.

50 Las líneas celulares de PAM inmortalizados pueden, en principio, crecer sin limitación a su nivel de pase y son las células hospedadoras más adecuadas para PRRSV.

Se han realizado varios intentos para desarrollar líneas celulares de PAM inmortalizados.

55 La solicitud de patente PCT WO2008/089094 divulga dos mutantes de PAM no transformados deliberadamente, naturales, obtenidos a partir de fetos porcinos. Estas células muestran comportamiento de línea celular de PAM inmortalizados y son capaces de desarrollar PRRSV. La desventaja del método descrito es, que es un método basado en prueba y error cuyo resultado es altamente incierto. Específicamente, es cuestionable si cualquier línea celular fetal aislada que utiliza este método es, en efecto, inmortalizada de una manera estable o simplemente tiene una esperanza de vida algo extendida o es capaz de dividirse unas pocas veces más en comparación con un PAM primario. Por lo tanto, el método es poco atractivo para el experto en la materia que necesita una línea celular de PAM inmortalizados.

65 Una tesis de Jian-Jun Jia (Agosto 2009, Universidad de Montreal, Montreal, Canadá) describe una línea celular de pulmón porcina supuestamente susceptible a PRRSV, pero esta línea celular no es una línea celular alveolar sino epitelial y, además, después resultó no ser de origen porcino (D.W. Silversides et al., Journal of virology 84: 5454-

5455 (2010)).

Un intento adicional para fabricar una auténtica línea celular de PAM inmortalizados se describe por H.M. Weingartl et al, en J. Virol. Meth. 104: 203-216 (2002). Weingartl describió la transfección de PAM primarios con un plásmido pSV3neo, que lleva genes para resistencia a neomicina y antígeno T de SV40. Esto condujo al aislamiento de tres líneas celulares inmortalizadas de mieloides (monocitos/macrófagos). Sin embargo, el resultado de este experimento resultó ser enigmático: no se pudo detectar antígeno T de SV40 en ninguna de estas líneas celulares y, además, ninguna de las líneas celulares admitió replicación de PRRSV. Por lo tanto, Weingartl concluye que un mecanismo alternativo, sin presencia de antígeno T de SV40, puede explicar la inmortalización.

Después de este fracaso, la ruta de utilización del antígeno T de SV40 se dejó para enfoques alternativos. Yoo Jin Lee et al., encontraron que las líneas celulares desarrolladas por Weingartl no expresan niveles detectables de la glucoproteína CD163 de 130 kDa de la superficie celular, que, como se sabe, es un receptor celular para PRRSV (J. Virol. Meth. 163, 410-415 (2010)). Por tanto, Yoo Jin Lee transfectó adicionalmente una de las líneas celulares de PAM de Weingartl con el gen CD 163 clonado en un vector retroviral bajo el control de un promotor LTR retroviral. Esto, en efecto, condujo a la formación de una línea celular de PAM inmortalizados capaz de desarrollar PRRSV.

En 2012, Mingeun Sagong, del grupo de investigación al que pertenece Yoo Jin Lee, concluyó que la pérdida de las propiedades originales de células primarias tales como marcadores específicos de PAM, por ejemplo CD163, puede deberse a la transformación con antígeno T de SV40 (J. of Virological Methods 179: 26-32 (2012)). Por esta razón Sagong siguió una ruta alternativa para inmortalizar PAM. Esta ruta comprende la expresión de transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT), que utiliza un vector retroviral, en PAM para restaurar la actividad de la telomerasa. La restauración de la actividad de la telomerasa evita la pérdida del ADN telomérico y, por lo tanto, evita la senescencia replicante de las células. Mingeun Sagong concluye que sus datos revelaron que, a diferencia de las células PAM transformadas con el antígeno T de SV40, la inmortalización con hTERT es capaz de hacer que las células sean representantes fiables del fenotipo de sus células parentales.

De lo anterior se deduce que para transformar con éxito PAM con el objetivo de inducir la inmortalización, independientemente de la ruta seguida para evitar la senescencia, debe evitarse la utilización del antígeno T de SV40 y debe utilizarse un retrovirus o al menos secuencias retrovirales grandes para insertar el ADN en el genoma de los PAM. Una desventaja severa de la utilización de retrovirus o al menos secuencias retrovirales grandes para transformar células es que en todos los casos están presente secuencias de repetición terminales largas (LTR) en el ADN utilizado para la transformación de las células.

Las LTR son elementos retrovirales que comprenden todas las señales requeridas para la expresión de genes retrovirales: potenciador, promotor, inicio de la transcripción, terminador de la transcripción y señal de poliadenilación.

Estas LTR son sospechosas de tener efectos tumorigénicos. Esto es debido al hecho de que se conocen otros genes celulares activos para cis y al hecho de que pueden recombinar con otras secuencias retrovirales en el genoma celular (Mosier, D.E., Applied Biosafety 9: 68-75 (2004)).

No obstante, la transformación de células con ADN retroviral que comprende secuencias de LTR y que evita la utilización de antígeno T de SV40 parece ser la única forma de obtener PAM inmortalizados.

Sorprendentemente se encontró ahora, que es posible obtener con éxito PAM que son inmortalizados y aún susceptibles a PRRSV y, sin embargo, libres de ADN de repeticiones terminales largas retrovirales.

Dichos PAM inmortalizados de acuerdo con la invención se podrían obtener inesperadamente a través de transfección con ADN que comprende antígeno T de SV40, ahora, sin embargo, en combinación con la utilización de un transposón como un medio para obtener integración estable en el genoma celular.

Los transposones se pueden considerar como vehículos de transferencia de ADN naturales que, de forma similar a los virus integradores, son capaces de una inserción genómica eficaz.

Por razones desconocidas, los efectos negativos del antígeno T de SV40 con o sin ADN retroviral como se describe anteriormente pueden evitarse, inesperadamente, si las células se transforman utilizando una molécula de ADN que comprende un gen que codifica antígeno T de SV40 y transposones.

En principio, los transposones permanecen presentes de manera estable en el genoma celular después de la integración en el genoma. Por lo tanto, preferentemente los PAM inmortalizados de acuerdo con la invención comprenden transposones.

Para el fin de la presente invención, una línea celular inmortalizada es una población de células (en este caso PAM) de un organismo multicelular que, normalmente, no proliferaría indefinidamente pero, debido a mutación, ha evadido la senescencia celular normal y en su lugar puede seguir experimentando división. Dichas células han escapado de la limitación normal de crecimiento para solo un número finito de ciclos celulares.

Los métodos utilizados para la preparación de un PAM inmortalizado de acuerdo con la invención básicamente comprenden las siguientes etapas:

- 5 a) la etapa de obtención de una muestra de lavado broncoalveolar que contiene células de un sujeto porcino. Dichas etapas se han descrito ya por, por ejemplo, Wensvoort, G. et al., en 1991 (véase más arriba), por Weingartl, H.M. et al. (véase más arriba) y por otros, y siguen siendo la forma preferida de obtener PAM.
- 10 b) la etapa de separación de un componente celular a partir de dicha muestra. Esta etapa también es bien conocida en la técnica y también se describe, por ejemplo, por Wensvoort y por Weingartl, y se realiza, normalmente, a través de centrifugación del material de lavado pulmonar a baja velocidad,
- c) la etapa de transfección de dicho componente celular con una molécula de ADN que comprende transposones y que comprende un gen que codifica el antígeno T de SV40 en el control de un promotor adecuado.

15 La transfección se puede realizar de muchas formas conocidas en la técnica. Los Kits comerciales para transfección están actualmente disponibles a través de, por ejemplo, Bio-Rad (Life Science (Research, Education, Process Separations, Food Science), Life Science Research, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547, USA) e Invitrogen (Life Technology, 3175 Staley Road, Grand Island, NY 14072, USA). Los métodos de transfección basados en reactivos comúnmente utilizados comprenden la utilización de lípidos, fosfato de calcio, polímeros
20 catiónicos, DEAE-dextrano, dendrímeros activados y perlas magnéticas. Los métodos basados en instrumentos comprenden electroporación y microinyección.

Una molécula de ADN que comprende transposones y que comprende un gen que codifica el antígeno T de SV40 en el control de un promotor adecuado podría ser, por ejemplo, un plásmido que comprende un gen que codifica el
25 antígeno T de SV40 en el control de un promotor adecuado. Este plásmido puede ser de forma circular o lineal cuando se utiliza para la etapa de transfección.

La utilización de transposones como tales es bien conocida en la técnica. Un documento de Ivics, Z. e Izsvak Z. revisan de manera extensa transposones y su uso y proporcionan información de los mecanismos de acción de
30 transposones (Mobile DNA 1: 25-39 (2010)).

Un documento de revisiones de Deepika Ahuja et al., sobre el antígeno T de SV40 proporciona información de los mecanismos de acción de esta proteína (Oncogene 24: 7729-7745 (2005)). Básicamente, el antígeno T de SV40 inhibe la familia de supresores tumorales p53 y Rb. Es esta actividad del antígeno T la que se piensa que causa la
35 transformación de las células hacia su carácter inmortalizado.

Se conocen en la técnica un gran número de promotores adecuados para la expresión del antígeno T de SV40, que se reconocen por su nivel eficaz de expresión. Incluyen promotores clásicos tales como el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (humano) (Seed, B. et al., Nature 329, 840-842, 1987; Fynan, E.F. et al., PNAS 90,
40 11478-11482, 1993; Ulmer, J.B. et al., Science 259, 1745-1748, 1993), el potenciador-promotor del citomegalovirus humano para la expresión de gD de BoHv-1. (Donofrio G., et al., Clinical and Vaccine Immunology 13: 1246-1254, (2006)), el promotor temprano inmediato del citomegalovirus de ratón (MCMVie1), el promotor temprano del citomegalovirus de ratón (MCMVe1), promotor temprano inmediato de SV40 (Sprague J. et al., J. Virology 45,
45 773, 1983), el promotor de SV-40 (Berman, P.W. et al., Science, 222, 524-527, 1983), el promotor de metalotioneína (Brinster, R.L. et al., Nature 296, 39-42, 1982), el promotor de choque térmico (Voellmy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4949-53, 1985), el promotor tardío principal de Ad2 y el promotor de β -actina (Tang et al., Nature 356, 152-154, 1992).

Un promotor preferido es el promotor de CAG. (Miyazaki, J; Takaki, S; Araki, K; Tashiro, F; Tominaga, A; Takatsu, K; Yamamura, K., Gene 79 (2): 269-77 (1989), y Niwa, H; Yamamura, K; Miyazaki, J., Gene 108 (2): 193-9 (1991).)
50

d) la etapa de selección de células que son capaces de proliferación sostenida. Las células PAM que son capaces de proliferación sostenida son células que se han cultivado durante al menos 5 ciclos celulares. El ciclo celular, o ciclo de división celular, es la serie de eventos que tienen lugar en una célula que conduce a su división y duplicación (la replicación celular). La selección de células que son capaces de proliferación sostenida es un proceso muy simple por las siguientes razones:

los PAM primarios son difícilmente capaces o incapaces de dividirse fuera de su medio natural; el pulmón porcino. Como puede observarse a partir de la figura 2, en las 2 primeras barras (no se añadió M-CSF) disminuye con el tiempo el número de células PAM primarias vivas después del lavado pulmonar y el
60 aislamiento. En un cultivo que empieza con 200000 células PAM, solo aproximadamente la mitad de las células son todavía viables después de 3 días. Esta cantidad disminuye además constantemente a lo largo del tiempo.

Esto significa que si hay un aumento en el número de células, esto debe deberse al hecho de que una o más células se han transfectado con éxito con la molécula de ADN que comprende el transposón y el gen que codifica el
65 antígeno T de SV40 se ha insertado en el genoma celular. Entonces, básicamente, el proceso es una autoselección: el mantenimiento de PAM que se transformaron con éxito en un medio de crecimiento celular adecuado conducirá

automáticamente a la replicación de células transformadas con éxito, mientras que las células no immortalizadas detendrán la división y morirán. Se conocen en la técnica medios de crecimiento celular adecuados y se describen, por ejemplo, en la sección de ejemplos. También se describen, por ejemplo, por Wensvoort, G. et al., en 1991 (véase más arriba), por Weingartl, H.M. et al. (véase más arriba). Se pueden encontrar en los ejemplos directrices adicionales sobre condiciones de cultivo celular.

Por tanto, una realización de la presente invención se refiere a un método para la preparación de un PAM immortalizado, en el que dicho método comprende las etapas de

- a) obtener una muestra de lavado broncoalveolar que contiene células de un sujeto porcino,
- b) separar un componente celular de dicha muestra,
- c) transfectar dicho componente celular con una molécula de ADN que comprende transposones y que comprende un gen que codifica el antígeno T de SV40 en el control de un promotor y
- d) seleccionar células que se pueden cultivar durante al menos 5 ciclos celulares

Normalmente, se seleccionan células que se han cultivado durante al menos 5 ciclos celulares. Para dichas células se puede asumir razonablemente que son PAM immortalizados con éxito, ya que, generalmente, los PAM primarios no se replicarán *in vitro* más de una o dos veces, excepcionalmente hasta 5 veces, después del aislamiento de los pulmones.

En casos excepcionales, los ciclos celulares tempranos pueden mostrar un comportamiento inestable, por ejemplo, debido al hecho de que el transposón se ha integrado en el genoma celular en un sitio muy crítico o debido a la integración inestable del gen que codifica el antígeno T de SV40. Por lo tanto, en la práctica se seleccionan células que se han cultivado durante al menos 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 o incluso 60 ciclos celulares en ese orden de preferencia.

Las posibilidades de que se manifieste cualquier inestabilidad disminuyen con la cantidad de ciclos celulares de los PAM immortalizados seleccionados.

Por tanto, preferentemente, se seleccionan células que se han cultivado durante al menos 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 o incluso 60 ciclos celulares en ese orden de preferencia.

La presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) no estimula significativamente la replicación de PAM primarios en más que unas pocas divisiones celulares.

La presencia de M-CSF de granulocitos (gM-CSF) puede mejorar la condición de los PAM primarios, incluso en la medida en que haya alguna replicación durante un periodo de tiempo muy corto. Sin embargo, se demostró por los inventores que la utilización de gM-CSF conduce a una disminución en la expresión de CD163. Y dado que CD163 está implicado en la replicación de PRRSV en PAM, la utilización de gM-CSF puede, a este respecto, no tener un efecto beneficioso neto.

M-CSF parece mejorar la condición de los PAM primarios en menor medida que gM-CSF, pero no interfiere con la producción de CD163.

Sin embargo, se encontró, sorprendentemente, que la presencia de M-CSF en el medio de crecimiento de PAM obtenidos a través de lavado pulmonar, antes de someterse a transfección, hace que las células sean más resistentes al estresante proceso de transfección. Por tanto, la eficacia de transfección se aumenta, significativamente, en presencia de M-CSF.

Son cantidades adecuadas de M-CSF, por ejemplo, 5, 10, 25, 50, 100 o 200 ng/ml en ese orden de orden de preferencia creciente.

(En la figura 2 se puede ver que, de hecho, en presencia de M-CSF, el número de células PAM primarias vivas disminuye después del lavado pulmonar y aislamiento (o en el mejor de los casos permanece estable durante 6 días). La disminución es menos dramática a lo largo del tiempo cuando se compara la disminución en ausencia de M-CSF, pero, en cualquier caso, dentro de la probabilidad estadística no hay aumento del número de células).

Por lo tanto, otra manera preferida de esta realización se refiere a métodos de acuerdo con la invención, en los que el método comprende la etapa de adición de una cantidad de al menos 5 ng/ml de M-CSF a la muestra de lavado broncoalveolar que contiene células y/o el componente celular antes de la etapa de transfección. La solicitud de patente PCT WO2008/089094 divulga la utilización de M-CSF como un componente del medio de crecimiento obligatorio a fin de mantener vivos PAM fetales immortalizados pero no transformados. Contrariamente a esto, en la presente invención M-CSF o gM-CSF se utiliza antes de immortalizarse los PAM.

Se demostró por los inventores que, inesperadamente, la presencia de M-CSF durante la etapa d) y/o mientras se cultivan PAM immortalizados de acuerdo con la invención, por ejemplo, PAM fetales transformados y no transformados, también mejora la viabilidad de estas células fetales transformadas y no transformadas de acuerdo con la invención. Se puede observar en la figura 4, que la tasa de viabilidad y de replicación de PAM immortalizados de acuerdo con la invención mejora significativamente en presencia de M-CSF. Pequeñas cantidades de M-CSF de una magnitud de 1, 2, 3, 4 o 5 ng/ml son ya suficientes para mejorar la tasa de viabilidad y de replicación. Son concentraciones preferidas de M-CSF 6, 12, 25, 50, 100, 200 o incluso 400 ng/ml, en orden de preferencia creciente.

Por tanto, de nuevo, otra forma preferida de esta realización se refiere a un método de acuerdo con la invención en el que el método comprende adicionalmente la etapa de adición de una cantidad de al menos 1 ng/ml de M-CSF durante la etapa d) y/o mientras se cultiva el PAM inmortalizado de acuerdo con la invención.

5 La figura 5 muestra que anticuerpos contra CD163 y P210, dos receptores que demostraron ser esenciales para la entrada y replicación de virus del PRRS en células PAM, son, de hecho, reactivos con PAM inmortalizados de acuerdo con la invención. Esto significa que CD163 y P210 están presentes, de hecho, en PAM inmortalizados de acuerdo con la invención.

10 La figura 6 muestra que los PAM inmortalizados de acuerdo con la invención, de hecho, soportan replicación de PRRSV. Se puede observar, que un aislado de campo de PRRSV se replica aún más rápido y con un título más alto en los primeros 2-3 días después de la infección, cuando se compara con PAM primarios.

15 La figura 7 muestra, que, de hecho, un aislado de campo de PRRSV se replica más rápido y a un título más alto en PAM inmortalizados de acuerdo con la invención, cuando se compara con la replicación en células MARC-145. También se puede observar que un aislado de campo, de hecho, replica mejor en PAM en general, independientemente de si están inmortalizados o no, cuando se compara con la replicación en células MARC-145.

20 La figura 7 también muestra, a la inversa, que cepas de tipo I y tipo II de PRRSV que se adaptan a la replicación en células MARC-145 se replican a un título más alto en células MARC-145 cuando se compara con la replicación en PAM.

25 Esto demuestra que, de hecho, PAM inmortalizados de acuerdo con la invención son tan adecuados como los PAM primarios para replicar aislados de campo de PRRSV y, por lo tanto, son más adecuados para este fin que células que no son PAM tales como células MA104, MARC-145 o CL2621.

30 La presente invención se refiere a un macrófago alveolar porcino inmortalizado (PAM), caracterizado por que el PAM es susceptible al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), el PAM expresa un antígeno T de SV40 y el PAM no comprende ADN de repetición terminal larga retroviral.

35 Los PAM inmortalizados de acuerdo con la invención pueden, en principio, proporcionarse además con un gen funcional que codifica transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT). Sin embargo, esto de ninguna manera es necesario, ya que el antígeno T de SV40 es capaz de mantener el estado inmortalizado de los PAM de acuerdo con la invención. De hecho, aunque solo sea por simplicidad técnica para producir PAM inmortalizados, se prefiere que solo el antígeno T de SV40 se utilice para la inmortalización de las células.

Por tanto, una forma preferida de la realización se refiere a PAM inmortalizados de acuerdo con la invención que se caracterizan por que los PAM no comprenden hTERT.

40 Una realización de la presente invención se refiere a métodos de replicación de virus del PRRS, caracterizados por que dichos métodos comprenden las etapas de

- a) cultivar un PAM inmortalizado de acuerdo con la invención,
- b) poner en contacto el PAM inmortalizado con el PRRSV
- 45 c) permitir que PRRSV se replique y
- d) aislar la progenie vírica.

Una realización de la presente invención se refiere a un cultivo celular que comprende un PAM inmortalizado de acuerdo con la invención.

50 En una forma preferente de esta realización, el cultivo celular que comprende el PAM inmortalizado se infecta con el PRRSV.

55 En otra forma preferente de esta realización, el cultivo celular que comprende el PAM inmortalizado comprende M-CSF.

Una realización de la presente invención se refiere a métodos para la preparación de una vacuna que comprende PRRSV, caracterizados por que los métodos comprenden el método de replicación de PRRSV de acuerdo con la invención seguido de la etapa de mezcla del virus con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 En una forma preferente de esta realización, el PRRSV está en una forma viva atenuada o inactivada.

Ejemplos

Ejemplo 1:

5 Materiales y métodos.

Plásmidos.

10 Para construir antígeno T de pPB-CAG-SV40, se añadieron sitios XhoI y BglII al antígeno T de SV40 mediante PCR utilizando cebadores SV40 Tag 5'-BII (5'-GGCGAGATCTACCATGGATAAAGTTTAAACAG-3') y SV40 Tag 3'-XI (5'-GGCGCTCGAGTTATGTTTCAGGTTTCAGGGG-3'). Se utilizó ADN polimerasa Phusion para la PCR de acuerdo con el protocolo del fabricante (New England Biolabs). Se clonó el fragmento en pCR-Blunt (Life Technologies) y se verificó mediante secuenciación. A continuación, se escindió el antígeno T de SV40 a partir de pCR-Blunt y se clonó en pPB-CAGEBNXN (Yusa et al., 2009) utilizando los sitios BglII-XhoI para crear antígeno T de pPB-CAG-SV40 (Figura 1). La construcción final se verificó mediante secuenciación. Se aisló ADN de plásmido para transfección en células PAM primarias con el kit Qiagen EndoFree plasmid maxi (Qiagen).

Aislamiento y crecimiento de células primarias y células de SVh de PAM.

20 Se cosecharon macrófagos alveolares porcinos de los pulmones de lechones SPF negativos al PRRSV de 1-2 semanas de edad. Se lavaron los pulmones de tres a cinco veces con solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS). Se centrifugó el fluido de lavado 10' a 1000xg a 4 °C para sedimentar células. Las células se volvieron a suspender y se almacenaron en nitrógeno líquido en RPMI 1640+HEPES+GlutaMax (Life Technologies) que contiene FCS al 50 % (Hyclone, Thermo Scientific), 1x de aminoácidos no esenciales (Life Technologies), glutamina 2 mM, antibióticos y DMSO al 10 %. Tras la descongelación, se colocaron células PAM en cultivo y se dejaron crecer en RPMI 1640+HEPES+GlutaMax (Life Technologies) que contiene FCS al 20 % (Hyclone, Thermo Scientific), 1x de aminoácidos no esenciales (Life Technologies), glutamina 2 mM, antibióticos a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se obtuvo M-CSF humano recombinante (M-CSF) a partir de R&D Systems. Se cultivaron células SVh de PAM en medio + 100 ng/ml M-CSF (R&D Systems).

Ensayos de viabilidad.

35 El efecto de M-CSF sobre la supervivencia *in vitro* de células PAM primarias se examinó mediante la siembra de 200.000 células por 24 pocillos en un medio que contenía diferentes concentraciones de M-CSF. Cada condición se analizó por duplicado. Se tomaron muestras de células de los pocillos 3 y 6 días después de la siembra y se determinó el número viable de células con el GUAVA Easycyte plus (Guava Millipore) que utiliza colorante Viacount (Guava Millipore) de acuerdo con el protocolo de fabricación. Se contó cada muestra dos veces.

40 El efecto de la concentración de M-CSF sobre la proliferación de SVh de PAM se examinó de manera similar con ajustes menores. En el presente caso, se sembraron 25000 células en placas de 96 pocillos de unión ultrabaja y se cosecharon las células para el recuento 3, 4, 5 y 6 días después de la siembra. Se contó cada muestra dos veces.

Transfección.

45 Después de 6 días en cultivo, se cosecharon células PAM primarias y se contaron células viables. En este experimento se añadió M-CSF (100 ng/ml) al medio para promover la supervivencia *in vitro* de PAM primarios. Por transfección, se transfectaron 1,10E6 células viables en 100 µl de tampón de células primarias P3 + suplemento (Lonza Cologne AG) que utiliza el programa DN-100 del nucleofector 4D (Lonza Cologne AG). Se transfectaron células con 1,6 µg de antígeno T de pPB-CAG-SV40 y 0,4 µg de pPB-CMV-hyPBBase (Yusa et al., 2011) o, como control, con 1,6 µg de pPB-CAGEBNXN y 0,4 µg de pPB-CMV-hyPBBase. Después de la administración del pulso de nucleofección, se dejaron las células a TA durante 10 min. Luego, se añadieron lentamente a las células 400 µl de RPMI 1640 (37 °C) y se incubaron las células a 37 °C durante 5 minutos. Después, se volvieron a suspender las células cuidadosamente, se sembraron en RPMI 1640+HEPES+GlutaMax (Life Technologies) que contenía FCS al 20 % (Hyclone, Thermo Scientific), 1x de aminoácidos no esenciales (Life Technologies), glutamina 2 mM, antibióticos y 100 ng/ml de M-CSF (R&D Systems) y se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Anticuerpos y citometría de flujo.

60 Se marcaron células con anticuerpos monoclonales de ratón generados contra CD163 porcino (clon 2A10/11, AbD Serotec), anticuerpos monoclonales de ratón generados contra sialoadhesina/p210 porcino (Duan et al., 1998) o anticuerpos control de isotipo IgG1 de ratón marcados con FITC (AbD Serotec). Tras el lavado, las células marcadas con anticuerpos anti-CD163 o anti-sialoadhesina/p210 se marcaron con anticuerpos de cabra anti-ratón marcados con FITC (Lifespan Biosciences). Se analizaron las células utilizando un citómetro Becton Dickinson FACS Calibur y el programa informático CellQuest Pro.

Replicación y titulación de PRRSV.

Para comparar PAM primarios, células SVh de PAM o MARC-145 como sustratos para replicación de PRRSV, se sembraron iguales cantidades de células en 12 pocillos. Las células se infectaron a $t=0$ con un aislado de campo patógeno, una cepa de vacuna de tipo I o una cepa de vacuna de tipo II con MOI de 0,001 o MOI de 0,0001. Se cosecharon los sobrenadantes varios días después de la infección y se almacenaron a -20°C . Se determinaron títulos de virus mediante titulación de PAM primarios y sobrenadantes de SVh de PAM sobre PAM primarios y sobrenadantes de MARC-145 sobre células MARC-145. Todas las titulaciones se realizaron por duplicado. Se calcularon títulos utilizando el método de Spearman-Kärber y se expresaron como $\log_{10}$ de TCID₅₀/ml.

Resultados:

M-CSF promueve la viabilidad *in vitro* de PAM primarios.

Los PAM primarios tienen una baja tasa de supervivencia *in vitro* en medios estándar RPMI 1640 que contienen FCS al 20 % (Figura 2). El número de células viables disminuye con el tiempo y solo aproximadamente el 50 % de células son todavía viables después de tres días. La adición del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) al medio de cultivo tiene un efecto positivo sobre la supervivencia y aumenta claramente el número de células viables después de tres o seis días en comparación con células cultivadas en ausencia de M-CSF.

Establecimiento de una línea celular de PAM inmortalizados con SV40.

Se cultivaron células primarias durante 6 días en un medio con M-CSF y se transfectaron posteriormente con antígeno T de pPBCAG-SV40 o pPB-CAG-EBNXXN en combinación con el vector pPB-CMV-hyPBase que codifica la transposasa piggy-Bac. Después de la transfección, se monitorizaron cuidadosamente células cada día para la proliferación y se relleno el medio regularmente con medio nuevo + 100 ng/ml de M-CSF. La proliferación celular no fue visible en las células control transfectadas con pPB-CAGEBNXXN y 4-5 semanas después de la transfección todas las células murieron. Por el contrario, pequeñas colonias crecieron en los cultivos de células transfectadas con antígeno T pPB-CAG-SV40 3-4 semanas después de la transfección (Figura 3). Estas colonias continuaron proliferando y pasaron a aumentar el número celular. Todas las células eran positivas para el antígeno T de SV40 como se demostró mediante inmunofluorescencia (datos no mostrados).

Estas células continúan proliferando, pueden someterse a pases dos veces a la semana y actualmente se han mantenido en cultivo durante más de 8 meses (50-60 pases). Esta línea celular puede volver a crecer fácilmente después del almacenamiento en nitrógeno líquido. La línea celular así estabilizada se nombró SVh de PAM.

La proliferación de la línea celular SVh de PAM depende de la concentración de M-CSF.

Para determinar si la línea celular SVh de PAM requiere M-CSF para proliferar, se cultivaron células SVh de PAM sin o con la presencia de diferentes concentraciones de M-CSF. Se determinó el número de células viables 3 y 6 días después de la siembra. La proliferación de SVh de PAM es dependiente de M-CSF de una manera dependiente de la concentración (Figura 4). El mayor aumento en el número celular se observa en presencia de altas concentraciones de M-CSF (400-100 ng/ml). Concentraciones más bajas de M-CSF dan como resultado una proliferación reducida de células y se detectó poco o ningún aumento en el número de células en ausencia de M-CSF, lo que indica que la proliferación de células SVh de PAM depende de la concentración de M-CSF en el medio.

Las células SVh de PAM expresan marcadores sialoadhesina/p210 y CD163.

Se ha demostrado que los dos receptores, sialoadhesina/P210 y CD163, son esenciales para la entrada y la replicación del virus del PRRS en células PAM. Mientras que se encontró que la expresión de sialoadhesina/p210 era esencial para la unión y la entrada de PRRSV (en) a células PAM, se demostró que CD163 era necesario para la replicación de PRRSV en células (Delputte et al., 2005; Van Gorp et al., 2008; Calvert et al., 2007). Se examinó si células SVh de PAM expresaban sialoadhesina/P210 y CD163 mediante marcaje de células con anticuerpos específicos generados contra estos receptores y análisis de ellos mediante citometría de flujo. Se encontró que más del 80 % de las células SVh de PAM eran CD163+ y más del 70 % sialoadhesina/P210+ (Figura 5), lo que sugiere que estas células podrían ser adecuadas para la infección y replicación de PRRSV.

Las células SVh de PAM son sustratos adecuados para la replicación de PRRSV.

Se analizó si las células SVh de PAM son un sustrato para la replicación de PRRSV infectándolas con un aislado de campo patógeno. Se cosecharon los sobrenadantes en diferentes días después de la infección y se titularon para determinar títulos de virus. A efectos de comparación, también se infectaron células PAM primarias en el mismo experimento. Se infectaron células SVh de PAM mediante aislados de campo del PRRSV y se produjo claramente virus del PRRS (Figura 6). En comparación con los PAM primarios, los títulos de virus producidos mediante células SVh de PAM fueron mayores el día 1 y día 2 después de la infección, comparables en el día 3 y día 4 y menores en el día 5.

Las células MARC-145 se utilizan normalmente como sustrato para la producción de virus de cepas de vacunas de PRRSV. Se compararon PAM primarios, células SVh de PAM y células MARC-145 como sustratos para replicación de diferentes cepas de PRRSV. Se infectaron igual número de PAM primarios, células SVh de PAM y MARC-145 con un aislado de campo patógeno, una cepa de vacuna de tipo I de PRRSV o una cepa de vacuna de tipo II de PRRSV. Se cosecharon los sobrenadantes en diferentes días después de la infección y se titularon los sobrenadantes para determinar títulos de virus. De nuevo, las células SVh de PAM producen títulos comparables o mayores del aislado de campo de PRRSV que PAM primarios (Figura 7A). SVh de PAM también produce títulos mayores del aislado de campo del PRRSV que células MARC-145. Cuando se compararon títulos de virus de cepas de tipo I y II de PRRSV producidas sobre diferentes sustratos, se encontró que ambas cepas replicaron mejor sobre células MARC-145, el sustrato que se utilizaba normalmente para producir estos virus atenuados (Figura 7B y C). Las células SVh de PAM, sin embargo, produjeron mayores títulos que PAM primarios para ambas cepas de vacuna en todos los puntos temporales, demostrando nuevamente que las células SVh de PAM son un mejor sustrato para la replicación de PRRSV que PAM primarios.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Mapa del vector de antígeno T de pPB-CAG-SV40

Figura 2: M-CSF aumenta la supervivencia *in vitro* de PAM primarios. Se sembraron 200000 células PAM primarias por duplicado en t = 0 (día 0) en un medio que contenía diferentes concentraciones o no contenía M-CSF. Se determinó el número de células viables a los 3 y 6 días después de la siembra. Se determinó el número de células por duplicado por pocillo. Los datos representados son la media + SEM de cuatro mediciones independientes.

Figura 3: Formación de colonias en células transfectadas con antígeno T de pPB-CAG-SV40. Las colonias se indican mediante flechas negras.

Figura 4: M-CSF estimula la proliferación de células SVh de PAM. Se sembraron 25000 células SVh de PAM en t = 0 (día 0) en un medio que contenía diferentes concentraciones o no contenía M-CSF. Se determinó el número de células viables 3, 4, 5 y 6 días después de la siembra. Los datos representados son la media de dos recuentos celulares por pocillo.

Figura 5: Las células SVh de PAM expresan CD163 y sialoadhesina. Se marcaron células SVh de PAM con anticuerpos generados contra anticuerpos de control de isotipo o CD163 o p210. Se marcaron células con anticuerpos secundarios marcados con FITC y se analizaron mediante citometría de flujo. Se representa el porcentaje de células positivas a FITC por anticuerpo.

Figura 6: Replicación de PRRSV sobre células SVh de PAM. Se infectaron células en t = 0 con un aislado de campo de PRRSV patógeno (MOI de 0.001). Se cosecharon los sobrenadantes en diferentes días después de la infección y se titularon para determinar títulos de virus. Se representan los valores 10log de la TCID₅₀/ml para PAM primarios (barras blancas) y SVh de PAM (barras negras). Los datos son la medida de dos titulaciones independientes.

Figura 7: Replicación de diferentes cepas de PRRSV sobre la línea celular SVh de PAM. Se infectaron células en t = 0 con (A) un aislado de campo de PRRSV patógeno (MOI de 0,0001), (B) cepa de vacuna de tipo I de PRRSV (MOI de 0,001) o (C) cepa de vacuna de tipo II de PRRSV (MOI de 0,001). Se cosecharon los sobrenadantes en diferentes días después de la infección y se titularon para determinar títulos de virus. Se representan los valores 10log de la TCID₅₀/ml para MARC-145 (barras blancas), PAM primarios (barras sombreadas) y SVh de PAM (barras negras). Los datos son la media de dos titulaciones independientes

Lista de referencias

Calvert,J.G., Slade,D.E., Shields,S.L., Jolie,R., Mannan,R.M., Ankenbauer,R.G., y Welch,S.K. (2007). CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. J. Virol. 81, 7371-7379.

Delputte,P.L., Costers,S., y Nauwynck,H.J. (2005). Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. J. Gen. Virol. 86, 1441-1445.

Duan,X., Nauwynck,H.J., Favoreel,H.W., y Pensaert,M.B. (1998). Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. J. Virol. 72, 4520-4523.

Van Gorp,H., Van Breedam, W., Delputte,P.L., y Nauwynck,H.J. (2008). Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 89, 2943-2953.

Yusa,K., Rad,R., Takeda,J., y Bradley,A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. Nat. Methods 6, 363-369.

Yusa,K., Zhou,L., Li,M.A., Bradley,A., y Craig,N.L. (2011). A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 1531-1536.

Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 5 de mayo de 1997; 407(3):313-9.

- 5 Alexopoulou AN, Couchman JR, y Whiteford JR. The CMV early enhancer/chicken beta actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC Cell Biology* 9: 2, 2008.

REIVINDICACIONES

1. Macrófago alveolar porcino inmortalizado (PAM), **caracterizado por que** el PAM es susceptible al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), expresa un antígeno T de SV40, estando integrado el ADN que comprende el antígeno T de SV40 en el genoma celular con la utilización de un transposón, y no comprende ADN de repetición terminal larga retroviral exógeno.
2. PAM inmortalizado de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el PAM no comprende transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT).
3. Cultivo celular que comprende un PAM inmortalizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
4. Cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** el cultivo celular está infectado por PRRSV.
5. Cultivo celular de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, **caracterizado por que** el cultivo celular comprende M-CSF.
6. Método para la preparación de un PAM inmortalizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, **caracterizado por que** dicho método comprende las etapas de
 - a) obtener una muestra de lavado broncoalveolar que contiene células de un sujeto porcino,
 - b) separar un componente celular de dicha muestra,
 - c) transfectar dicho componente celular con una molécula de ADN que comprende transposones y que comprende un gen que codifica el antígeno T de SV40 bajo el control de un promotor adecuado,
 - d) seleccionar células PAM que se han cultivado durante al menos 5 ciclos celulares.
7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** en la etapa d) se seleccionan células que se han cultivado durante al menos 10 ciclos celulares.
8. Método de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, **caracterizado por que** dicho método comprende la etapa de añadir una cantidad de al menos 5 ng/ml de M-CSF a la muestra de lavado broncoalveolar que contiene células y/o al componente celular antes de la etapa de transfección.
9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, **caracterizado por que** dicho método comprende adicionalmente la etapa de añadir una cantidad de al menos 1 ng/ml del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) durante la etapa d) y/o mientras se cultiva el PAM inmortalizado.
10. Método de replicación de PRRSV, comprendiendo dicho método las etapas de
 - a) cultivar un PAM inmortalizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2,
 - b) poner en contacto el PAM inmortalizado con el virus del PRRS
 - c) permitir que PRRSV se replique y
 - d) aislar la progenie vírica.
11. Método para la preparación de una vacuna que comprende PRRSV, **caracterizado por que** el método comprende el método de acuerdo con la reivindicación 10 seguido de la etapa de mezcla del virus con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Método de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado por que** el PRRSV es una forma viva atenuada o inactivada.

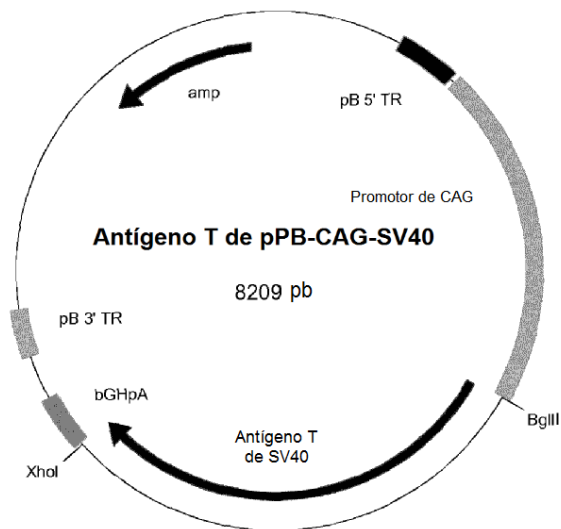


Figura 1.

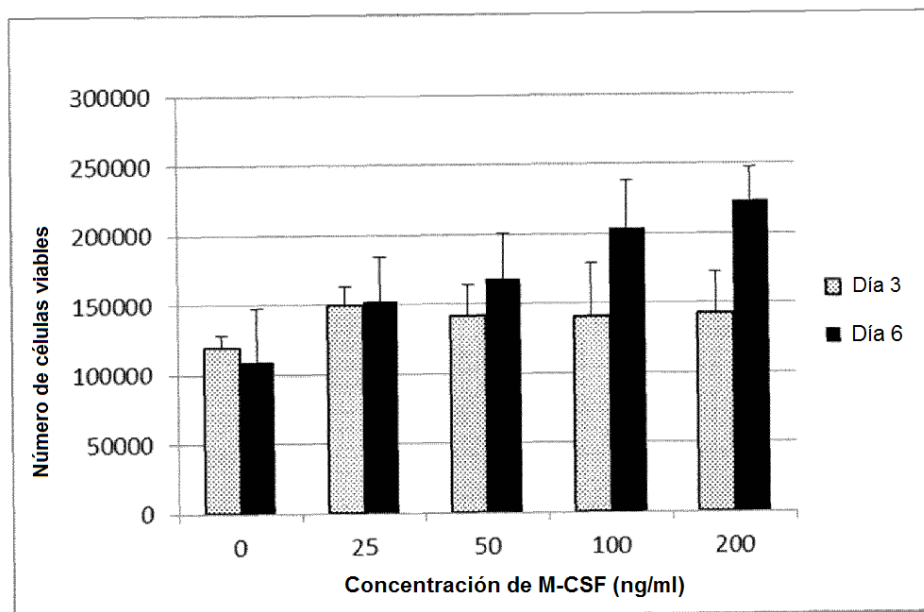


Figura 2.

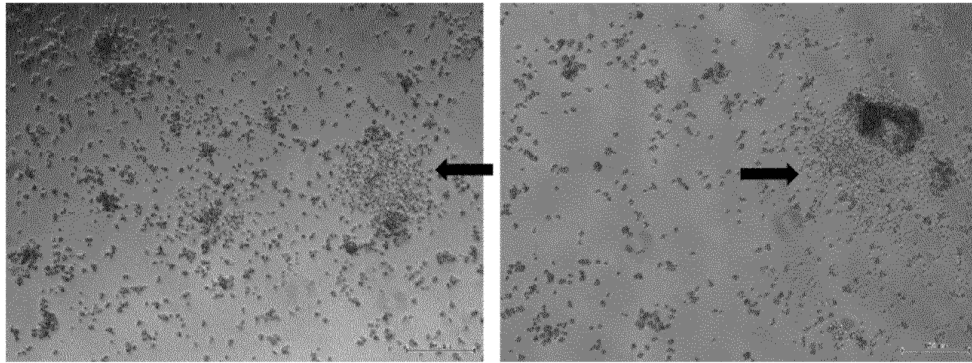


Figura 3.

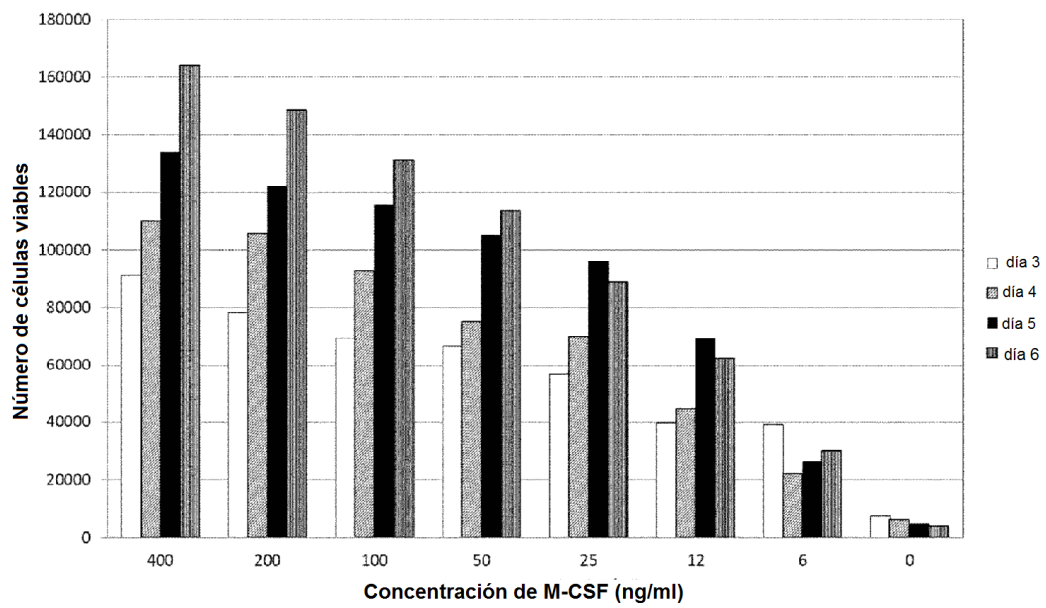


Figura 4.

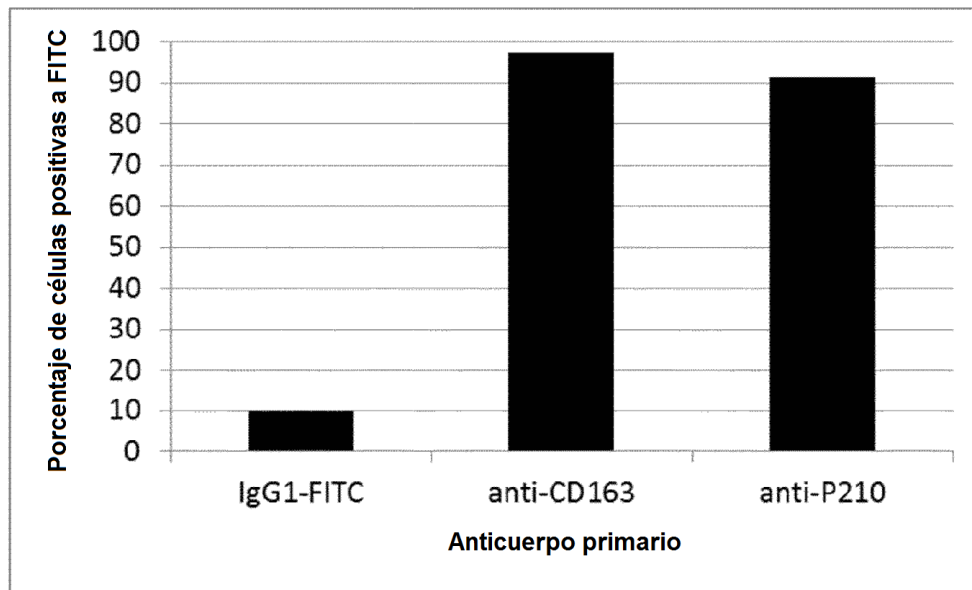


Figura 5.

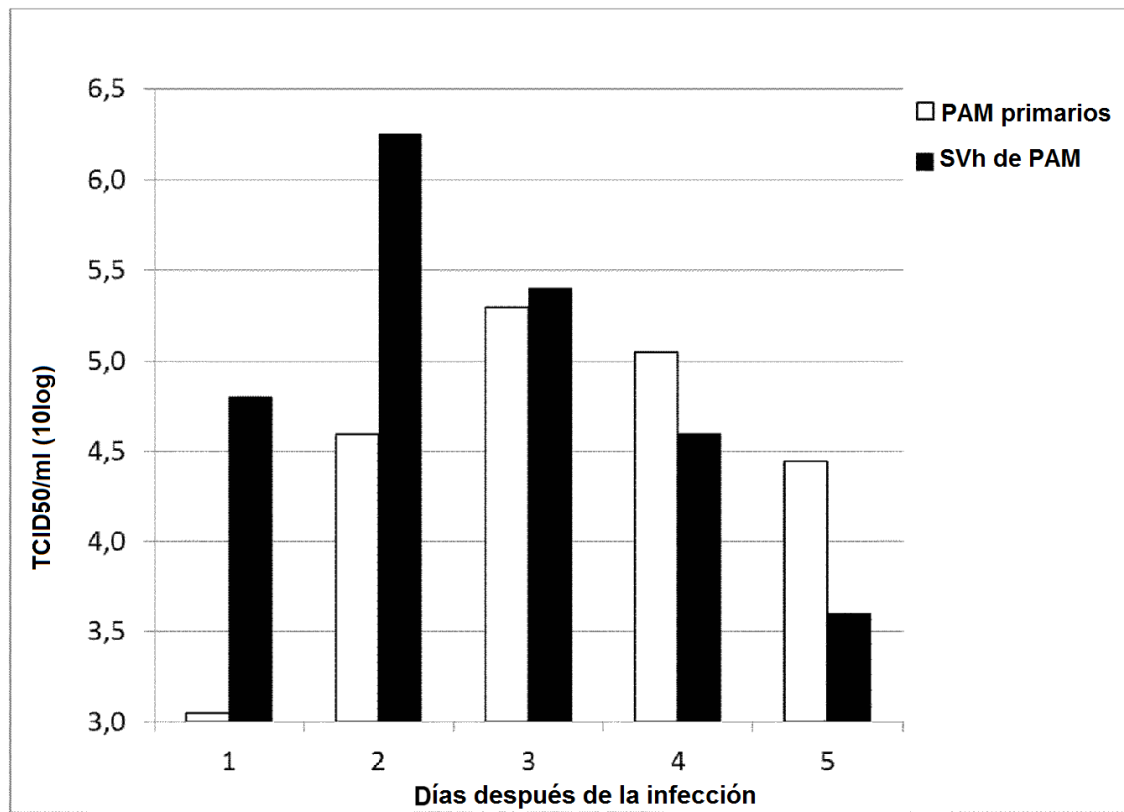


Figura 6.

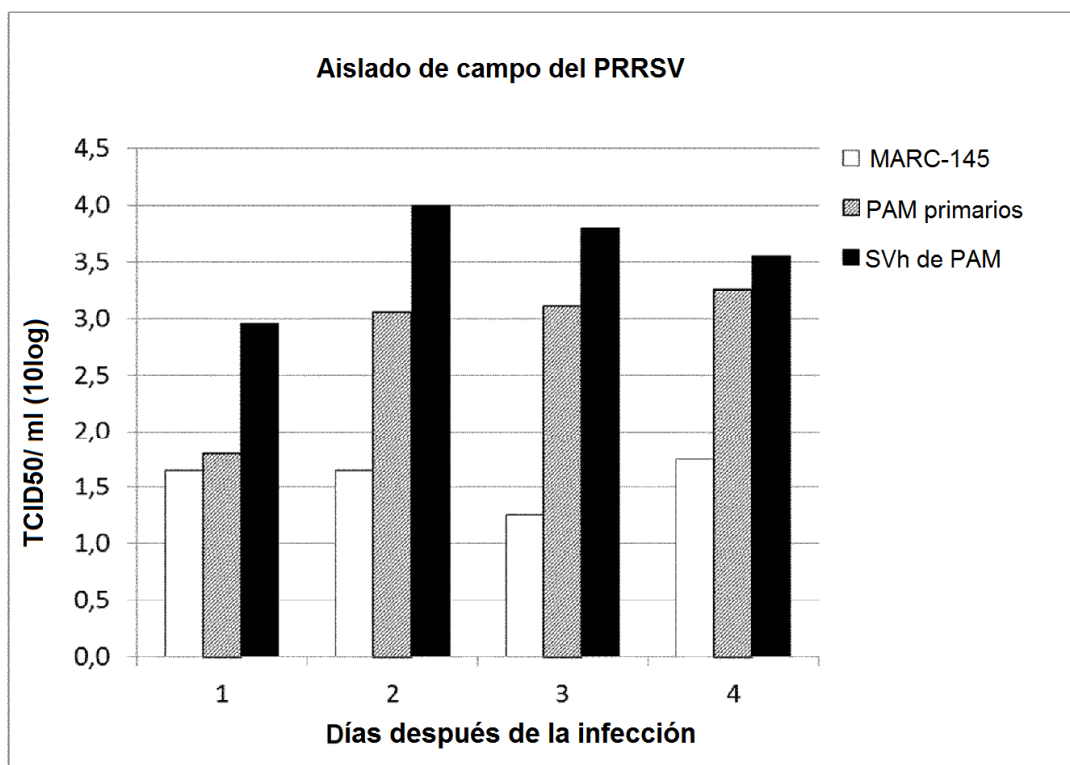


Figura 7A.

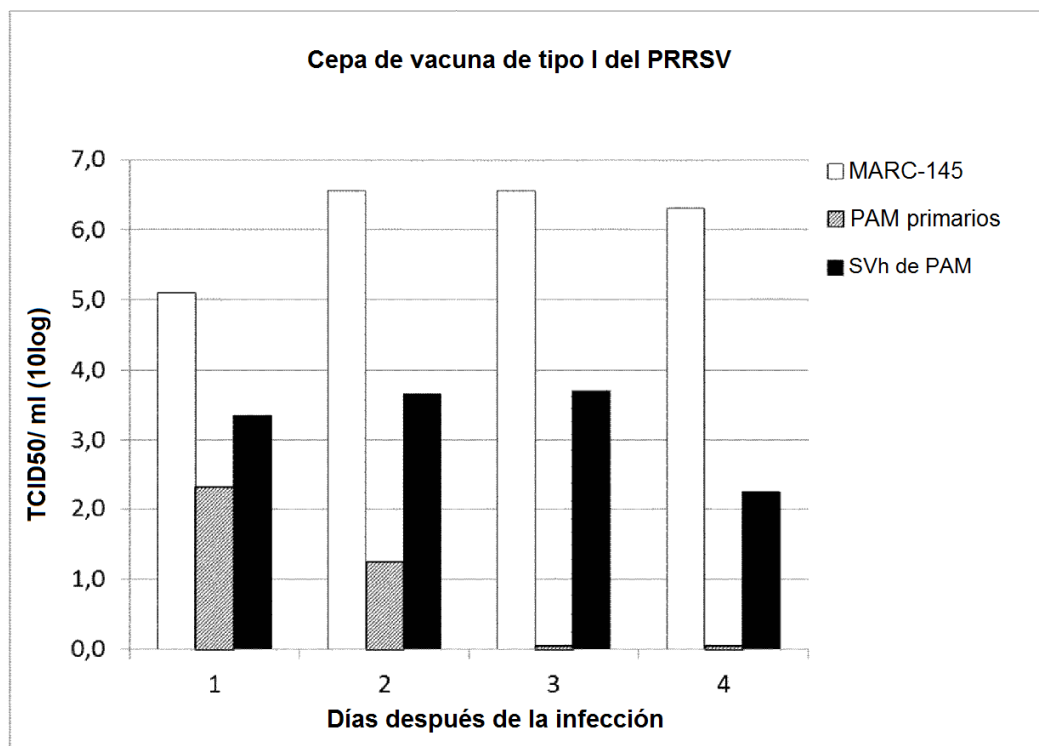


Figura 7B.

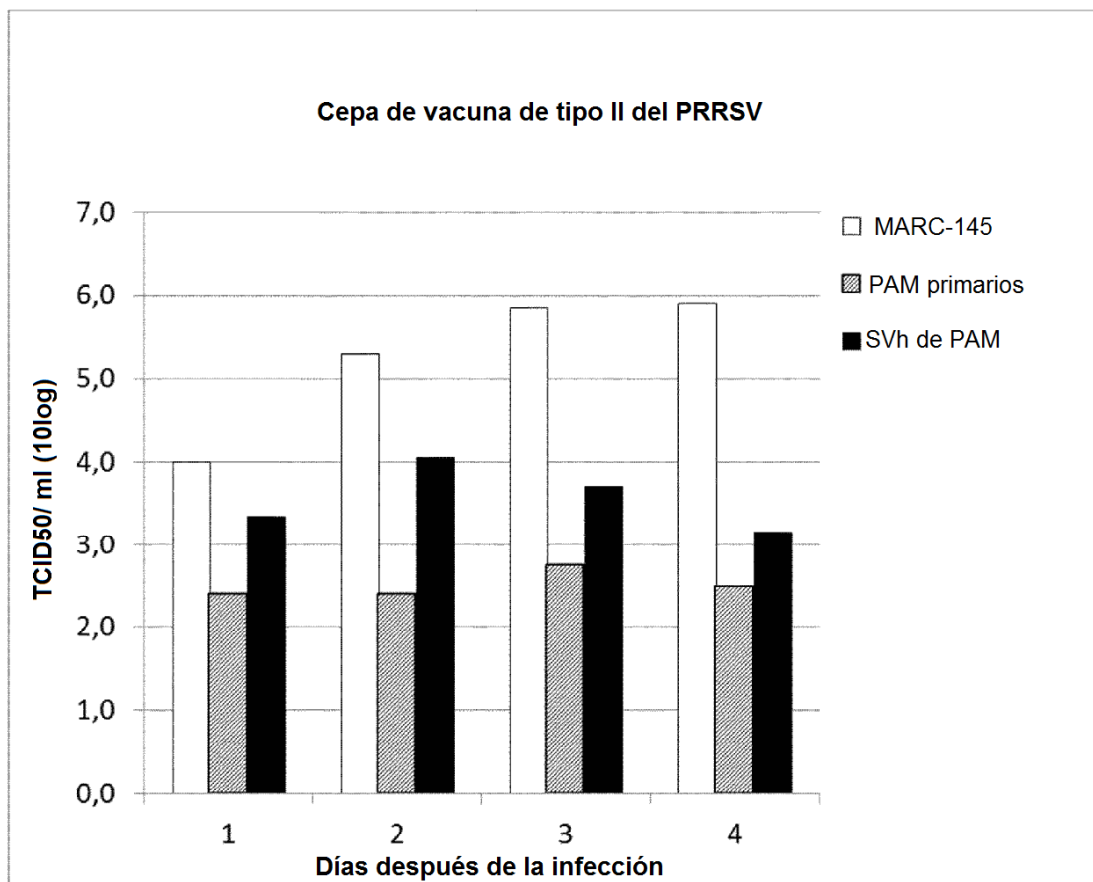


Figura 7C.