

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 084**

51 Int. Cl.:

A61K 39/215 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2015** **PCT/US2015/015009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015** **WO15120378**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2015** **E 15710299 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018** **EP 3102235**

54 Título: **Proteínas y antígenos del virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP)**

30 Prioridad:

07.02.2014 US 201461937419 P

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

18.09.2018

73 Titular/es:

**MJ BIOLOGICS, INC. (100.0%)
1961 Premier Drive, Suite 402
Mankato, MN 56001, US**

72 Inventor/es:

KIM, BYOUNG KWAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 682 084 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

Proteínas y antígenos del virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP)

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a la preparación y aislamiento de proteínas y antígenos del virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP). La divulgación proporciona además proteínas y antígenos virales como se obtienen de células infectadas con VDEP y en composiciones que comprenden las proteínas y antígenos.

10

Antecedentes

El virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP) es un coronavirus altamente infeccioso que infecta el sistema intestinal de un cerdo, normalmente causando diarrea y deshidratación. Mientras que los cerdos adultos se ponen la mayoría enfermos y pierden peso después de ser infectados, el virus es frecuentemente mortal para los lechones recién nacidos. Piaras infectadas pueden sufrir una pérdida del 50 % al 100 % de los lechones durante un periodo de cuatro a cinco semanas. Se ha estimado que entre junio de 2013 y marzo de 2014 se perdieron más de 4 millones de lechones por VDEP.

15

J. S. Oh et al, J. Vet. Sci. (2005), 6(4), 349-352 desvelan una comparación de un enzoinmunoanálisis de adsorción con la prueba de neutralización de suero para el serodiagnóstico de VDEP.

20

Sumario

La presente divulgación se refiere a proteínas y antígenos del coronavirus conocido como VDEP. VDEP es un virus con un genoma de ARN, y es conocido por infectar sujetos porcinos.

25

En el presente documento se desvelan realizaciones de un método de preparación de proteínas y/o antígenos de VDEP de células infectadas con VDEP. En algunas realizaciones, las proteínas y/o antígenos se recogen en un momento de tiempo anterior después de la infección cuando la mayoría, o la totalidad, de las proteínas y/o antígenos virales siguen asociados a las células infectadas. En tales realizaciones, la mayoría o la totalidad de las proteínas de VDEP codificadas están o bien dentro de las células infectadas o asociadas a la membrana celular de las células infectadas. En tales condiciones, relativamente algunas, si alguna, de las partículas de VDEP están presentes en el entorno extracelular fuera de las células. En otras realizaciones, las proteínas y/o antígenos se recogen en una etapa después de la infección cuando al menos algunas de las células infectadas han liberado partículas virales de VDEP replicadas en el entorno extracelular.

30

35

La presente invención proporciona un método que comprende:

aislar células infectadas con el virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP) de partículas virales de VDEP libres de células en una población de células en un medio de cultivo; y
extraer proteínas y antígenos de VDEP de las células infectadas con VDEP aisladas con una solución que contiene detergente para formar una solución que comprende proteínas y antígenos de VDEP aislados y el detergente, en el que la solución que contiene detergente comprende un detergente no iónico, que es p-isooctilfenil éter de poli(etilenglicol), octilfenoxipoliétoxietanol (Nonidet P- 40), Triton X-100, o una combinación de los mismos;
combinar la solución de proteínas y antígenos de VDEP aislados y detergente con un adyuvante para formar una composición inmunogénica que comprende proteínas y antígenos de VDEP, detergente y el adyuvante.

40

45

Ciertas realizaciones del método desvelado pueden incluir proporcionar una población de células cultivadas infectadas con VDEP; aislamiento y/o separación de las células de VDEP infectadas del medio de cultivo y/o virus VDEP libre de células en el medio; y recogida de proteínas y/o antígenos de VDEP de las células aisladas. La recogida de las proteínas y/o antígenos virales se hace extrayéndolos o eluyéndolos de las células infectadas aisladas con una solución que contiene detergente. La solución que contiene detergente comprende una cantidad de detergente eficaz para extraer o eluir las proteínas y/o antígenos, tal como 0,5 % de Triton X-100. En realizaciones adicionales, la recogida, extracción o elución puede ser durante hasta 24 horas, tal como 2 a 15 horas o en algunas realizaciones de 0,2 a 5 horas. La recogida, extracción o elución se realiza a una temperatura adecuada para la recogida, extracción o elución, tal como de 0 °C a 25 °C, de 2 °C a 10 °C, de 2 °C a 6 °C o, en ciertos ejemplos, a 4 °C. Opcionalmente, las proteínas y/o antígenos de VDEP producidos por el método pueden incluir proteínas de la envoltura de VDEP.

50

55

60

También en el presente documento se desvelan proteínas y/o antígenos de VDEP aislados preparados por el método desvelado. Las proteínas y/o antígenos virales pueden incluir una o más proteínas de la envoltura de VDEP producidas por una célula infectada. También se contemplan composiciones que comprenden las proteínas y/o antígenos virales. Opcionalmente, la composición puede contener uno o más excipientes adicionales, tales como un vehículo farmacéuticamente aceptable, un adyuvante, o una combinación de los mismos.

65

También se desvela un método de producción de una respuesta inmunitaria en un sujeto porcino. El método puede incluir administrar una o más proteínas y/o antígenos de VDEP, preparados por el método desvelado, al sujeto porcino. Opcionalmente, la respuesta inmunitaria resultante puede ser para vacunar el sujeto porcino. En algunos aspectos del método, una composición que comprende las proteínas y/o antígenos se administra al sujeto. El método también puede incluir una o más administraciones repetidas de las proteínas y/o antígenos, o la composición, al mismo sujeto, tal como 2, 3, 4 o más administraciones.

Se desvela en el presente documento un kit que comprende las proteínas y/o antígenos aislados. El kit puede comprender una composición que comprende las proteínas y/o antígenos de VDEP. En aspectos del kit, es adecuado para su uso en un método de producción de una respuesta inmunitaria en, o un método de vacunación, de un sujeto porcino.

Se contemplan los diversos aspectos de la divulgación para su uso en relación con todas las cepas de VDEP que son antigénicamente idénticas, o están relacionadas con, aquellas aisladas en América del Norte, Europa y Asia. Por tanto, la divulgación puede ser más generalmente considerada como basado en la(s) proteína(s) y/o antígenos de cualquier cepa aislada, cepa o subtipo de VDEP.

Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que continúa con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una transferencia Western de proteínas de VDEP de cultivos de células infectadas, puestas en contacto con dos anticuerpos monoclonales.

La FIG. 2 es una transferencia Western de proteínas de VDEP de cultivos de células infectadas con el tiempo, con una mezcla de los dos anticuerpos monoclonales usados en la FIG. 1.

La FIG. 3 es una tabla de datos que compara la mortalidad de lechones de cerdas no vacunadas y cerdas vacunadas 3-5 días antes de parir con una realización a modo de ejemplo de una vacuna desvelada en el presente documento, donde las cerdas no vacunadas y vacunadas y las crías se mantienen en la misma sala.

La FIG. 4 es una tabla de datos que compara la mortalidad de lechones de cerdas no vacunadas y cerdas vacunadas 3-5 días antes de parir con una realización a modo de ejemplo de una vacuna desvelada en el presente documento, donde las cerdas no vacunadas y vacunadas y las crías se mantienen en salas separadas.

La FIG. 5 es una tabla de datos de múltiples granjas, que proporcionan datos de mortalidad de lechones iniciales de pjaras no vacunadas.

Descripción detallada

I. Definiciones

Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a aquellos expertos habituales en la materia en la práctica de la presente divulgación. Las formas en singular "un", "una" y "el" y "la" se refieren a uno o más de uno, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. El término "o" se refiere a un único elemento de elementos alternativos establecidos o una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente de otro modo. Como se usa en el presente documento, "comprende" significa "incluye." Así, "que comprende A o B" significa que incluye A, B, o A y B, sin excluir elementos adicionales.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares, porcentajes, temperaturas, tiempos, etc., como se usa en la memoria descriptiva o reivindicaciones, deben entenderse como que están modificados por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, implícitamente o explícitamente, los parámetros numéricos expuestos son aproximaciones que pueden depender de las propiedades deseadas buscadas y/o límites de detección en condiciones/métodos de prueba estándar. Cuando se distinguen directamente y explícitamente realizaciones del estado de la técnica tratado, los números de realización no son aproximados, a menos que se cite la palabra "aproximadamente".

A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido para un experto habitual en la materia a la que la presente divulgación pertenece. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente divulgación, métodos y materiales adecuados se describen más adelante. Los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser limitantes.

Proteína VDEP se refiere a cualquier producto de polipéptido codificado por el genoma de VDEP y/o producido solo como resultado de infección con VDEP o el ciclo vital de VDEP. Así, polipéptidos específicos de VDEP no codificados por o expresados por una célula infectada con VDEP están dentro del alcance del término. No están previstos polipéptidos endógenos codificados por una célula infectada con VDEP, pero no expresada en ausencia de

infección y/o ciclo vital de VDEP. Sin embargo, polipéptidos endógenos expresados solo como consecuencia de infección y/o ciclo vital de VDEP están dentro del alcance del término. El término también incluye formas alternativas de los polipéptidos debido a cambios en la estructura secundaria y/o terciaria, tales como aquellos resultantes de desnaturalización de proteínas parcial o sustancial como ejemplo no limitante. Así, formas desnaturalizadas de los polipéptidos están dentro del alcance del término.

Antígeno de VDEP se refiere a cualquier porción o fragmento de un polipéptido de VDEP que es reconocido por un anticuerpo anti-VDEP. En algunos casos, la porción o fragmento puede ser un péptido con un resto unido, tal como, pero no se limita a, un resto de azúcar, un resto fosfato, o un resto de lípido. Alternativamente, la porción o fragmento puede ser un péptido sin ningún resto de no péptido unido.

Un adyuvante se refiere a un agente que modifica el efecto de otro agente. Como se usa en el presente documento, un adyuvante puede añadirse a una composición inmunogénica, tal como una vacuna, para modificar la respuesta inmunitaria para aumentar la cantidad de anticuerpos producidos y/o aumentar la longitud de protección conferida por la vacuna. Un adyuvante también puede añadirse a una composición para ayudar a estabilizar una formulación de proteínas y/o antígenos en una composición de vacuna. Ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, compuestos inorgánicos, tales como alumbre, hidróxido de aluminio, hidróxido de fosfato de aluminio o fosfato de calcio; aceite mineral, tal como aceite de parafina; productos bacterianos, tales como las bacterias muertas *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium bovis*, o toxoides; extractos orgánicos no bacterianos tales como escualeno o timerosal; sistemas de administración, tales como detergentes (Quil A); citocinas, tales como IL-1, IL-2 o IL-12; y combinaciones, tales como adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables (vehículos) útiles en la presente divulgación son convencionales. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21ª Edición (2005), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de una o más composiciones terapéuticas y/o agentes farmacéuticos.

En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. En algunos ejemplos, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser estéril para ser adecuado para administración a un sujeto (por ejemplo, por inyección parenteral, intramuscular o subcutánea). Además de vehículos biológicamente neutros, composiciones farmacéuticas que van a administrarse pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, y agentes de tamponamiento del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico o monolaurato de sorbitano.

Un excipiente útil en la presente divulgación es un aditivo en una composición farmacéutica. Como se usa en el presente documento, un excipiente puede incorporarse dentro de partículas de una composición farmacéutica, o puede mezclarse físicamente con partículas de una composición farmacéutica. Un excipiente puede usarse, por ejemplo, para diluir un agente activo y/o para modificar propiedades de una composición farmacéutica. Ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a, polivinilpirrolidona (PVP), succinato de tocoferilpolietilenglicol 1000 (también conocido como vitamina E TPGS, o TPGS), dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), trehalosa, bicarbonato sódico, glicina, citrato de sodio y lactosa.

II. Método de extracción o elución de proteínas y/o antígenos de VDEP

La divulgación se basa en parte en la disponibilidad y conocimiento de técnicas de cultivo celular y su uso en la propagación de virus, tal como VDEP. MJ Biologics, Inc., también es el cesionario de las patentes de EE.UU. N.º 7.241.582, 7.449.296, 7.776.537 y 8.142.788, que se refieren al virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VSRPP). La divulgación puede ponerse en práctica por el uso de cualquier línea celular adecuada susceptible a infección con VDEP y replicación intracelular *in vitro*. Así, la célula infectada puede ser cualquiera que sea capaz de ser productivamente infectada con VDEP. Ejemplos no limitantes incluyen células porcinas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Un ejemplo no limitante de células *in vitro* es células primarias de un sujeto porcino que se infecta con VDEP. Otros ejemplos no limitantes incluyen líneas celulares simias, tales como MA-104; células VERO; células BGM; células MDCK y células ST.

La infección de células con VDEP puede ser a cualquier multiplicidad de infección (m.o.i.) adecuada, tal como 0,1, 0,5 o 1, y no se requiere la infección de todas las células en un cultivo. En algunos casos, la infección inicial de algunas células en un cultivo puede ir seguida de la posterior liberación de VDEP infeccioso que infecta células no infectadas en el cultivo. Las células infectadas pueden todavía usarse en la práctica de los métodos desvelados.

Después del contacto e infección con VDEP, se deja que el virus reproduzca intracelularmente sus proteínas y antígenos, y así se replique, durante un periodo de tiempo adecuado. El periodo de tiempo adecuado puede variar entre diferentes cepas aisladas, cepas y/o subtipos de VDEP. En algunas realizaciones, los tiempos post-infección oscilan de 1 hora a al menos 3 días, tal como de 6 horas a 3 días, de 12 horas a 60 horas, o de 24 horas a 48 horas.

Otros tiempos post-infección incluyen aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 54 horas, aproximadamente 60 horas y aproximadamente 66 horas. Además de los métodos desvelados, la divulgación incluye un método de evaluación de la producción de proteínas de VDEP con el tiempo, después de la infección, para determinar posibles momentos de tiempo para el aislamiento de células infectadas y la recogida de proteínas y/o antígenos virales de las células. Esta evaluación de la "evolución temporal" después de la infección puede usarse para seleccionar un momento de tiempo post-infección para la preparación de proteínas y/o antígenos virales. La evaluación se realiza opcionalmente para cada cepa aislada, cepa y/o subtipo de VDEP. También pueden compararse los rendimientos de proteína y/o antígeno usando diferentes cepas aisladas de VDEP y diferentes días después de la inoculación del virus, y condiciones óptimas para los rendimientos antigénicos más altos pueden ser determinados por prueba comparativa.

En algunas realizaciones, las proteínas y/o antígenos recogidos de células infectadas con VDEP pueden estar en mayores cantidades que aquellos disponibles de partículas de VDEP en el medio de cultivo. En algunos momentos de tiempo después de la infección, la mayoría, o la totalidad, de las proteínas de VDEP replicadas pueden seguir asociadas a las células infectadas o son de otro modo parte de un componente viral asociado a célula (CAVC). Así, la mayoría o la totalidad de las proteínas y/o antígenos de VDEP están ya sea dentro de las células infectadas o asociados a la membrana celular de las células infectadas. En tales condiciones, relativamente pocas, si alguna, de las partículas de VDEP están presentes en el entorno extracelular. La preparación de CAVC a partir de un momento de tiempo anterior, tal como antes de la producción de partículas de VDEP y/o la liberación de las mismas en el entorno extracelular, también tiene el beneficio de elevada seguridad por que no están presentes partículas virales infecciosas como contaminante.

Sin embargo, en otras realizaciones, se encontró sorprendentemente que recoger las proteínas y antígenos en un momento de tiempo después de que las células infectadas hubieran liberado partículas virales de VDEP replicadas produjo resultados mejorados. Esto fue a diferencia de los resultados obtenidos con VSRRP.

En algunas realizaciones, el método de preparación de proteínas y antígenos de VDEP de células infectadas con VDEP comprende proporcionar una población de células infectadas con VDEP; aislar las células infectadas de VDEP libre de células para formar células que contienen proteínas y antígenos de VDEP asociados a célula; y extraer o eluir proteínas y antígenos de VDEP de las células aisladas. En casos en los que no está presente virus sin células, entonces aislar las células infectadas de VDEP libre de células puede comprender aislar las células infectadas de otros materiales que pueden interferir con el método, tal como el medio de cultivo usado con las células. La etapa de aislamiento puede realizarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como por uso de centrifugación para generar un sedimento de células y sobrenadante. El sobrenadante puede entonces eliminarse, desecharse, o separarse de otro modo, tal como por uso de una filtración en membrana, para dejar las células. La etapa de extracción se realiza opcionalmente resuspendiendo las células en un tampón. La extracción o elución se realiza con una solución que contiene detergente, así el tampón usado para resuspender las células pueden contener detergente.

En algunas realizaciones, el método comprende usar una población de células que ha sido infectada con VDEP durante un tiempo suficiente para producir de pocas cantidades a indetectables de unidades infecciosas por ml de sobrenadante, tal como los medios de cultivo usados con las células. Ejemplos no limitantes incluyen usar menos de $10^{1.5}$ dosis infecciosa de cultivo de tejido (TCID₅₀/ml).

La solución que contiene detergente comprende un detergente no iónico, que es p-isooctil-fenil éter de poli(etilenglicol), octilfenoxipolietoxietanol (Nonidet P-40), Triton X-100 o una combinación de los mismos. El detergente se usa a una concentración eficaz para extraer o eluir proteínas y/o antígenos de VDEP, tal como a una concentración de superior a cero al 5 % en solución, tal como de superior a cero al 2 %, 0,25 % al 1 %, o 0,5 % en solución. En ciertas realizaciones, el detergente es una solución de 0,5 % de Triton X-100. La recogida, extracción y/o elución pueden ser de superior a cero a al menos aproximadamente 24 horas, tal como de 0,1 horas a 24 horas, 0,1 horas a 15 horas, 0,2 horas a 10 horas o 0,2 horas a 5 horas, o en ciertas realizaciones de 2 horas a 15 horas. La recogida, extracción y/o elución se realizan a una temperatura adecuada. En algunas realizaciones, la temperatura es de cero a inferior a 30 °C, tal como de 0 °C a 25 °C, de 1 °C a 20 °C, de 2 °C a 10 °C o de 2 °C a 6 °C, y en ciertas realizaciones es 4 °C. Opcionalmente, las proteínas y/o antígenos virales producidos por el método incluyen proteínas de la envoltura de VDEP.

Las proteínas y antígenos de VDEP pueden prepararse a partir de células infectadas con VDEP. En ciertas realizaciones, el método comprende preparar las proteínas y antígenos de una población de células preparadas por métodos *in vitro* e *in vivo*. Para el método *in vitro*, se cultivan células VERO, y las células se recogen tras una infección de VDEP.

III. Composiciones y aplicaciones

En el presente documento se desvelan realizaciones de una composición que comprende las proteínas y/o antígenos de VDEP aislados preparados según realizaciones del método desvelado. La composición es adecuada

para su uso para cualquier fin para el que se usen proteínas y/o antígenos de VDEP. Ejemplos no limitantes de aplicaciones de las proteínas y/o antígenos incluyen la preparación de anticuerpos contra las proteínas/antígenos; usando las proteínas y/o antígenos como marcadores de referencia para proteínas de VDEP; y usar las proteínas y/o antígenos en una composición inmunogénica, tal como en una formulación de vacuna, opcionalmente con un vehículo adecuado, adyuvante, etc., y combinación de los mismos. La composición inmunogénica puede administrarse a un animal para generar una respuesta inmunitaria. Ejemplos no limitantes adicionales de las composiciones incluyen aquellos donde la(s) proteína(s)/antígeno(s) está/n en forma soluble o liofilizada (secada por congelación).

10 IV. Ejemplos

Pueden prepararse proteínas de VDEP a partir de una cepa de VDEP infectando células susceptibles *in vitro* o *in vivo*, y recogiendo las células infectadas en un momento óptimo para preparar componentes virales asociados a célula. Para métodos *in vitro*, el (los) antígeno(s) pueden prepararse por un sistema de cultivo celular o usando tecnologías recombinantes.

En una realización a modo de ejemplo, las células se sedimentaron por centrifugación, y el sobrenadante se eliminó o desechó. Los sedimentos pueden ser opcionalmente lavados. Se extrajeron proteínas y antígenos de VDEP de los sedimentos de células suspendiendo los sedimentos de células en un tampón tris(hidroximetil)aminometano 0,05 M-EDTA 0,025 M que contenía 0,5 % de Triton X-100 a un volumen de 5-10 veces el del concentrado de eritrocitos. La mezcla se agitó durante 2-15 horas a 4 °C y luego se centrifugó a 10.000 g durante 1 hora. El sobrenadante resultante comprendió las proteínas y antígenos de VDEP. Opcionalmente, la solución que contiene antígeno puede entonces someterse a uno o más ciclos de congelación-descongelación, uno o más de cada uno, seguido de un ciclo de extracción adicional, para romper adicionalmente células intactas y aumentar la eficiencia del proceso de extracción. El proceso de congelación-descongelación también puede facilitar asegurar que la solución de antígeno es no infecciosa, y permitir su uso sin un riesgo de diseminar el virus.

La FIG. 1 proporciona una fotografía de una transferencia Western de proteínas de VDEP. Las proteínas se obtuvieron de células infectadas por una realización a modo de ejemplo del método desvelado y se mezclaron con uno de dos anticuerpos monoclonales, 6C8 o 3F12, que se seleccionaron para detectar ciertas proteínas de VDEP. Los carriles identificados como 'S' contuvieron marcadores de peso molecular de proteína pre-teñida. Los otros carriles contuvieron muestras de un medio de cultivo celular infectado con VDEP al final del cultivo (carriles 1), un extracto de células infectadas con VDEP aisladas diluidas 2x (carriles 2), un extracto de células infectadas con VDEP aisladas diluidas 3x (carriles 3), un extracto de células infectadas con VDEP aisladas diluidas 4x (carriles 4) y un extracto de células infectadas con VDEP aisladas diluidas 5x (carriles 5). Sorprendentemente, en este ejemplo, pareció que ambos de los anticuerpos monoclonales usados detectaron proteínas con el mismo peso molecular.

La FIG. 2 proporciona una fotografía de una transferencia Western de proteínas de VDEP de cultivos de células infectadas con el tiempo con una mezcla de los dos anticuerpos monoclonales usados en la FIG. 1. El carril S contuvo marcadores de peso molecular de proteína pre-teñida. Los otros carriles contuvieron muestras extraídas de células infectadas con VDEP aisladas 24 horas después de la infección (carril 1), 30 horas después de la infección (carril 2), 35 horas después de la infección (carril 3), 47 horas después de la infección (carril 4) y 52 horas después de la infección (carril 5).

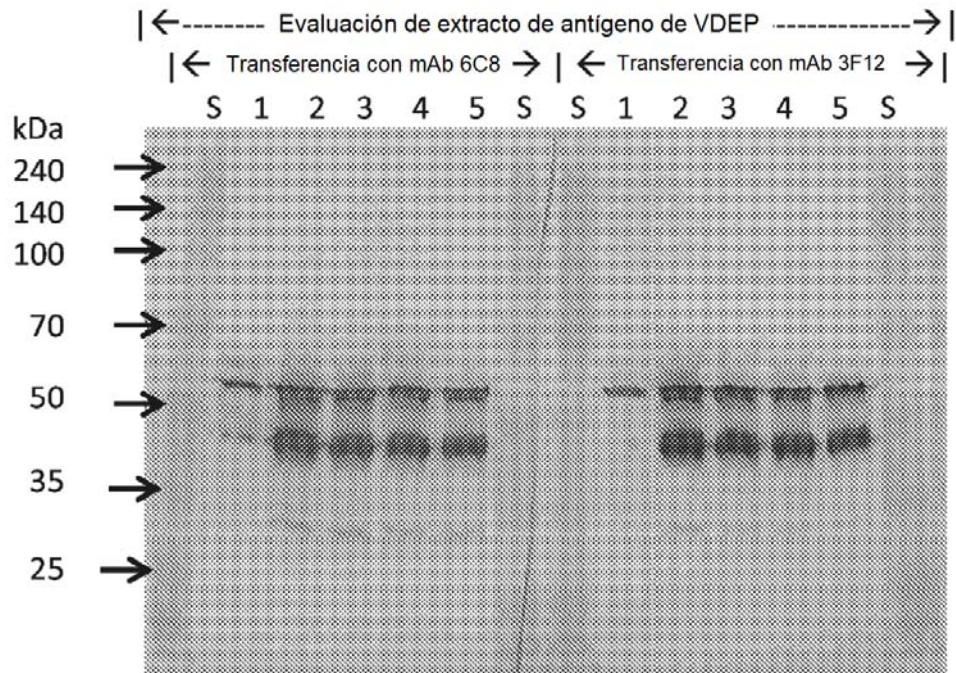
Los resultados de estos dos experimentos demostraron que el método desvelado extrajo satisfactoriamente proteínas de células infectadas con VDEP. Además, las transferencias Western ilustran que el método de extracción produce una mezcla de proteínas concentrada en comparación con un medio de cultivo, tal como el medio de cultivo de una vacuna con virus muertos. La concentración de proteínas en los extractos o eluyentes puede ser superior a dos veces la concentración de proteínas en el medio de cultivo, tal como 4 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces o superior a 10 veces la concentración de proteínas en el medio de cultivo.

Se preparó una vacuna a partir de una solución de antígeno a modo de ejemplo preparada por el método desvelado. La vacuna se administró a cerdas 3-5 días antes de parir en una piara endémica, 150 días después del brote clínico. La FIG. 3 muestra los datos de una prueba donde las cerdas vacunadas y no vacunadas se mantuvieron en la misma sala. La FIG. 4 muestra datos de una prueba donde cerdas vacunadas y no vacunadas se mantuvieron en salas separadas. Las tasas de mortalidad de lechones en las FIGS. 3 y 4 son del 15 % y 9,6 %, respectivamente, para lechones de cerdas vacunadas, en comparación con 28 % y 17,6 %, respectivamente, para lechones de cerdas no vacunadas. La FIG. 5 proporciona datos iniciales de piaras no vacunadas de múltiples granjas, que ilustran la mortalidad previa al destete basándose en los días posteriores a la exposición al virus VDEP de la piara completa inicial. Los datos en las FIGS. 3-5 ilustran claramente el éxito de la vacuna a modo de ejemplo preparada por el método desvelado.

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:

- 5 aislar células infectadas con el virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP) de partículas virales de VDEP libres de células en una población de células en un medio de cultivo; y
extraer proteínas y antígenos de VDEP de las células infectadas con VDEP aisladas con una solución que
contiene detergente para formar una solución que comprende proteínas y antígenos de VDEP aislados y el
10 detergente, en el que la solución que contiene detergente comprende un detergente no iónico, que es p-isooctil-
fenil éter de poli(etilenglicol), octilfenoxipoliétoxietanol, o una combinación de los mismos;
combinar la solución de proteínas y antígenos de VDEP aislados y detergente con un adyuvante para formar una
composición inmunogénica que comprende proteínas y antígenos de VDEP, detergente y el adyuvante.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además permitir que la población de células se incube durante
un periodo de tiempo suficiente para producir una o más partículas virales de VDEP replicadas que se liberan en el
medio de cultivo.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en el que la solución que contiene detergente comprende un detergente a una
concentración de superior a cero y hasta el 5 % en solución.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en el que extraer proteínas y antígenos de VDEP comprende extraer proteínas y
antígenos de VDEP durante 0,1 a 15 horas.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, en el que extraer proteínas y antígenos de VDEP se realiza a una temperatura
de 0 °C a 25 °C.
- 35 6. El método de la reivindicación 4, en el que extraer proteínas y antígenos de VDEP comprende extraer proteínas y
antígenos de VDEP durante de 0,1 horas a 15 horas a 4 °C.
- 40 7. El método de la reivindicación 1, en el que las proteínas y antígenos incluyen proteínas de la envoltura de VDEP.
- 45 8. El método de la reivindicación 1, en el que la solución de proteínas y antígenos de VDEP aislados tiene una
concentración de proteínas y antígenos de VDEP superior a una concentración de proteínas y antígenos de VDEP
en un medio de células que contiene la población de células infectadas.
9. Una composición que comprende una composición inmunogénica que comprende las proteínas y antígenos de
VDEP, el detergente y adyuvante obtenible por el método de la reivindicación 1.
10. La composición de la reivindicación 9 formulada como una vacuna.
11. Una composición según la reivindicación 9 para su uso en un método de vacunación de un sujeto porcino.
12. Una composición según la reivindicación 9 para su uso en un método de generación de una respuesta
inmunitaria en un sujeto porcino.



Carril	Muestras
S	Patrón de proteína preteñido
1.	Caldo de cultivo de VDEP
2.	Extracto de VDEP – dilución 2x
3.	Extracto de VDEP – dilución 3x
4.	Extracto de VDEP – dilución 4x
5.	Extracto de VDEP – dilución 5x

FIG. 1

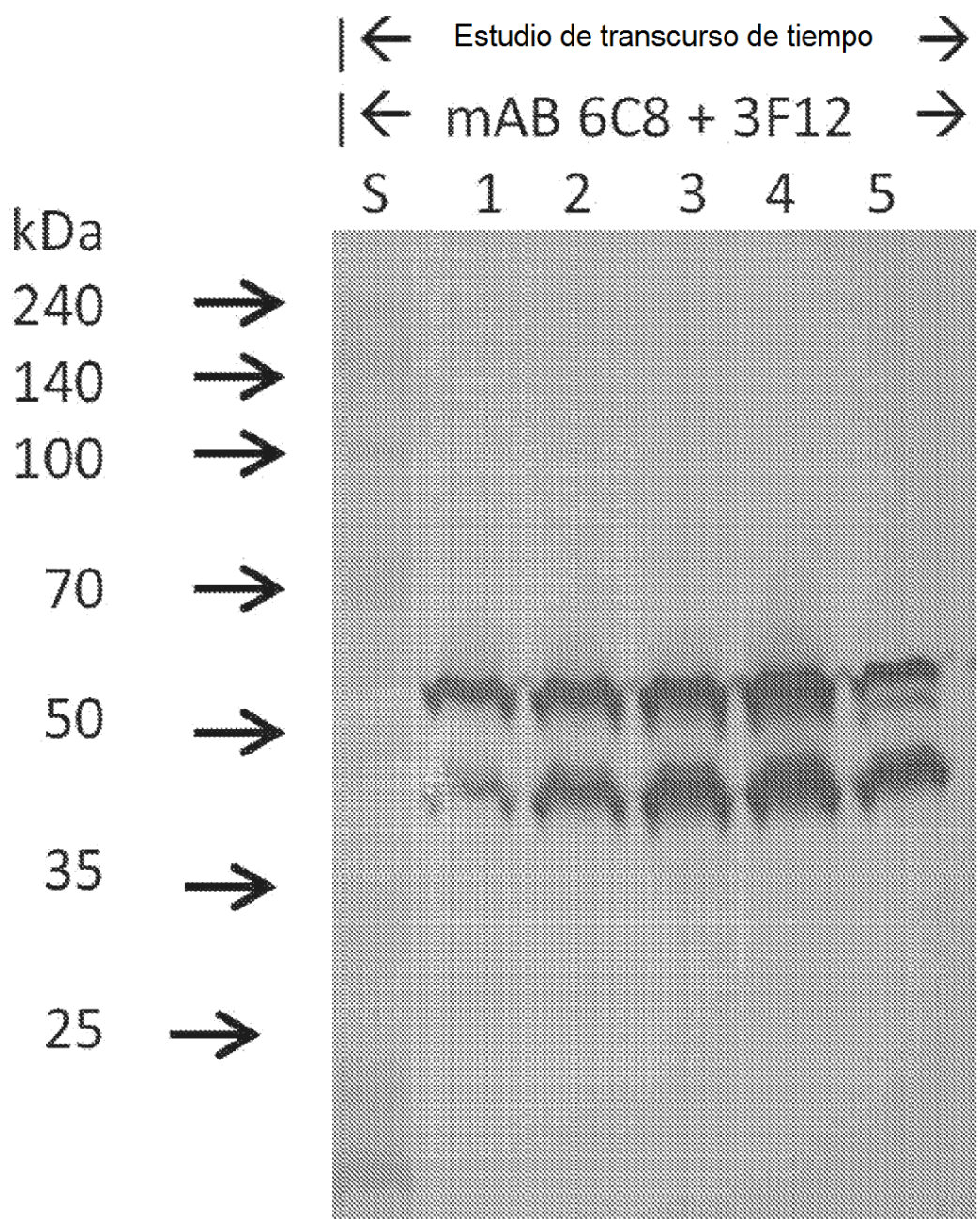


FIG. 2

	Nacidos vivos (promedio de crías)	Cerdos que quedan en destete (promedio de crías)	Mortalidad de lechones
Cerdas vacunadas – 10 cabezas – dosis de 2 cm ³	133 (13,3)	113 (11,3)	15%
Cerdas no vacunadas – 33 cabezas	405 (12,2)	291 (8,8)	28%

FIG. 3

	N.º de crías	Nacidos vivos (promedio de crías)	Cerdos destetados (promedio de crías)	Mortalidad pre-destete
Salas completas vacunadas	128	1466 (11,4)	1324 (10,3)	9,6%
No se usa vacuna en las salas	88	1059 (12,0)	872 (9,9)	17,6%

FIG. 4

	Granja 1	Granja 2	Granja 3	Granja 4	Granja 5	Granja 6	Promedio de todas las granjas
Día 1-7	100	99	97	100	97	100	98%
Día 8-15	98	94	98	98	100	100	98%
Día 16-23	51	47	78	89	90	100	76%
Día 24-31	23	24	34	54	45	100	46%
Día 32-39	19	14	27	43	34	100	39%
Día 40-47	19	25	17	30	16	22	21%
Día 48-55	24	12	18	27	20	37	23%
Día 56-63	19	11	16	25	19	32	20%
Promedio de granja individual antes de VDEP	15%	14%	15%	20%	17%	12%	

FIG. 5