

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 468**

51 Int. Cl.:

C12N 15/863 (2006.01)

A61K 39/275 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015 PCT/EP2015/080468**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16097281**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015 E 15813838 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3234159**

54 Título: **Virus de viruela porcina recombinante y vacunas**

30 Prioridad:

19.12.2014 EP 14307110

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

16.03.2020

73 Titular/es:

**CEVA SANTÉ ANIMALE (100.0%)
10 Avenue de La Ballastière
33500 Libourne, FR**

72 Inventor/es:

SATO, TAKANORI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 748 468 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

Virus de viruela porcina recombinante y vacunas

La presente invención se refiere a nuevos virus recombinantes de viruela porcina y su uso en composiciones de vacunas. Los virus de la viruela porcina recombinantes de la invención se producen insertando uno o más genes foráneos en el gen de la proteína de unión a IL-18 (IL18bp) del virus de la viruela porcina. La invención es particularmente adecuada para producir vacunas porcinas, particularmente para la vacunación de cerdos contra la infección por PCV2.

Antecedentes

Se han propuesto diferentes tipos de virus en la técnica como vectores para la administración de genes o la expresión de péptidos in vivo. En particular, se han preparado vacunas veterinarias que expresan al menos un antígeno relevante usando virus recombinantes tales como poxvirus (Ogawa R. et al., Vaccine, 8: 486-490 (1990)), adenovirus (HSU, K.H. et al., Vaccine, 12: 607-612 (1994)), baculovirus, así como herpesvirus (Shin, M. -F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 5867-5870 (1984)). Ejemplos de vectores de virus específicos que permiten la expresión de un gen para un antígeno foráneo incluyen el virus de la enfermedad de Aujeszky (virus de la seudorrabia; PRV) (Van Zijl M. et al., J. Virol., 65: 2761-2765 (1991)), herpesvirus de pavo (HVT) (Morgan R.W. et al., Avian Dis. 36: 858-870 (1992)) y el virus de la enfermedad de Marek (MDV). Los vectores recombinantes basados en el género herpesvirus están bajo estudio intensivo.

Sin embargo, existe la necesidad en la técnica de nuevos productos de vectores virales que puedan usarse para expresar péptidos o proteínas recombinantes in vivo. A este respecto, los poxvirus han sido diseñados para codificar diferentes polipéptidos. Los poxvirus, una vez liberados en la sangre por las células infectadas, pueden infectar otras células y, por lo tanto, potencialmente conducir a niveles de expresión elevados. Los poxvirus recombinantes se han producido a partir de diferentes tipos de poxvirus, incluidos el virus de la viruela vacuna, el virus vaccinia y el virus de la viruela porcina (SPV). Hasta ahora, sin embargo, los recombinantes SPV se han producido esencialmente clonando secuencias de genes foráneas en una región genética que se considera no esencial para la supervivencia de SPV, la región TK (Richard W. Moyer, Eladio Vinuela, E.P.J. Gibbs, US 5,651,972 (1997)).

Los inventores de la presente invención han encontrado y validado una nueva región de inserción de genes de SPV en la que se pueden insertar una variedad de secuencias de genes foráneas. Los virus SPV recombinantes resultantes permiten una expresión eficiente y estable de la secuencia del gen clonado, y tienen una gran capacidad de clonación. Además, estos virus tienen una inmunogenicidad mejorada in vivo y pueden usarse para producir terapias o vacunas para el tratamiento de cualquier mamífero, particularmente en cerdos.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a nuevos virus recombinantes de viruela porcina y su uso para la administración y expresión de genes in vivo, particularmente en composiciones de vacunas. Los virus de la viruela porcina recombinantes de la invención contienen una o más secuencias de genes foráneas en el gen de la proteína de unión a IL-18 (IL18bp) del virus de la viruela porcina. La invención es particularmente adecuada para producir vacunas porcinas, particularmente para la vacunación de cerdos contra la infección por PCV2.

Por lo tanto, un primer objeto de la presente invención se refiere a un virus de la viruela porcina recombinante (rSPV) que comprende al menos una primera secuencia de gen foránea en su genoma, en el que dicha primera secuencia de gen foránea se inserta en el gen IL18bp del genoma de rSPV. En una realización particular, la secuencia de gen foránea se inserta en reemplazo de toda o parte de la secuencia del gen IL18bp viral. En una realización particular adicional, el rSPV de la invención comprende además al menos una segunda secuencia de gen foránea insertada en una región distinta del genoma de rSPV, por ejemplo, en el gen viral de timidina quinasa (TK) o el gen de proteína repetida de Ankyrin.

Otro objeto de la invención reside en una molécula de ácido nucleico que comprende el genoma de un rSPV como se definió anteriormente.

Un objeto adicional de la invención es una célula huésped que comprende un rSPV o una molécula de ácido nucleico de la invención.

La presente invención proporciona además un método para producir un rSPV, que comprende infectar o introducir en una célula competente una molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente y recolectar el rSPV.

La invención también se refiere a un método para propagar un rSPV, que comprende infectar una célula competente con un rSPV como se definió anteriormente y recolectar el rSPV producido por dichas células.

La invención también se refiere a una composición, preferiblemente una composición veterinaria, que comprende un rSPV como se definió anteriormente, o una célula como se definió anteriormente, o una molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente, y un excipiente.

Un objeto adicional de la invención es una composición de vacuna que comprende un rSPV como se definió anteriormente, o una célula como se definió anteriormente, o una molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente, un excipiente adecuado y, opcionalmente, un adyuvante.

5 La invención también se refiere a un rSPV o célula o molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente para su uso para administrar un péptido o proteína terapéutico o de vacuna a un porcino.

La invención también se refiere a un rSPV o célula o molécula de ácido nucleico como se definió anteriormente para su uso para inmunizar o vacunar un porcino contra un patógeno.

La invención también se refiere a un kit de vacunación para inmunizar un porcino que comprende los siguientes componentes:

- 10 a. una cantidad efectiva de un rSPV o vacuna como se definió anteriormente, y
b. un medio para administrar dicho rSPV o vacuna a dicho porcino.

Un objeto adicional de la invención se refiere a un plásmido o vector lanzadera que comprende un transgén flanqueado por dos secuencias de ácido nucleico homólogas a la secuencia del gen IL18bp, permitiendo dichas secuencias flanqueantes la recombinación homóloga entre el plásmido lanzadera y un genoma SPV.

- 15 La invención puede usarse para administrar y expresar cualquier secuencia génica foránea a un mamífero, particularmente un porcino. Es particularmente adecuado para expresar antígenos foráneos para inmunizar o vacunar porcino (por ejemplo, cerdos, lechones, cerdas).

Leyenda de las figuras

Figura 1. Construcción del plásmido homólogo pSP92-Ess_ORF2.

- 20 Figura 2. Construcción del plásmido homólogo pSP911-Ess_ORF2.

Figura 3. Ilustración de las estructuras genómicas de los SPV parentales y recombinantes.

Figura 4. Inmunoprecipitación Western de SVR12 y SVR13 purificados.

- 25 Las células ESK-4 se infectaron con SPV parental (p), clon SVR12 1H2C9D4G5 (G5) o clon 2F5D5E5 (E5), o clon SVR13 G2C2D4 (D4), o clon D10E5A5 (A5). Seis días después, los lisados celulares se aplicaron a SDS-PAGE al 15% y análisis de inmunoprecipitación Western usando anti-ORF2 de rata (1:500), IgG secundaria de cabra anti-rata conjugada con biotina (1:1000) y ABC-ALP (Vecterstain). M: marcador de peso molecular.

Figura 5. Verificación por PCR de pasaje in vitro de rSPVs.

- 30 (A) Resultados de la PCR: la PCR se realizó utilizando un conjunto de cebadores de SP7450F y SP8552R. Cada plantilla era ADN de virus del pase in vitro +0 o +15p del clon SVR12 1H2C7F3E5 (E5), el clon 2F5D5E5G5 (G5) y el clon SVR13 G2C2D4 (D4), o el clon D10E5A5 (A5). Cada plásmido de transferencia en la transfección para hacer SVR12 o SVR13, y pCR4-SPV6030/9574, se usó para una plantilla de control positivo (PC) o control negativo (NC), respectivamente. Los marcadores de peso molecular fueron 10 kb (M1) y pHY. (B) Regiones flanqueantes IL-18bp parentales y rSPVs. El recuadro amarillo es el gen IL-18bp.

Figura 6. Crecimiento relativo de rSPV en células Vero.

- 35 Las células Vero en placas de 6 pozos se infectaron con cada uno de los tres tipos de SPV recombinantes, SVR3, SVR7 o SVR12, a una MOI alta (aproximadamente 0.01) o baja (aproximadamente 0.001). A los 0, 4, 7, 11 y 14 días después de la infección (DPI), cada célula infectada y sobrenadante se cosecharon con raspadores celulares, y se congelaron y descongelaron. Para la titulación del virus, estos lisados celulares después de centrifugar se diluyeron en serie, se infectaron en células ESK-4 y se incubaron a 37°C durante 1 semana para formar placas. Las relaciones de crecimiento relativas se calcularon sobre la base de cada título de 0 DPI.
- 40

Descripción detallada de la invención

- La presente invención se refiere a los nuevos virus de la viruela porcina recombinantes y sus usos. Los virus de la viruela porcina recombinantes de la invención contienen una o más secuencias de genes foráneos en el gen de la proteína de unión a IL-18 (IL18bp) del virus de la viruela porcina. Como se muestra en la sección experimental, estos nuevos vectores SPV permiten una expresión génica sostenida y eficiente. Además, los rSPV de la invención son estables y pueden producir respuestas inmunes mejoradas in vivo. Además, sorprendentemente, los vectores SPV de la invención son más seguros que los SPV anteriores ya que no crecen en células de mamífero tales como las células Vero. Este es el primer informe de un virus SPV que contiene un gen IL18-bp eliminado, y la primera demostración de que las secuencias de genes foráneas pueden clonarse en este sitio dando como resultado vectores SPV recombinantes estables, inmunogénicos y altamente productores. El rSPV de la invención puede contener además
- 50

más de una secuencia de gen foránea, insertada en la misma ubicación o en ubicaciones distintas. Se pueden usar solos o en combinación con otros virus o antígenos recombinantes para generar vacunas mejoradas. La invención es particularmente adecuada para producir vacunas porcinas, particularmente para la vacunación de cerdos contra la infección por PCV2.

5 rSPVs

Dentro del contexto de la invención, un virus de la viruela porcina recombinante designa un virus de la viruela porcina que tiene un genoma diseñado artificialmente (por ejemplo, por vía recombinante) como se menciona en las reivindicaciones. El rSPV incluye, particularmente, virus de la viruela porcina que contienen material genético foráneo o secuencia en su genoma. El rSPV típicamente comprende un genoma de SPV que contiene una secuencia genética foránea, empaquetada en una cápside o envoltura de SPV, que también puede contener una proteína o péptido foráneo.

El rSPV de la presente invención puede prepararse a partir de cualquier SPV, tal como cualquier SPV natural o cualquier SPV disponible de colecciones tales como ATCC, CNCM, etc. Preferiblemente, el rSPV de la invención se produce a partir de la cepa kasza SPV (VR-363), aislado 17077-99 (GeneBank Acc: AF410153.1), o cepa VTCC/AVA/121 (GeneBank Acc: KJ725378.1). Dichos SPV están disponibles en colecciones o bibliotecas, o pueden clonarse a partir de sus secuencias genómicas disponibles públicamente. Otros aislados de SPV también pueden aislarse de animales infectados y usarse para preparar rSPV de la invención.

SPV o rSPV pueden cultivarse o mantenerse o propagarse en cualquier célula adecuada. Por ejemplo, los SPV pueden cultivarse, mantenerse o propagarse en células embrionarias de riñón porcino, como las células ESK-4 (CL-184), cultivarse de forma rutinaria a 37°C en 5% de CO₂ en medio de Ham F-12K (Gibco, Cat. No.: 21127-022) suplementado con estreptomycin-penicilina al 1% (Gibco, Cat. No.: 15140-122) y 5% de FBS (Gibco, Cat. No.: 10437-028).

Para construir un virus recombinante de la presente invención, inicialmente, el virus SPV puede propagarse en una célula huésped adecuada y luego se obtiene el ADN genómico. Posteriormente, se identifica la región IL18bp del ADN genómico, opcionalmente eliminada, en todo o en parte, y se inserta una secuencia de gen foránea (o un sitio de clonación que permite la inserción de una secuencia de gen foránea) en la región, opcionalmente en reemplazo de toda o parte de la secuencia del gen IL18bp endógeno. El genoma de SPV recombinante así obtenido puede usarse para producir rSPV mediante transformación de células competentes adecuadas de acuerdo con técnicas convencionales. Alternativamente, se puede producir un vector lanzadera que contenga una secuencia de gen foránea (o un sitio de clonación) flanqueado por secuencias homólogas a las regiones del gen IL18bp. Tras la introducción en una célula competente en presencia de un virus o genoma de SPV, la recombinación homóloga entre el vector lanzadera y el genoma genera el rSPV. Por supuesto, una vez que un rSPV ha sido diseñado como se describió anteriormente, puede ser fácilmente replicado y propagado por cultivo simple en cualquier célula competente.

Los SPV pueden cultivarse, mantenerse o propagarse en células embrionarias de riñón porcino, como las células ESK-4 (CL-184), cultivarse rutinariamente a 37°C en 5% de CO₂ en medio de Ham F-12K (Gibco, Cat. No.: 21127-022) suplementado con estreptomycin-penicilina al 1% (Gibco, Cat. No.: 15140-122) y 5% de FBS (Gibco, Cat. No.: 10437-028). El ADN se puede extraer de las células infectadas por virus de acuerdo con cualquier método convencional. Por ejemplo, las células cultivadas en monocapas pueden rasparse y luego rotarse para recolectar el sobrenadante. Después de desnaturalizar la proteína en un tampón de lisis y eliminarla, el ADN se puede extraer con fenol y/o etanol.

El gen IL18bp de un ADN SPV viral contiene aproximadamente 402 pb, y generalmente se encuentra en los restos nt 7745-8146 del genoma SVP. Como ejemplo específico, en la cepa SPV kasza (VR-363), el gen IL18bp se encuentra en nt7745-8146.

En una realización particular, los rSPV de la invención contienen una secuencia de gen foránea insertada en una ubicación entre nt 7750 y nt 8140 de un genoma de SPV. La inserción de la secuencia de gen foránea provoca una interrupción de la secuencia del gen IL18bp nativo, lo que generalmente impide la expresión de una IL18bp funcional. En una realización preferida, la secuencia de gen foránea se inserta en reemplazo de la secuencia del gen IL18bp. A este respecto, los rSPV preferidos de la invención comprenden una eliminación de al menos 10 a aproximadamente 400nt de la secuencia del gen genómico IL18bp, y una secuencia de gen foránea localizada en lugar de la secuencia eliminada.

Los rSPV preferidos de la invención comprenden una secuencia génica foránea contenida en el gen IL18bp, en donde el gen IL18bp endógeno carece de al menos 50nt, preferiblemente al menos 100nt, incluso más preferiblemente al menos 150nt, al menos 200nt, al menos 250nt, al menos 300nt, más preferiblemente entre 320nt y 380nt.

Los rSPV específicos y preferidos de la invención contienen una eliminación de al menos nt 100-200 del gen IL18bp, incluso más preferiblemente de al menos nt50-300 del gen IL18bp, tal como nt19-369 del gen IL18bp.

La construcción de un rSPV de la invención puede llevarse a cabo utilizando métodos conocidos per se en la técnica, siguiendo la guía e información contenida en la presente solicitud. En particular, el experto en la técnica puede insertar una secuencia de gen foránea en la secuencia de IL18bp, en reemplazo o toda o parte de la secuencia endógena, utilizando métodos conocidos tales como mutagénesis, PCR, recombinación homóloga, etc.

En una realización particular, se prepara un vector lanzadera mediante tecnología de ADN recombinante en el que una secuencia de gen foránea se clona flanqueada por dos regiones de homología de IL18bp. Las regiones de homología típicamente contienen cada una entre 50-1000 nt de secuencia del gen IL18bp, lo que permite una recombinación homóloga específica. El vector lanzadera puede prepararse a partir de cualquier plásmido, cósmido, fago y similares conocidos o convencionales, tales como plásmidos pBS, pBR322, pUC18, pUC19 y pHC79. El plásmido lanzadera se puede introducir luego en una célula infectada con SPV usando técnicas conocidas tales como electroporación, fosfato de calcio, un método basado en lipofectina o similares. Luego se seleccionan los virus SPV recombinantes que han integrado la secuencia de gen foránea. Su secuencia puede ser verificada. El rSPV puede mantenerse en cualquier celda competente adecuada. El virus puede mantenerse en cultivo, o purificarse y congelarse o liofilizarse.

Secuencia de genes foránea

La secuencia de genes foránea puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos o molécula que no esté presente de forma natural en un genoma de SPV, o que no esté presente de forma natural en dicha ubicación en un genoma de SPV. Una secuencia de gen foránea típicamente comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARNm, un péptido o un polipéptido (o proteína). La secuencia de gen foránea puede, por ejemplo, codificar diversos tipos de moléculas activas, como un antígeno, adyuvante, citoquina, linfoquina, factor de crecimiento, enzima, marcador, etc.

En una realización preferida, la secuencia de gen foránea codifica un antígeno (péptido, polipéptido o antígeno de proteína) de un patógeno de una enfermedad infecciosa porcina, y lo más preferiblemente un antígeno de un virus, bacteria, hongo o protozoo. Dentro del contexto de la invención, un péptido típicamente designa una molécula que comprende de 4 a 30 aminoácidos. Un polipéptido es cualquier polímero de aminoácidos que comprende más de 30 aminoácidos. El término polipéptido incluye proteínas de longitud completa.

La secuencia de genes foránea codifica preferiblemente un péptido o polipéptido (por ejemplo, glucoproteína, proteína de la cápside o fragmento de la misma) de un virus o patógeno seleccionado de circovirus porcino (PCV1, PCV2, PCV2A, PCV2B), *Actinobacillus pleuropneumoniae*; adenovirus; alfavirus tales como los virus de la encefalomiélitis equina del este; *Balantidium coli*; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., preferiblemente *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *Brucella suis*, preferiblemente biovars 1, 2 y 3; virus de la peste porcina clásica, virus de la peste porcina africana; *Chlamydia* y *Chlamydophila* sp. y preferiblemente *C. pecorum* y *C. abortus*; *Clostridium* spp., preferiblemente *Cl. difficile*, *Cl. perfringens* tipos A, B y C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; Coronavirus digestivo y respiratorio; *Cryptosporidium parvum*; *Eimeria* spp; *Eperythrozoonis suis* actualmente llamado *Mycoplasma haemosuis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, preferiblemente subtipos 1, 7 y 14; virus de encefalomiélitis hemaglutinante; *Isospora suis*; virus de la encefalitis japonesa; Intracelulares de *Lawsonia*; *Leptospira* spp., preferiblemente *Leptospira australis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira pomona* y *Leptospira tarassovi*; *Mannheimia haemolytica*; *Mycobacterium* spp. preferiblemente, *M. avium*, *M. intracelular* y *M. bovis*; *Mycoplasma hyopneumoniae*; *Parvovirus*; *Pasteurella multocida*; citomegalovirus porcino; Parvovirus porcino, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino: virus de la seudorrabia; Rotavirus; virus Sagiyama; *Salmonella* spp. preferiblemente, *S. typhimurium* y *S. choleraesuis*; *Staphylococcus* spp., preferiblemente, *S. hyicus*; *Streptococcus* spp., preferiblemente *Strep. suis*; citomegalovirus porcino; virus del herpes porcino; virus de la gripe porcina; virus de la viruela porcina; *Toxoplasma gondii*; virus de la estomatitis vesicular o virus del exantema de los cerdos.

En una realización particularmente preferida, la secuencia de gen foránea codifica un antígeno PCV2, particularmente una proteína o péptido PCV2, incluso más particularmente una proteína o péptido de cápside PCV2 (por ejemplo, ORF2).

La secuencia de gen foránea puede contener un promotor transcripcional para permitir o aumentar la expresión del ARNm o polipéptido codificado. El promotor utilizado puede ser un promotor sintético o natural, que incluye un promotor SPV, un promotor de poxvirus o un promotor derivado de diferentes virus o células, tales como promotores derivados de organismos eucariotas o procariotas. Ejemplos específicos de promotores incluyen el promotor del virus vaccinia 7.5-kD (P7.5k) (Davison A.J. et al., *J. Mol. Biol.*, 210(4): 749-69 (1989)), promotor 11-kD (P11k) (Bertholet et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 82: 2096-2100 (1985)) o promotor de 28 kD (P28k) (Weir J.P. & Moss B., *J. Virol.* 61: 75-80 (1987)), o un promotor sintético artificial de poxvirus (Ps), el promotor de timidina quinasa del herpesvirus (Ross L.J., *Gen. Virol.* 74: 371-377 (1993)), promotor de proteína gB (supra) de HVT o MDV, el promotor IE de citomegalovirus humano (HCMV) (Alting-Mess M.A., *Nucleic Acids Res.*, 17: 9494 (1989)), promotor SV40 (Gunning P., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 4931-4835 (1987)), promotor de la [beta]actina (supra, y Kost A.T., *Nucleic Acids Res.*, 11: 8287-8301 (1983)), promotor de la [beta]-globina (Spitzner J.R., *Nucleic Acids Res.*, 18: 1-11 (1990)), el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (Fiek A. et al., *Nucleic Acids Res.*, 20: 1785 (1992)), y similares. Además, también se pueden usar promotores de las proteínas estructurales o los genes esenciales de SPV.

El rSPV de la invención puede contener varias secuencias de genes foráneas, ubicadas en una misma región de clonación (es decir, IL18bp) y/o en sitios de clonación distintos (uno de ellos es IL18bp). En una realización particular, el rSPV de la invención comprende al menos 2 secuencias de genes foráneas que codifican dos antígenos distintos (de un patógeno igual o distinto). En una realización particular adicional, el rSPV de la invención comprende al menos

una secuencia de gen foránea que codifica un antígeno PCV2 y una secuencia de gen foránea que codifica un antígeno distinto. En otra realización particular, el rSPV de la invención comprende una secuencia de gen foránea que codifica un antígeno y una secuencia de gen foránea que codifica un adyuvante o una citoquina. En tal rSPV multivalente de la invención, las al menos dos secuencias de genes foráneas pueden estar bajo el control del mismo promotor o distinto, y en la misma orientación u opuesta.

Moléculas de ácido nucleico

La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden el genoma de un rSPV de la invención. Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser ADN o ARN, bicatenarias o monocatenarias. El ADN o ARN monocatenario puede ser la cadena codificadora, también conocida como la cadena en sentido, o puede ser la cadena no codificadora, también conocida como la cadena antisentido. La invención también se refiere a variantes o análogos de tales moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, moléculas que tienen al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o más de identidad de secuencia de las mismas.

El grado de homología entre dos secuencias de ácido nucleico puede determinarse por medio de programas informáticos conocidos en la técnica como GAP proporcionado en el paquete del programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1996, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, Estados Unidos 5371 1) (Needleman, S.B. and Wunsch, CD., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453). Uso de GAP con los siguientes ajustes para la comparación de secuencias de ADN: penalización de creación de GAP de 5.0 y penalización de extensión de GAP de 0.3. Las moléculas de ácido nucleico pueden alinearse entre sí utilizando el software de alineación Pileup, disponible como parte del paquete del programa GCG, utilizando, por ejemplo, la configuración predeterminada de la penalización de creación de brechas de 5 y la penalización de ancho de brechas de 0.3.

Las condiciones experimentales adecuadas para determinar si una molécula de ácido nucleico dada se hibrida con un ácido nucleico específico puede implicar un remojo previo de un filtro que contiene una muestra relevante del ácido nucleico que se examinará en 5 x SSC durante 10 minutos, y la prehibridación del filtro en una solución de 5 x SSC, 5 x solución de Denhardt, SDS al 0.5% y 100 [mu]g/ml de ADN de esperma de salmón sometido a sonicación desnaturizado, seguido de hibridación en la misma solución que contiene una concentración de 10 ng/ml de una sonda marcada con P-dCTP durante 12 horas a aproximadamente 45°C, de acuerdo con los métodos de hibridación como se describe en Sambrook et al. (1989; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York). El filtro se lava dos veces durante 30 minutos en 2 x SSC, SDS al 0.5% a al menos 55°C (baja restricción), a al menos 60°C (restricción media), a al menos 65°C (restricción medio/alta), a al menos 70°C (alta restricción), o a al menos 75°C (muy alta restricción). La hibridación puede detectarse mediante la exposición del filtro a una película de rayos X.

Las moléculas de ácido nucleico según la invención pueden proporcionarse en forma de una molécula de ácido nucleico per se tal como moléculas de ácido nucleico desnudas; un vector virus o célula huésped, etc. Los vectores incluyen vectores de expresión que contienen una molécula de ácido nucleico de la invención.

Células huésped

En una realización adicional de la invención, se proporciona una célula huésped transformada con un ácido nucleico o con un rSPV de acuerdo con la invención. Dichas células pueden producir rSPV de la invención. Los expertos en la técnica conocen ejemplos adecuados de células huésped o los expertos en la técnica pueden seleccionarlos fácilmente. Las células huésped son preferiblemente células eucariotas tales como células de mamífero (por ejemplo, cerdo), fúngicas (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *pichia*, *aspergillus*, *fusarium*), de insectos y plantas. Ejemplos específicos de células huésped son las células de riñón porcino, como las células ESK-4 (CL-184).

Composiciones de vacunas y métodos.

El término "vacuna" tal como se usa en el presente documento incluye cualquier composición que pueda usarse para causar, estimular o amplificar una respuesta inmune en un animal (por ejemplo, cerdos) contra un patógeno. Ejemplos particulares de vacunas de la invención son composiciones como se mencionan en las reivindicaciones, capaces de causar o estimular o amplificar la inmunidad contra un virus PCV2. En una vacuna de la invención, la al menos una secuencia de gen foránea codificará un antígeno o un adyuvante.

El término "inmunización" incluye el proceso de administrar un inmunógeno a un sujeto. La inmunización puede, por ejemplo, permitir un alto nivel continuo de anticuerpos y/o respuesta celular en el que los linfocitos T pueden matar o suprimir el patógeno en el animal no humano inmunizado, como el cerdo, que se dirige contra un patógeno o antígeno al cual el animal ha sido expuesto previamente.

Las vacunas de la invención comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de un rSPV o ácido nucleico o célula como se describe anteriormente, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la práctica, la cantidad exacta requerida para una dosis inmunológicamente efectiva puede variar de un sujeto a otro dependiendo de factores tales como la edad y el estado general del sujeto, la naturaleza de la formulación y el

modo de administración. Un experto en la materia puede determinar la "cantidad efectiva" apropiada utilizando solo experimentación de rutina. Por ejemplo, se conocen métodos en la técnica para determinar o valorar dosis adecuadas de una vacuna para encontrar dosis efectivas mínimas basadas en el peso del sujeto animal no humano, la concentración de la vacuna y otros factores típicos. En una realización típica, la vacuna comprende una dosis unitaria de entre 10 y 10.000.000 TCID₅₀, preferiblemente entre 100 y 1.000.000 TCID₅₀, incluso más preferiblemente entre 1.000 y 100.000 TCID₅₀, de un rSPV de la invención. TCID₅₀ designa la dosis infecciosa mediana del cultivo de tejidos, es decir, la cantidad de virus que produce un cambio patológico en el 50% de los cultivos celulares inoculados.

La dosificación de la vacuna, la concentración de componentes en la misma y el momento de la administración de la vacuna, los cuales generan una respuesta inmune adecuada, se pueden determinar por métodos tales como por titulaciones de anticuerpos de sueros, por ejemplo, por ELISA y/o análisis de análisis de seroneutralización y/o por evaluación por desafío de vacunación.

Las vacunas pueden comprender otros ingredientes, conocidos per se por un experto en la materia, tales como vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, diluyentes, adyuvantes, estabilizadores de liofilización, agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH, aditivos gelificantes o mejoradores de la viscosidad, o conservantes, según la vía de administración.

Ejemplos de vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, agua desmineralizada o destilada; solución salina; aceites a base de vegetales tales como aceite de maní, aceite de arachis, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo o aceite de coco; aceites de silicona, que incluyen polisiloxanos, tales como metilpolisiloxano, fenilpolisiloxano y metilfenilpolisiloxano; siliconas volátiles; aceites minerales tales como aceite de parafina líquido liviano o aceite de parafina líquido pesado; escualeno; derivados de celulosa tales como metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, sal sódica de carboximetilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa; alcoholes inferiores, por ejemplo etanol o isopropanol; aralcanoles inferiores; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles inferiores, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina; ésteres de ácidos grasos tales como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo u oleato de etilo; polivinilpirrolidona; agar; carragenano; goma de tragacanto o goma arábiga y vaselina. Típicamente, el portador o los portadores formarán del 10% al 99.9% en peso de la composición de la vacuna y se pueden tamponar mediante métodos convencionales usando reactivos conocidos en la técnica, tales como hidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, una mezcla de los mismos y similares.

Ejemplos de adyuvantes incluyen, entre otros, emulsiones de aceite en agua, hidróxido de aluminio (alumbre), complejos inmunoestimulantes, polímeros o copolímeros de bloque no iónicos, citoquinas (como IL-1, IL-2, IL-7, IFN-[alfa], IFN-[beta], IFN- γ , etc.), saponinas, monofosforil lípido A (MLA), dipéptidos de muramilo (MDP) y similares. Otros adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, sulfato de aluminio y potasio, enterotoxinas termolábiles o estables al calor aisladas de *Escherichia coli*, toxina del cólera o la subunidad B de la misma, toxina diftérica, toxina tetánica, toxina pertussis, adyuvante incompleto o completo de Freund, etc. Los adyuvantes basados en toxinas, tales como la toxina de la difteria, la toxina del tétanos y la toxina de la tosferina pueden inactivarse antes del uso, por ejemplo, mediante tratamiento con formaldehído.

Ejemplos de estabilizadores de liofilización pueden ser, por ejemplo, carbohidratos como sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa, proteínas como albúmina o caseína y derivados de los mismos.

Las vacunas pueden comprender antígenos de varios patógenos, como PCV2, *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Adenovirus; Alfavirus tales como los virus de la encefalomiелitis equina del este; *Balantidium coli*; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., preferiblemente *B. hyodentheriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *Brucella suis*, preferiblemente biovars 1, 2 y 3; virus de la peste porcina clásica, virus de la peste porcina africana; *Chlamydia* y *Chlamydophila* sp. y preferiblemente *C. pecorum* y *C. abortus*; *Clostridium* spp., preferiblemente *Cl. difficile*, *Cl. perfringens* tipos A, B y C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; coronavirus digestivo y respiratorio; *Cryptosporidium parvum*; *Eimeria* spp; *Eperythrozoonis suis* actualmente llamado *Mycoplasma haemosuis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, preferiblemente subtipos 1, 7 y 14; virus de encefalomiелitis hemaglutinante; *Isospora suis*; virus de la encefalitis japonesa; intracelulares de *Lawsonia*; *Leptospira* spp., preferiblemente *Leptospira australis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagicae*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira pomona* y *Leptospira tarassovi*; *Mannheimia haemolytica*; *Mycobacterium* spp. preferiblemente, *M. avium*, *M. intracelular* y *M. bovis*; *Mycoplasma hyponeumoniae*; *Parvovirus*; *Pasteurella multocida*; citomegalovirus porcino; *Parvovirus* porcino, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino: virus de laseudorrabia; *Rotavirus*; virus *Sagiyama*; *Salmonella* spp. preferiblemente, *S. thyphimurium* y *S. choleraesuis*; *Staphylococcus* spp. preferiblemente, *S. hyicus*; *Streptococcus* spp., preferiblemente *Strep. suis*; citomegalovirus porcino; virus del herpes porcino; virus de la gripe porcina; virus de la viruela porcina; *Toxoplasma gondii*; virus de la estomatitis vesicular y/o virus del exantema de los cerdos.

Las composiciones de vacuna de la invención pueden ser formulaciones líquidas tales como una solución acuosa, agua en aceite o emulsión de aceite en agua, jarabe, un elixir, una tintura, una preparación para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable), como suspensiones o emulsiones estériles. Dichas formulaciones son conocidas en la técnica y se preparan típicamente por

disolución del antígeno y otros aditivos típicos en los sistemas de vehículo o disolvente apropiados. Las formulaciones líquidas también pueden incluir suspensiones y emulsiones que contienen agentes de suspensión o emulsionantes.

5 La ruta de administración puede ser percutánea, vía administración de la mucosa o vía parenteral (intradérmica, intramuscular, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal). La vacuna de la invención se puede administrar convenientemente por vía intranasal, transdérmica (es decir, se aplica sobre o en la superficie de la piel para absorción sistémica), parenteral, ocular, etc. La vía de administración parenteral incluye, pero no se limita a, intramuscular, intravenosa, rutas intraperitoneales y similares.

10 Las vacunas de la invención pueden administrarse como dosis únicas o en dosis repetidas. Las vacunas de la invención pueden administrarse solas, o pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente administradas con una o más composiciones adicionales, tales como, por ejemplo, otras composiciones inmunogénicas o vacunas porcinas. Cuando las composiciones se administran en diferentes momentos, las administraciones pueden estar separadas entre sí o superpuestas en el tiempo.

15 La presente invención también se refiere a métodos para inmunizar o inducir una respuesta inmune en un mamífero no humano (por ejemplo, cerdos) que comprende administrar a dicho mamífero un rSPV o un ácido nucleico, o una célula o una vacuna como se describió anteriormente.

20 Las vacunas de la invención se administran preferiblemente a cerdos, cerdos adultos, pero también a cerdos jóvenes, lechones o cerdas gestantes. La vacunación de cerdas gestantes es ventajosa ya que puede conferir inmunidad pasiva a los recién nacidos mediante la transmisión de anticuerpos maternos. Los cerdos pueden tener menos de 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 semana de edad; 1 a 6 semanas de edad; 2 a 5 semanas de edad; o de 3 a 4 semanas de edad. Deseablemente, la vacuna se administra a un sujeto que aún no ha sido expuesto al patógeno.

25 La presente invención también proporciona un recipiente que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de rSPV, ácido nucleico, célula o vacuna como se describió anteriormente. La invención también proporciona kits de vacunación que comprenden un recipiente opcionalmente estéril que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna, medios para administrar la vacuna a animales, y opcionalmente un manual de instrucciones que incluye información para la administración de la cantidad inmunológicamente efectiva de la composición para tratar y/o prevenir enfermedades infecciosas.

Vacuna PCV2

Los rSPV de la invención son particularmente adecuados para el tratamiento (curativo preventivo) de la infección por PCV2 y enfermedades asociadas.

30 Las vacunas PCV2 desarrolladas actualmente, como Circovac[®] (Merial), Ingelvac[®], CircoFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica) o Suvaxyn[®], son vacunas PCV2 inactivadas o vacunas de subunidades. Las vacunas de la subunidad PCV2 típicamente usan una proteína de cápsida PCV2A recombinante purificada producida por expresión recombinante del gen ORF2 de PCV2A. A este respecto, la proteína codificada por ORF2 de los aislados de PCV2 Imp1011 se ha reportado en EP1741785. Una proteína codificada por ORF2 de PCV2 aislado, PCV2Rm, se ha reportado en WO2010/061000. La proteína codificada por ORF2 del aislado de PCV2 412 se ha reportado en EP1816200. Otra proteína codificada por un ORF2 de otro aislado de PCV2 se ha reportado en EP1036180 o EP2225367. Las proteínas sintéticas de tipo ORF2 mejoradas se han descrito en WO2013/030320 y en WO2014/167060.

40 En una realización particular, la presente invención se refiere a un rSPV como se definió anteriormente en el que la secuencia de gen foránea codifica un antígeno PCV2, más preferiblemente una proteína, polipéptido o péptido PCV2. En una realización más preferida, la presente invención se refiere a un rSPV como se definió anteriormente en el que la secuencia de gen foránea codifica un polipéptido PCV2 ORF2 o un fragmento del mismo. En una realización particular, el ORF2 se selecciona de ORF2 de PCV2 aislados Imp1011, PCV2Rm o 412, o un ORF2 que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con tales proteínas, o un fragmento inmunogénico de las mismas que comprende al menos 10, 15, más preferiblemente en al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos de los mismos.

45 Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a métodos para tratar y/o prevenir una enfermedad asociada a PCV2 en un mamífero no humano, y a métodos para inmunizar o vacunar a un sujeto animal no humano, como cerdos, porcinos, cerdas, lechones, contra la infección por PCV2, que comprende administrar a dicho sujeto animal un rSPV, un ácido nucleico, una célula o una composición de vacuna como se definió anteriormente.

50 Las infecciones por PCV2 o enfermedades asociadas incluyen, entre otras, el síndrome de desgaste multisistémico posdestete (PMWS), el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS), el complejo de enfermedades respiratorias porcinas (PRDC), trastornos reproductivos, enteritis granulomatosa, epidermitis exudativa, linfadenitis necrotizante y temblores congénitos. Preferiblemente, un sujeto animal no humano, como el cerdo, está protegido hasta el punto de que uno de todos los síntomas o efectos fisiológicos adversos de las infecciones por PCV2 se reducen, mejoran o previenen de manera significativa.

55

En una realización, las composiciones de vacuna de la invención se usan para la administración a un cerdo susceptible a o de otro modo en riesgo de infección por PCV2 para mejorar las capacidades de respuesta inmune propias del sujeto.

5 Preferiblemente, el sujeto es un cerdo que necesita vacunación contra el síndrome de desgaste multisistémico postdestete (PMWS) y/o el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS).

En la siguiente sección experimental se divulgarán aspectos y ventajas adicionales de la invención, lo que ilustra la invención reivindicada.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de plásmidos para hacer SPV recombinantes.

10 (1) Construcción de pSP92-Ess_ORF2 (Figura 1)

El ADN genómico de SPV se preparó de la siguiente manera:

Se pueden comprar adquirir la cepa de kasza SPV (VR-363) y célula de riñón porcino embrionario, células ESK-4 (CL-184), de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células ESK-4 se cultivaron rutinariamente a 37°C en CO₂ al 5% en medio de Ham F-12K (Gibco, Cat. No.: 21127-022) suplementado con estreptomycin-penicilina al 1% (Gibco, Cat. No: 15140-122) y 5% de FBS (Gibco, Cat. No.: 10437-028). Para la preparación del ADN genómico de SPV, las células ESK-4 confluentes en un matraz de 225 cm² se infectaron con SPV y se incubaron durante 6 días hasta que las células mostraron un 100% de efecto citopático (CPE). Las células infectadas se cosecharon raspando las células en el medio y centrifugando a 1300 rpm durante 5 minutos. El medio se decantó y el sedimento celular se resuspendió suavemente en 2 ml de solución salina tampón de fosfato (PBS: 1.5 g de Na₂HPO₄, 0.2 g de KH₂PO₄, 0.8 g de NaCl y 0.2 g de KCl por litro de H₂O) y se sometió a dos sucesivos procesos de congelación y descongelación. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Los viriones SPV, presentes en el sobrenadante, se sedimentaron por centrifugación a 20.000 xg durante 20 min a 4°C. El sedimento resultante se suspendió luego con Tris 10 mM, pH 7.5. Luego se extrajeron los ADN genómicos de SPV de los viriones de SPV suspendiéndolos con el tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 9, NaCl 0.1M, EDTA 5 mM, SDS al 0.1%, proteinasa K a 0.2 mg/ml) e incubando a 60°C durante 5 min. La extracción con fenol:cloroformo (1:1) se realizó dos veces, y la muestra precipitó mediante la adición de dos volúmenes de etanol y centrifugación. El sobrenadante se decantó y el sedimento (ADN SPV) se secó al aire y se rehidrató en Tris 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM a 4°C.

Las regiones flanqueantes del gen de la proteína de unión a interleucina 18 (IL-18bp) en el genoma SPV se clonaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dos cebadores (oligonucleótidos sintéticos), SP6030F y SP9574R que se muestran en las SEQ ID NO: 1 y 2 se compraron de Takara Bio. La reacción de PCR se realizó usando LA Taq polimerasa (Takara Bio) y un conjunto de cebadores de SP6030F y SP9574R con ADN de SPV como plantilla, de acuerdo con el protocolo del productor.

SEQ ID NO: 1: CGAATTCATTCCCTTATCTTTA

35 SEQ ID NO: 2: GGAACTACGTTATACGATCAT

El ADN amplificado de aproximadamente 3.5kbp se confirmó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, y se purificó del gel usando el Kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen). El fragmento de ADN purificado se clonó en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del productor. Se recogieron 12 transformantes blancos resistentes a la ampicilina y se cultivaron en caldo LB que contenía 50 microg/ml de ampicilina, y cada plásmido se preparó con QuickLyse Miniprep Kit (Qiagen). Cada plásmido se digirió con ScaI y se seleccionaron dos tipos de plásmidos candidatos (ambas direcciones del ADN insertado). Los ADN insertados de ellos se secuenciaron con el reactivo Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) y el secuenciador CEQ2000XL (Beckman Coulter). Se confirmó que uno de los plásmidos candidatos, pCR-SPV6030/9574 (#1), contenía el fragmento de ADN de 6.030 a 9.574 nt de ADN genómico de SPV (GeneBank Acc: NC_003389) y se usó como un plásmido básico (Figura 1).

45 Luego, se realizó la mutagénesis por PCR para eliminar una parte del gen IL-18bp e introducir los sitios de enzimas de restricción múltiple usando pCR-SPV6030/9574 (#1) como plantilla y usando dos tipos de conjuntos de cebadores, (1) SEQ ID NO: 3 y 4 o (2) SEQ ID NO: 5 y 6.

SEQ ID NO: 3: TTCGCCCTTACGGTACCATTCTTTATCTTTATAAAGC

SEQ ID NO: 4: CTATAATATTAATAAGCTTTATGGAGTTGTTTAAATAC

50 SEQ ID NO: 5: CACACGATAAACTGCAGTCCACATATTACGGTTC

SEQ ID NO: 6: GCCGCGAATTCGCCCTCGAGGAGCTCACTACG

Cada producto de PCR se aplicó a una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y se purificó utilizando el kit de extracción de gel QIAquick. El fragmento de ADN purificado, que se amplificó por PCR usando un conjunto de cebadores de SEQ ID NOs: 3 y 4, se digirió con dos enzimas de restricción, KpnI y HindIII, y se ligó con las mismas enzimas de restricción-corte-pBluescript KS(+) (Stratagene). El plásmido resultante pBS-9L (Kpn..Hin) (Figura 1) se digirió con SacI y PstI, y el mismo fragmento de ADN cortado con enzimas de restricción amplificado por PCR usando un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 5 y 6, fue insertado en él. El plásmido resultante se denominó pSP90 (Figura 1).

Entre los sitios EcoRI y HindIII los sitios de enzimas de restricción múltiple de pSP90 se reemplazaron con el adaptador de oligonucleótidos preparado mediante la fusión de dos oligonucleótidos de ADN sintéticos de SEQ ID NOs: 7 y 8. El plásmido resultante se denominó pSP91 (Figura1).

SEQ ID NO: 7: AATTGCCCGGGTACCGTCGATCGACTTTTTATGGCCCCCGGCCA

SEQ ID NO: 8: AGCTTGCCCGGGGGGCCATAAAAAGTCGATCGACGGTACCCGGGC

El fragmento de ADN del casete del gen del promotor 'P7.5-LacZ' derivado de pNZ76, que se cortó con HindIII y SmaI de pNZ76 y luego hizo romo con ADN polimerasa (descrito en el documento USP 5,387,519) se ligó al sitio SmaI de pSP91. El plásmido resultante se denominó pSP92 (Figura 1), y el casete del gen 'P7.5-LacZ' se insertó en el gen IL-18bp (desde 8.146 nt hasta 7.745 nt en el genoma SPV).

El fragmento de corte BglI de 0.8 kb derivado de pGTPs-Ess_ORF2 (Ejemplo 1 de WO2014/167060) se insertó en el sitio SfiI de pSP92, y el plásmido resultante se denominó pSP92-Ess_ORF2 (Figura 1). Este plásmido incluía el casete del gen 'promotor de poxvirus fuerte (Ps)-Ess_ORF2 (PCV2-ORF2 modificado) también dentro del gen IL-18bp, y se usó como un plásmido de homología para hacer un SPV recombinante, SVR12.

(2) Construcción de pSP911-EssORF2 (Figura 2)

La secuencia entre KpnI y PstI de pSP91 se reemplazó con el adaptador sintético mostrado en SEQ ID NO: 9 para insertar el promotor 11-kD del virus vaccinia en él. El plásmido resultante se designó como pSP911.

SEQ ID NO: 9:

GGTACCGAGCTCGGTAGCCCGGGCCATGGTAGATCCTCTAGAGGATCCAAT

TCATTTATAGCATAGAAAAAACAATAAATGAAATTTCTACTATATTTTCTGCAG

Se obtuvo una secuencia de ácido nucleico sintético que codifica un ORF2 modificado de PCV2 (Ess_ORF2) digiriendo pGTPs-Ess_ORF2 con BamHI y Sall, y se insertó en el corte pSP911 con BamHI y Sall. El plásmido resultante se designó como pSP911-Ess_ORF2, y se usó para hacer SVR13 de virus de la viruela porcina recombinante.

Ejemplo 2: Producción de virus de la viruela porcina recombinante (rSPV)

(1) Producción de SVR12 (Figura 3)

El SPV recombinante se generó en células ESK-4 por recombinación homóloga entre el genoma de SPV de tipo salvaje y los vectores de homología. Las células ESK-4 subconfluentes en una placa de 6 pozos se infectaron con SPV de tipo salvaje (wtSPV), y 17 horas después las células infectadas con wtSPV se transfectaron con 2 µg de pSP92-Ess_ORF2 usando el reactivo Lipofectamin Plus (Invitrogen) y se dejó incubar a 37°C durante 5 días hasta que se produjo el efecto citopático (CPE). Los lisados celulares de células infectadas-transfectadas se seleccionaron para detectar placas recombinantes que expresaban β-galactosidasa mediante la adición de 0.5 mg/ml de Bluo-gal (Invitrogen Cat. No.: 15519-028) en la capa de nutrientes agarosa. Dos virus recombinantes libres de wtSPV independientes se purificaron a través de 3-4 rondas de detección. El rSPV purificado se designó como SVR12. Dos clones purificados de SVR12 se designaron como clones 1H2C9D4G5 y 2F5D5E5.

(2) Producción de SVR13 (Figura 3)

Las células ESK-4 subconfluentes en una placa de 6 pozos se infectaron con SPV de tipo salvaje (wtSPV), y 17 horas después las células infectadas con wtSPV se transfectaron con 2 µg de pSP911-Ess_ORF2 usando el reactivo Lipofectamin Plus (Invitrogen) y se dejó incubar a 37°C hasta que se produjo el efecto citopático (CPE). Los lisados celulares de células infectadas-transfectadas fueron semillas de transfección (TFS) para SVR13. El TFS se diluyó en 1:20 con medio de Ham F-12K sin FBS, y se infectó en células ESK-4 en placas de 96 pozos. Siete días después, las células infectadas se lisaron con tampón de lisis (Tris-Cl 20 mM, NaCl 0.1M, EDTA 5 mM, SDS al 0.1%, proteasa K 200 µg/ml) seguido de tratamiento térmico (60°C 5 min y 98°C 2 min). Estas muestras de ADN lisado de células infectadas se seleccionaron por PCR con un conjunto de cebadores de 5'-GGCCGTTGATATGATGAGGT-3' (SEQ ID NO: 10) y 5'-TCCAGCACTGGCTTAGGAGT-3' (SEQ ID NO: 11).

Las muestras que amplificaron el fragmento de ADN de 0.3kbp fueron positivas, y los sobrenadantes correspondientes se enviaron al siguiente paso de selección. El cribado se repitió hasta que todas las placas aparecieron teñidas con

un ensayo de inmunofluorescencia (IFA) usando suero de cerdo anti-PCV2 (PAB-PCV2, VMR) como el primer anticuerpo e IgG anti-cerdo conjugado con FITC (F1638-2ML, SIGMA) como el segundo anticuerpo.

Se purificaron dos clones recombinantes libres de wtSPV de SVR13 a partir de TFS a través de tres rondas de cribado, y se designaron como clones G2C2D4 y D10E5A5.

5 **Ejemplo 3: Análisis in vitro de SPV recombinantes**

(1) Expresión de genes PCV2-ORF2 por inmunoprecipitación Western

10 Los tamaños moleculares de las proteínas PCV2-ORF2 expresadas por rSPV se analizaron mediante un SDS-PAGE al 15% y un análisis de inmunoprecipitación Western usando sueros de rata anti-PCV2. Las células ESK-4 se infectaron con el clon SVR12 1H2C9D4G5, el clon 2F5D5E5, SVR14, SVR15 o wtSPV. Seis días después, los lisados celulares se fraccionaron en una SDS-PAGE al 15%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), Immobilon-P (Merk Millipore, Cat. No: IPVH08130), y se bloquearon con leche en polvo al 5% en PBS. Las sondas de membrana PDVF se sondearon con suero de rata anti-PCV2 (1:1.000) como el primer anticuerpo, seguido de reacción con IgG secundaria de cabra anti-rata conjugada con biotina (1:1.000) y el kit estándar VECTASTAIN ABC-AP (Vector Labs, AK-5000). Las transferencias de membrana se desarrollaron con sustrato de fosfatasa alcalina, Nitroblue Tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP).

15 Los resultados de la inmunoprecipitación Western mostraron que SVR12 y SVR13 expresaron dos tipos de ORF2, tamaños moleculares de 27kDa y 25kDa (Figura 4). La proteína anterior de 27kDa corresponde a una forma precursora, y la última proteína de 25kDa corresponde a una forma procesada después de la escisión al final del péptido señal B5R. Estos resultados demuestran así la expresión efectiva de antígenos a partir de los SPV de la invención.

(2) Estabilidad a largo plazo y expresión del gen PCV2-ORF2

20 Para verificar la estabilidad de los rSPV de la invención usando el gen IL-18bp como el sitio de inserción, SVR12 y SVR13 se pasaron a las células ESK-4 15 veces. La estabilidad y la expresión de los genes insertados después de x15 pases se verificaron por PCR e inmunoprecipitación Western. Los resultados de la PCR mostraron que los genes insertados de todos los rSPV eran estables después de 15x pases in vitro (Figura 5). No apareció una banda de tamaños irregulares de productos del gen PCV2-ORF2 en los carriles de pasajes in vitro x15 en la membrana PDVF en comparación con el pasaje x0 por análisis de inmunoprecipitación Western.

(3) Crecimiento de recombinantes en células animales no diana

25 La seguridad en el medio ambiente de una vacuna viva genéticamente modificada es una preocupación importante. Como una evaluación de riesgo de seguridad de los SPV, se puede evaluar la capacidad de infectividad o crecimiento en animales o líneas celulares no objetivo. Los SPV generalmente no crecen en las células HeLa, pero pueden crecer en las células Vero. Las células Vero han sido ampliamente probadas y han demostrado estar libres de agentes adventicios, y son las más aceptadas por las autoridades reguladoras para usar en la producción de vacunas, como las vacunas contra la poliomielitis y la diarrea epidémica porcina.

30 Las células Vero (ATCC CCL-81; línea celular comercial derivada del riñón de un mono verde africano) cultivadas en placas de 6 pozos se infectaron en cultivos separados con tres SPV:SVR12 y dos SPV comparativos, a saber, SVR3, que comprende un gen ORF2 en el sitio de clonación ARP y SVR7, que comprende un gen ORF2 en el sitio de clonación TK. La infección se realizó a dos multiplicidades de infección (MOI) (alta: ~0.01 y baja: ~0.001), y las células se cultivaron en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ durante dos semanas después de la infección. A los 0, 4, 7, 11 y 14 días después de la infección (DPI), las células infectadas y los sobrenadantes se recuperaron, se congelaron y se descongelaron. Las cantidades de virus infecciosos a 0, 4, 7, 11 y 14 DPI se valoraron mediante el ensayo TCID₅₀ usando células ESK-4 en placas de 24 pozos.

35 Los resultados se resumen en la Tabla 1 y la Figura 6. Las relaciones de crecimiento relativas a cada título de '0 DPI' se muestran entre paréntesis en la Tabla 1, y el curso temporal de las relaciones de crecimiento relativo se trazan en la Figura 6. Los resultados muestran sorprendentemente que la capacidad de crecimiento de los SPV recombinantes está influenciada por los sitios de inserción, y los SPV recombinantes de la invención, usando el gen IL-18bp como el sitio de inserción, ventajosamente no crecieron en células Vero.

40 Esta es una ventaja adicional de los SPV recombinantes de la invención que usan el gen IL-18bp como el sitio de inserción en el punto de menor riesgo para el medio ambiente.

50 Tabla 1. Crecimiento de rSPV en células Vero

		Titulador de virus: TCID ₅₀ /pozo (Relación a 0 DPI)				
Virus	MOI	0 DPI	4 DPI	7 DPI	11 DPI	14 DPI

SVR 3	Alto	4.8E+04 (1.0)	6.3E+05 (13.1)	8.5E+05 (17.7)	6.3E+05 (13.1)	4.2E+05 (8.7)
	Bajo	4.8E+03 (1.0)	8.5E+04 (17.7)	1.4E+05 (29.2)	8.5E+04 (17.7)	6.3E+04 (13.1)
SVR 7	Alto	4.8E+04 (1.0)	4.2E+05 (8.8)	4.2E+05 (8.8)	1.4E+05 (2.8)	1.4E+05 (2.8)
	Bajo	4.8E+03 (1.0)	4.8E+04 (10.0)	8.5E+04 (17.8)	6.3E+04 (13.1)	1.4E+04 (2.8)
SVR 12	Alto	8.5E+03 (1.0)	4.8E+03 (056)	4.2E+03 (0.49)	8.5E+02 (0.10)	1.4E+02 (0.02)
	Bajo	8.5E+02 (1.0)	4.2E+02 (049)	1.4E+02 (0.16)	8.5E+01 (0.10)	6.3E+01 (0.07)

Ejemplo 4: Inducción de una respuesta inmune in vivo

5 Se inmunizaron grupos (N=7) de lechones negativos para anticuerpos anti-PCV2 de 4 semanas de edad por vía subcutánea en el lóbulo de la oreja izquierda con cada uno de los SPV recombinantes, SVR7 o SVR12 a 5.0E+04 TCID50/cerdo, o con PBS. Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular externa en preinmunes, 1, 2 y 3 semanas después de la inmunización (wpi), y se midió el anticuerpo anti-PCV2 en suero mediante inmunofluorescencia indirecta. Las células RPL-2 infectadas con PCV2 se cultivaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pozos y se fijaron con acetona/metanol (2:1). Después de bloquear con 0.5% de leche desnatada en PBS durante 1 hora, las diluciones dobles de los sueros se colocaron en capas en los pozos de la placa de cultivo de tejidos de 96 pozos y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Los sueros de cerdo PAB-PCV2 (VMRD) diluidos en serie también se colocaron en capas en un carril de cada placa de 96 pozos como sueros de control positivo. Después de la incubación, las placas se lavaron 3 veces y los anticuerpos anti-IgG-FITC de cerdo producidos en conejo (SIGMA Cat. #: F1638, 1:1000) se colocaron en capas en los pozos de la placa de cultivo de tejidos de 96 pozos y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, las placas se lavaron con PBS tres veces. Las señales de los anticuerpos secundarios se detectaron por microscopía fluorescente y se registraron las señales positivas o negativas de cada pozo. La dilución más alta que resultó en una reacción fluorescente positiva fue el título de IF de la muestra, y los errores experimentales entre placas y días fueron calibrados por el título de IF (1:2560) del suero de control positivo.

15 Los resultados obtenidos muestran que los títulos IF promedio del grupo vacunado con SVR12 fueron estadísticamente (p<0.05) mayores que los del grupo vacunado con SVR7. Además, la observación clínica de la formación de viruela o enrojecimiento en los sitios de vacunación se inició de 1 a 3 wpi. Los tamaños máximos de viruela del grupo vacunado con SVR12 fueron más pequeños que los del grupo vacunado con SVR7.

20 Los resultados anteriores indican que el rSPV de la invención en el que se inserta un gen foráneo dentro del gen IL-18bp, tal como SVR12, estaba más atenuado y podría inducir respuestas inmunes más altas que el rSPV que usa el sitio TK como el sitio de inserción tal como SVR7.

25

REIVINDICACIONES

1. Un virus de la viruela porcina recombinante (rSPV) que comprende al menos una primera secuencia de gen foránea en su genoma, en el que dicha primera secuencia de gen foránea se inserta en el gen de la proteína de unión a IL-18 (IL18bp) del genoma de rSPV.
- 5 2. El rSPV de la reivindicación 1, en el que la primera secuencia génica foránea se inserta en reemplazo de toda o una porción de la secuencia génica viral IL18bp.
3. El rSPV de la reivindicación 2, en el que el genoma de rSPV comprende una eliminación de al menos 100 pb de la secuencia del gen IL18bp, y en el que la primera secuencia de gen foránea se encuentra en dicha eliminación.
- 10 4. El rSPV de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos una segunda secuencia de gen foránea insertada en una región distinta del genoma de rSPV, preferiblemente en el gen viral de timidina quinasa (TK) o el gen de proteína de repetición de Ankyrin.
5. El rSPV de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera y/o segunda secuencia de gen foránea codifica un antígeno, preferiblemente un antígeno PCV2.
- 15 6. El rSPV de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera o segunda secuencia de gen foránea codifica un antígeno de la cápside PCV2, preferiblemente una proteína o péptido PCV2 ORF2.
7. El rSPV de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada una de las secuencias genéticas foráneas primera y/o segunda contiene un promotor transcripcional.
- 20 8. El rSPV de la reivindicación 7, en el que el promotor se selecciona del promotor del virus vaccinia 7.5-kD (P7.5k), promotor 11-kD (P11k) o promotor 28-kD (P28k), un promotor sintético artificial de Poxvirus (Ps), el promotor de beta-actina (Bac) de pollo o un derivado del mismo, el promotor de Pec, el promotor de citomegalovirus murino (Mcmv) inmediato-temprano (es decir) 1 promotor, el promotor de citomegalovirus humano (Hcmv), el promotor del virus de smio (SV)40, y el promotor del virus del sarcoma de Raus (RSV), o cualquier fragmento del mismo que retenga una actividad promotora.
- 25 9. Un rSPV de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno PCV2 en su genoma, en el que dicha secuencia de ácido nucleico se inserta en el gen IL18bp del genoma de rSPV.
10. Una molécula de ácido nucleico que comprende el genoma de un rSPV de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 30 11. Una célula huésped que comprende un rSPV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 10.
12. Un método para producir un rSPV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende infectar una célula competente con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 10 y recolectar el rSPV.
13. Una composición que comprende rSPV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un excipiente.
14. Una composición de la reivindicación 13, que es una vacuna.
- 35 15. Un rSPV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en la inmunización de un porcino contra un patógeno.
16. Un kit de vacunación para inmunizar un porcino que comprende los siguientes componentes:
 - a. una cantidad efectiva de una vacuna de la reivindicación 14, y
 - b. un medio para administrar dicha vacuna a dicho porcino.

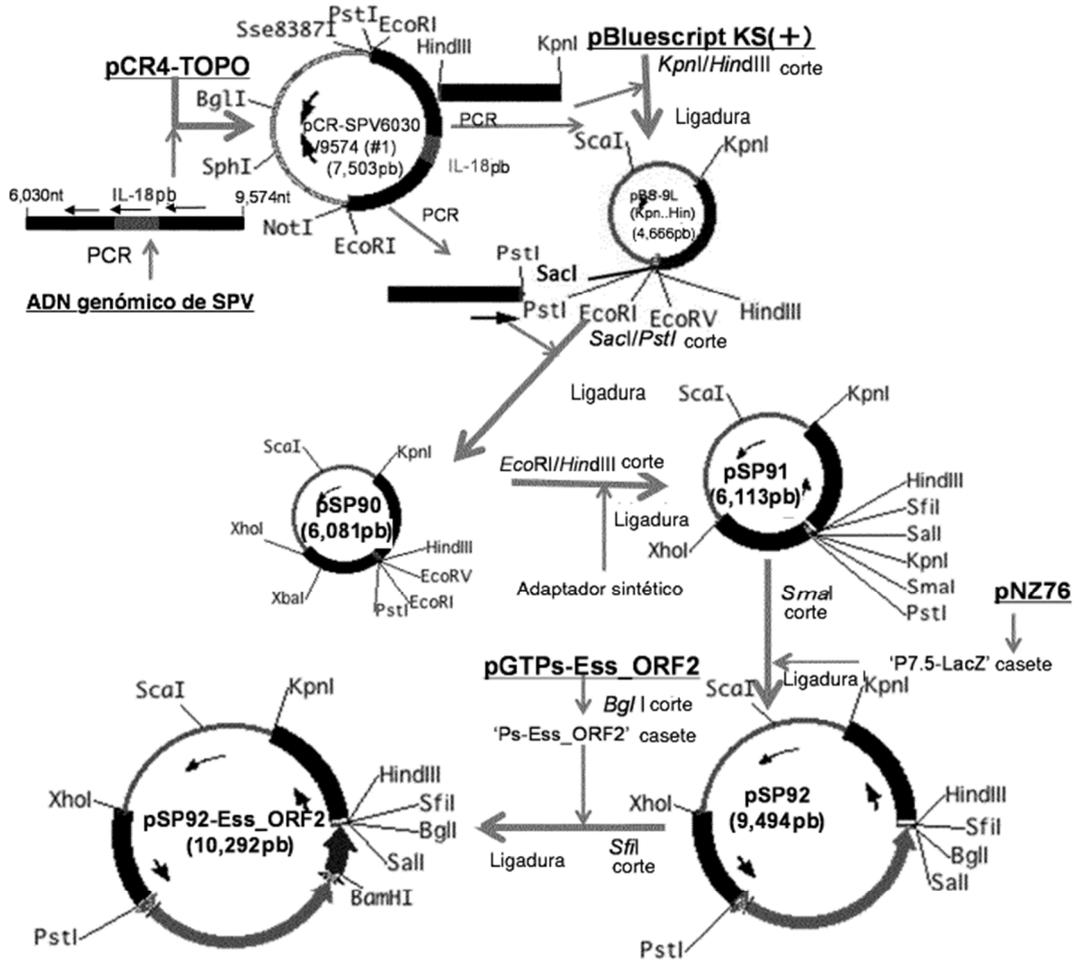


Fig. 1

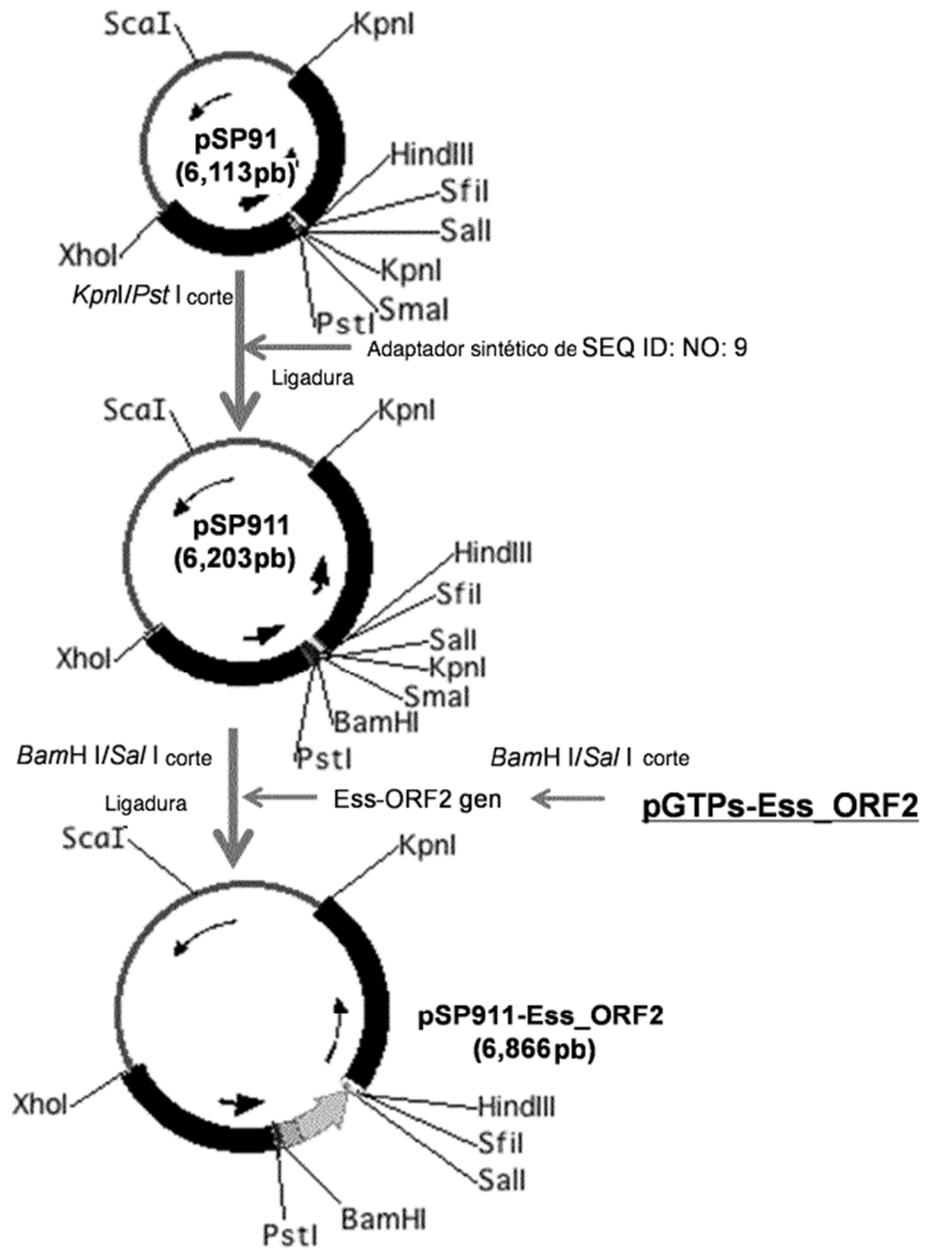


Fig.2

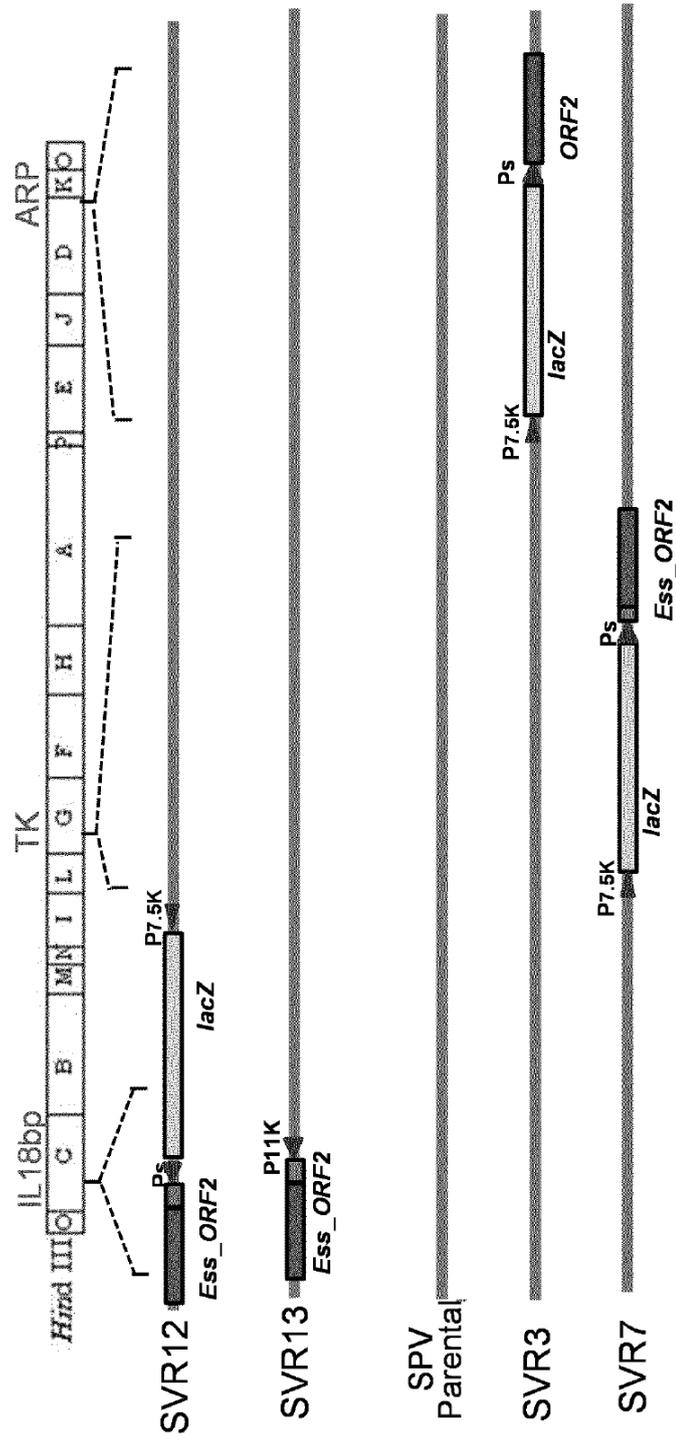


Fig. 3

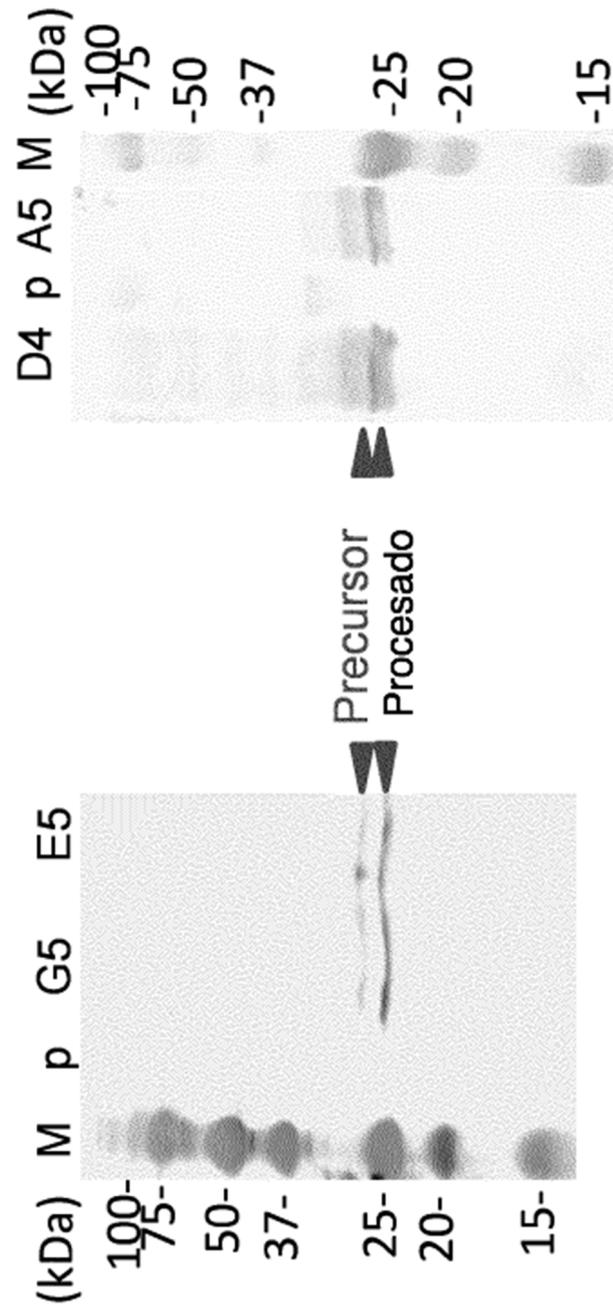


Fig. 4

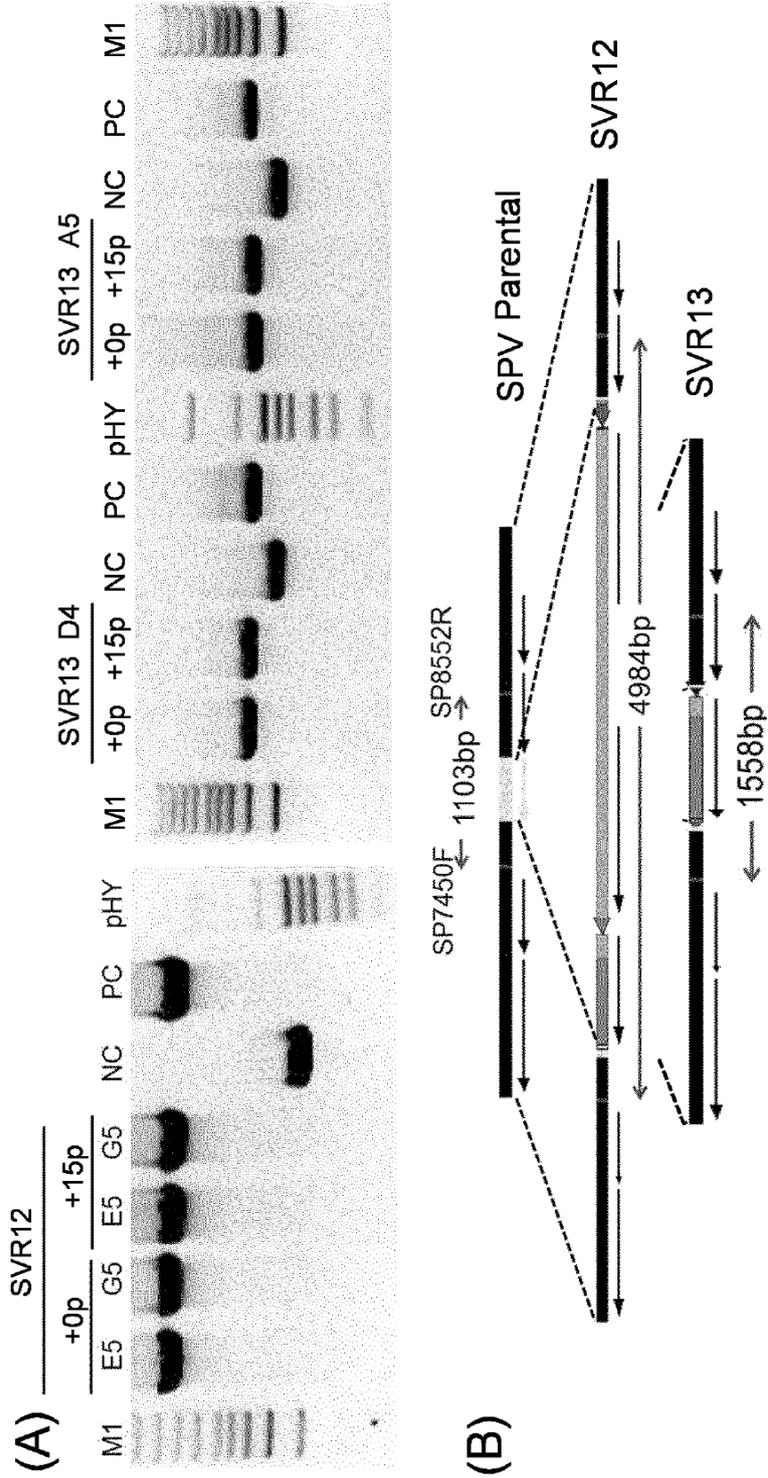


Fig. 5

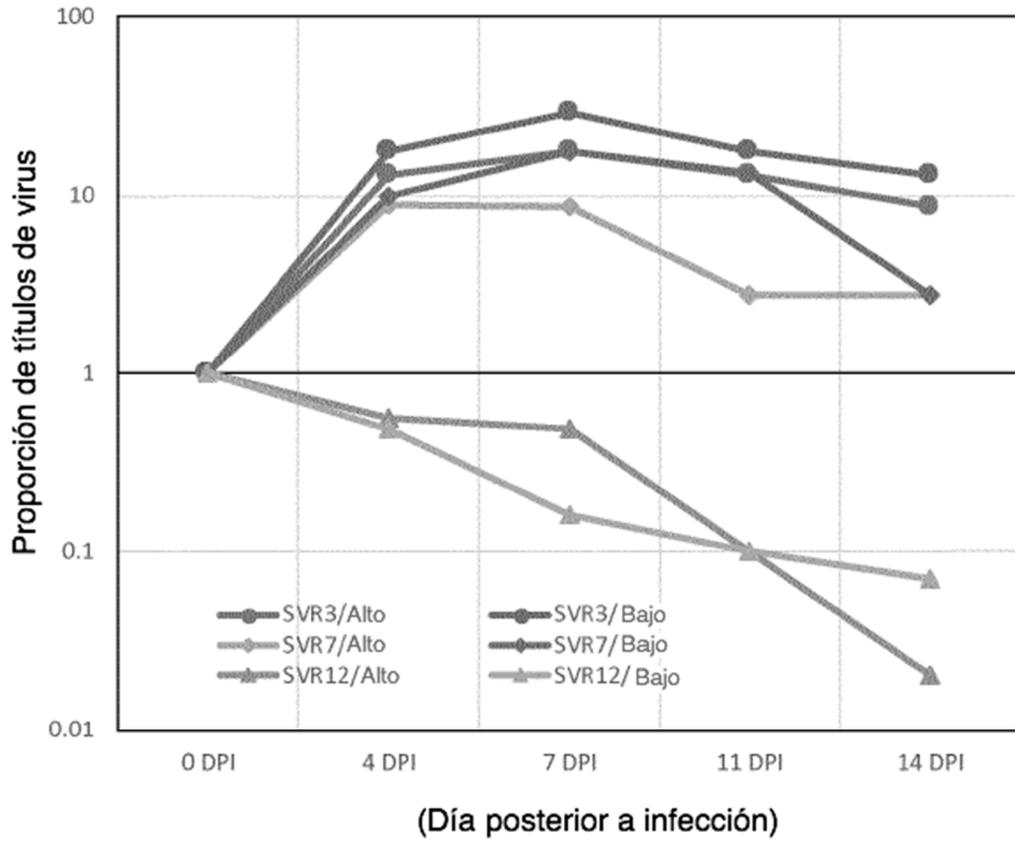


Fig. 6