



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 563**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**C07K 14/18** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07711102 .9**

96 Fecha de presentación : **28.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1994943**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

54

Título: **Antígenos quiméricos para vacunas contra el virus de la peste porcina clásica.**

30

Prioridad: **28.02.2006 CU 522006**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.04.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.04.2011**

73

Titular/es: **Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)  
Avenida 31 Entre 158 y 190, Cubanacán Playa  
Ciudad de La Habana 10600, CU  
Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria**

72

Inventor/es: **Toledo Alonso, Jorge, Roberto;  
Sánchez Ramos, Oliberto;  
Barrera Valle, Maritza, Isidra;  
Figueroa Baile, Nancy, Elena;  
Prieto Carratalá, Yanet;  
Rodríguez Moltó, María, Pilar;  
Frías Lepoureau, María, Teresa y  
Borroto Nordelo, Carlos, Guillermo**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 563 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

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a la salud animal, en particular a nuevos antígenos quiméricos que incluyen subunidades virales del Virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC) acopladas a proteínas que pueden estimular el sistema inmunológico celular y humoral, desarrollando una respuesta inmunológica potente y rápida contra dicho virus en cerdos.

**Técnica anterior**

10 La Peste Porcina Clásica (PPC), también conocida como cólera porcino por su carácter altamente infeccioso y por su distribución mundial, es considerada la enfermedad más importante en cerdos y se incluye en el listado de enfermedades notificadas de la Organización Mundial de la Salud Animal. El agente etiológico de esta enfermedad, VPPC, es un virus del género Pestivirus de la familia *Flaviviridae*. Se sabe que es un virus con una cubierta lipídica, con un diámetro de 40 a 60 nm y simetría hexagonal, con ácido ribonucleico (ARN) monocatenario como material genético (Kummerer y col. (2000)). The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. Vet. Microbiol. 77:117-128; Moenning y col. (2003). Clinical signs and epidemiology of Classical Swine Fever; a review of new Knowledge. Vet. Journal 165: 11-20).

20 La PPC es una enfermedad altamente contagiosa, en su forma aguda presenta fiebre, degeneración de los vasos capilares, necrosis de los órganos internos y muerte. Los primeros síntomas clínicos aparecen tras un período de incubación de 2 a 6 días, produciendo pirexia, reducción de movimientos y anorexia, produciéndose un empeoramiento en los días siguientes y pudiendo alcanzar la temperatura corporal 42 °C. De igual forma, se desarrolla leucopenia, con valores leucocitarios menores de 8000/mm<sup>3</sup>. El cerdo también desarrolla conjuntivitis, estreñimiento seguido de diarrea, vómitos, pérdida de coordinación motriz, convulsiones, parálisis muscular en la fase terminal. Se aprecia un color rojo difuso de la piel a lo largo de todo el abdomen, morro, orejas y parte interna de las extremidades. En la mayoría de los casos letales la histopatología cerebral muestra una encefalitis no supurativa con elevada vascularización (Moenning y col. (2002) Clinical Signs and Epidemiology of Classical Swine Fever. A review of new knowledge. Vet. Journal 161:1-10).

30 El VPPC actúa como un inmunosupresor durante la infección (Susa y col. (1992) Patogénesis of Classical Swine Fever: B-lymphocyte deficiency caused by Hog Cholera virus. J. Virol. 66:1171-1175) y la detección de anticuerpos neutralizantes comienza a las 2 y 3 semanas después de la infección (Laevens y col. (1998. An experimental infection with a classical swine fever virus in weaner pigs. II). The use of serological data to estimate the day of virus introduction in natural outbreaks. Vet. Q. 20:46-49). La fase terminal de la infección está asociada a una notable disminución de linfocitos B en el sistema circulatorio, así como en el tejido linfoide (Susa y col. (1992). Patogénesis of Classical Swine Fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. J. Virol. 66: 1171-1175). La mayoría de los cerdos que desarrollan la enfermedad mueren entre 10 y 20 días después de la infección, con una mortalidad por encima del 95 %. Las lesiones *post mortem* características de la PPC son diátesis hemorrágicas con petequias en la mayoría de los sistemas de órganos. Resultan más frecuentes en riñón, vejiga urinaria y ganglios linfáticos, aunque también pueden aparecer en el bazo, laringe y en la membrana mucosa y serosa (Mouwen y col. (1983) Atlas of Veterinary Pathology, Bunge, Utrecht, Países Bajos).

45 La infección transplacentaria es otra forma clínica de la PPC; en este caso el virus puede atravesar la placenta de la cerda preñada infectando al feto. Las consecuencias de esta infección pueden ser aborto, el nacimiento de individuos muertos, momificaciones, malformaciones, nacimiento de individuos debilitados y problemas en la diferenciación de órganos. Dependiendo del tiempo de gestación en el que se produce la infección, pueden nacer descendientes inmunotolerantes al VPPV como consecuencia de infección a través de la cerda (transmisión vertical). Los lechones continúan infectados y son virémicos hasta que mueren, generando una diseminación del VPPC estable enfocada en la pira (Moenning y col. (2003) Clinical Signs and Epidemiology of Classical Swine Fever: a review of new knowledge. Vet. Journal 165:11-20) La mortalidad asociada a la PPC constituye un problema económico para los países afectados, con una clara influencia sobre el perjuicio de la situación económica y social de los países en vías de desarrollo. Por este motivo, en aquellos países con una elevada densidad porcina y elevada frecuencia del virus, resulta necesario aplicar programas de control basados en la vacunación. En los países muy desarrollados en los que las explotaciones porcinas se encuentran principalmente subvencionadas por los gobiernos, como Europa, Estados Unidos y Canadá, se aplica un procedimiento de erradicación basado en el sacrificio sanitario. No obstante, los costes resultan muy elevados y esos países son aún susceptibles de posibles epizootias.

55 La Unión Europea (EU) es considerada una zona de alto riesgo de re-emergencia de nuevas epizootias del VPPC debido a la elevada densidad de población porcina, la política de no vacunación y su proximidad geográfica con los países del Este de Europa, en los que el VPPC es enzootico. Uno de los

problemas asociados con la emergencia de nuevas epizootias en esta zona es la presencia de jabalíes con infecciones endémicas de PPC (Laddomada (2000) Incidente and control of PPC in wild boars in Europe. *Vet. Microb.* 73: 121-130). Esta aparición de nuevas epizootias ha tenido lugar a pesar de los sólidos programas de control que se han llevado a cabo en la Unión Europea, que incluyen el sacrificio sanitario de toda la población contagiada y la restricción de exportación porcina desde las zonas afectadas a las zonas sin la enfermedad (van Oirschot (2003) *Vaccinology of Classical Swine Fever: from lab to field.* *Vet. Microbiol.* 96:367-384). Por tanto, existe una necesidad de desarrollar vacunas que induzcan una respuesta inmune, rápida y segura, que garanticen la protección contra la infección y la transmisión viral.

Se han desarrollado vacunas frente al VPPC basadas en virus intactos: vacunas con virus inactivados con violeta cristal o formalina (Biront y col. (1988) *Classical swine fever related infections.* Liess B.M. Martines Nijhoff Publishing, Boston: 181-200), vacunas con virus atenuados por medio de pases en conejo, como la cepa Sinlak (Baibikov y col. RU 2182495) y la cepa china lapinizada (Dahle y col. (1995) *Assessment of safety and protective value of a cell culture modified strain C vaccine of hog cholera/classical swine fever virus.* *Berl-Munch. Tierarztl.Wsch.* 108:20-25), o vacunas con virus atenuado en cultivos tisulares procedentes de conejo, cobaya y cerdo (Kachiku y col. JP 73001484; Terpstra y col. (1990) *Development and properties of a cell culture produced for hog cholera based on Chinese strain.* *Ditsh. Tierarztl.Wsch.* 97:77-79). Estos tipos de vacunas suponen un riesgo debido a la posibilidad de que contengan fracciones de virus activos que, una vez inoculadas en animales susceptibles, producirán nuevos brotes de PPC. Además, en algunos casos, para obtener la respuesta inmunológica protectora, se requieren inmunizaciones repetitivas ya que la inactivación afecta a las propiedades inmunogénicas del virus.

En el caso específico de vacunas vivas con virulencia atenuada, presentan el riesgo potencial de que ocurra una atenuación parcial o una reversión de la virulencia. En cualquiera de estos casos se producirán partículas virales patógenas, que una vez inoculadas en animales susceptibles, permiten la infección, la enfermedad clínica y la propagación de la PPC en las piaras. Estos problemas ocasionan un mayor riesgo en las cerdas preñadas ya que el virus puede infectar a los fetos, que son altamente susceptibles, y la descendencia infectada propaga la enfermedad.

Existen vacunas basadas en cepas del VPPC cuya atenuación se ha demostrado, como la cepa China C, cepa PAV 250, cepa Thierval y cepa IFFA/A-49.

(Björklund, H.JV. y col. (1998) *Molecular characterization of the 3' noncoding region of classical swine fever virus vaccine strains.* *Virus Genes* 16:307-312, Launais y col. (1978) *Hog Cholera Virus: Active immunization of piglets with the Thiverval strain in the presence and absence of colostral passive immunity.* *Vet. Microbiology* 3:31-43). Estas cepas se emplean únicamente en los países en los que la enfermedad es enzoótica, ya que tienen el inconveniente de que no permiten diferenciar entre un animal vacunado y uno infectado con el virus original. Los animales vacunados con estas cepas producen respuestas idénticas en los ensayos serológicos a las de los animales infectados. Los anticuerpos específicos anti-VPPC que se generan con las vacunas basadas en virus atenuados interfieren con el diagnóstico de la infección por PPC. El diagnóstico se realiza por la inmunodetección del virus infeccioso en las amígdalas y la multiplicación de la cepa viral de la vacuna se produce en las amígdalas. Por este motivo, las cepas atenuadas no son adecuadas para su uso en los programas de erradicación. La vacunación con la cepa LK-VNIIWM y la hiperinmunización adicional con la cepa purificada Shi-Myng, formulada con adyuvante de Freund es otro ejemplo. No obstante, la inmunización en 40-45 sitios no es viable en una campaña de vacunación en la que el número de vacunaciones diarias asciende a cientos de animales (Balashova y col. RU2183972).

La inmunización con estas vacunas, que contienen el virus completo, interfiere también con el diagnóstico diferencial entre infecciones causadas por el VPPC y las causadas por otros miembros del género Pestivirus que puedan infectar al cerdo, tales como el Virus de la Diarrea Viral Bovina (abreviado BDVB) y el Virus de la Enfermedad de la Frontera (abreviado, VEF), (Dahle y col. (1991) *Clinical Post Mortem and Virological Findings after Simultaneous Inoculation of Pigs with Hog Cholera and BVD Virus.* *J. Med. Vet.* 38: 764-772).

Para evitar los inconvenientes de las vacunas basadas en virus completos, resulta adecuado el uso de vacunas totalmente inocuas, como las variantes basadas en subunidades, o en proteínas virales obtenidas de manera recombinante. Estas variantes deberían proteger a la piara de la reintroducción de cepas virales y también, permitir la diferenciación entre los animales infectados y los vacunados mediante procedimientos serológicos sencillos. En este sentido, se han desarrollado vacunas basadas en subunidades virales. Las vacunas que contienen proteínas virales tales como glucoproteína E2 de cubierta vírica (Bourna y col. (2000) *Duration of the onset of the herd immunity induced by E2 subunit vaccine against Swine Fever virus.* *Vaccine* 18:1374-1381) son seguras, ya que su uso no supone ningún riesgo de reversión de la virulencia y no interfiere con el diagnóstico. Estas vacunas permiten la diferenciación entre los animales infectados y los vacunados, ya que los anticuerpos que se generan son

únicamente reactivos contra un segmento viral. Por lo tanto, son convenientes para un programa de erradicación de PPC.

Se han desarrollado varias vacunas recombinantes que expresan la proteína E2 en procariotas y vacunas basadas en péptidos sintéticos de dicha proteína (Chen y col. WO 200232453). En estos casos, la proteína no está glucosilada, de manera que su inmunogenicidad y su capacidad protectora se ven afectadas. Otros candidatos de vacuna usan vectores virales para la expresión del gen heterólogo de E2 en células eucariotas como el virus de la pseudorrabia porcina (Peeters y col. (1997). Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever. J. Gen. Virol. 78:3311-3315), el virus de viruela porcina (Gibbs y col. US62117882) y el adenovirus porcino (Nagy y col. WO 200183737). En estos casos, la infección viral con virus de tipo silvestre produce anticuerpos neutralizantes contra el vector viral del mismo serotipo. De esta manera, la inducción de la respuesta inmune contra el VPPC se ve afectada. De igual forma, los vectores virales basados en virus de la pseudorrabia porcina y en virus de la viruela porcina no pueden aplicarse en países en los que se ha declarado que no presentan estos virus, debido a problemas legales. De igual modo, se ha usado el virus vaccinia como un vector pero la normativa de la Organización Mundial de la Salud impide su uso (Meyers y col. EP 1087014).

Las vacunas basadas en ácido desoxirribonucleico (ADN) desnudo para la expresión de la proteína E2 en miocitos y osteocitos presentan el inconveniente de que necesitan mayores concentraciones de ADN para inducir una respuesta, ya que la transfección con ADN desnudo es muy ineficaz. Esta vacuna está sometida a estrictos controles normativos que impiden su aplicación (Audonnet y col. WO 0152888).

La producción de VPPC-E2 como antígeno en los sistemas de expresión de células de insectos mediada por Baculovirus ha resultado una alternativa viable (Van-Rijn y col. (1999). An experimental marker vaccine and accompanying serological diagnostic test based on enveloped glycoprotein E2 of classical swine fever virus. Vaccine, 17: 433-440; Kretzdorn y col. US 20040028701). En este sistema, la E2 recombinante se produce como una glucoproteína, que aumenta su inmunogenicidad con respecto a la isoforma no glucosilada. El baculovirus se inactiva posteriormente y no se producen efectos patógenos para el cerdo. No obstante, tres semanas después de la vacunación se induce la protección eficaz contra la infección y no existe una protección completa contra la infección intrauterina. Por lo tanto, un problema importante en cuanto a la prevención de la PPC es que no existen vacunas de subunidades recombinantes que permitan un diagnóstico diferencial entre animales infectados y vacunados y que puedan producir una protección rápida tras la vacunación, suprimiendo la transmisión transplacentaria hacia su descendencia en cerdas preñadas.

Se ha observado que una vacuna contra el VPPC que comprende un plásmido que codifica la glucoproteína E2 del VPPC y un plásmido que codifica CD154 induce anticuerpos neutralizantes (Wienhold y col. "Immunomodulatory effect of plasmid co-expressing cytokines in classical swine fever virus subunit gp55/E2 DNA vaccination" veterinary research, Elsevier NL, vol. 36, n°. 4, Julio 2005, páginas 571-587). Sin embargo, no se desvelaron proteínas quiméricas.

En el documento EP-A-152285 se desveló un antígeno quimérico para vacuna destinado para su uso como una vacuna contra el VPPC de la mucosa, que comprende el dominio extracelular de E2 fusionado con la proteína LT estimuladora del sistema inmunológico. Sin embargo, no se observó inducción de respuesta inmunológica alguna.

Huang H-I ("Improved immunogenicity of a self tumor antigen by covalent linkage to CD-40 ligand" International Journal of Cancer, US, vol. 108, 2004, páginas 696-703) desvela proteínas de fusión que comprenden el dominio extracelular de CD154 y una inmunoglobulina. Sin embargo, no se sugiere fusión del dominio extracelular de CD154 con el dominio extracelular de E2.

#### **Descripción de la invención:**

La presente invención responde a la descripción de las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a antígenos quiméricos contra la PPC en los que se usa como inmunógeno el segmento extracelular de la glucoproteína E2, acoplado a una proteína estimuladora del sistema inmunológico (denominada en el contexto de la presente invención "adyuvante molecular"), para mejorar la estimulación de una respuesta inmunológica celular rápida y la inducción de más litros de anticuerpos neutralizantes del VPPC.

En la presente invención, la proteína estimuladora del sistema inmunológico es el segmento extracelular de la molécula CD154. El segmento extracelular de la molécula CD 154 puede proceder de cualquier mamífero.

La presente invención resuelve los problemas anteriormente mencionados. La nueva vacuna contiene antígenos quiméricos que comprenden subunidades virales combinadas con moléculas

estimuladoras del sistema inmunológico, que permiten el desarrollo de una respuesta inmunológica rápida que protege al cerdo de la infección por el VPPC. Otra ventaja de la solución propuesta es que suprime la transmisión viral desde la cerda preñada infectada a su descendencia, debido al efecto de potenciación inmunológico de las moléculas estimuladoras que se combinan con las proteínas virales en los antígenos quiméricos.

Los antígenos de la vacuna de la presente invención, basados en proteínas quiméricas, garantizan una protección a cerdos vacunados desde la primera semana después de la inmunización, cuando se exponen a una  $DL_{50}$  de  $10^5$  (dosis del virus que provoca la muerte del 50% de los animales infectados por el VPPC). Dicha protección está mediada por una fuerte respuesta inmunológica celular contra el VPPC, que está directamente relacionada con la combinación de los elementos que se combinan en el antígeno quimérico. También se observa una reducción en el tiempo en la inducción de anticuerpos neutralizantes, que aparece la segunda semana después de la vacunación. Esto contribuye a aumentar la protección contra el VPPC de los cerdos vacunados. Los animales inmunizados no presentan pruebas de la enfermedad clínica, y no es posible aislar el VPPC de los fluidos corporales ningún día después de la exposición a dicho virus.

Los antígenos quiméricos con el adyuvante molecular E2 impiden la transmisión vertical del VPPC desde las cerdas a sus fetos. Estas proteínas inducen una protección rápida en cerdas preñadas, lo que supone un retraso en el desarrollo de la enfermedad clínica y no permite la multiplicación de virus, no solo en las madres sino también en los fetos, después de la exposición con una  $LD_{50}$  de  $10^5$  del VPPC.

En una realización preferida, el antígeno quimérico para la vacuna se caracteriza por contener esencialmente la secuencia de aminoácidos del segmento extracelular (o dominio) de la glucoproteína E2 del VPPC, que aparece en la Lista de Secuencias como Sec. ID N°: 1; y el segmento extracelular de la molécula CD154 del cerdo como Sec ID N°: 2. El antígeno quimérico para la vacuna comprende esencialmente dichas secuencias de aminoácidos, pero también puede incluir el segmento extracelular de E2 de cualquier aislado del VPPC. Otro aspecto de la presente invención es que los antígenos quiméricos para la vacuna pueden obtenerse de manera sintética, recombinante o por conjugación química. En una realización particular de la invención, como una proteína de fusión, se generó una variante basada en una proteína quimérica que contenía E2his (segmento extracelular de E2 fusionado a una cola de 6 histidinas) y un adyuvante molecular. Con esta finalidad, al extremo C-terminal de E2his, se añadieron un péptido espaciador, que consistía en 4 unidades repetidas de  $Gly_4Ser$  ( $4G_4S$ ), y una molécula estimuladora del sistema inmunológico. La incorporación del péptido  $4G_4S$  permite un cierto grado de relajación de la cadena polipeptídica. Esto garantiza el correcto plegamiento de estructura terciaria de la estructura de la proteína para obtener las proteínas fusionadas con una estructura terciaria, similar a la original. Uno de los antígenos para vacuna, objeto de la presente invención, presenta el dominio extracelular de molécula CD 154 porcina fusionado en su extremo C-terminal, como adyuvante molecular (E2his-CD154).

Hasta ahora, no se había investigado la producción de candidatos de vacunas recombinantes contra el VPPC mediados por los sistemas de expresión en animales como biorreactores. No obstante, la capacidad de la glándula mamaria para expresar proteínas recombinantes glucosiladas con un plegamiento correcto de su estructura terciaria, constituye un sistema de expresión adecuado para producir la glucoproteína E2 con elevada inmunogenicidad y capacidad protectora. El sistema de expresión transitoria en la glándula mamaria de rumiantes, mediado por vectores adenovirales, constituye una herramienta para obtener altos niveles de expresión de proteínas recombinantes de manera sencilla y rápida (Toledo y col., WO 2004/034780). Este procedimiento es muy útil para la producción de E2 recombinante con el fin de aplicar programas de vacunación dirigidos a la erradicación del la PPC. En una materialización de la invención, los antígenos para vacuna, objeto de la presente invención, se expresan en las células epiteliales mamarias de mamíferos modificados genéticamente, durante el proceso de lactancia y se secretan en la leche. Las moléculas quiméricas recombinantes se producen en la leche de los mamíferos transgénicos o por la transformación directa del epitelio glandular mamario de mamíferos no transgénicos, empleando vectores adenovirales. En otra materialización de la invención, los antígenos quiméricos para vacuna se producen en levaduras modificadas genéticamente. Dichos antígenos se obtienen en el medio de cultivo de la levadura transformada con el gen quimérico y las secuencias reguladoras permiten la expresión y secreción de la proteína recombinante en el medio de cultivo.

La proteína E2 del VPPC original se encuentra expuesta como homodímero en la cubierta viral, estabilizada por puentes disulfuro que existen entre las cadenas. Esto determina que se generen anticuerpos neutralizantes y protectores contra epítopes conformacionales presentes en los homodímeros. Los antígenos para vacuna desarrollados durante la presente invención se producen en sistemas de expresión que permiten el correcto plegamiento de estas proteínas recombinantes. El diseño de construcciones genéticas garantiza que no se produzcan modificaciones de la estructura terciaria de las proteínas de fusión. Los antígenos recombinantes para vacuna se purifican fácilmente por una sencilla etapa cromatográfica de afinidad a los iones metálicos.

El diseño de construcciones genéticas, el uso de sistemas de expresión y la simplicidad relativa del

procedimiento de purificación garantiza que los antígenos para la vacuna contra el VPPC, descritos en la presente invención, conserven las propiedades antigénicas e inmunogénicas similares a las de la proteína viral E2. La inmunización con moléculas quiméricas, producidas en sistemas de expresión como *Pichia pastoris* o la glándula mamaria de cabra, conduce a una respuesta inmunológica potente y rápida. El dominio extracelular de E2 genera homodímeros que proporcionan los epítopos conformacionales para la generación de los anticuerpos neutralizantes y protectores. El segmento de CD154 actúa como un adyuvante molecular, que estimula el sistema inmunológico de los cerdos vacunados, produce una respuesta celular inmunológica que protege a los animales contra el VPPC, desde la primera semana después de la vacunación. La combinación de ambas moléculas en la proteína quimérica, que contiene un péptido espaciador, garantiza el correcto plegamiento de cada molécula. Los sistemas de expresión usados permiten que las proteínas recombinantes se expresen en su isoforma glucosilada. Esto también contribuye a la obtención de moléculas con la estructura terciaria apropiada.

Otro aspecto de la presente invención son las formulaciones de vacuna con la posibilidad de producir una respuesta inmunológica protectora contra el VPPC, que se caracterizan porque comprenden los antígenos quiméricos descritos anteriormente que contienen el dominio extra-celular de la glucoproteína E2 y el segmento extracelular de la molécula CD154. Dichas formulaciones de vacuna puede administrarse a los animales por una vía sistémica o mucosa, con el fin de prevenir la PPC y evitar las pérdidas materiales y económicas que se producen por la infección del VPPC en piaras porcinas.

### Breve descripción de los dibujos

**Figura 1.** Análisis por SDS-PAGE, en condiciones reductoras, de la expresión de E2his en células PK-15 transducidas con el vector adenoviral Ad-E2his-sec. (A) SDS-PAGE, Carril 1: medio de cultivo de células transducidas, Carril 2: medio de cultivo de células no tratadas, MPM: marcador de peso molecular. (B) Inmuno-identificación de E2his por transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cola de histidina, Carril 1: medio de cultivo de células transducidas, Carril 2: medio de cultivo de células no tratadas, Carril 3: control positivo para cola de histidina, MPM: marcador de peso molecular. (C) Inmuno-identificación de E2his por transferencia de Western usando un suero policlonal de cerdos infectados por el VPPC, Carril 1: medio de cultivo de células no tratadas, Carril 2: medio de cultivo de células transducidas con Ad-E2his, MPM: marcador de peso molecular.

**Figura 2.** Análisis de las condiciones de expresión de E2his y de E2his-CD154 en células PK-15 transducidas con los vectores adenovirales Ad-E2his-sec y Ad-E2his-CD154-sec. Las proteínas del medio de cultivo se separaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. La inmuno-identificación de moléculas de interés se realizó por transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal (Mab) contra la proteína E2 del VPPC (Mab-1G6). Carril 1: medio de cultivo de células transducidas con el vector Ad-E2his-sec, Carril 2: medio de cultivo de células transducidas con el vector Ad-E2hisCd154-sec, MPM: marcador de peso molecular.

**Figura 3.** Cinética de la expresión de E2his en la leche de cabras transducidas con el vector Ad-E2his-sec. Las proteínas del suero lácteo correspondientes a cada día de ordeño se separaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. La inmuno-identificación de E2his se ensayó por transferencia de Western usando el Mab-1G6. Carril PK: control positivo de E2his expresada en el medio de cultivo de células PK-15 transducidas con el vector Ad-E2his-sec, Carril C: muestras de suero lácteo de cabras no tratadas, Carriles: 1-8: muestras de suero lácteo de cabras transducidas con el vector Ad-E2his-sec, correspondientes a cada uno de los 8 días de ordeño posteriores a la transducción adenoviral.

**Figura 4.** Cinética de la expresión de E2his-CD154 en leche de cabras transducidas con Ad-E2hisCd154-sec. Las proteínas presentes en el suero lácteo correspondientes a cada día de ordeño se separaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. La inmuno-identificación de la molécula E2his-CD154 se realizó por transferencia de Western usando el Mab-1G6. Carriles 1-5: muestras de suero lácteo de cabras transducidas con el vector Ad-E2hisCD154-sec, correspondientes a cada uno de los 5 días de ordeño posteriores a la transducción adenoviral, Carril C: muestras de suero lácteo de cabras no tratadas, Carril PK: control positivo de E2his-CD154 expresado en el medio de cultivo de células PK-15 transducidas con el vector Ad-E2his-CD154-sec.

**Figura 5.** Análisis de pureza e identificación de E2his separada en SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Se expresó la proteína en leche de cabras transducidas con el vector Ad-E2his-sec y se realizó la purificación por cromatografía de afinidad de iones metálicos. (A) SDS-PAGE de las diferentes etapas de la purificación. (B) Inmuno-identificación por transferencia de Western usando Mab 1 G6. Carril 1: control positivo de E2his expresado en el medio de cultivo de células PK-15 transducidas con el vector Ad-E2his-sec, Carril 2: muestras de suero lácteo de cabras no tratadas, Carril 3: muestras de suero lácteo de cabras transducidas con el vector Ad-E2his-sec, tomadas

como material inicial para la cromatografía, Carril 4: material no unido a la matriz, Carril 5: lavado con imidazol 20 mM, Carril 6: lavado con imidazol 50 mM, Carril 7: elución con imidazol 200 mM.

5 **Figura 6.** Comparación del reconocimiento antigénico de dos isoformas del antígeno para vacuna E2his por anticuerpos presentes en suero de cerdos infectados por una cepa virulenta del VPPC. El E2his purificado de leche de cabras transformadas con el vector de adenovirus Ad-E2his-sec se analizó por electroforesis y ensayo de transferencia de Western en condiciones reductoras (monómero) y en condiciones no reductoras (homodímero). (A) SDS-PAGE. (B) Transferencia de Western usando un suero policlonal de cerdos infectados por la PPC, Carril 1: E2his separado en condiciones no reductoras, Carril 2: E2his separado en condiciones reductoras.

10 **Figura 7.** Cinética de los anticuerpos neutralizantes obtenidos en dos grupos de cerdos vacunados con una sola dosis del antígeno para vacuna E2his. Las titulaciones de los anticuerpos se determinaron por un ensayo de unión a peroxidasa neutralizante. Se inoculó el grupo A con una dosis de 30 µg/animal y el grupo B con una dosis de 50 µg/animal. Los dos grupos se expusieron tres semanas después de la vacunación a una dosis viral de PPC de  $DL_{50} 10^5$ . Los resultados se muestran como la media geométrica recíproca de las titulaciones.

15 **Figura 8.** Ensayo linfoproliferativo usando linfocitos aislados de cerdos 5 días después de la vacunación con antígenos E2-CD154 (grupos D y E) y E2his (grupo F). Los resultados se expresan como índice de estimulación (IE), definido como la relación entre los valores de recuento por minuto (rpm) del cultivo estimulado y los valores de rpm del cultivo de control no tratado. Se consideró que la respuesta linfoproliferativa que indujo un  $SI \geq 2$  fue positiva. Se evaluó la proliferación en los cultivos tratados con VPPC, así como la inhibición de la proliferación en cultivos tratados con VPPC y un Mab contra el dominio porcino CD4.

20 **Figura 9.** Ensayo de actividad antiviral en células PK-15, usando suero de cerdos vacunados con antígenos E2-CD154 (Grupos D y E) y E2his (Grupo F). Los resultados se expresan como la media geométrica recíproca de las titulaciones.

25 **Figura 10.** Cinética de los anticuerpos neutralizantes obtenidos en dos grupos de cerdos vacunados con antígenos E2-CD154 (Grupo H) y E2his (Grupo I), usando una dosis de 50 µg/animal. Las titulaciones de los anticuerpos se determinaron por un ensayo de unión a peroxidasa neutralizante. Los resultados se muestran como media geométrica recíproca de las titulaciones.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Amplificación de los segmentos génicos que codifican los dominios extracelulares de E2 del VPPC y CD154 porcino, y clonación del plásmido pMOS-E2his-CD154.

35 El segmento génico que codifica el dominio extracelular de E2, de 363 aminoácidos, se amplificó por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), a partir del genoma viral de la cepa "Margarita" de aislamiento del VPPC cubano, número de acceso AJ704817 de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (CNIB). Para facilitar la purificación del antígeno se incluyó la secuencia codificante de una cola de 6 histidinas en el oligo 3'.

40 La secuencia codificante del dominio extracelular de CD154 porcino, de 210 aminoácidos se obtuvo por síntesis química, tomando el gen CD154 de cerdo *Sus scrofa* (número de acceso del CNIB AB040443) como patrón de secuencia. En el extremo 5' de la secuencia codificante de dicha molécula, se incluyó una región que codifica un péptido de cuatro unidades repetidas de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (4G<sub>4</sub>S). A través de una subclonación en el plásmido pMOS-BLUE (Amersham, Estados Unidos) se insertó la secuencia sintetizada (4G<sub>4</sub>S-CD154) inmediatamente después de la cola de 6 histidinas en la secuencia codificante de E2his. Se obtuvo el plásmido pMOS-E2his-CD154.

### Ejemplo 2. Construcciones genéticas de las moléculas E2his y E2his-CD154 con señales de secreción para células de mamíferos.

50 Se insertó la secuencia correspondiente a E2his, obtenida por RT-PCR, en los sitios *Bg/II-EcoRV* del plásmido pAEC-SPT (Herrera y col. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279:548-551). Así, se obtuvo el vector pE2his-sec que contenía la secuencia codificante de E2his precedida de la señal de secreción del activador de plasminógeno de tejido humano (APth) y bajo el control transcripcional del promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (PCMV).

55 La secuencia correspondiente a E2his-CD154, subclonada en el vector pMOS-BLUE, se insertó en los sitios de restricción de endonucleasas *Bg/II-Sal I* en el plásmido pAEC-STP. Así, se obtuvo el vector pE2hisC154-sec que contenía la secuencia codificante de E2his-CD154, precedida de la señal de secreción del APth y bajo el control transcripcional del PCMV.

**Ejemplo 3. Generación de vectores adenovirales recombinantes que contienen las secuencias codificantes de E2his y E2his-CD154 con señales de secreción para células de mamíferos.**

Se generaron vectores adenovirales con replicación defectuosa (Ad- $\Delta$ E1,  $\Delta$ E3), como se describe en la guía del sistema AdEasy (AdEasy<sup>tm</sup>-sistema de vector, Quantum Biotechnologies, Estados Unidos). Como vector de transferencia se usó el plásmido pAdTrack-CMV. Se extrajo la secuencia codificante de E2his, con la señal de secreción del APth (E2his-sec), del plásmido pE2his-sec por digestión enzimática con las endonucleasas de restricción *Nco* I y *Eco*R V y se insertó en el sitio de restricción *Eco*R V del vector pAdTrack. Se obtuvo el pAdT-E2his-sec recombinante con la variante segregable de E2his bajo el control transcripcional del PCMV.

Se extrajo la secuencia codificante de E2his-CD154 segregable, del plásmido pE2his-CD154-sec por digestión enzimática con las endonucleasas de restricción *Nco* I y *Sal* I y se insertó en los sitios de restricción *Kpn* I-*Xho* I del vector pAdTrack. Se obtuvo el pAdT-E2hisCD154-sec recombinante con el E2his-CD154-sec bajo el control transcripcional del PCMV. Los vectores adenovirales de transferencia, pAdT-E2his-sec y pAdT-E2hisCD154-sec, se linealizaron por digestión enzimática con la endonucleasa de restricción *Pme* I, para generar los genomas adenovirales recombinantes. Se sometió, por separado, a co-electroporación cada uno de los vectores lineales con el vector pAdEASY-1 en la cepa BJ5183 de *Escherichia coli*. Se obtuvieron los genomas recombinantes de ambos vectores, pAd-E2his-sec y pAd-E2hisCD154-sec, por recombinación de homólogos. Uno de ellos contiene la secuencia codificante de E2his-sec y el otro la secuencia codificante de la molécula de E2his-CD154-sec. En ambos casos, permanecieron bajo el control transcripcional del PCMV.

Posteriormente, los genomas adenovirales recombinantes se sometieron a digestión con la endonucleasa *Pac* I y se transfectaron por separado en la línea de células complementarias HEK-293A y se obtuvieron los viriones infectados. Se generaron dos vectores adenovirales: Ad-E2his-sec y Ad-E2hisCD154-sec. Los vectores se amplificaron independientemente en la línea celular HEK-293A, hasta titulaciones de  $1 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml) y se purificaron mediante centrifugación doble en gradiente de CsCl. Posteriormente, los vectores se sometieron a diálisis frente a un tampón de almacenamiento (Tris 10 mM, pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 4 % de sacarosa) y se mantuvieron a -70 °C. La capacidad de los vectores adenovirales Ad-E2his-sec y Ad-E2hisCD154 para transformar células de mamíferos y para mediar en la expresión y en la secreción de moléculas de E2his y E2his-CD154 en el medio de cultivo quedó corroborada por ensayos de infección en la línea celular porcina PK15. Se separaron las muestras de proteína presentes en el medio de cultivo de las células infectadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), en condiciones no reductoras y se analizaron por ensayo de transferencia de Western con un anticuerpo monoclonal contra a E2 del VPPC ( $\alpha$ E2-1G6) (Fig. 1 y 2).

El análisis del peso molecular de las glucoproteínas E2his y E2his-CD154 demostró que correspondían a isoformas diméricas y triméricas. En el carril 1, Figura 2, se observan dos bandas correspondientes a isoformas diméricas (180 kDa) y triméricas (270 kDa) de E2-CD154.

**Ejemplo 4. Transducción *in situ* del epitelio glandular mamario de cabra para la producción de E2his y E2his-CD154 en la leche.**

Se usaron vectores adenovirales recombinantes Ad-E2his-sec y Ad-E2hisCD154 para la transformación de epitelio mamario con los casetes de expresión E2his y E2his-CD154. En ambos casos, los vectores se inocularon en la glándula mamaria de cabras lactantes mediante infusión directa de las ubres a través del canal del pezón. Los vectores adenovirales infectaron las células epiteliales secretoras que conforman el epitelio mamario permitiendo la expresión de las proteínas recombinantes.

Se emplearon cabras en el segundo mes de lactancia natural, con una producción media de 1 litro de leche al día. Para transducir los vectores adenovirales, se ordeñaron inicialmente las hembras hasta retirar la leche de las ubres, posteriormente se infundió una solución salina isoosmótica a las cisternas directamente a través de los canales de los pezones, masajeando suavemente las ubres para garantizar el lavado completo de la glándula mamaria. Se retiró la solución salina mediante ordeño exhaustivo de la ubre y se repitió el procedimiento dos veces. Posteriormente, se infundió el inóculo adenoviral con una titulación de  $10^9$  UFC/ml en solución salina, que contenía 36 mM de EGTA. El volumen de infusión para cada ubre fue variable y garantizó el llenado completo de las cisternas, dependiendo de la capacidad de la ubre. Tras la infusión, se aplicaron masajes a las ubres para facilitar una distribución homogénea de los inóculos adenovirales en la glándula, alcanzando las células epiteliales secretoras de los alvéolos. Se retiraron los inóculos adenovirales 24 horas después por ordeño. Con el objetivo de eliminar los restantes vectores adenovirales de la cisterna o de los conductos mamaros, se lavaron las glándulas mamaras de nuevo mediante infusión de solución salina.

Veinticuatro horas después comenzó la recogida de la leche de los animales transformados por ordeño manual. Se realizaron dos ordeños diarios con intervalos de 12 horas. La leche recogida se

almacenó a -70 °C. Se analizaron las expresiones cinéticas de las proteínas recombinantes E2his y E2his-CD154 en la leche, para cada muestra de ordeño (Fig. 3 y 4). Se comprobó que los tamaños moleculares de las proteínas recombinantes correspondieron a isoformas diméricas y triméricas. Se obtuvo una expresión media de 1,03 g/l de E2his los días 2-8 posteriores a la inoculación, con un rendimiento medio de 5,22 g para cada animal. Se obtuvo una expresión media de 0,73 g/l para la molécula recombinante E2his-CD154, con un rendimiento medio de 3,04 g por animal.

#### **Ejemplo 5. Purificación de antígenos de E2his y E2his-CD154 de leche de cabra.**

Se mezclaron y centrifugaron a 15000 g durante 30 min a 4 °C las muestras de cada día de ordeño que contenían los antígenos de vacuna recombinantes E2his y E2his-CD154, respectivamente. Se separó la fase soluble (suero lácteo) y se descartó la fase grasa. Se diluyó el suero recogido en un tampón separador lácteo (Tris-HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH: 8,0) en una proporción de 1:4. Se enfrió la mezcla en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 15000 g, durante 30 minutos a 4 °C. Se analizaron los sobrenadantes y los precipitados por SDS-PAGE y ensayo de transferencia de Western. Se determinó que había un porcentaje principal de dichas proteínas recombinantes en la fase soluble pero el precipitado contenía caseínas.

Se clarificaron las fracciones de suero que contenían los antígenos recombinantes de interés (E2his y E2his-CD154) por filtraciones secuenciales en membranas de 0,8 µM y 0,4 µM (Millipore) y posteriormente se aplicaron en una columna de purificación XK16 (Amersham, Estados Unidos) con relleno de matriz de Ni-NTA-agarosa (Qiagen, Estados Unidos). Se realizaron dos etapas de lavado con tampón de fosfato 100 mM, imidazol 20 mM, pH 7,2 (primer lavado) y fosfato 100 mM, imidazol 50 mM, pH 7,2 (segundo lavado). Tras el lavado, se sometieron a elución las proteínas de interés con tampón fosfato 100 mM, imidazol 200 mM, pH 7,2. Se sometió a diálisis el pico correspondiente de la fracción pura frente a un tampón de fosfato 10 mM, pH 7,2 (Fig. 5).

El procedimiento de purificación de E2his y E2his-CD154 de leche de cabra fue el mismo para ambos antígenos de vacuna. Se obtuvieron las dos proteínas con un nivel de pureza mayor del 90 %. Se obtuvo E2his con una recuperación del 70 % y en el caso de E2his-CD154 se obtuvo una recuperación del 58 %. Se analizaron las proteínas purificadas por SDS-PAGE y ensayo de transferencia de Western, para determinar la formación de agregados de proteína. Se pudo determinar que las isoformas diméricas (homodímeros) de E2his producidas en la leche fueron reconocidas de manera eficaz por el suero policlonal de los cerdos infectados por el VPPC, lo que es indicativo de que esta conformación específica aumenta la antigenicidad de la molécula (Fig. 6).

#### **Ejemplo 6. Construcción de vectores de expresión en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.**

Se sometió a digestión el vector de expresión pPS10 de *P. pastoris* con endonucleasa de restricción *Nae* I para incorporar las secuencias codificantes de interés en el extremo 3' de la señal de secreción para la sacarosa invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Suc2). Se insertó la secuencia codificante E2 amplificada por PCR en el sitio de restricción *Nae* I del plásmido pPS10. Se retiró la secuencia codificante E2his-CD154 del plásmido pMOS-E2his-CD154 por digestión enzimática con endonucleasa de restricción *Sma* I-*EcoRV* y se insertó en el sitio de restricción *Nae* I de pPS10. Así, se obtuvieron los plásmidos pPS-E2his y pPS-E2his-CD154. Se acoplaron las secuencias codificantes de ambas moléculas a la señal de secreción de Suc2 de *S. cerevisiae* y permanecieron bajo el control de transcripción del promotor (AOX1) de enzima alcohol oxidasa de la levadura *P. pastoris*.

Los plásmidos recombinantes se linealizaron con la endonucleasa de restricción *Pvu* II y se sometieron a electroporación en células electrocompetentes de la cepa MP36 de *P. pastoris*. Así, se generaron varios clones de cepa MP36 de *P. pastoris* transformados de manera estable con los plásmidos pPS-E2his y pPS-E2his-CD154. Esta cepa es una mutante auxotrófica de histidina, por lo tanto la levadura recombinante adquiere un fenotipo His<sup>+</sup>, permitiendo su selección auxotrófica.

La levadura recombinante, inicialmente identificada por ensayo de transferencia puntual, se analizó por ensayo de transferencia de Southern, para determinar el patrón de integración que pudiera ocurrir a través de la sustitución del gen AOX1 de *P. pastoris*, generando un fenotipo Mut<sup>s</sup>-His (baja utilización de metanol). La sustitución génica de AOX1 se produce por recombinación entre la región del promotor 5'AOX1 y la región 3' AOX1 presentes en el genoma de la levadura y la otra presente en el plásmido, dando lugar a la eliminación de la región codificante del gen AOX1. La levadura recombinante con fenotipo Mut<sup>s</sup> contribuye a la producción de la enzima alcohol oxidasa en el gen AOX2, aunque su ritmo de crecimiento en metanol es bajo. De igual forma, por sustitución, puede obtenerse un patrón de integración de fenotipo de Mut<sup>t</sup>-His.

Las secuencias codificantes de las variantes E2his y E2his-CD154 permanecieron bajo el control de regulación del promotor AOX1, que inducible por metanol. Los niveles bajos de proteínas que secreta *P. pastoris* y sus medios de cultivo no requieren proteínas complementarias, por lo tanto cabe esperar que la proteína heteróloga segregada constituya la mayoría de las proteínas totales del medio (hasta más del

80 %). Se realizó la producción de proteínas recombinantes en fermentadores de 5 l. Se realizó la inducción de la expresión por adición de metanol al cultivo durante 5 días y se obtuvieron las proteínas recombinantes en el medio de cultivo de fermentación. Se segregó E2his al medio de cultivo de levadura recombinante en cantidades de 0,143 mg/ml. En el caso de E2his-CD154, se obtuvieron niveles de expresión de 0,122 mg/ml.

#### **Ejemplo 7. Purificación de antígenos E2his y E2his-CD154 del medio de cultivo de *Pichia pastoris*.**

Se centrifugó el producto de fermentación a 10000 g durante 30 minutos, a 4 °C para separar la biomasa de la fase líquida. Se filtró el medio de cultivo en membranas de 0,8 µM y 0,2 µM (Millipore) y se aplicó en una columna de purificación XK16 (Amersham, Estados Unidos) con relleno de matriz de Ni-NTA-Agarosa (Qiagen, Estados Unidos). Se realizó un lavado con tampón de fosfato 100 mM, imidazol 30 mM, pH 7,2 y se sometieron a elución las proteínas de interés con tampón de fosfato 100 mM, imidazol 200 mM, pH 7,2. Se sometió a diálisis la fracción pura frente a tampón de fosfato 10 mM. El procedimiento de purificación de E2his y E2-CD154 a partir del sobrenadante de fermentación de la levadura *P. pastoris* transformada genéticamente fue idéntico para ambos antígenos de vacuna. Se obtuvieron las dos proteínas con una pureza mayor del 95 %. Se obtuvo E2his con una recuperación de 83 % y en el caso de E2his-CD154 se obtuvo con una recuperación de 78 %.

#### **Ejemplo 8. Ensayo de protección en cerdos vacunados con la variante segregable E2his.**

En este ensayo se usaron veinticuatro cerdos sanos, de 20 kg de peso aproximadamente, con serología negativa al VPPC y pertenecientes a una piara no vacunada y sin presentar PPC. Se distribuyeron los cerdos en grupos de 8 animales y se introdujeron en tres salas de experimentación separadas (A, B y C) con agua y alimento a discreción.

Se inmunizaron los animales de los grupos A y B con una formulación de vacuna que contenía antígeno E2his, con una sola dosis de 30 µg (grupo A) y de 50 µg (grupo B) por animal y el grupo C se inmunizó con placebo. El antígeno se formuló en una emulsión de agua en aceite y se inoculó mediante inyección de 2 ml, por vía intramuscular, en el cuello. Se inoculó el placebo, formado por adyuvante y solución salina de fosfato en una proporción de 1:1 (v/v), en las mismas condiciones. La tercera semana después de la inmunización todos los animales se expusieron a una DL<sub>50</sub> de 10<sup>5</sup> de cepa "Margarita" del VPPC homólogo por inyección intramuscular.

La inoculación con la formulación de vacuna E2his no produjo reacciones adversas, a la vista del hecho de que no se observó ninguna modificación de los parámetros clínicos normales. Se obtuvieron titulaciones de anticuerpos neutralizantes mayores que 1/50 (considerado protector) en los grupos vacunados después de la segunda semana de inmunización. Después de la tercera semana las titulaciones aumentaron hasta 1/1600 – 1/6400 (Fig. 7), pero no se observaron diferencias en cuanto a la respuesta inmunológica entre los grupos vacunados (A y B). Los cerdos vacunados no desarrollaron pirexia o síntomas clínicos de la enfermedad y no hubo fracciones aisladas víricas a partir de los linfocitos en los días posteriores a la exposición. No obstante, el grupo de placebo desarrolló todos los síntomas clínicos de la enfermedad incluyendo pirexia, hemorragia y encefalitis no purulenta. En este grupo se obtuvieron aislados de virus a partir del cuarto día desde la exposición y hasta el día del sacrificio. En este caso, quedó demostrado que los cerdos destetados vacunados con la formulación E2his, y a los que se les administró una dosis de 30 µg, con el esquema de vacunación propuesto, permanecieron protegidos frente a los síntomas clínicos y frente a la infección por el VPPC.

#### **Ejemplo 9. Ensayo de protección vertical en cerdas preñadas vacunadas con el antígeno segregable E2his.**

Se tomaron diez cerdas serológicamente negativas contra el VPPC, procedentes de una piara sin enfermedad de PPC o historial de vacunación (3 años antes). Tras el destete, se indujo el ciclo estral por tratamiento hormonal y tres días después todas las cerdas se inseminaron. La inseminación se realizó de forma simultánea a la inmunización. Se tomó un grupo de 5 cerdas y se aplicaron 2 ml de formulación de vacuna, mencionado en el Ejemplo 7 (Grupo B), en el cuello por inyección intramuscular. Las 5 cerdas restantes se tomaron como grupo de control negativo y se les inyectó el placebo, constituido por 2 ml de adyuvante y solución salina en una proporción de 1:1 (v/v). El grupo vacunado recibió un refuerzo 21 días después. Se sometieron a estudio las cerdas preñadas midiendo la tríada clínica (temperatura, pulso cardíaco y frecuencia respiratoria) y se realizaron extracciones de sangre semanales para estudio hematológico y detección de anticuerpos neutralizantes contra el VPPC. Dos meses más tarde las hembras preñadas se expusieron a una DL<sub>50</sub> de 10<sup>5</sup> de la cepa "Margarita" del VPPC homólogo por inyección intramuscular. Se realizó el asilamiento del virus a partir de linfocitos sanguíneos periféricos 3 y 5 días después de la exposición, para detectar la presencia de VPPC. Se sacrificaron las cerdas dos semanas después de la exposición y se extrajeron los fetos para análisis morfológico, análisis de anatomía patológica y ensayo de aislamiento del virus. Durante el experimento las cerdas tuvieron acceso a agua y alimento a discreción.

La vacuna resultó inocua para todas las cerdas preñadas y no se produjeron abortos o modificaciones clínicas en los días posteriores a la inmunización. Los animales vacunados desarrollaron anticuerpos neutralizantes específicos contra el VPPC con titulaciones entre 1:50 y 1:51200. Las cerdas procedentes del grupo vacunado permanecieron completamente sanas después de la exposición. Ninguno de estos animales presentó pirexia, leucopenia, trombocitosis o cualquier otro signo clínico de PPC.

El análisis de morfometría y de anatomía patológica permitió determinar que los fetos de las cerdas vacunadas presentaban un tamaño normal y no exhibían lesiones histopatológicas. No se aisló el VPPC de leucocitos ni en las muestras de sangre de los progenitores tomadas en los días posteriores a la exposición ni en la sangre o en los órganos de los fetos sacrificados.

Las cerdas del grupo de placebo mostraron pirexia y leucopenia tras exposición. Una de las cerdas abortó el día 8 después de la exposición y se sacrificó el día 9 después de la exposición. Se observaron síntomas patológicos tales como menor tamaño, momificación, esplenomegalia, petequias varias en riñón y vejiga urinaria y encefalitis no purulenta en los fetos procedentes de cerdas sacrificadas 2 semanas después de la exposición y en los fetos resultantes de los abortos. Se aisló el VPPC en la sangre y en todos los órganos de los fetos de este grupo. La vacunación de los cerdos con la formulación de vacuna E2his impidió la transmisión del VPPC de las cerdas a la descendencia.

#### **Ejemplo 10. Ensayo de protección rápida en cerdos vacunados con la formulación de vacuna E2his-CD154.**

Se tomaron cuatro grupos de 6 cerdos cada uno (en las mismas condiciones que en el Ejemplo 8) y se aplicó la formulación de vacuna con las siguientes cantidades de antígeno: 50 µg de E2his-CD154 (Grupo D), 80 µg de E2his-CD154 (Grupo E) y 50 µg de E2his (Grupo F). Se tomó el Grupo G como placebo. Se formularon los antígenos en una emulsión de "aceite en agua" se inocularon 2 ml por inyección IM, inoculándose el grupo de placebo con adyuvante sin proteínas. Se aplicaron las vacunas en una sola dosis. Los animales se expusieron, el día 8 después de la inmunización, a través de inoculación IM con  $DL_{50} 10^5$  de cepa "Margarita" de VPPC. Se registraron los síntomas clínicos diarios durante el período de experimento y se tomaron muestras de sangre semanalmente para realizar análisis hematológico y cálculo de anticuerpos neutralizantes. De igual forma, se tomaron muestras de sangre en los días 1, 3, 5 y 7 posteriores a la vacunación para evaluar la respuesta celular inmunológica mediante ensayos de linfoproliferación y "actividad antiviral en el suero".

Tras la vacunación, se observaron síntomas clínicos normales sin reacciones adversas al inóculo. Se detectó un mayor recuento de linfocitos en los cultivos procedentes de animales vacunados con el antígeno E2-CD154 (Grupos D y E) y mitógeno fitohemaglutinina en el ensayo de linfoproliferación. Esta respuesta se bloqueó con Mab contra el dominio CD4, lo que indica que los linfocitos T auxiliares actuaron como mediadores en la respuesta inmunológica. Durante el ensayo, las muestras de linfocitos de los animales de los grupos F y G (placebo) no respondieron a la estimulación ni con mitógeno ni con VPPC (Fig. 8).

Se observaron altas titulaciones de interferón alfa en las muestras en los días 3, 5 y 7 posteriores a la vacunación con antígeno E2-CD154 de los grupos D y E. No obstante, no se detectó interferón en animales vacunados con antígeno E2his (Grupo F) ni en el grupo de placebo (G) durante el tiempo de los experimentos. Se realizó un "ensayo de actividad antiviral" frente a gastroenteritis transmisible en células PK-15. En los grupos D y E, se obtuvieron concentraciones de actividad antiviral de 1:512; no obstante, no se detectó protección antiviral en muestras de cerdos inmunizados con E2his ni en el grupo de placebo (Fig. 9). Con estos experimentos se determinó que el antígeno E2 acoplado a la molécula CD154 potencia la respuesta celular inmunológica frente al VPPC que está relacionada con la actividad inmunoestimulante de CD154.

#### **Ejemplo 11: Comparación de la cinética de los anticuerpos neutralizantes en cerdos vacunados con una sola dosis de formulaciones de vacuna que contiene E2his y E2his-CD154.**

Se tomaron tres grupos de 6 cerdos, de aproximadamente 20 kg de peso, serológicamente negativos contra el VPPC, de una piara sin enfermedad de PPC o historial de vacunación (3 años antes). Se suministró agua a los animales y alimento a discreción.

Se vacunó cada animal con 50 µg de E2his-CD154 en el Grupo H; 50 µg de E2his en el Grupo I y se tomó el Grupo J como placebo. Se formularon los antígenos en una emulsión de "aceite en agua" y se inocularon 2 ml mediante inyección IM, inoculándose el grupo de placebo con adyuvante sin proteínas. Se aplicó una sola dosis y se midieron los niveles de anticuerpos neutralizantes por un ensayo de unión a peróxido de neutralización (NPLA) durante 5 semanas después de la inmunización.

Se detectaron anticuerpos neutralizantes desde la segunda semana de inmunización, con titulaciones superiores a 1:50 (consideradas de protección), en los grupos vacunados con E2-CD154 y E2

5 his (H e I). No se detectaron anticuerpos en animales procedentes del grupo de placebo durante el ensayo. Las titulaciones de anticuerpo neutralizante de animales del grupo H (antígeno E2-CD154) fueron mayores que las del grupo inmunizado con el antígeno E2his en la segunda semana después de la inmunización. Estos resultados sugieren una estimulación mayor de la respuesta humoral en los animales del grupo H (Fig. 10).

Se llega a la conclusión de que la formulación de vacuna E2his-CD154 en un nivel de dosis de 50 µg es segura, inmunogénica e induce una respuesta humoral normal en cerdos vacunados cuando se compara con la formulación de vacuna E2his.

**Ejemplo 12: Ensayo de protección vertical en cerdas preñadas vacunadas con la formulación de vacuna E2his-CD154.**

5 Se seleccionaron diez cerdas con las mismas condiciones de salud y origen que las usadas en el ejemplo 8. Tras el destete, se indujo el ciclo estral por tratamiento hormonal y tres días después se inseminaron todas las cerdas. De manera simultánea, se inmunizó un grupo de 5 cerdas con 2 ml de formulación de vacuna de E2his-CD154 (80 µg/animal; composición empleada en el ejemplo 10 para el grupo E), por inyección IM detrás de la oreja, en el cuello. Se inmunizó el grupo de 5 cerdos restante con adyuvante como placebo. Se estudiaron las cerdas preñadas midiendo la triada clínica (temperatura, pulso cardíaco y frecuencia respiratoria) y se realizaron extracciones de sangre semanalmente para análisis hematológico y detección de anticuerpos neutralizantes contra el VPPC. Transcurridos dos meses de gestación, los animales se expusieron a una DL<sub>50</sub> de 10<sup>5</sup> de cepa "Margarita" del VPPC. Se sometió la sangre extraída a ensayo de viremia en los días 3 y 5 después de la exposición. Dos semanas más tarde, se sacrificaron las cerdas y se extrajeron los fetos para realizar el análisis virológico, morfológico y patológico. Durante el experimento, las cerdas tuvieron acceso al agua y alimento diario a discreción.

15 No se observaron casos de aborto ni cualquier otro síntoma clínico de PPC después de la inmunización. Así, la formulación de vacuna E2his-CD154, en una única inmunización, resultó segura en cerdas preñadas. Los animales vacunados desarrollaron concentraciones de anti-cuerpos neutralizantes específicos frente a VPPC de 1:50 a 1:16000.

20 Tras la prueba de exposición, no se observaron pirexia, leucopenia o trombocitosis en el grupo de cerdas vacunadas. En este grupo, los fetos presentaron un tamaño normal sin lesiones histopatológicas, determinadas mediante análisis morfométrico y de anatomía patológica. No se encontró VPPC en los leucocitos procedentes de las muestras sanguíneas tomadas en las madres vacunadas después de la prueba de exposición, ni en los órganos ni en la sangre de sus fetos.

25 Las cerdas del grupo de placebo presentaron pirexia, leucopenia y anorexia después de la prueba de provocación. Los fetos de este grupo presentaron tamaño reducido y mostraron lesiones histopatológicas compatibles con PPC, tales como esplenomegalia, petequias en riñón y vejiga urinaria, necrosis en el intestino; hemorragias varias en los órganos internos y encefalitis no purulenta. Se aisló el VPPC en todos los órganos y en la sangre de los fetos de este grupo. La vacunación de las cerdas preñadas con la formulación de vacuna E2his-CD154, aplicada en el esquema evaluado, impidió la transmisión del VPPC desde las cerdas hasta la descendencia.

Listado de secuencias

Listado de secuencia

<110> CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

35 <120> ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DE VACUNA PARA VIRUS DE PESTE PORCINA CLÁSICA

<130> P85767EP00

<150> PCT/CU2007/000008

40 <151> 2007-02-28

<150> CU 2006-0052

<151> 2006-02-28

45 <160>2

<170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

<211> 363

<212> PRT

<213> Virus de Peste Porcina Clásica

5 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1).. (363)

<223> Secuencia de polipéptidos del 363 aa correspondiente al segmento extra-celular E2 VPPC.

10 <400> 1

```

Lys Val Leu Arg Gly Gln Val Val Gln Gly Val Ile Trp Leu Leu Leu
 1          5          10
Val Thr Gly Ala Gln Gly Arg Leu Ala Cys Lys Glu Asp Phe Arg Tyr
          20          25          30
Ala Ile Ser Ser Thr Asn Glu Ile Gly Leu Leu Gly Ala Glu Gly Leu
          35          40          45
Thr Thr Thr Trp Lys Asp Tyr Asp His Asn Leu Gln Leu Asp Asp Gly
          50          55          60
Thr Ile Lys Ala Ile Cys Thr Ala Gly Ser Phe Lys Val Ile Ala Leu
 65          70          75          80
Asn Val Val Ser Arg Arg Tyr Leu Ala Ser Leu His Lys Gly Ala Leu
          85          90          95
Pro Thr Ser Val Thr Phe Glu Leu Leu Phe Asp Gly Thr Ser Pro Ser
          100          105          110
Ile Glu Glu Met Gly Asp Asp Phe Gly Phe Gly Leu Cys Pro Phe Asp
          115          120          125
Thr Ser Pro Val Val Lys Gly Arg Tyr Asn Thr Thr Leu Leu Asn Gly
 130          135          140
Ser Ala Phe Tyr Leu Val Cys Pro Ile Gly Trp Thr Gly Val Ile Glu
 145          150          155          160
Cys Thr Ala Val Ser Pro Thr Thr Leu Arg Thr Glu Val Val Lys Thr
          165          170          175

Phe Arg Arg Glu Lys Pro Phe Pro His Arg Lys Asp Cys Val Thr Thr
          180          185          190
    
```

Thr Val Glu Asn Glu Asp Leu Phe Tyr Cys Arg Leu Gly Gly Asn Trp  
 195 200 205  
 Thr Cys Val Lys Gly Glu Pro Val Ile Tyr Thr Gly Gly Leu Val Lys  
 210 215 220  
 Gln Cys Arg Trp Cys Gly Phe Asp Phe Asn Glu Pro Asp Gly Leu Pro  
 225 230 235 240  
 His Tyr Pro Ile Gly Lys Cys Ile Leu Ala Asn Glu Thr Gly Tyr Arg  
 245 250 255  
 Ile Val Asp Ser Thr Asp Cys Asn Arg Asn Gly Val Val Ile Ser Thr  
 260 265 270  
 Glu Gly Ser His Glu Cys Leu Ile Gly Asn Thr Ser Val Lys Val His  
 275 280 285  
 Ala Leu Asp Glu Arg Leu Gly Pro Met Pro Cys Arg Pro Lys Glu Ile  
 290 295 300  
 Val Ser Ser Glu Gly Pro Val Arg Lys Thr Ser Cys Thr Phe Asn Tyr  
 305 310 315 320  
 Thr Lys Thr Leu Arg Asn Lys Tyr Tyr Glu Pro Arg Asp Ser Tyr Phe  
 325 330 335  
 Gln Gln Tyr Met Leu Lys Gly Glu Tyr Gln Tyr Trp Phe Asp Leu Asp  
 340 345 350  
 Val Thr Asp His His Ser Asp Tyr Phe Thr Glu  
 355 360

<210> 2

<211> 210

5 <212> PRT

<213> Sus scrofa

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1).. (210)

<223> Dominio extra-celular CD154 de 210 aa obtenido tomando como patrón de secuencia el gen CD154 de cerdo "Sus scrofa" (AB040443)

<400> 2

Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val Phe Ile Lys  
 1 5 10 15  
 Thr Ile Gln Arg Cys Lys Gln Gly Glu Gly Ser Leu Ser Leu Leu Asn  
 20 25 30  
 Cys Glu Glu Ile Arg Ser Gln Phe Glu Asp Leu Val Lys Gly Ile Met  
 35 40 45  
 Gln Ser Lys Glu Val Lys Lys Lys Glu Lys Ser Phe Glu Met His Lys  
 50 55 60  
 Gly Asp Gln Asp Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Lys Thr Ala Ser Val Leu Gln Trp Ala Pro Lys Gly Tyr Tyr Thr  
 85 90 95  
 Leu Ser Thr Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Arg Gln Leu Ala Val  
 100 105 110  
  
 Lys Arg Gln Gly Ile Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser  
 115 120 125  
 Asn Arg Asp Ala Ala Gly Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu  
 130 135 140  
 Arg Ser Pro Ser Gly Ser Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr  
 145 150 155 160  
 His Ser Ser Ser Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly  
 165 170 175  
 Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp  
 180 185 190  
 Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu  
 195 200 205  
 Lys Leu  
 210

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un antígeno de vacuna de proteína quimérica contra el Virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC), que comprende una subunidad viral como inmunógeno fusionado o conjugado químicamente a una proteína estimuladora del sistema inmunológico, en el que la subunidad viral es el segmento extracelular de la glucoproteína E2 de la cubierta viral del VPPC y en el que la proteína estimuladora del sistema inmunológico es el segmento extracelular de la molécula CD154.
- 10 2. El antígeno quimérico de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el segmento extracelular de la molécula CD154 puede proceder de cualquier mamífero.
- 10 3. El antígeno quimérico de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** la secuencia de aminoácidos del segmento extracelular de la glucoproteína E2 procedente del VPPC es la Sec. ID. N°: 1, y el segmento extracelular de la molécula CD154 porcina es la Sec. ID. N°: 2.
- 15 4. El antígeno quimérico de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que puede obtenerse por vía recombinante, sintética o por medio de conjugación química.
- 15 5. El antígeno quimérico de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que puede obtenerse partiendo de leche de mamíferos no humanos modificados genéticamente que expresa el antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en las células epiteliales mamarias.
- 20 6. El antígeno quimérico de vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, que puede obtenerse partiendo de leche de mamíferos no humanos no transgénicos, por medio de transformación genética directa de la glándula mamaria.
- 20 7. El antígeno quimérico de vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la transformación genética directa de la glándula mamaria puede obtenerse empleando vectores adenovirales.
- 25 8. El antígeno quimérico de vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, que puede obtenerse partiendo de leche de mamíferos transgénicos no humanos que expresa el antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en las células epiteliales mamarias.
- 30 9. El antígeno quimérico de vacuna de acuerdo con la reivindicación 4, que puede obtenerse partiendo de levaduras modificadas genéticamente que expresan el antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 30 10. Una formulación de vacuna capaz de producir una respuesta inmunológica protectora contra el VPPC, **caracterizada porque** contiene los antígenos quiméricos descritos en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso como un medicamento.
11. La formulación de vacuna para su uso como medicamento de acuerdo con la reivindicación 10, para administrar a animales por vía sistémica o mucosa.

Figura 1

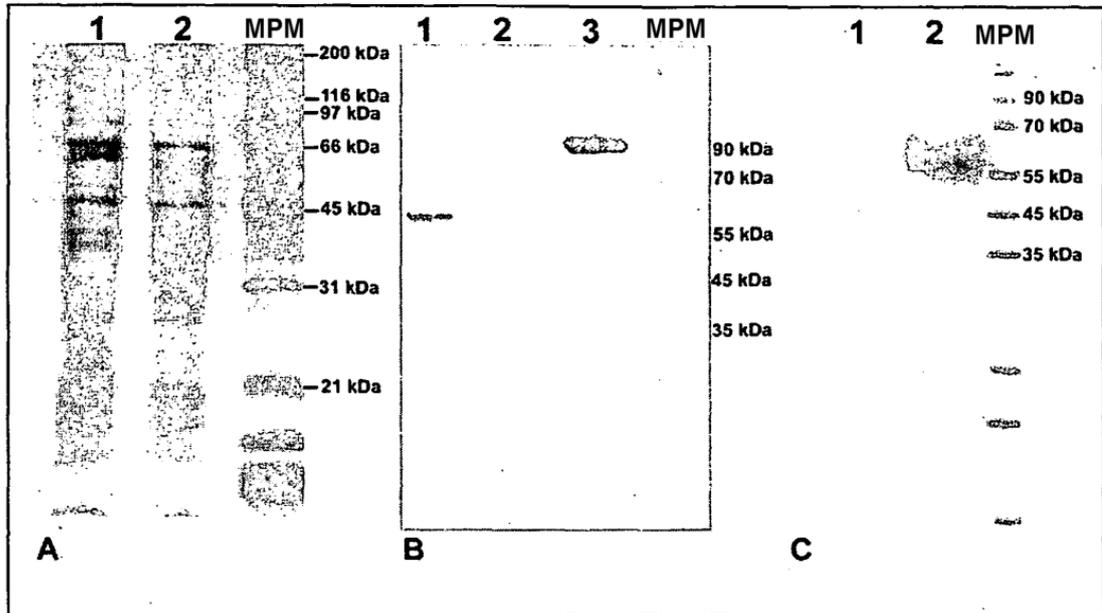


Figura 2

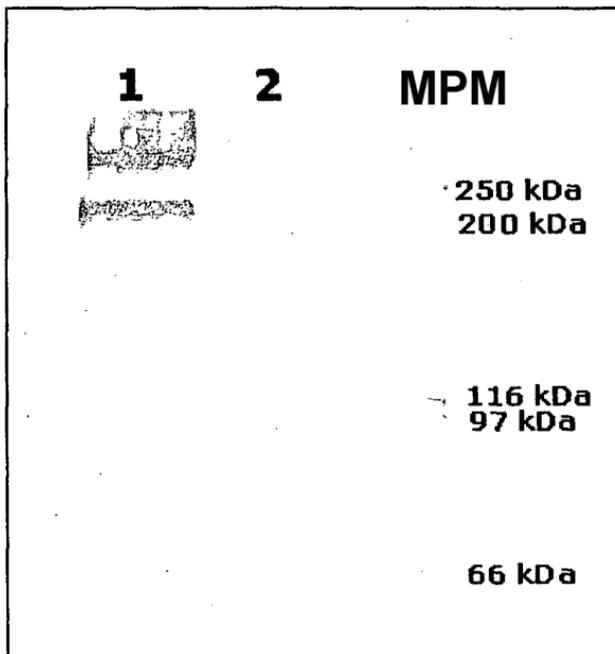


Figura 3

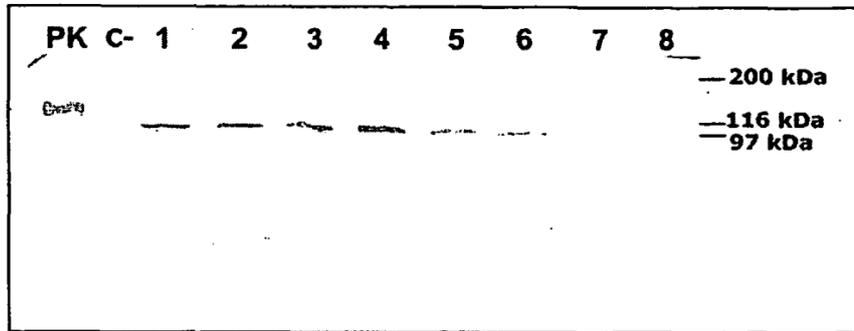


Figura 4

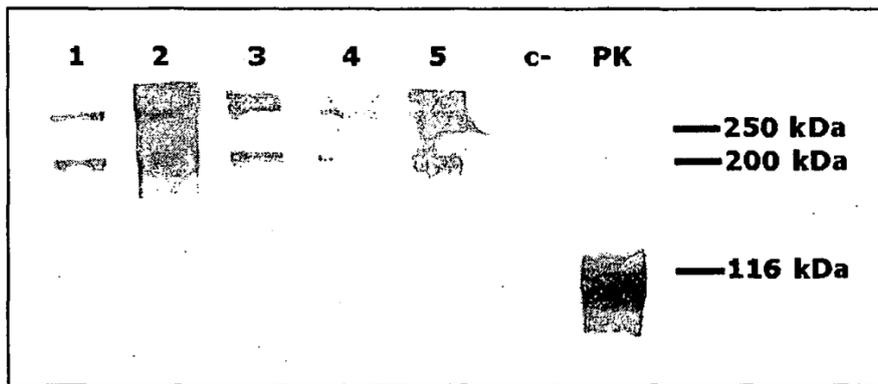


Figura 5

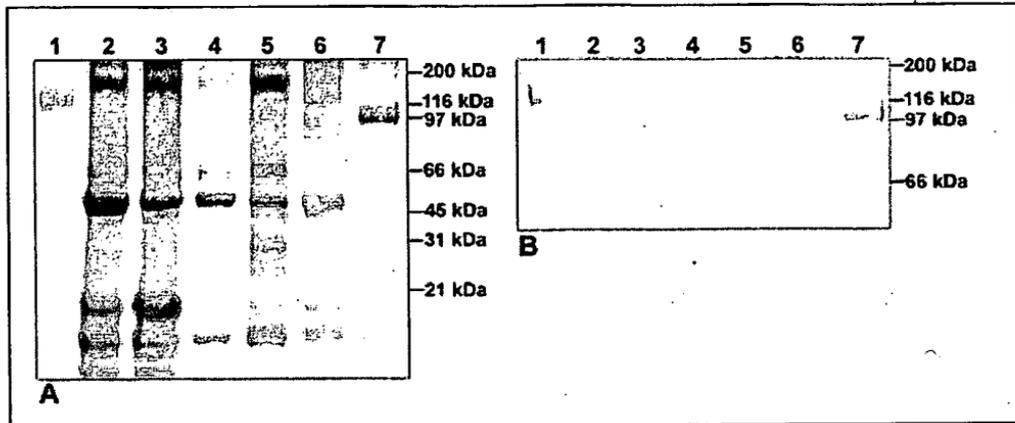


Figura 6

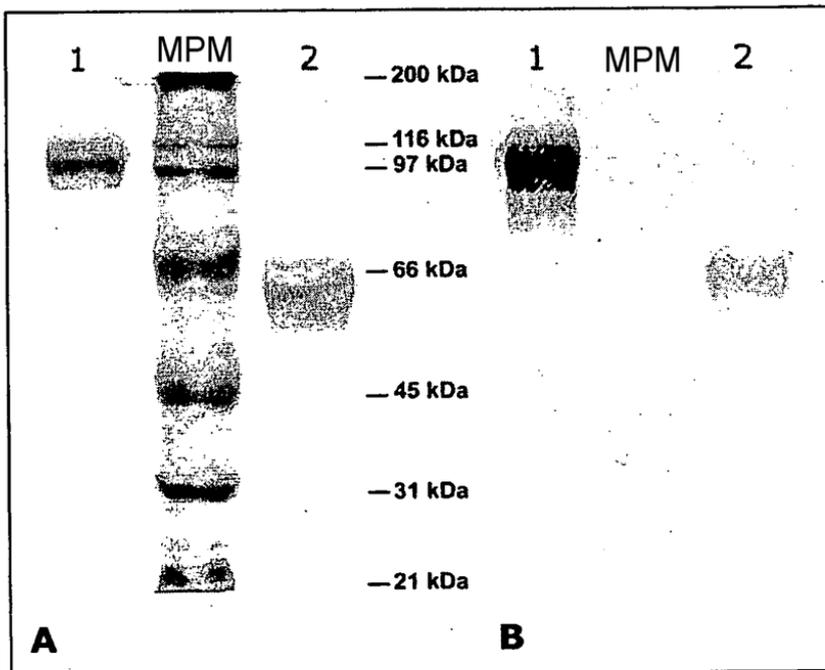


Figura 7

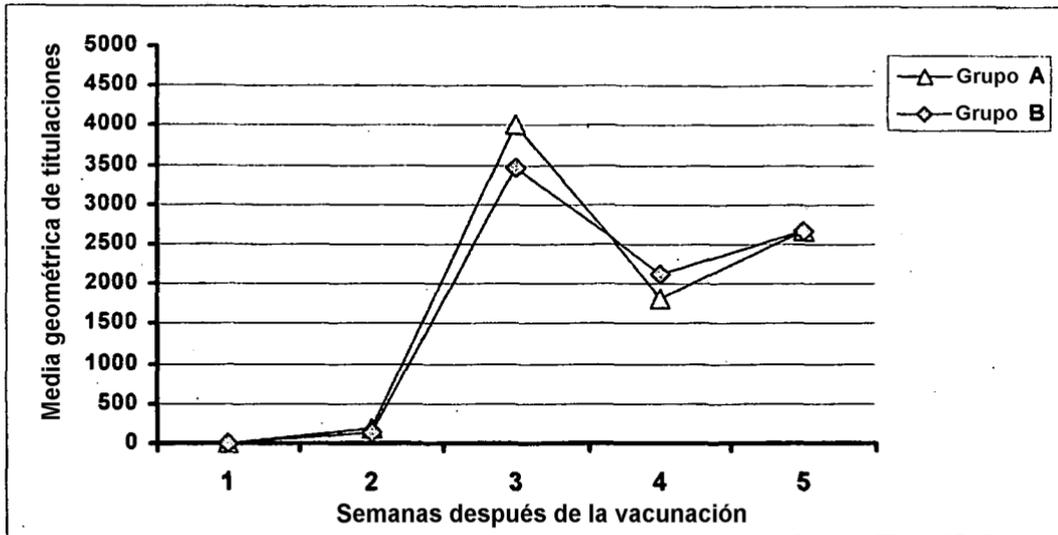


Figura 8

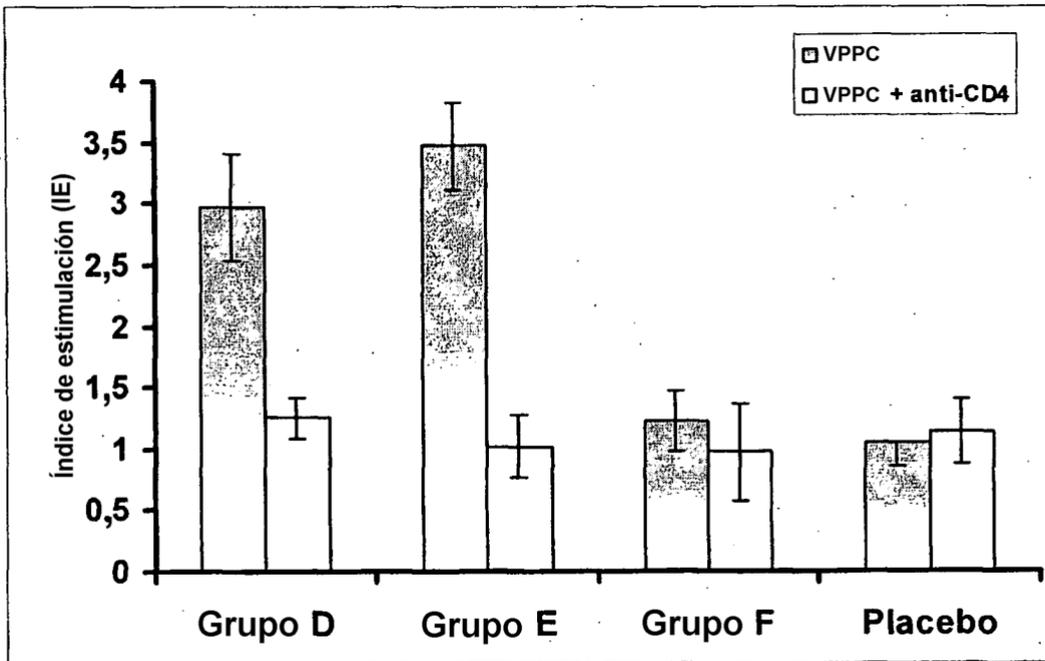


Figura 9

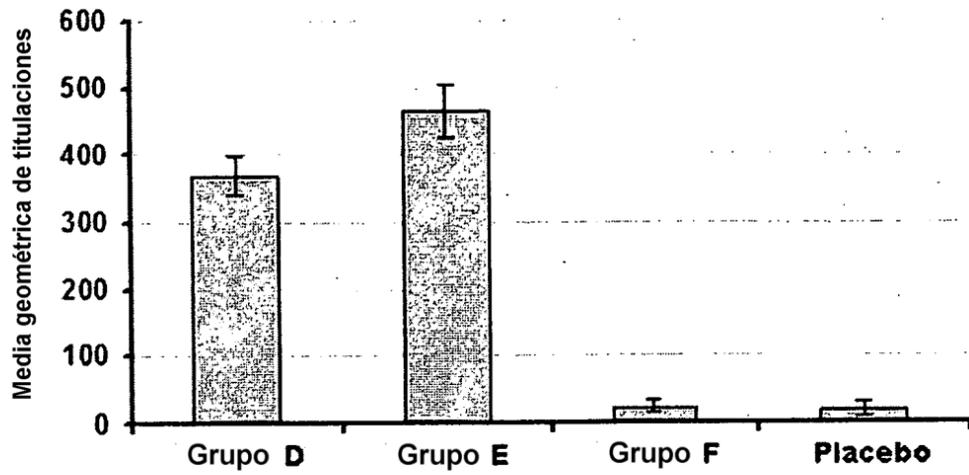


Figura 10

