

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 276**

21 Número de solicitud: 201131597

51 Int. Cl.:

C12N 15/34 (2006.01)

A61K 39/187 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

04.10.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.04.2013

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓ CENTRE DE RECERCA EN SANITAT
ANIMAL (100.0%)
Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de
Bellaterra
08193 Cerdanyola del Valles (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, Fernando;
MARQUÉS ARGILAGUET, Jordi;
PÉREZ MARTÍN, Eva;
ACCENSI ALEMANY, Francesc;
LACASTA MARÍN, Anna;
LÓPEZ MONTEAGUDO, Paula y
BALLESTER DEVIS, María**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

54 Título: **UTILIZACIÓN DE UNA CONSTRUCCIÓN GENICA Y/O PEPTÍDICA PARA LA FABRICACIÓN DE UNA VACUNA PARA LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA).**

57 Resumen:

Utilización de una construcción génica y/o peptídica para la fabricación de una vacuna para la prevención y/o tratamiento de la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA).

La presente invención se refiere a la utilización de una construcción génica y/o peptídica para la fabricación de una vacuna para la prevención y/o tratamiento de la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA). Así mismo, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica y a una vacuna que comprenden la construcción génica y/o peptídica.

ES 2 401 276 A1

DESCRIPCIÓN

Utilización de una construcción génica y/o peptídica para la fabricación de una vacuna para la prevención y/o tratamiento de la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA)

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los virus, en particular al virus de la peste porcina africana (VPPA).

Antecedentes de la invención

Una de las enfermedades que mayores pérdidas económicas causa en los países que la sufren es la peste porcina africana, por su repercusión en el ganado porcino y lo que conlleva para la cadena alimenticia. A pesar de que la enfermedad ha estado limitada en la última década a los países del África subsahariana, con la excepción de la isla de Cerdeña, desde el año 2007 ha reentrado en el continente Europeo y desde entonces está en continua expansión. Actualmente, el riesgo de que la enfermedad resulte endémica para el Cáucaso es muy elevado y la amenaza de que se extienda a la Unión Europea aumenta día a día (www.fao.org). El hecho de que el virus que causa esta enfermedad (el VPPA) infecte tanto cerdos domésticos como salvajes (jabalíes), así como a garrapatas del género *Ornithodoros* complica aún más su control.

Actualmente no existe ninguna vacuna ni tratamiento eficaz contra esta enfermedad. La única medida de control consiste en el diagnóstico eficaz de los brotes y el sacrificio de todos los animales afectados o en contacto con el virus, medida cada día más discutida desde el punto de vista ético y económico y del todo inviable en los países más pobres.

Mediante la presente invención se consigue una consistente protección frente a la infección letal con el VPPA (en el ejemplo aquí presentado, la protección se consiguió inicialmente mediante la vacunación con ADN). Aunque la protección sólo afecta a una proporción de los animales vacunados experimentalmente, nuestros datos permiten ser muy optimistas en cuanto al futuro diseño de vacunas más "universales" frente al VPPA.

Las vacunas ADN se basan en la inmunización con un plásmido que contiene la información genética de uno o varios genes o fragmentos de genes que codifican proteínas (o fragmentos de proteínas) inmunogénicas de uno o más patógenos determinados, frente al que (o a los que) se desea inducir una respuesta inmune protectora en el sujeto vacunado. Dicho plásmido actúa como un vector que vehiculiza la introducción de la información genética de interés al interior de las células del hospedador para su expresión, procesamiento y presentación al sistema inmune, en lo que sería una imitación de lo que ocurre durante la infección con el patógeno completo. La respuesta inmune generada, humoral y/o celular, prepara al sujeto vacunado para contrarrestar una infección con el patógeno, de manera que su utilización de forma profiláctica constituye una potencial herramienta a aplicar, sobre todo en aquellas enfermedades que requieren ambas ramas de la respuesta inmune, tales como las causadas por virus.

Los presentes inventores han identificado que la protección conferida (en nuestro ejemplo, tras la vacunación con ADN codificando tres antígenos virales), viene mediada por la fracción extracelular de la hemaglutinina del VPPA (secuencia de aminoácidos comprendida entre las posiciones 21 y 204 de la hemaglutinina del VPPA; a partir de ahora referida como sHA), y sorprendentemente además, que dicha protección viene mediada por la inducción de una respuesta T-CD8 citotóxica específicamente dirigida contra al menos 3 péptidos concretos de la sHA (secuencias R2F3, R3A3 y R3A6). No obstante es posible que puedan existir otras secuencias a las que se pueda dirigir la respuesta T-CD8 citotóxica. La utilización de estos tres péptidos sintéticos como vacuna ratificó su potencial protectoro frente al desafío con el VPPA.

A pesar de que el potencial protectoro de la Hemaglutinina completa del VPPA, ya había sido descrito con anterioridad por nuestro grupo (Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus, Ruiz-Gonzalvo F, Rodríguez F, Escribano JM. *Virology*. 1996; 218:285-9.), ésta fue obtenida tras inmunizar a los animales con células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante expresando la hemaglutinina completa, y en presencia del adyuvante de Freund. Además de resultar inviable su utilización en el campo, no se identificó ninguna secuencia concreta de la hemaglutinina completa como responsable de dicha protección, ni los mecanismos exactos responsables de la misma, ni mucho menos se evaluó la inducción de una respuesta T- específica en los animales.

Del mismo modo, y a pesar de que la sHA (la misma que aquí se utiliza), ya había sido utilizada con anterioridad en experimentos de inmunización en cerdos, únicamente había sido incluida como adyuvante inmunológico (EMPLEO DE LA HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA COMO ADYUVANTE; PCT/ES2008/000264); es decir, para mejorar la respuesta inmunológica frente a otros antígenos distintos fusionados a ella.

La presente invención se basa en la utilización de la sHA, y/o de los péptidos CTL en ella identificados en el diseño de vacunas contra la VPPA. Nuestras evidencias experimentales demuestran que para que la sHA resulte protectora, es estrictamente necesario que ésta induzca una respuesta T-CD8 específica, algo que queda demostrado en la presente invención: a) con la fusión de ubiquitina a la sHA y b) Inmunizando con los péptidos (nonámeros) aquí descritos.

Evidencias experimentales disponibles en el laboratorio demuestran que el poder adyuvante requiere la presencia intacta de la sHA, mientras que para la inducción de una respuesta T-citotóxica, la sHA ha de ser degradada intracelularmente.

5 Un primer objetivo de la presente invención es obtener una construcción génica o péptidica que puedan ser utilizadas para la obtención de una vacuna frente al VPPA, de manera que se pueda prevenir y/o tratar la infección por dicho virus.

Un segundo objetivo de la presente invención es obtener una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de la infección causada por el virus VPPA.

10

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1A) representa el porcentaje de supervivencia a la infección letal con VPPA tanto en el grupo de los animales inmunizados con pCMV-UbsHAPQ como en el grupo control y la figura 1B) Cinética de depleción de células T-CD8 detectada en ambos grupos de animales tras la infección con VPPA. Únicamente los animales supervivientes (inmunizados con pCMV-UbsHAPQ) muestran un pico de expansión de células T-CD8 observado a día 3 post-infección y la recuperación de éste subset celular.

20 La figura 2A) representa el número de células T específicas por cada millón de PBMCs, presente en los animales supervivientes (inmunizados con pCMV-UbsHAPQ) a la infección con el VPPA. La frecuencia de células T específicas frente a cada uno de los péptidos identificados dentro de la secuencia de la sHA se midió mediante un ELISPOT de IFN γ . La figura 2B representa el porcentaje de supervivencia a la infección letal con VPPA tanto en el grupo de los animales inmunizados con una mezcla de los tres péptidos sintéticos identificados en A, como en el grupo control.

25 Descripción de la invención

La presente invención se refiere en un primer aspecto a la utilización de una construcción **génica** que expresa un polipéptido que comprende la sHA del VPPA para la fabricación de una vacuna o composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA) o a una construcción génica que expresa un polipéptido que comprende la sHA del VPPA para utilizar en la fabricación de una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA).

35 En la presente invención, el término "comprende" o cualquiera de sus derivados, se refiere a un grupo abierto, es decir, no queda limitado por los elementos indicados a continuación del término "comprende" o cualquiera de sus derivados.

El término "VPPA", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere al virus de la peste porcina africana (VPPA) e incluye cualquier cepa de VPPA que circule, haya circulado o circule en el futuro independientemente de su procedencia geográfica, por ejemplo, la cepa española España 75 (E75), una cepa altamente virulenta o la cepa Georgia 2007 (secuenciada) circulante en Georgia (Chapman DA *et al.* Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerg Infect Dis.* 2011 Apr, 17(4): 599-605)) cuyo número de acceso del genoma completo es FR682468.1.

Preferiblemente, dicho dominio extracelular comprende por lo menos un péptido entre:

- 45
- a) el péptido R2F3 de SEC ID No. 1 (**SVDSPTITY**);
 - b) el péptido R3A3 de SEC ID No. 2 (**NCTNPILKY**);
 - c) el péptido R3A6 de SEC ID No. 3 (**TNGDILNYY**).

50 No obstante, no se excluye la posibilidad de que aparte de estos tres péptidos, en la sHA puedan existir otros péptidos con potencial protectorio.

En una realización preferida, dicha construcción génica comprende además uno o más adyuvantes. Preferiblemente, dicho uno o más adyuvantes son potenciadores de la presentación antigénica de los péptidos en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I). Más preferiblemente, dicho adyuvante es ubiquitina.

55 En otra realización, la construcción génica según cualquiera de las realizaciones de la presente invención está comprendida en un vector. Dicho vector puede ser un vector de almacenamiento, multiplicación o expresión, típicamente, un vector de expresión, y, si se desea, puede ser utilizado para transformar células u organismos susceptibles de ser transformados por dicho vector. Dichas células pueden ser procariontes o eucariotas. En una realización particular, el vector de la invención es un vector útil para transformar células eucariotas, por ejemplo, células del cerdo.

60 En una realización particular, el vector de la invención comprende una construcción génica de la invención operativamente unida a una secuencia reguladora de la expresión de dicha construcción génica constituyendo de este modo un "cassette" de expresión. "Operativamente unida" significa que la proteína codificada por dicha construcción génica, es expresada en el marco de lectura correcto bajo el control de las secuencias de control o reguladoras de

65

5 expresión. Las secuencias de control o reguladoras de expresión son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción de una proteína, e incluyen secuencias promotoras, secuencias codificantes para reguladores transcripcionales, secuencias de unión a ribosomas (RBS) y/o secuencias terminadoras de transcripción. Aunque, en una realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos procariotas, por ejemplo, bacterias, etc., ventajosamente, en otra realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos eucariotas, por ejemplo, células de mamífero (cerdo), líneas celulares de mamífero (cerdo), etc.

10 Adicionalmente, si se desea, el vector de la invención comprende, además, un marcador o gen que codifica un motivo o un fenotipo que permita la selección y/o localización de las células u organismos transformados con dicho vector.

15 En una realización particular, el vector de la invención es un plásmido que, cuando se introduce en una célula hospedadora, es reconocido por la maquinaria de transcripción celular permitiendo que el antígeno de interés se exprese. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de vectores de la en los que puede insertarse la construcción génica de la invención incluyen el vector pCMV comercializado por Clontech.

20 La obtención del vector de la invención puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook *et al.*, "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3].

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de una construcción **peptídica** que comprende la sHA del VPPA para la fabricación de una vacuna o composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA) o a una construcción peptídica que comprende la sHA del VPPA para utilizar en la fabricación de una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA).

Preferiblemente, dicho dominio extracelular comprende por lo menos un péptido entre:

- 30 a) el péptido R2F3 de SEC ID No. 1;
b) el péptido R3A3 de SEC ID No. 2;
c) el péptido R3A6 de SEC ID No. 3.

35 El término "péptido " o "construcción peptídica" , tal como se utiliza en esta descripción, incluye modificaciones post-traduccionales del péptido o proteína, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares.

En una realización preferida, dicha construcción peptídica comprende además uno o más adyuvantes. Preferiblemente, dicho uno o más adyuvantes son potenciadores de la presentación antigénica de los péptidos en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHCI). Más preferiblemente, dicho adyuvante es ubiquitina.

40 En otra realización preferida, la construcción génica según cualquiera de las realizaciones de la presente invención, o la construcción peptídica según cualquiera de las realizaciones de la presente invención o el vector tal como se define en la presente invención, están contenidos en una célula hospedadora. Dicha célula hospedadora de la invención es capaz de expresar la construcción peptídica de la invención y puede ser obtenida mediante transformación, transfección o infección con un vector de la invención, tal como se ha mencionado previamente, por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook *et al.*, 1989]. Células hospedadoras adecuadas incluyen células procariotas, levaduras o células eucariotas, más preferentemente, una célula presentadora de antígenos (CPA). Asimismo, algunos ejemplos de líneas celulares de mamíferos hospedadoras adecuadas incluyen pero no se limitan a células NS/0, células L, C127, 3T3, células de ovario de hámster chino (CHO), células embrionarias humanas de riñón (HEK-293), HeLa y BHK; células CV-1 (ATCC CCL70) y células COS-7, ambas derivadas de riñón de mono, etc. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula presentadora de antígenos (CPA), en particular, una célula dendrítica, un macrófago o una célula B, y, entre las células dendríticas, preferentemente, las células de Langerhans o células dendríticas foliculares, de la médula ósea o sanguíneas.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la construcción peptídica según las realizaciones de la presente invención, la construcción génica según las realizaciones de la presente invención, el vector según las realizaciones de la presente invención o la célula hospedadora según las realizaciones de la presente invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una vacuna que comprende una la construcción peptídica según las realizaciones de la presente invención, la construcción génica según las realizaciones de la presente invención, el vector según las realizaciones de la presente invención o la célula hospedadora según las realizaciones de la presente invención, que es útil para la prevención y/o el tratamiento de la infección causada por el VPPA.

65 Para su administración, la composición farmacéutica o la vacuna de la invención se presentarán en una forma farmacéutica de administración apropiada. Para ello, la, composición farmacéutica o la vacuna de la invención incluirán los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la elaboración de la forma de administración

5 elegida. La forma de administración del componente activo (construcción génica de la invención, vector de la invención, construcción peptídica de la invención o célula hospedadora de la invención) presente en la composición farmacéutica o vacuna de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo de posibilidades conocidas por los expertos en la materia, dependiendo, entre otros factores, de la naturaleza de dicho componente activo (ácido nucleico, proteína o célula) y de la vía de administración elegida. En este sentido, la composición farmacéutica o vacuna de la invención puede ser administrada a un sujeto por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, parenteral (intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea), intranasal, etc.

10 En una realización particular, la composición farmacéutica o vacuna de la invención comprende una construcción génica de la invención o un vector de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En este caso, dicha construcción génica o vector de la invención puede ser administrada en forma de un ADN desnudo (es decir, simplemente diluido en una solución fisiológica), administrado en cualquiera de sus posibles formas y utilizando las más diversas vías de inoculación (revisadas en la página web: www.dnavaccine.com). En general, para su administración a un sujeto, la construcción génica de la invención estará incluida en un vector de la invención apropiado para su administración a un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, dicho vector de la invención puede ser un vector viral, por ejemplo, un vector basado en un retrovirus, o en un adenovirus, etc., o un vector no viral, por ejemplo, un complejo ADN-liposoma, un complejo ADN-polímero, un complejo ADN-polímero-liposoma, etc. [véase "Nonviral Vectors for Gene Therapy", editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)]. Dichos vectores pueden ser administrados directamente al sujeto por métodos convencionales. Alternativamente, dichos vectores pueden ser utilizados para transformar, transfectar o infectar células, por ejemplo, células de mamíferos, *ex vivo*, y, posteriormente implantarlas en el cuerpo animal para obtener el efecto terapéutico deseado. Para su administración al sujeto receptor dichas células se formularán en un medio adecuado que no afecte adversamente a la viabilidad de dichas células.

25 La composición farmacéutica o vacuna de la invención puede ser formulada, a modo ilustrativo no limitativo, en una forma farmacéutica de administración sólida (no en el caso de la vacuna) (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, etc.) o líquida (por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.) para su administración por vía oral, parenteral (por ejemplo, intramuscular, subcutánea, intravenosa, etc.), etc. En cada caso se elegirán los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para la forma farmacéutica de administración y vía de administración elegida. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos, en general, y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

35 La composición farmacéutica o vacuna de la invención comprende, al menos, un componente activo, tal como una construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula hospedadora de la invención o una construcción peptídica de la invención, en una cantidad terapéuticamente efectiva. Tal como aquí se utiliza en la presente invención, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de componente activo calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias del componente activo y el efecto terapéutico a conseguir. Por tanto, la dosis de componente activo a administrar a un sujeto será una cantidad terapéuticamente efectiva y puede variar dentro de un amplio intervalo. La composición farmacéutica o vacuna de la invención se puede administrar una o más veces al día con fines preventivos o terapéuticos. La dosis de componente activo a administrar dependerá de numerosos factores, entre los que se incluyen las características del producto a administrar, tales como, por ejemplo, su actividad y vida media biológica, la concentración del producto en la composición farmacéutica, la forma farmacéutica de administración elegida, etc.

45 A modo simplemente ilustrativo, no limitativo, en una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar una o más veces al día, en una cantidad típica comprendida entre 100 µg y 1.000 µg de vector/sujeto, preferentemente, entre 200 µg y 800 µg vector/sujeto aunque pueden surgir variaciones dependiendo de la respuesta del sujeto individual a dicha composición farmacéutica, así como del tipo de la formulación farmacéutica elegida y del periodo de tiempo e intervalo en el cual se efectúa tal administración. La dosis de composición farmacéutica de la invención puede ser repetida, dependiendo del estado del sujeto y su evolución, a intervalos de tiempo (días, semanas o meses) que tendrán que ser establecidos en cada caso por el especialista. Por otro lado, a modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo, la composición vacunal de esta invención se administrará, en general, de una a hasta cuatro dosis máximas durante la vida del animal.

55 En la presente invención por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se pretende incluir cualquier vehículo, tal como cualquier vehículo acuoso, que sea adecuado para el uso fisiológico y farmacéutico. Este vehículo se selecciona del grupo que consiste de agua, soluciones salinas amortiguadas, tal como solución amortiguada con fosfato (PBS) o soluciones de cloruro de sodio amortiguadas con agentes tales como Tris, glicina u otros aminoácidos, en particular aminoácidos básicos, una solución acuosa que contiene alcohol, tal como etanol, propilenglicol, propanodiol, glicerol o manitol, así como también soluciones de azúcar, tales como soluciones de glucosa o lactosa o una mezcla de los diversos disolventes mencionados. Además, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" puede incluir diluyentes o materiales de relleno inertes, tales como sacarosa, sorbitol, azúcar, manitol, celulosa microcristalina, almidones inclusive almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, lactosa, fosfato de calcio, sulfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegración, por ejemplo derivados de celulosa inclusive celulosa microcristalina, almidones inclusive almidón de patata, croscarmelosa de sodio, alginatos o ácido algínico; agentes de enlace, por ejemplo sacarosa, glucosa, sorbitol, goma acacia, ácido algínico, alginato de sodio, gelatina, almidón,

almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, silicato de magnesio-aluminio, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol; y agentes de lubricación, inclusive sustancias deslizantes y antiadhesivos, por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados o talco.

La presente descripción también se refiere a un método de administración de una composición farmacéutica o vacuna según la presente invención, preferiblemente en una cantidad terapéuticamente eficaz, para la prevención y/o el tratamiento de la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA) en un cerdo con necesidad del mismo.

A continuación se ilustra la presente invención mediante ejemplos que no pretenden limitar el alcance de la invención.

Caracterización de los mecanismos de protección desencadenados por la vacunación con pCMV-UbsHAPQ y Caracterización del potencial inmunoprotector de la Hemaglutinina del VPPA.

Una vez llegada a la conclusión de que la inducción de anticuerpos no neutralizantes podría perjudicar más que beneficiar a los animales, y basándonos también en evidencias experimentales de otros grupos que habían demostrado el potencial protector de las células T-CD8⁺ (CTL), decidimos diseñar una “vacuna a la carta” capaz de generar una buena respuesta CTL en ausencia de anticuerpos. Diseñamos así pues un nuevo prototipo de vacuna ADN: pCMV-UbsHAPQ, expresando los tres antígenos del VPPA hasta ahora utilizados (p54, p30 y sHA), fusionados a ubiquitina, con el objetivo de promocionar la degradación intracelular del antígeno vacunal en el proteasoma, potenciar la presentación antigénica en clase I y la inducción de una respuesta CTL específica (ver CV anterior del IP). Ratificando la hipótesis de partida, la vacunación con pCMV-UbsHAPQ:

- a) no indujo anticuerpos *in vivo*
- b) Indujo una respuesta específica celular
- c) protegió parcialmente a los cerdos frente a la infección letal con el virus. El 33% de los cerdos vacunados con dos dosis de pCMV-UbsHAPQ sobrevivieron a la infección, recuperándose totalmente de la infección (Figura 1 A).
- d) La protección correlacionaba totalmente con la expansión de un gran número de células T-CD8⁺, coincidiendo con la ausencia de virus en sangre (Figura 1B).

Identificación de epítomos T-CD8⁺ protectivos en la HA

Con el objetivo de identificar la especificidad de las células T-CD8⁺ estimuladas, se realizó un ensayo de estimulación *in vitro* usando como células efectoras del ensayo, células mononucleares de sangre (CMS) extraídas de los animales supervivientes. Como estimuladores en el ensayo, se utilizó un panel de 53 péptidos (de 9 aminoácidos de longitud cada uno de ellos), seleccionados computacionalmente a partir de la secuencia aminoacídica de la fusión sHAPQ. La lectura del ensayo se realizó mediante en un ensayo de ELISPOT de IFN γ . De todos los péptidos seleccionados *in silico*, sólo 3 fueron capaces de estimular una respuesta de IFN γ detectable por encima del fondo (o ruido), provocado por un péptido irrelevante. Curiosamente, los 3 péptidos seleccionados mapearon en la sHA del virus, y ninguno de ellos en los otros tres antígenos incluidos en la vacuna: p54 y p30. Los péptidos mostraron un claro patrón de dominancia, siendo claramente dominante la respuesta frente al péptido R2F3 (**SVDSPTITY**), capaz de estimular a más de 200 células T a secretar IFN γ , y siendo las respuestas frente a los péptidos R3A3 (**NCTNPILKY**) y R3A6 (**TNGDILNYY**) subdominantes respecto al primero (Figura 2 A).

La capacidad de todos estos péptidos de unirse a fibroblastos primarios obtenidos a partir de la piel (células que expresan MHCI en su superficie) de estos mismos animales supervivientes y actuar como presentadores de antígeno a las CMS autólogas en ensayos de ELISPOT (estimulan a las células T-CD8⁺ a secretar IFN γ), ratifican su potencial como epítomos CTL (no mostrado, gráfico casi idéntico al mostrado en Figura 2A).

Finalmente y con el objetivo de demostrar su potencial protector, se realizó un experimento preliminar de inmunización con los péptidos sintéticos R2F3, R3A3 y R3A6 (utilizando dos dosis de 60microgramos (20 microgramos de cada uno) cada una en presencia de adyuvante de Freund). Mientras que todos los animales control (6 de 6) sucumbieron al desafío letal con el virus E75, uno de los 5 animales vacunados con R2F3, R3A3 y R3A6, sobrevivió a la infección con la misma dosis letal de virus (Figura 2B).

Este resultado demuestra definitivamente la capacidad protectora de los epítomo R2F3, R3A3 y R3A6, a pesar de que el protocolo de inmunización utilizado es a todas luces subóptimo, principalmente debido a la inestabilidad *in vivo* con péptidos solubles tan pequeños. Experimentos preliminares inmunizando con el péptido R2F3 a KLH (molécula más compleja que actúa como adyuvante), ratifican el potencial protector de R2F3.

Actualmente estamos generando nuevas construcciones plasmídicas que permitan expresar el péptido como una fusión a ubiquitina y potenciar así las respuestas T-CD8 generadas.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Utilización de una construcción génica que expresa un polipéptido que comprende la sHA del VPPA para la fabricación de una vacuna o una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA).
- 10 2.- Utilización, según la reivindicación 1, en la que dicho dominio extracelular comprende por lo menos uno entre:
- a) el péptido R2F3 de SEC ID No. 1;
 - b) el péptido R3A3 de SEC ID No. 2;
 - c) el péptido R3A6 de SEC ID No. 3.
- 15 3.- Utilización según la reivindicación 1 ó 2, que además comprende uno o más adyuvantes.
- 15 4.- Utilización según la reivindicación 3, en la que dicho uno o más adyuvantes son potenciadores de la presentación antigénica de los péptidos en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHCI).
- 20 5.- Utilización según la reivindicación 4, en la que el adyuvante es ubiquitina.
- 20 6.- Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la que la construcción génica está comprendida en un vector.
- 25 7.- Utilización de una construcción peptídica que comprende la sHA del VPPA para la fabricación de una vacuna o una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA).
- 30 8.- Utilización según la reivindicación 7, en la que dicho dominio extracelular comprende por menos un entre:
- a) el péptido R2F3 de SEC ID No. 1;
 - b) el péptido R3A3 de SEC ID No. 2;
 - c) el péptido R3A6 de SEC ID No. 3.
- 35 9.- Utilización según la reivindicación 7 u 8, que además comprende uno o más adyuvantes.
- 35 10.- Utilización según la reivindicación 9, en la que dicho uno o más adyuvantes son potenciadores de la presentación antigénica de los péptidos en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHCI).
- 40 11.- Utilización según la reivindicación 10, en la que el adyuvante es ubiquitina.
- 40 12.- Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la construcción peptídica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 o el vector según la reivindicación 6, están contenidos en una célula hospedadora.
- 45 13.- Composición farmacéutica que comprende una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la construcción peptídica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, el vector según la reivindicación 6 o la célula hospedadora según la reivindicación 12, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 14.- Vacuna que comprende una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la construcción peptídica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, el vector según la reivindicación 6 o la célula hospedadora según la reivindicación 12.

FIGURA 1A

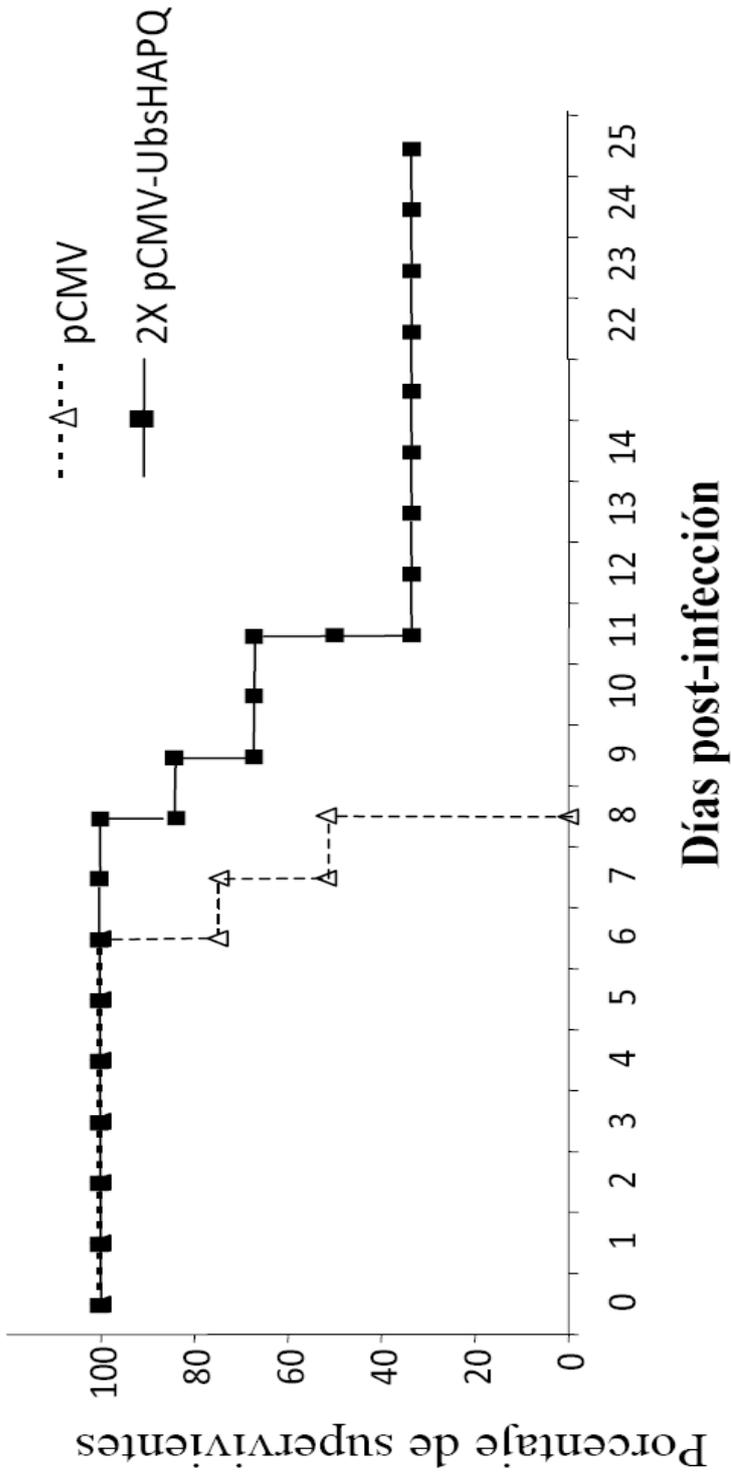


FIGURA 1B

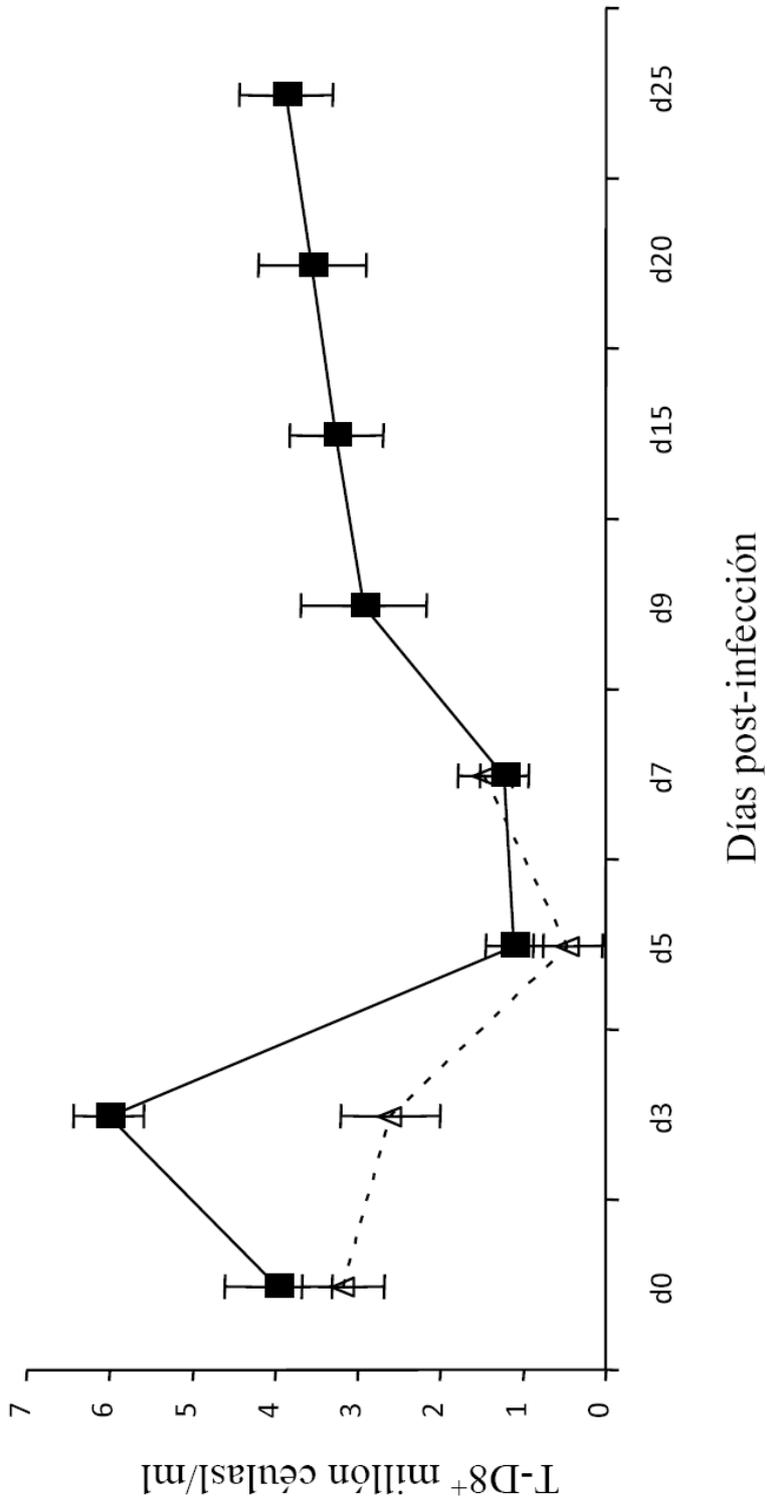


FIGURA 2A

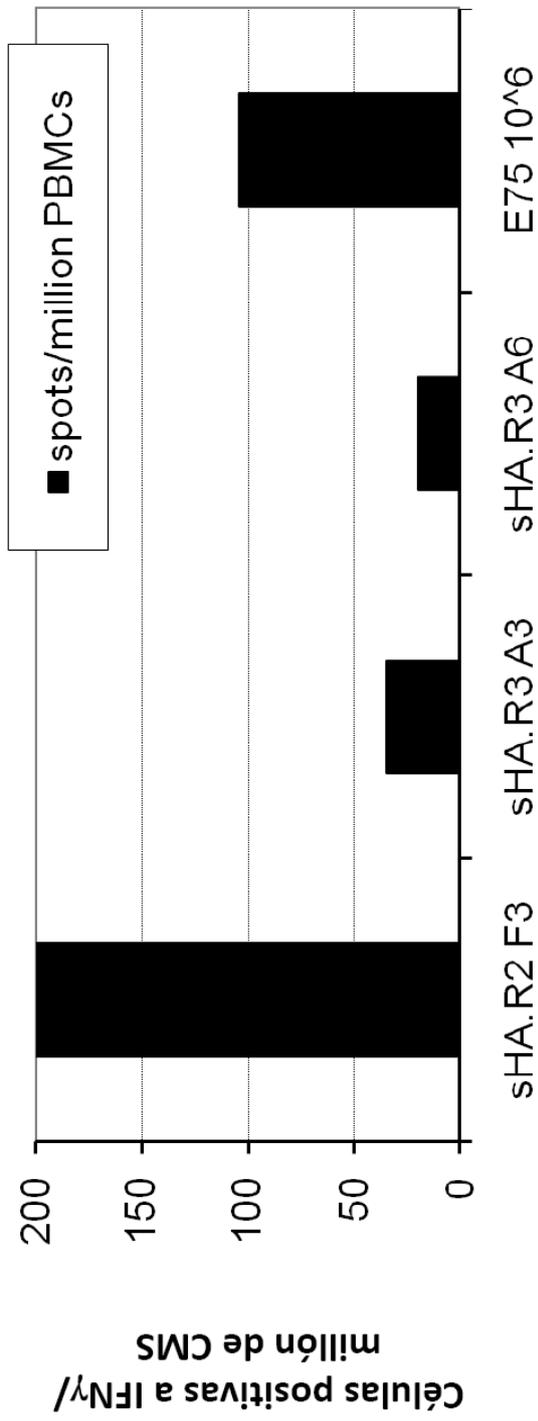
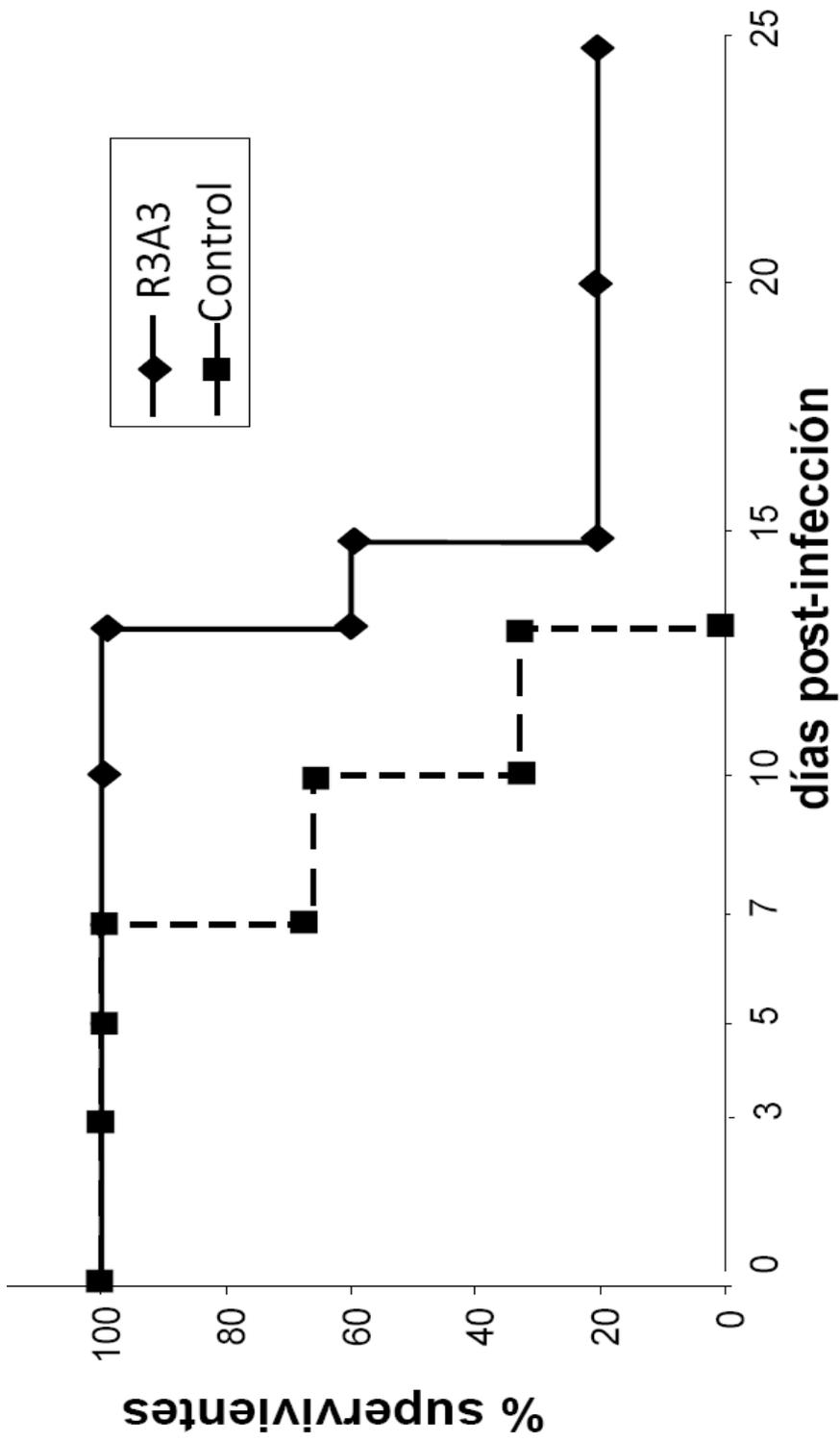


FIGURA 2B



ES 2 401 276 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUNDACIÓ CENTRE DE RECERCA EN SANITAT ANIMAL

- 5 <120>
CONSTRUCCIÓ GENICA Y/O PEPTÍDICA PARA LA OBTENCION DE UNA VACUNA PARA LA PREVENCIÓ Y/O
TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓ CAUSADA POR EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA)
- 10 <130> P26002ES00
<160> 3
<170> PatentIn version 3.3
- 15 <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
- 20 <220>
<223> Dominio extracelular de la hemaglutinina (HA) del virus de la
peste porcina africana (VPPA)
- 25 <400> 1
Ser Val Asp Ser Pro Thr Ile Thr Tyr
1 5
- 30 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
- 35 <220>
<223> Dominio extracelular de la hemaglutinina (HA) del virus de la
peste porcina africana (VPPA)
- 40 <400> 2
Asn Cys Thr Asn Pro Ile Leu Lys Tyr
1 5
- 45 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
- 50 <220>
<223> Dominio extracelular de la hemaglutinina (HA) del virus de la
peste porcina africana (VPPA)
- 55 <400> 3
Thr Asn Gly Asp Ile Leu Asn Tyr Tyr



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131597

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.10.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2337113 B1 (CENTRE DE RECHERCA EN SANITAT ANIMAL (CRESA)) 20.04.2010, página 3, líneas 5-65; página 11, línea 61 – página 13, línea 56; reivindicación 1.	1-14
A	RUIZ-GONZALVO F. et al. Functional and Immunological Properties of the Baculovirus-Expressed Hemagglutinin of African Swine Fever Virus. Virology. 1996. Vol 218, páginas: 285-289, página 285, todo el documento.	1-14
A	YAO Q. et al. Th Cell-Independent Immune Response to Chimeric Hemagglutinin/Simian Human Immunodeficiency Virus-Like Particles Vaccine. The Journal of Immunology. 2004. Vol. 173, páginas: 1951-1958, todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.03.2013

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/34 (2006.01)

A61K39/187 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR, EBI.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.03.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2337113 B1	20.04.0020
D02	RUIZ-GONZALVO F. et al. Virology. 1996. Vol. 218, páginas: 285-289.	1996
D03	YAO Q. et al. The Journal of Immunology. 2004. Vol. 173, páginas: 1951-1958.	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga el uso de una construcción génica que contiene la totalidad o parte de la secuencia codificante de la fracción soluble (sHA) de la hemaglutinina (HA) del virus de la peste porcina africana (VPPA), para la fabricación de una vacuna o composición farmacéutica para prevención y/o tratamiento de la infección causada por dicho virus (reivindicaciones 1-12). Así mismo, la invención se refiere a una composición farmacéutica y a una vacuna que comprenden dicha construcción génica y/o peptídica (reivindicaciones 13 y 14).

El documento D01 divulga el uso de la hemaglutinina del virus de la peste porcina africana como adyuvante para potenciar la respuesta inmune en humanos. Así mismo, divulga una construcción génica que contiene la totalidad o parte de la secuencia codificante de la hemaglutinina del VPPA fusionada a la secuencia codificante de un antígeno (ver página 3, líneas 5-65; página 11, línea 61 - página 13, línea 56; reivindicación 1).

El documento D02 divulga las propiedades inmunológicas de la hemaglutinina completa del VPPA. Un estudio realizado con cerdos inmunizados con un baculovirus recombinante, que porta el gen de la HA del VPPA, muestra que estos animales desarrollan una inhibición de la aglutinación, así como anticuerpos que los protegen de infecciones letales (ver todo el documento).

El documento D03 divulga el efecto adyuvante de la hemaglutinina del virus de la gripe incorporada a partículas virales del virus HIV de simio (SHIV VLPs). Un estudio realizado con partículas SHIV VLPs y con las moléculas quiméricas HA/SHIV VLPs, muestra que tras su administración, a ratones deficientes en células CD4+, las moléculas quiméricas con hemaglutinina incorporada, inducen una mayor respuesta de anticuerpos; sugiriendo así que el papel adyuvante de la hemaglutinina del virus de la gripe puede considerarse como una nueva estrategia para el desarrollo de vacunas más efectivas destinadas a pacientes con SIDA y bajo nivel de células CD4+ (ver todo el documento).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

La presente invención divulga el uso de una construcción génica que contiene la totalidad o parte de la secuencia codificante de la fracción sHA de la hemaglutinina del virus de la peste porcina africana (VPPA), para la fabricación de una vacuna o composición farmacéutica para prevención y/o tratamiento de la infección causada por dicho virus. Así mismo, la invención se refiere a una composición farmacéutica y a una vacuna que comprenden dicha construcción génica y/o peptídica.

1.1. REIVINDICACIONES 1-14

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa el uso de una construcción génica que contiene la totalidad o parte de la secuencia codificante de la hemaglutinina (HA) del virus de la peste porcina africana (VPPA), para la fabricación de una composición farmacéutica para potenciar la respuesta inmune en humanos.

La diferencia entre D01 y la presente invención radica en que en el citado documento a las moléculas de hemaglutinina (HA) se les atribuye una función adyuvante, debiendo ir unidas a un antígeno para su uso en una composición farmacéutica para potenciar la respuesta inmune en humanos. Sin embargo, la presente invención se basa en el uso de la fracción soluble (sHA) de la hemaglutinina del VPPA y/o de los péptidos CTL en ella identificados para elaborar una composición farmacéutica o vacuna; por lo que se considera que proporciona unas composiciones nuevas, alternativas a lo divulgado en el estado de la técnica, para prevención y/o tratamiento de la infección causada por el virus de la peste porcina africana.

En consecuencia, según lo divulgado en D01 las reivindicaciones 1-14 cumplen con el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

Los documentos D02 y D03 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.