

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 965**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**C07K 14/18** (2006.01)

**C12N 15/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2011 PCT/EP2011/002624**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011 WO11144360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2011 E 11724548 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2571519**

54 Título: **Vacuna marcadora contra la peste porcina clásica**

30 Prioridad:

**22.03.2011 EP 11159207**  
**17.12.2010 EP 10075760**  
**17.12.2010 EP 10075759**  
**18.05.2010 EP 10075206**  
**18.05.2010 EP 10075205**  
**18.05.2010 EP 10075207**  
**18.05.2010 DE 102010017006**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.12.2016**

73 Titular/es:

**IDT BIOLOGIKA GMBH (100.0%)**  
**Am Pharmapark**  
**06861 Dessau-Rosslau, DE**

72 Inventor/es:

**BEER, MARTIN;**  
**BLOME, SANDRA y**  
**LEIFER, IMMANUEL**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 593 965 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

Vacuna marcadora contra la peste porcina clásica

- 5 La invención se refiere a una vacuna marcadora para el tratamiento preventivo de la peste porcina clásica que comprende virus modificados de la peste porcina clásica vivos atenuados. En una realización de la invención, la vacuna marcadora se caracteriza porque la secuencia de nucleótidos vírica, que codifica para el epítipo TAV, y/o la secuencia de aminoácidos del epítipo TAV comprenden una secuencia diferente de un virus de la peste porcina asociado con la enfermedad, de modo que los sujetos que presentan infección con el virus de la peste porcina asociada con la enfermedad pueden diferenciarse de los sujetos vacunados con la vacuna marcadora de la presente invención mediante procedimientos analíticos serológicos y/o genómicos.

## Antecedentes de la invención

- 15 La peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad animal epizootica que se produce a nivel mundial y tiene importancia política y relevancia económica (Vandeputte y Chappuis, 1999). La peste porcina clásica, también conocida como cólera porcina o plaga del cerdo, es una de las enfermedades de notificación obligatoria a nivel nacional, a nivel de la CE así como de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) de París tras su aparición en cualquier país miembro. La peste porcina clásica esta causada por un pequeño virus de ARN con envoltura del género *Pestivirus* perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Los hospedadores naturales del virus de la peste porcina son exclusivamente especies porcinas domésticas y salvajes (p. ej., el jabalí europeo).

La Unión Europea ha realizado muchos esfuerzos por erradicar la PPC a través de medidas rigurosas sin vacunación preventiva, que ha estado prohibida desde 1990. A pesar de la prohibición, la vacunación representa una opción aprobada a nivel legal como vacunación de urgencia en casos en los que aparece la peste porcina. En estos casos la vacunación debería producirse mediante uno de los planes de vacunación de urgencia, que han sido ratificados por la Unión Europea (véase el art. 19 de la Directiva del Consejo Europeo 2001/89/CE). Hasta ahora, Rumanía ha sido el único país en el se ha llevado a cabo una vacunación de urgencia. Los motivos de esta aplicación limitada recaen en las limitaciones técnicas de las vacunas marcadoras disponibles en este momento, así como en las restricciones de la eficacia de la vacuna, además de barreras comerciales relacionadas con animales vacunados de forma convencional (limitaciones para la comercialización nacional). La eficacia de las vacunas marcadoras aprobadas no puede compararse con las vacunas vivas modificadas que muestran ventajas significativas y dichas vacunas inactivadas o vacunas subunidades no están adaptadas en modo alguno para la vacunación de urgencia debido a una aparición de la inmunidad tardía y a la necesidad de revacunaciones.

35 Considerando la expansión de la Unión Europea a países de Europa del Este y la globalización cada vez mayor, se han descrito nuevas estrategias para una posible vacunación de urgencia, que serán útiles para evitar el sacrificio a gran escala de animales y las pérdidas económicas asociadas (Leifer y col., 2009). Por tanto, existe una demanda significativa de una vacuna altamente eficaz que permita la diferenciación serológica entre animales vacunados y no vacunados y, adicionalmente, muestre todas las ventajas de las vacunas vivas modificadas tradicionales.

Debido a que la primera generación de vacunas marcadoras, que se basaba en la glucoproteína E2 del virus de la PPC, tenía solo una disponibilidad restringida y desventajas graves como las condiciones de almacenamiento, costes y eficacia, existe una enorme demanda de nuevas vacunas marcadoras. Se han investigado varios candidatos a este tipo de vacunas, como vacunas de ADN, péptidos inmunogénicos, vacunas vector, mutaciones por delección y virus de la peste quiméricos (Beer y col., 2007; Dong y Chen, 2007). La mayoría de estos candidatos a vacunas marcadoras muestran la desventaja de que están producidos por métodos modernos de modificación genética. Debido al significativo temor del consumidor a los productos genéticamente modificados, además de los complicados procedimientos de admisión, las vacunas genéticamente modificadas muestran desventajas significativas.

Las vacunas tradicionales dirigidas frente al VPPC incluyen vacunas vivas modificadas. Estas vacunas son muy eficaces tras una única aplicación aunque no permiten la diferenciación entre animales vacunados e infectados en función de su perfil serológico. Muchas de estas vacunas se basan en la cepa vírica clásica "C" o un derivado de la misma (denominadas "vacunas de la cepa C"). Adicionalmente, existen vacunas que se basan en la cepa vírica japonesa "exultación de cobaya negativa (GPE-)", la cepa "Thival" y la cepa "PAV mejicana", todas las cuales han sido utilizadas tanto en ámbitos regionales como internacionales (Blome y col., 2006; Greiser-Wilke y Moennig, 2004; van Oirschot, 2003). Existen numerosos datos sobre el uso de las vacunas basadas en la cepa C. Es sabido que cuatro días después de la aplicación de la vacuna, puede comprobarse que existe una protección completa de los animales frente a una infección de provocación del VPPC virulento. Adicionalmente, siete días después de la

vacunación, se proporciona una protección completa frente a la transmisión vertical del virus de prueba en los animales portadores (de Smit y col., 2001).

La desventaja significativa de las vacunas vivas modificadas conocidas es la absoluta incapacidad para discriminar a nivel serológico entre los animales vacunados e infectados. A la vista de esto, una tarea de la presente invención es proporcionar una vacuna viva modificada que permita la discriminación entre animales vacunados e infectados.

En el área de las vacunas marcadoras, las denominadas vacunas de subunidades son conocidas en la técnica previa porque se basan en la glucoproteína E2 recombinante del VPPC. La prueba de discriminación para dichas vacunas es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), en el que se usan anticuerpos dirigidos frente a la glucoproteína E<sup>ms</sup> para detectar indirectamente infecciones por el virus de la PPC. En el momento actual, solo hay disponible en el mercado una vacuna de subunidades de E2; no obstante, se ha suspendido su autorización durante algunos meses (véase el informe de la EMA sobre las vacunas de subunidades de E2).

Independientemente de la imposibilidad de comercializar dichos productos, estos sistemas muestran graves desventajas biológicas. Una de estas desventajas es que son necesarias al menos dos inmunizaciones por vía parenteral antes de transmitir una protección completa, lo que hace que estas vacunas sean completamente incompatibles con las "vacunaciones administradas en cebo", donde se alimenta a los animales con una única dosis de cebo con la vacuna. Además, las campañas de vacunación de urgencia solo son razonables cuando no se consigue protección frente al VPPC natural en diversos experimentos usando las vacunas de subunidades de E2, no se consigue protección completa para la transmisión vertical. Una desventaja adicional de estos sistemas es que se utilizan anticuerpos dirigidos frente a la glucoproteína E<sup>ms</sup> para una diferenciación serológica y la sensibilidad y especificidad de dichos sistemas de ensayo eran solo moderadas en todas las ocasiones (Floegel-Niesmann, 2003).

Las vacunas de PPC vivas atenuadas son conocidas en la técnica aunque hasta la fecha se han visto dificultadas debido a diversas desventajas. La mayoría de las vacunas descritas en la técnica previa comprende ADN extraño y se generan usando procedimientos de ingeniería genética, conocida por otro lado como tecnología de ADN recombinante, que se asocian por tanto con problemas graves de evaluación del riesgo ambiental con el producto. Se conocen otras variantes de VPPC donde se han sustituido o eliminados aminoácidos del epítotope TAV natural (documento WO 2010/074575 A2). No obstante, los restos de aminoácidos y/o nucleótidos que se modifican en la presente invención no se han descrito o sugerido en la técnica previa.

Se han utilizado pases de cultivo múltiples para generar variantes de virus, que pueden usarse como vacunas, aunque previamente no se ha aplicado la presión de anticuerpos. Los pases múltiples de cultivos infectados por virus para generar variantes como se describe en la técnica previa están, por tanto, limitados por el hecho de tener que realizar un gran número de pases de cultivo y también por una falta de control sobre qué epítotope se va a modificar (Hulst y col.).

Kortekaas y col. describen una vacuna para PPC viva atenuada, genéticamente estable, que permite la diferenciación serológica entre animales infectados y vacunados. Se modificó genéticamente una cepa C mutada usando una estrategia dirigida, en la que se utilizó tecnología de ADN recombinante para introducir deleciones en la proteína E2 del VPPC. Posteriormente se adquirieron mutaciones adicionales en diversas localizaciones dentro del genoma vírico mediante múltiples pases para crear cepas que mostraban una proliferación potenciada. Las cepas descritas en Kortekaas y col. son virus modificados mediante ingeniería genética, lo que supone una desventaja significativa a la vista de los complicados procesos de admisión para la liberación de productos genéticamente modificados al entorno.

Holinka y col. describen la cepa del VPPC atenuado vivo con marcador antigénico doble "FlagT 4vn" que se obtuvo combinando dos determinantes genéticos de atenuación. FlagT4v es portador de un marcador antigénico positivo, el epítotope Flag sintético, introducido mediante una inserción 19mer en la glucoproteína E1; y de un marcador negativo resultado de las mutaciones del sitio de unión del epítotope del anticuerpo monoclonal WH303 (AcmWH303) en la glucoproteína E2. La administración intranasal o intramuscular de FlagT4v protegía a los cerdos frente a la cepa Brescia de VPPC virulenta en tiempo postinoculación temprano (2 o 3 días) y tardío (28 días). FlagT4v inducía una respuesta anticorporeal en cerdos que reaccionaba fuertemente contra el epítotope Flag pero no conseguía inhibir la unión del AcmWH303 a un péptido sintético que representaba el epítotope WH303. La vacuna descrita por Holinka se refiere a un virus modificado genéticamente que muestra ADN extraño en su genoma (secuencia Flag-Tag además de la secuencia y marcadores del vector asociados). Esto representa una desventaja significativa en comparación con la presente invención, en la que no se muestra ADN extraño ni recombinante.

En el documento WO 2007/143442 A2 se describen los efectos de las mutaciones dentro del epítotope WH303 de E2 del VPPC, que cambia la secuencia de aminoácidos del VPPC virulento Brescia progresivamente hacia la secuencia de aminoácidos homóloga de la cepa NADL de BVDV. Los animales infectados con virus mutantes estaban protegidos cuando se les inyectaba el virus virulento Brescia los días 3 y 21 después de la vacunación. La modificación en este sitio dentro del péptido WH303 también permite el desarrollo de una prueba diagnóstica para diferenciar a los animales vacunados de los infectados. A pesar de estos efectos, las mutaciones se introdujeron usando tecnología de ingeniería genética, introduciendo por tanto material genético extraño en la vacuna vírica.

En el estado del arte mencionado anteriormente se describen vacunas que se han modificado genéticamente mediante tecnología genética recombinante para producir cepas víricas. Como se describió anteriormente, las vacunas modificadas genéticamente son objeto de problemas de seguridad ambiental y, por tanto, se impide su desarrollo mediante protocolos de admisión complicados y al temor entre la población general, lo que proporciona, por tanto, una desventaja significativa para su uso.

## 15 Resumen de la invención

A la luz de la técnica previa el problema técnico que subyace a la presente invención es proporcionar una vacuna marcadora para cerdos domésticos y salvajes que proporciona protección frente al virus de la peste porcina clásica, lo que permite la diferenciación entre animales vacunados e infectados, producida preferiblemente mediante tecnologías convencionales. En una realización preferida la vacuna marcadora no se produce mediante tecnología de modificación genética recombinante.

Este problema se resuelve mediante las características de las reivindicaciones independientes. En las reivindicaciones dependientes se proporcionan realizaciones preferidas de la presente invención.

Por tanto, la invención se refiere a una vacuna marcadora para el tratamiento preventivo de la peste porcina clásica que comprende virus modificados de la peste porcina clásica vivos atenuados.

En una realización preferida, la invención además se refiere a una vacuna marcadora para el tratamiento profiláctico de la peste porcina clásica que comprende virus modificados de la peste porcina clásica vivos atenuados, caracterizada porque la secuencia vírica de aminoácidos del epítotope TAV de la proteína E2 comprende una secuencia diferente de la de un virus de la peste porcina clásica natural, donde la secuencia vírica de aminoácidos muestra al menos una de las siguientes sustituciones:

- 35 – sustitución del aminoácido 830 por valina,
- sustitución del aminoácido 833 por serina,
- sustitución del aminoácido 839 por glicina.

En una realización preferida la vacuna marcadora de la presente invención se caracteriza porque el virus modificado no muestra secuencias de ácido nucleico recombinantes.

En una realización preferida la vacuna marcadora de la presente invención se caracteriza porque la secuencia vírica de nucleótidos muestra una o más de las siguientes sustituciones:

- 45 – sustitución en el nucleótido de la posición 2862 por T,
- sustitución en el nucleótido de la posición 2870 por T,
- sustitución en el nucleótido de la posición 2889 por G.

En una realización preferida la vacuna marcadora de la presente invención se caracteriza porque la secuencia vírica de aminoácidos muestra una o más de las siguientes sustituciones:

- sustitución del aminoácido 426; en la proteína E<sup>RNS</sup>; por valina,
- sustitución del aminoácido 576; en la proteína E1; por histidina,
- sustitución del aminoácido 583; en la proteína E1; por ácido glutámico,
- 55 – sustitución del aminoácido 951; en la proteína E2; por isoleucina.

En una realización preferida la vacuna marcadora de la presente invención se caracteriza porque la secuencia vírica de nucleótidos muestra una o más de las siguientes sustituciones:

- sustitución en el nucleótido de la posición 1649 por G,
- sustitución en el nucleótido de la posición 2099 por C,
- sustitución en el nucleótido de la posición 2122 por G,
- sustitución en el nucleótido de la posición 3225 por T.

5

En una realización preferida la vacuna marcadora de la presente invención se caracteriza porque la secuencia vírica de aminoácidos del epítotope TAV comprende la secuencia de acuerdo con la SEC ID N. ° 3 o la SEC ID N. ° 4.

10 En una realización preferida la vacuna marcadora de la presente invención se caracteriza porque la secuencia vírica de nucleótidos comprende la secuencia de acuerdo con la SEC ID N. ° 1.

15 En otra realización la vacuna marcadora de la presente invención se caracteriza porque los sujetos tratados con la vacuna como se describe en este documento pueden diferenciarse de los sujetos infectados con el virus de la peste porcina asociado con la enfermedad a través del análisis de muestras biológicas obtenidas a partir de dichos sujetos usando procedimientos analíticos serológicos y/o genómicos.

20 En otra realización la vacuna marcadora de la presente invención se caracteriza porque el procedimiento analítico genómico se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), preferiblemente PCR en tiempo real, en el que se utilizan cebadores y/o sondas que reconocen tanto la secuencia vírica de nucleótidos modificada y/o asociada con la enfermedad.

25 En otra realización la vacuna marcadora de la presente invención se caracteriza porque el procedimiento analítico serológico se basa en un inmunoensayo enzimático (EIA), preferiblemente un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), en el que se utilizan anticuerpos que se unen específicamente al epítotope TAV bien modificado y/o asociado con la enfermedad.

30 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una vacuna marcadora, preferiblemente como se describe en este documento, que se obtienen mediante la generación de variantes de escape víricas de cepas víricas de la peste porcina asociadas con la enfermedad u otras conocidas mediante la aplicación de presión de anticuerpos.

35 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento de fabricación de una cepa de vacuna del virus modificado de la fiebre porcina clásica vivo atenuado, preferiblemente como se describe en este documento, que comprende la generación de variantes de escape de las cepas víricas de la peste porcina asociadas con la enfermedad y otras conocidas mediante la aplicación de presión de anticuerpos.

En una realización preferida el procedimiento de fabricación como se describe en este documento se caracteriza porque el procedimiento comprende:

- múltiples pases de células, preferiblemente células renales embrionarias de cerdo, infectadas con el virus de la peste porcina asociado con la enfermedad en cultivos celulares y
- aplicación simultánea de anticuerpos dirigidos frente al epítotope TAV de la proteína E2 del virus de la peste porcina asociada con la enfermedad y/o suero policlonal de conejos inmunizados con el péptido CTAVSPTTLRTEVVK.

45 La invención además se refiere a una composición farmacéutica que comprende la vacuna marcadora como se describe en este documento junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una vacuna marcadora como se describe en este documento para su uso como medicamento en el tratamiento preventivo) (vacunación, preferiblemente mediante inyección intramuscular o aplicación oral, de la peste porcina clásica.

55 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento preventivo (vacunación) de la peste porcina clásica que comprende la administración de la vacuna marcadora como se describe en este documento a un sujeto, preferiblemente un cerdo, preferiblemente mediante inyección intramuscular o aplicación oral.

Otra situación frecuente en la que la peste porcina clásica requiere vacunación es en respuesta a la detección de la infección vírica de campo en poblaciones porcinas. Cuando se produce una infección de los cerdos, de modo que aparece el virus de la peste porcina clásica en cerdos salvajes o domésticos, es necesaria una vacunación de urgencia de las poblaciones de cerdos circundantes y/o vecinas. Posteriormente, se llevan a cabo vacunaciones

durante un período de 1 a 2 años de todos los cerdos de la región circundante, tanto salvajes como domésticos, para evitar una epidemia o infección a gran escala por el virus de la peste porcina. La vacuna marcadora de la presente invención se adapta de forma ideal a una vacunación de urgencia en el caso de detección o epidemia de peste porcina. La vacuna marcadora facilita una administración rápida y eficaz a través de las vías orales, además de  
5 mediante inyección, y permite la discriminación entre animales infectados con el virus de campo (asociado con la peste) y la vacuna.

**Descripción detallada de la invención**

10 El desarrollo de la vacuna según se describe en la presente invención no se basa en procedimientos de modificación genético sino más bien en el principio de que un virus se modificará a sí mismo de forma adaptativa cuando se someta a presión selectiva con anticuerpos. Por tanto, la presente invención se refiere a una vacuna viva no genéticamente modificada que proporciona protección frente al VPCC, que muestra todos los requisitos de una vacuna marcadora (serológica y genéticamente diferenciada). La vacuna marcadora se diseñó aplicando la presión  
15 selectiva con anticuerpos a diferentes cepas C en cultivo celular. Las variantes generadas poseen preferiblemente tres cambios de aminoácido en el epítipo TAV de E2 y dos cambios compensatorios en la proteína E1. Se comprobó la estabilidad de estas variantes realizando más de diez pases de cultivo celular en rotatubos y, por ejemplo, vacunación intramuscular de cerdos que induce a una protección completa frente a una cepa de provocación altamente virulenta. Adicionalmente, el DIVA directo puede realizarse mediante técnicas serológicas y/o  
20 genéticas, por ejemplo mediante tinción de inmunofluorescencia diferenciada y sistemas de reacción en cadena de la polimerasa mediante transcripción inversa en tiempo real (rRT-PCR). También, podría obtener un DIVA indirecto optimizando ELISA para E2 comerciales (p. ej., cambiando los valores de exclusión) o desarrollando sistemas ELISA específicos de péptido de TAV. Por tanto, se presenta una vacuna marcadora viva no genéticamente modificada frente al VPPC.

25 La producción de la vacuna como se describe en la presente invención se lleva a cabo como sigue:

Las variantes de escape de la cepa C natural "Riems" se seleccionan en un sistema de cultivo celular (células de riñón de embrión de cerdo-IFN) mediante pases de cultivo del virus de la cepa C durante la aplicación de anticuerpos  
30 específicos para E2-TAV y suero policlonal de conejo inmunizado con el péptido CTAVSPTTLRTEVVK.

Los anticuerpos aplicados, además de los anticuerpos contenidos en el suero policlonal de conejo tratado con el péptido, reconocen el epítipo TAV en la proteína E2 del virus de la PPC específicamente, y mediante la unión a este epítipo se neutraliza el virus de la PPC (cepa C). El VPPC muestra una alta tasa de mutación debido a su ARN  
35 natural. Bajo la presión de selección de los anticuerpos neutralizantes proporcionados, se seleccionan los virus, que sufren mutación en el epítipo al que se unen los anticuerpos (en este caso, el epítipo de TAV), en el que se neutralizan los virus naturales sin variaciones. Mediante múltiples pases con diversas concentraciones y mezclas de anticuerpos y suero de conejo, pueden seleccionarse varias cepas aisladas del virus mutadas.

40 Se seleccionaron en primer lugar los virus con una sustitución en el epítipo de TAV. Mediante pases adicionales de estos virus bajo distintos tipos de presión de anticuerpos se seleccionó una cepa aislada, que muestra dos sustituciones en el epítipo TAV y una única sustitución compensatoria en la proteína E1 (la interacción entre E1 y E2 es importante para la estructura del virus). Estos virus se sometieron a una presión de anticuerpos adicional, que llevó al aislamiento de virus con tres sustituciones en el epítipo TAV además de dos sustituciones compensatorias  
45 en la proteína E1. Los virus resultantes (cepa C "Riems" Q7, cepa C "Riems" S10 y cepa C "Riems" O11) mostraban sustituciones en la proteína E2 en las posiciones 2862, 2870 y 2889, 3225, además de los cambios en la proteína E1 en las posiciones 2099 y 2122, además de una sustitución en la proteína E<sup>RNS</sup> en la posición 1649.

Tabla 1: Información adicional sobre las variantes de escape de TAV

Posición en el genoma	Sustitución de nucleótidos (de la cepa C a la variante de escape)	Aminoácido	Proteína	Sustitución de aminoácido (cambio de aminoácido resultado de la cepa C a la variante de escape)
1649	A a G	426	E <sup>RNS</sup>	Isoleucina a valina
2099	T a C	576	E1	Tirosina a histidina
2122	T a G	583	E1	Ácido aspártico a ácido glutámico
2862	C a T	830	E2 (epítipo TAV)	Alanina a valina
2870	C a T	833	E2	Prolina a serina

			(epítoto TAV)	
2889	A a G	839	E2 (epítoto TAV)	Ácido glutámico a glicina
3225	C a T	951	E2	Treonina a isoleucina

Los cambios en la secuencia de nucleótidos permiten aplicar un sistema de RT-PCR en tiempo real, que puede diferenciar entre las variantes (Q7, S10, O11) y las cepas aisladas de campo.

- 5 Los cambios en la secuencia de aminoácidos permite la diferenciación entre las variantes (Q7, S10, O11) y las cepas aisladas de campo en función de la unión al anticuerpo, en el que los anticuerpos utilizados para la neutralización (anticuerpos A18) se dejan de unir a las variantes, aunque se unen a todas las cepas aisladas de campo debido al epítoto TAV altamente conservado en el VPPC. Los anticuerpos generados frente a la secuencia peptídica de TAV modificada (que muestra las mutaciones de la presente invención) también pueden utilizarse para
- 10 la diferenciación entre el virus infeccioso y la vacuna, en el que los anticuerpos dirigidos frente a las variantes se unirán a la vacuna vírica modificada de la presente invención y proporcionarán la identificación positiva de los animales vacunados, aunque no se unirán a las cepas aisladas de campo.

Tabla 2: Secuencias de la presente invención:

SEC ID N.º	Cepa	ADN/proteína	Secuencia 5'-3'
SEC ID N.º 1	Q7/S10/O11	ADN	CGGGTGCATAGAGTGCACA GTAGTGAGCTCAACGACTCT GAGAACAGGAGTGGTAAAGA
SEC ID N.º 2	Cepa C	ADN	CGGGTGCATAGAGTGCACA GCAGTGAGCCCAACGACTCT GAGAACAGAAGTGGTAAAGA
SEC ID N.º 3	B5/2	proteína	TAVSSTTLRTGWK
SEC ID N.º 4	Q7/S10/O11	proteína	TVVSSTTLRTGVVK
SEC ID N.º 5	Cepa C	proteína	TAVSPTTLRTEWK

- La presente invención se refiere a un virus de la peste porcina modificado que pueden comprender cualquiera o todas las posibles combinaciones de mutaciones y sustituciones descritas en este documento. Los ejemplos y soporte experimental proporcionado en este documento demuestran que se generaron cepas víricas que muestran solo un subgrupo de todas las sustituciones enumeradas en la tabla 1. Estas cepas víricas muestran un efecto protector además de ser posible que se utilicen como marcadores, cumpliéndose por completo el objetivo de la presente invención. Las cepas preferidas de la presente invención hacen referencia a cepas que comprende subgrupos de las sustituciones descritas, además de aquellas cepas que muestran todas las sustituciones descritas.
- 25 Fue totalmente sorprendente que las combinaciones de una o más de las modificaciones genéticas específicas (derivadas mediante procesos naturales como resultado de la presión de anticuerpos) pudieran llevar a las propiedades beneficiosas de la vacuna marcadora como se describe en este documento. En la técnica previa se muestran algunas modificaciones similares, aunque no se conoce en la técnica nada que pudiera sugerir que los restos en particular modificados de la presente invención podrían proporcionar una protección especialmente eficaz
- 30 frente a una infección por VPPC. Sus combinaciones exclusivas llevan al grupo de propiedades descritas que permiten que la invención actúe como una vacuna capaz de diferenciar entre animales infectados y vacunados.

Se desconocía que dicha presión selectiva como se aplica en la presente solicitud mediante el tratamiento con anticuerpos podría llevar a la modificación precisa descrita en este documento. Las combinaciones de las modificaciones genéticas como se describe en este documento funcionan juntas, proporcionando el efecto sinérgico de mutaciones compensatorias que mantienen la estructura de la proteína, al tiempo que se permite que los restos de TAV muten y proporcionen, de este modo, las características de marcador necesarias para el cometido de la presente invención.

- 40 El término ingeniería genética se refiere a la modificación o manipulación genética del genoma de un organismo, por ejemplo, introduciendo material de ácido nucleico extraño, como ADN o ARN, o secuencias de ácido nucleico sintéticas en el genoma del huésped. Esta tecnología también se conoce como tecnología de ADN recombinante.

El término virus atenuado se refiere a un virus que ha sido modificado, en todo tipo de formas, de modo que el virus es menos peligroso y/o menos virulento en comparación con el virus natural (asociado con la enfermedad). Por ejemplo, aparecen menos síntomas asociados con la enfermedad en los sujetos infectados con el virus atenuado en comparación con el virus natural.

5

El término presión de anticuerpos o presión selectiva de anticuerpos en términos de la presente invención se refiere a la aplicación de anticuerpos durante el cultivo celular, preferiblemente durante múltiples pases, que van dirigidos frente a uno o más epítopes específicos del virus. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier tipo de anticuerpo conocido en la técnica, mono o policlonales, o pueden estar contenidos en el suero de animales tratados con un péptido de interés, por ejemplo, el epítope diana. Dichos anticuerpos a menudo se denominan anticuerpos neutralizantes. Bajo la presión de selección proporcionando los anticuerpos neutralizantes, los virus que sufren mutación en el epítope al que se unen los anticuerpos (en este caso, el epítope TAV) se seleccionan debido a su ventaja de crecimiento, ya que los anticuerpos dejan de unirse a dicho epítope y, por tanto, ya no proporcionan un efecto limitante o neutralizante, por lo que los virus naturales sin cambios que son neutralizados por los anticuerpos están posteriormente en desventaja selectiva en el cultivo.

Dichos virus, que sufren una mutación en el epítope al que se unen los anticuerpos (en este caso, el epítope TAV), se denominan normalmente como variantes de escape. Estas variantes son objeto de la presente invención y se diferencian genética y serológicamente del virus natural.

20 El término múltiples pases de cultivo se refiere a la práctica de pases del cultivo celular (también conocido como subcultivo o división de las células) durante un número de veces, por la que se transfiere un pequeño número de células a un nuevo recipiente, preferiblemente con medio recién preparado, o mediante dilución de los cultivos celulares en medio nuevo, durante varias veces de modo que se permite que los cultivos celulares continúen creciendo sin los efectos asociados de la alta densidad celular en los cultivos.

25

A la luz de la vacuna marcadora, la invención también puede referirse a un grupo unificado de invenciones que se combinan bajo un único concepto de invención. La vacuna marcadora, el propio virus y las composiciones farmacéuticas de las mismas, su uso para tratar a los animales mediante la vacunación y los procedimientos para la producción del virus están todos dentro de un concepto de invención general. La nueva e ingeniosa vacuna marcadora descrita en este documento posibilita tanto como unifica todos los aspectos de la presente invención, de modo que las diversas realizaciones descritas en este documento están dentro de una única invención unificada.

30

Donde se proporcionan las secuencias de nucleótidos de la presente solicitud, los listados de secuencias pretenden abarcar las correspondientes secuencias tanto de ARN como de ADN. Aunque algunas secuencias de nucleótidos se proporcionan como secuencias de ADN, se pretende que la presente invención abarque las correspondientes secuencias de ARN (por ejemplo, cuando el genoma del virus presente una molécula de ARN). Las secuencias de nucleótidos de la presente invención también abarcan a las secuencias complementarias de aquellas enumeradas, por ejemplo, la secuencia complementaria que podría unirse a la secuencia enumerada mediante la unión por apareamiento de bases de Watson y Crick. Las correspondientes secuencias complementarias de ARN y/o ADN no requieren un esfuerzo inventivo para su conversión de una en la otra y están fácilmente al alcance de un experto en la materia.

35

40

El procedimiento de administración de la vacuna vírica de la presente invención, las composiciones de la invención como composiciones farmacéuticas, inmunológicas, antigénicas o de vacuna o las composiciones terapéuticas, pueden ser administradas mediante rutas parenterales, como procedimientos de aplicación intradérmicos, intramusculares o subcutáneos. Dicha administración permite una respuesta inmunitaria sistémica, o respuestas inmunitarias humorales o mediadas por células. La vacuna como se describe en la presente invención también puede administrarse mediante rutas orales, como incorporándola al pienso del animal, lo que permite una inmunización fácil y eficaz de grandes poblaciones, por ejemplo, el jabalí europeo.

45

Los procedimientos de aplicación preferidos se refieren bien a la aplicación subcutánea o aplicación intramuscular, preferiblemente mediante inyección, y aplicación oral.

Más en general, las composiciones de vacuna o composiciones terapéuticas de la vacuna vírica de la invención pueden prepararse mediante técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia farmacéutica o veterinaria.

55

Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de dichas composiciones en dosis y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia médica o veterinaria teniendo en cuenta factores como edad, sexo, peso, especie y estado del sujeto en particular, así como la vía de administración. Las composiciones pueden

60

administrarse solas, o pueden coadministrarse o administrarse secuencialmente con composiciones, por ejemplo, con "otras" composiciones inmunológicas, antigénicas o de vacuna, o terapéuticas, proporcionando de este modo composiciones multivalentes, cócteles o combinaciones de la invención y procedimientos en los que se utilizan. De nuevo, los compuestos y manera (secuencial o coadministración) de administración, así como la dosis, pueden determinarse teniendo en cuenta factores como edad, sexo, peso, especie y estado del sujeto en particular, así como la vía de administración.

Entre los ejemplos de composiciones de la invención se incluyen preparaciones líquidas para orificios, por ejemplo, oral, nasal, anal, vaginal, perioral, intragástrica, etc., administración con suspensiones, jarabes o elixires; y preparaciones para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (p. ej., administración inyectable) como suspensiones o emulsiones estériles.

En dichas composiciones las variantes del VPPC pueden estar mezcladas con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similares. Las composiciones también pueden estar liofilizadas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, adyuvantes, gelificantes o aditivos que potencian la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colores y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada.

## 20 Breve descripción de las figuras

**Figura 1:** Comparaciones de secuencias

**Figura 2:** Análisis de inmunofluorescencia indirecta

25 **Figura 3:** PNV con la cepa Rösrath del VPPC

**Figura 4:** E2-ELISA de Idexx con suero de cerdo del animal del estudio 06/10

## 30 Descripción detallada de las figuras

**Figura 1:** Comparaciones de secuencias. A) Comparación de las secuencias de nucleótidos de la región del epítipo TAV entre las variantes Q7, S10, O11 y la cepa aislada de campo de la cepa C. B) Comparación de las secuencias de aminoácidos de la región del epítipo TAV entre las variantes Q7, S10, O11 y la cepa aislada de campo de la cepa C.

**Figura 2:** Análisis de inmunofluorescencia indirecta. A) Análisis de los mutantes de escape de E2, pase 2 B5/2 (virus precursor de Q7, S10 y O11, que muestra solo 2 sustituciones en el epítipo TAV). B) Análisis de la cepa C del virus.

40 **Figura 3:** Tres semanas después de las inmunizaciones todos los animales, a excepción de un animal del grupo S10 y otro del grupo O11, presentaban anticuerpos neutralizantes. Siete días después de la infección los animales inmunizados presentaban un valor en la PNV de 640 o mayor. El valor más bajo era 320, observado en un animal del grupo inmunizado con mutante de TAV. Los animales control no inmunizados no mostraban valor en la PNV frente a la cepa Rösrath.

45 **Figura 4:** Los animales inmunizados con la cepa C mostraban resultados positivos en el E2-ELISA 21 días después de la inmunización. Siete días después de la infección todos los animales inmunizados mostraban resultados claramente positivos en el ELISA. El grupo control no inmunizado no presentaba anticuerpos detectables tras la infección.

## 50 EJEMPLOS

### Diseño y procedimientos experimentales

#### 55 Inmunización de conejos utilizando el péptido TAV

Se inmunizó a dos conejos de 8 a 10 semanas de edad (etiqueta de la oreja 304 y 305) conforme al siguiente esquema, usando el péptido CTAVSPTTLRTEWK conjugado con hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés) para obtener un suero policlonal neutralizante de la cepa C. La inmunización se realizó mediante 60 refuerzos, cada uno a intervalos de aproximadamente 1 mes.

Aislamiento de variantes de escape de E2 del virus de la cepa C "Riems"

Para crear la presión de anticuerpos con la que se generan las mutaciones del virus de la cepa C "Riems" en la glucoproteína E2, el virus se trató con varios anticuerpos dirigidos frente al epítipo TAV de la proteína E2, usando varias concentraciones. Las células infectadas se incubaron posteriormente y se realizaron varios pases de cultivo. Los anticuerpos que se aplicaron en los presentes experimentos son anticuerpos monoclonales específicos de E2, que están disponibles en el mercado para la prueba de ELISA para el VPPC específico de E2.

10 Anticuerpos:

- A18I (IDEXX)
- A18B (Bommeli)
- A18C (Ceditest)
- 15 HC34 (CRL, Hannover)
- WH303 y WH 211 (Weybridge, Gran Bretaña)

La incubación de los cultivos víricos se llevó a cabo conforme al siguiente protocolo. Se aplicaron varias concentraciones y mezclas de anticuerpos con diversas cantidades de virus. La incubación se realizó durante 2 a 6 horas a temperatura ambiente. La suspensión de virus y anticuerpo se suministró a las placas de cultivo celular con crecimiento celular en confluencia y posteriormente se incubó. Durante este tiempo, el virus fue absorbido dentro de las células (células PK15) durante 1 a 2 horas a 37°C. Finalmente, se añadió medio de cultivo celular y las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C y atmósfera de COT al 5%.

25 Después de 72 horas, se separaron de forma individual los sobrenadantes de los cultivos celulares y se conservaron. A continuación las placas se fijaron y tñieron usando tinción de inmunofluorescencia y un anticuerpo C16 (específico para la proteína NS3 del VPPC). Los pocillos de los cultivos celulares de sobrenadantes débilmente positivos se pasaron a continuación a otro pocillo con una presión de anticuerpos adicional como se describió anteriormente. Los sobrenadantes de los cultivos de pocillos con células únicas positivas o las placas de células con tinción única se pasaron a continuación a pocillos con una presión de anticuerpos muy débil o nula para aumentar el título de virus en 1 o 2 pases. Se seleccionaron varios sobrenadantes de cultivo celular para la secuenciación de las regiones E1 y E2.

El control de los virus variantes de escape se llevó a cabo usando tinción de inmunofluorescencia con un anticuerpo C16 o el anticuerpo A18 utilizado para producir las variantes de escape. Las variantes víricas que muestran un cambio en el epítipo TAV dejaban de teñirse con el anticuerpo A18.

Registros de los pases

40 Tabla 3: Registros de los pases de los virus de escape de la cepa C "Riems"

Variante O11		Variante Q7		Variante S10	
Pase	Sustitución	Pase	Sustitución	Pase	Sustitución
SP867/2+ A18(B)/HC34 (0,2mg/ml)					
D5+ A18 (B, C)	2870				
16P1+ A18(B,I,C) je 0,25mg/ml (50µl)+ 50µl 305	2870 2122				
B1A1+0,25mg/ml A18(C,B,I) (100µl) + 100µl 305					
B5/2	2870, 2122, 2889, 3225				
B5/2-P2 (sin presión)					
B5/2-P3 (sin presión)					
B5/2-P3+0,1mg					
A18(I)+50µl 304					

ES 2 593 965 T3

B5/2-P3* +0,1mg A18 (I) +50ml 305					
C32+ 50µl A18 (I) + 50µl 305					
CB32-P2 (-)	2870, 2122, 2889, 3225, 2862, 2099				
CB32-P3 +A18(I,C) cada 50µl, +305(25)					
Z2+A18(I,C) 50µl, +304/305 25µl					
F8 +304/305 30µl					
G18 + 304 30µl					
<b>H15 (-)</b>		<b>H15 (-)</b>	2870, 2122, 2889, 3225, 2862,2099	<b>H15 +304 50µl</b>	2870, 2122, 2889, 3225, 2862, 2099
<b>I16</b> +A18(I,C) 50µl +10µl HC34 +304 25µl		I15 A18(I,C) 30µl +304 30µl +HC34 15µl		I14 A18(I,C) 30µl +304 30µl +HC34 15µl	
K12 (-)		O4 +A18 (I 50µl, B 25µl) +304/305 25µl		N2 +A18(C 30µl, I 50µl) +304 50µl +305 25µl +HC34 15µl	
L7 (-)		P4 +305 50µl		O6 +A18 (I 50µl, B 25µl) +304/305 25µl	
N17 (-)		<b>Q7</b>		Q6 +A18 (I 50µl, B 25µl) +304 50µl	
<b>O11</b>	2870, 2122, 2889, 3225, 2862, 2099			R9 +A18 I 50µl + 304 50µl	
				<b>S10</b>	

Caracterización de las variantes de escape B5/2, I16, Q7, S10 y O11

5 Las variantes de escape aisladas se secuenciaron en la región de las proteínas E1 y E2. Se llevaron a cabo varias tinciones por inmunofluorescencia usando los anticuerpos A18-idexx, A18-bommeli, A18-ceditest y el anticuerpo C16. Las variantes de escape se pasaron a ambas botellas de cultivo celular (todos) además de a cultivos en rotatubos (Q7, S10, O11) y, posteriormente, se secuenciaron, tiñeron de forma diferencial y se valoraron.

10 RT-PCR en tiempo real específica de Q7

Para comprobar las características genéticas del virus y analizar, por tanto, una de las propiedades de marcador de la vacuna, se llevó a cabo la detección del ARN vírico tras la inmunización con las variantes de escape usando cebadores y una sonda, que eran capaces de diferenciar las variantes de escape de la cepa C original "Riems" y las cepas aisladas de campo del VPPC.

Estudio en animales 27/09: comprobación de la respuesta inmunitaria de los mutantes de la cepa C Riems B5/2-P6 y I16-P2

20 En los actuales estudios en animales, se inmunizaron tres crías de cerdo con 2 ml de suspensión vírica (sobrenadante de cultivo celular) mediante aplicación intramuscular. El agrupamiento de los animales se realizó del

## ES 2 593 965 T3

siguiente modo: grupo A (B5/2), grupo B (I16) y el grupo control de la cepa C Riems (vacuna de la peste porcina Riems). Se realizó una prueba serológica de la respuesta inmunitaria para cada grupo.

### Estudio en animales 06/10: comprobación de las variantes de escape Q7, S10 y O11

5

Los siguientes estudios en animales se llevaron a cabo para comprobar qué variantes de escape eran las más prometedoras en los cerdos receptores con respecto a la ausencia de un efecto peligroso y la eficacia tras la aplicación intramuscular.

10 Se utilizaron en el estudio 21 crías de cerdo de 8 a 9 semanas de edad (aproximadamente 15-20 kg). Cada cría de cerdo se inmunizó con  $2 \times 10^{5.0}$  KID<sub>50</sub>/ml, i.m.

Se probaron 5 grupos:

Grupo 1 (5 cerdos):	mutantes de las variantes Q7-P7 de la cepa C ( $10^{5.0}$ KID <sub>50</sub> /ml)
Grupo 2 (5 cerdos):	mutantes de las variantes S10-P8 de la cepa C ( $10^{5.0}$ KID <sub>50</sub> /ml)
Grupo 3 (5 cerdos):	mutantes de las variantes O11-P8 de la cepa C ( $10^{5.0}$ KID <sub>50</sub> /ml)
Grupo 4 (3 cerdos):	vacuna de la peste porcina Riems (virus sin modificar)
Grupo 5 (3 cerdos):	grupo de control sin inmunizar

15

Inmunización y muestras de sangre

0 dpv	Muestras de sangre (EDTA y suero), inmunización
7 dpv	Muestras de sangre (EDTA)
14 dpv	Muestras de sangre (EDTA y suero)
21 dpv	Muestras de sangre (EDTA y suero)

Se obtuvieron diariamente los datos correspondientes a la temperatura corporal y a los síntomas clínicos.

20

Provocación:

28 dpv	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal
	Infección de provocación con la cepa del VPPC altamente virulenta Koslov ( $1 \times 10^{6.5}$ KID <sub>50</sub> )
4 dpi	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal
7 dpi	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal
10 dpi	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal
14 dpi	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal
21 dpi	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal
28 dpi	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal

### Estudio en animales 24/10: comprobación de las variantes de escape S10 y O11; protección tras la inmunización

25 oral

Para comprobar la eficacia de la aplicación oral, se llevó a cabo el siguiente estudio en animales.

30 Se utilizaron 15 crías de cerdo como animales del ensayo, que tenía de 8 a 10 semanas de edad (aproximadamente 15-20 kg).

Grupo 1 (6 cerdos):	mutantes A de la variante S10 de la cepa C
Grupo 2 (6 cerdos):	mutantes B de la variante O11 de la cepa C
Grupo 3 (3 cerdos):	control infeccioso (sin vacunar)

Inmunización y muestras de sangre

0 dpv	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal
14 dpv	Muestras de sangre
28 dpv	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal
4 dpi	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal
7 dpi	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal

10 dpi	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal
14 dpi	Muestras de sangre (EDTA y suero), frotis nasal
21 dpi	Muestras de sangre
28 dpi	Muestras de sangre

Se obtuvieron diariamente los datos correspondientes a la temperatura corporal y a los síntomas clínicos.

**Resultados experimentales**

5

Immunización de conejos con el péptido TAV

Los sueros de ambos conejos (304 y 305) eran positivos en la prueba de E2-ELISA obtenido en el mercado tras el tercer tratamiento de refuerzo (aproximadamente 12 meses después de la primera inmunización). En la prueba de neutralización del virus ambos sueros probados eran positivos aproximadamente después del tercer refuerzo. Los valores en la prueba de neutralización eran menores y se reducían adicionalmente tras el 4<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> refuerzo.

Tabla 4: Caracterización del los sueros de conejo 304 y 305 tras la inmunización con el péptido TAV.

Suero	% de inhibición del E2-ELISA IDEXX de	NT Alfort	Nota
304	6	<5	1. inmunización
305	10	<5	
304	28	<5	1. Refuerzo
305	19	<5	
304	45	<5	2. Refuerzo
305	26	<5	
304	87	5	3. Refuerzo
305	<b>60</b>	<5	
304	90	10	4. Refuerzo
305	77	5	
304	No realizado	5	2 semanas después del 5. refuerzo
305	No realizado	<5	
304	No realizado	7,5	1 semanas después del 6. refuerzo
305	No realizado	<5	
304	No realizado	<5	3 semanas después del 6. refuerzo
305	No realizado	<5	

15

Aislamiento de variantes de escape de E2 del virus de la cepa C Riems

La incubación de la cepa C Riems con anticuerpos específicos de E2 llevan, tras solo unos cuantos pases, al aislamiento de las variantes de escape que exhiben una sustitución en la región E2 en la posición 2870. Era importante para el aislamiento de variantes adicionales que también se produzca un cambio compensatorio en la proteína E1 en la posición 2122, por ejemplo como en la cepa aislada 16P1. Si ambos cambios se producían de forma simultánea, entonces solo eran necesarios pocos pases bajo presión de anticuerpos y el suero para aislar variantes adicionales que mostraban adicionalmente una sustitución en la posición 2889 de la proteína E2. Algunas de estas variantes de escape mostraban adicionalmente un cambio en la posición 3225 en la proteína E2. Un ejemplo de dichas variantes de escape en la cepa aislada B5/2.

Representación esquemática del epítipo TAV de la variante B5/2:

30 Cepa C natural: CTAVSPTTLRTEVVK  
 Mutante B5/2: CTAVSSTTLRTGVVK

Pases adicionales de la cepa aislada B5/2 bajo la presión de anticuerpos llevaban al aislamiento de la cepa aislada CB32. Esta cepa aislada mostraba adicionalmente una sustitución adicional en la proteína E2 (nucleótidos 2862), además de una sustitución compensatoria en la proteína E1 en la posición 2899. La cepa aislada CB32 resultaba de una mezcla de las variantes B5/2 y una nueva variante con la sustitución adicional. Para aislar las nuevas variantes que mostraban las sustituciones adicionales, la cepa aislada CB32 se sometía a pases de cultivo múltiples veces bajo presión de anticuerpos. Las cepas aisladas Q7, S10 y O11 se aislaban a partir de pases sucesivos y ligados de H15.

Véase en la figura 1 una comparación de secuencias del epítipo TAV de los mutantes S10, O11 y Q7. Véase en la tabla 1 una revisión de las sustituciones de nucleótidos y aminoácidos en las variantes de escape aisladas.

Caracterización de la variantes de escape B5/2, I16, Q7, S10 y O11

La comprobación de las variantes de escape con respecto a la unión de diversos anticuerpos específicos de E2 se llevó a cabo usando inmunofluorescencia.

Tabla 5: Tinción por inmunofluorescencia indirecta de las variantes de escape de E2 seleccionadas con una sustitución en la proteína E2

Mutantes de E2	C16 CSF-NS3B	A18Bommeli CSF-E2
SNT	positivo	negativo
16P1	positivo	negativo
25P3	positivo	negativo
60P3	positivo	negativo
12P5	positivo	negativo
34P5	positivo	positivo
50P5	positivo	negativo
51P5	positivo	negativo
5P6	positivo	negativo
48P6	positivo	negativo
59P7	positivo	negativo
60P7	positivo	negativo
C-Stamm	positivo	positivo
Alfort	positivo	positivo

En la mayoría de los casos, una única sustitución de aminoácidos en el epítipo TAV era suficiente para proporcionar una señal negativa cuando se usaba inmunofluorescencia con el anticuerpo A18Bommeli. Las variantes de escape con dos mutaciones TAV (como B5/2) también mostraban resultados negativos con ambos anticuerpos A18Bommeli y A18C (figura 2).

Tabla 7: Tinción por inmunofluorescencia de pases particulares de diversos variantes de escape de E2, que muestran tres sustituciones en el epítipo TAV.

Mutantes de E2	A18 Idexx 1:400	A18 Bommeli 1:250	A18 Ceditest 1:500	303 1:100	211 1:100	C16 1:90
I16-P3	-	-	-	-	-	+++
Q7-P8	-	-	-	-	-	+++
O11-P7	-	-	-	-	-	+++
S10-P8	-	-	-	1 colonia	-	+++
Cepa C	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Todas las cepas aisladas probadas mostraban señales negativas para los pases seleccionados de las tinciones de A18. No obstante, en el pase 8º de la cepa aislada S10, podía teñirse una pequeña colonia usando el anticuerpo WH303. Esto apoya una alta estabilidad de las sustituciones en el epítipo TAV. Se llevaron a cabo pruebas adicionales de estabilidad para las cepas aisladas Q7, S10 y O11, usando cultivos en rotatubos durante 10 pases más.

Tabla 8: Tinción diferencial de pases seleccionados con los anticuerpos A18 (idexx y bommeli, WH303 [VLA]). El anticuerpo específico de NS3 C16 (EURL) se usó como control

Muestra	Q7-P10	Q7-P14	Q7-P16	S10-P10	S10-P14	S10-P16	O11-P10	Cepa C	anticuerpo
Idexx	-	-	-	-	(+; EZ)	(+; EZ)	-	+++	Idexx
Bommeli	-	-	-	-	-	-	-	+++	Bommeli
WH 303	-	-	-	-	-	-	-	+++	WH 303
C16	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	C16
O11-P14	-	-	-	+++	-	-	-	-	
O11-P16	-	(+; EZ)	(+; EZ)	+++	-	-	-	-	
Antikörper	Idexx	Bommeli	WH303	C16					

EZ = algunas células individuales

- 5 En el pase 10<sup>o</sup>, no se observaba ninguna variante vírica que mostrara una reversión, por lo que la tinción era solo posible con C16. La variante Q7 era negativa para todas las tinciones hasta el pase 14<sup>o</sup>, por lo cual en el pase 16<sup>o</sup> tampoco era posible detectarla con el anticuerpo C16. Estos hallazgos se confirmaron usando RT-PCR además de los protocolos de PCR de secuenciación. Por tanto, es claro que no existen virus en el pase 16<sup>o</sup>, por lo que también puede excluirse un error de pase de cultivo. No obstante, algunas células podían teñirse en los pases 14<sup>o</sup> y 16<sup>o</sup> de la cepa aislada S10 usando el anticuerpo A18 (idexx). Para el mutante O11, se realizaron 16 pases antes de que se teñieran algunas células individuales usando los anticuerpos A18 (bommeli) y WH303. Estos resultados demuestran la alta estabilidad de las características serológicas de las vacunas víricas como se describe en este documento.

Caracterización de las variantes de escape mediante secuenciación de E1 y E2

15

Tabla 9: Secuenciación de las cepas aisladas de forma temprana que mostraban una sustitución en el epítipo TAV de la proteína E2

Mutantes	secuenciación original	secuenciación en el pase 10
48P6	Sustitución 2870	Sustitución 2870
2SNTP1	Sustitución 2870	Sustitución 2870
59P7	Sustitución 2870	Sustitución 2870
60P7	Sustitución 2870	Sustitución 2870
5P6b	Sustitución 2870	Sustitución 2870
D9	Sustitución 2870	Sustitución 2870
E51	Sustitución 2870	Sustitución 2870
E52	Sustitución 2870	Sustitución 2870
16P1	Sustitución 2870, sustitución 2122	Sustitución 2870, sustitución 2122

- 20 La sustitución en la posición 2870 se mantuvo en todas las cepas aisladas después de 10 pases, lo que significa que eran muy estables. Esto apoya la conclusión de que esta sustitución en particular no tiene un efecto importante sobre la estructura de la proteína, de modo que una reversión a la secuencia natural no proporciona ventajas.

25 Tabla 10: Secuenciación de aislados con 3 sustituciones en el epítipo TAV de E2.

Mutante de E2	Valor del virus/ml	sustitución E <sup>RNS</sup>	sustitución E1	sustitución E2	Mutaciones estables
I16-P3	10 <sup>5,25</sup>	1649	2099	2862 (80%)	I16-P24
				2870	1649 (1657,1878)
				2889	2122, 2870, 2889
				3225	
Q7-P8	10 <sup>5</sup>	1649	2099	2862	Q7-P17
				2870	1649, 2099, 2122
				2889	2862, 2870, 2889, 3225
				3225	
O11-P7	10 <sup>5</sup>	1649	2099	2862	O11-P14

			2122	2870	1649, 2099, 2122
				2889	2862, 2870, 2889, 3225
				3225	
S10-P8	10 <sup>5</sup>	1649	2099	2862	S10-P15
			2122	2870	1649, 2099, 2122
				2889	2862, 2870, 2889, 3225
				3225	

Los cambios de secuencia en las cepas aisladas O11, S10 y Q7 eran estables en todos los países probados (14-17).

Tabla 11: Secuenciación de las cepas aisladas Q7, S10 y O11 tras varios países en cultivos en rotatubos

Muestra	Q7-P10	Q7-P14	Q7-P16	S10-P10	S10-P14	S10-P17	O11-P9	O11-P14	O11-P16
Proteína E1	2099	2099	no	2099	2099	2099	n.d.	2099	2099
	2122	2122	secuenciada	2122	2122	2122	n.d.	2122	2122
Proteína E2	2862			2862	2862	2862	2862	2862	2862
	2870			2870	2870	2870	2870	2870	2870
	2889			2889	2889	2889	2889	2889	2889

5

Todos los países de los virus secuenciados de las tres variantes contenían las sustituciones en las proteínas E1 y E2 que han sido inducidas mediante presión inmunitaria. El país 16° de Q7 no podía ser secuenciado, probablemente debido a que no quedaban virus en el sobrenadante del cultivo celular (véase anteriormente). En caso de que aparezcan virus revertientes, que en función de las diversas tinciones de la figura 2 no puedan excluirse, estos solo eran detectables mediante secuenciación a partir de un porcentaje determinado. No obstante, la enorme mayoría de los virus no reversionen y permanecen con las sustituciones. No podían detectarse virus revertidos individuales únicos mediante secuenciación.

10

RT-PCR en tiempo real específica de Q7

15

Para diferenciar entre animales vacunados e infectados, se aplicó un sistema de RT-PCR. Debido a que el epítipo TAV está altamente conservado en todos los virus de la PPC, las sustituciones en el epítipo TAV se utilizaron como base para cebadores y sondas en el ensayo de PCR en tiempo real.

20

Tabla 13: Se utilizó una RT-PCR en tiempo real para controlar la carga vírica. Se aplicaron los siguientes sistemas de PCR: mezcla 1 PPC (específico del VPPC, reconoce todas las cepas), Q7-TAV (específico para las variantes) y mezcla TAV de cepa C (cepa C natural, también puede detectarse con una sensibilidad mucho más baja). Los resultados se proporcionan como valores Cu (umbral del ciclo).

Sistema de muestra	Q7-P10	Q7-P14	Q7-P16	S10-P10	S10-P14	S10-P17	O11-P9	O11-P14	O11-P16
Mezcla 1 PPC	21,2	20,4	n.d.	20,5	19,2	20,1	20,1	19,5	20,1
Mezcla TAV de cepa C	36,5	35,7	37,8	34,9	31,2	30,2	35,8	33,6	33
rRT-PCR Q7-TAV	22,4	21,9	27,3	21,4	20,9	21	20,9	20,2	21,6

25

La carga vírica se determinó usando RT-PCR en tiempo real. El sistema de mezcla 1 PPC reconocía todas las cepas del VPPC y no diferenciaba entre la cepa C natural y las nuevas variantes de escape. El sistema Q7-TAV reconocía específicamente las tres variantes de escape. El sistema cepa C-TAV solo reconocía la cepa C natural (ninguna de las variantes de escape), con un valor de Cu de aproximadamente 14.

30

La reducción muy pequeña en la diferencia de los valores de Cu entre el sistema RT-PCR Q7-TAV y el sistema cepa C-TAV con el aumento un número de pases proporciona fuertes evidencias de una cantidad muy pequeña de revertientes tras un número elevado de pases. En general, una diferencia entre los dos sistemas de un valor Cu de 14 representa una relación entre mutantes y revertientes de aproximadamente 1:8000, mientras que un valor Cu de 10 representa una relación de 1:1000.

Estudio en animales 27/09: examen de la respuesta inmunitaria de los mutantes de la cepa C Riems B5/2-P6 y I16-P2

La inmunización intramuscular se llevó a cabo en 3 crías de cerdo, donde cada cría de cerdo recibió 2 ml de suspensión vírica (sobrenadante de cultivo celular). El grupo A se trató con B5/2, el grupo B se trató con 116 y el grupo control se trató con la vacuna de la peste porcina Riemser. Estos estudios proporcionan un análisis de la respuesta inmunitaria tras la inmunización, la comprobación de las propiedades de marcador de la vacunación tras la respuesta inmunitaria modificada (ELISA) y la comprobación de las propiedades del virus en animales vacunados (estabilidad genética y propiedades de replicación).

Una valoración por retroceso de los virus aplicados proporcionó los siguientes resultados:

B5/2-P6: Valor del virus  $10^{4,25}$  virus/ml  
 I16-P2: Valor del virus  $10^{4,75}$  virus/ml

Tolerancia de los animales a la vacuna

Los cerdos tratados no mostraban síntomas obvios tras la inmunización (ni fiebre ni síntomas de enfermedad). El número de leucocitos no aumentaba por encima de lo normal durante los primeros 7 días después de la inmunización.

No podía aislarse el virus de la sangre. El ARN aislado de las muestras de sangre 4 y 7 días después de la inmunización se utilizó para el análisis mediante RT-PCR. No obstante, el producto de PCR no era adecuado para una posterior secuenciación. Esto demuestra una velocidad de replicación muy baja del virus en los animales.

Estudio en animales 06/10: comprobación de las variantes de escape Q7, S10 y O11

La valoración por retroceso mostró las siguientes concentraciones de virus, que se utilizaron en los experimentos:

Q7-P8	$10^{4,0}$ KID <sub>50</sub> /ml
S10-P8	$10^{4,25}$ KID <sub>50</sub> /ml
O11-P7	$10^{4,25}$ KID <sub>50</sub> /ml
Vacuna de la cadena C de peste porcina	$10^{2,25}$ KID <sub>50</sub> /ml

Tras la inmunización, no se encontraron cambios en la temperatura corporal ni en los síntomas de la enfermedad de la peste porcina.

Análisis clínico tras la infección de provocación

La fiebre se definió como una temperatura corporal rectal de  $>40^{\circ}\text{C}$  durante al menos dos días sucesivas.

Se probaron 5 grupos:

Grupo 1 (5 cerdos):	mutantes de las variantes Q7-P7 de la cepa C ( $10^{5,0}$ KID <sub>50</sub> /ml)
Grupo 2 (5 cerdos):	mutantes de las variantes S10-P8 de la cepa C ( $10^{5,0}$ KID <sub>50</sub> /ml)
Grupo 3 (5 cerdos):	mutantes de las variantes O11-P8 de la cepa C ( $10^{5,0}$ KID <sub>50</sub> /ml)
Grupo 4 (3 cerdos):	vacuna de la peste porcina de Riemser (virus sin modificar)
Grupo 5 (3 cerdos):	grupo control sin inmunizar

En el grupo 1 se observaron medidas de aumento de temperatura esporádicas entre el 3<sup>er</sup> y el 13<sup>o</sup> día tras la infección de provocación que, no obstante, no estaban relacionados con ninguna otra alteración visible del bienestar de los animales. Solo el animal n.º 4 mostró fiebre durante 4 días.

En el grupo 2 se mostró un aumento esporádico de la temperatura en 3 animales tratados, donde el animal n.º 9 mostró temperaturas altas significativas.

En el grupo 3 solo el animal n.º 14 mostró un aumento en la temperatura corporal con fiebre el 4º y 5º día tras la infección de provocación.

Los animales del grupo 4 no mostraron fiebre, en el que se observó un aumento esporádico de la temperatura en 2 animales tratados.

10 Todos los animales del grupo 5 mostraron fiebre entre el 2º y el 7º día tras la infección. Debido a los síntomas significativos de peste porcina en todos los animales del grupo 5 se sacrificaron a los 7 días posteriores a la infección. Los síntomas más frecuentes fueron efectos sobre el sistema nervioso central (paresia y ataxia de las patas traseras, diarrea, conjuntivitis y somnolencia). Un animal mostró hematomas en la piel.

15 No era posible aislar el virus a partir de frotis nasales de los animales inmunizados, por lo que los animales control no vacunados presentaban una prueba positiva 7 días después de la infección.

#### Resultados de la RT-PCR con muestras de suero

20 Los resultados de la RT-PCR mostraban que 14 días después de la infección solo podían obtenerse señales muy débiles de los animales inmunizados cuando se comprobaba la presencia del virus virulento asociado con la enfermedad. Sin embargo, los animales control no vacunados mostraban fuertes señales positivas con valores Cu positivos de 30 o menores 3 días después de la infección. Los valores de Cu de los animales no vacunados caían a 17 después de 7 días.

25

#### Resultados de la RT-PCR a partir de los frotis nasales

Los resultados de la RT-PCR de los animales inmunizados fueron exclusivamente negativos. Sin embargo, los animales control no vacunados mostraban una fuerte señal positiva con valores de Cu positivos de 25 y 28 a los 7 días después de la infección.

30

#### Prueba de neutralización del virus con VPPC Alfort

La prueba de neutralización de virus se refiere a la determinación de qué animales (vacunados o no vacunados) presentan anticuerpos que son capaces de neutralizar al virus virulento. Todos los grupos inmunizados mostraban anticuerpos neutralizantes 21 días después de la inmunización. Siete días después de la infección el valor de la prueba de neutralización de virus frente a Alfort era de 640 ND<sub>50</sub> o superior, en todos los grupos inmunizados. Un animal del grupo inmunizado con O11 y otro del grupo control con la cepa C mostraban un valor de 480. Los animales control no inmunizados no mostraban valor del virus frente a la cepa Alfort en la PNV.

40

#### Prueba de neutralización del virus (PNV) con VPPC Rösrath

Véase en la figura 3 la PNV con la cepa VPPC Rösrath.

45 Tres semanas después de la inmunización todos los animales, a excepción de un animal del grupo S10 y otro del grupo O11, presentaban anticuerpos neutralizantes. Siete días después de la infección los animales inmunizados mostraban, en general, un valor en PNV de 640 o mayor. El valor más bajo era 320, observado en un animal del grupo inmunizado con mutante de TAV. Los animales control no inmunizados no mostraban valor en la PNV frente a la cepa Rösrath.

50

#### E2-ELISA (idexx)

El E2-ELISA es un kit de ELISA disponible en el mercado para comprobar la presencia de la peste porcina clásica. Como promedio, los animales inmunizados con la cepa C mostraban resultados positivos en el E2-ELISA 21 días después de la inmunización. Los animales inmunizados con mutantes de TAV también mostraban resultados positivos después de 7 días en el E2-ELISA de Idexx. El grupo control no inmunizado no presentaba anticuerpos detectables tras la infección.

55

Véase en la figura 4 el E2-ELISA de idexx con suero de cerdo.

60

En el E2-ELISA, los resultados de los mutantes de TAV antes de la infección eran positivos, aunque no fuertes, mientras que tras la infección los resultados se hacían fuertemente positivos, lo que sugiera un fuerte efecto de refuerzo. Los animales control inmunizados con la cepa C eran fuertemente positivos en el E2-ELISA antes de la infección.

- 5 Los resultados de los animales inmunizados con los mutantes de TAV son comparables a los de los animales inmunizados con el grupo control con la cepa C. El aislamiento del virus tras la infección era negativo y los resultados de la RT-PCR eran cuestionables o débilmente negativos, lo que también se mostraba en el grupo control con la cepa C. Todos los animales mostraban valores superiores en la prueba de neutralización del virus frente a Alfort además de frente a Rösrath. Todos los animales inmunizados mostraban una protección completa frente a la cepa vírica infecciosa Koslav cuatro semanas después de la inmunización intramuscular.

Estudio en animales 24/10: comprobación de las variantes de escape S10 y O11; protección tras la inmunización oral

- 15 Para comprobar la eficacia de la aplicación oral se llevó a cabo el siguiente estudio en animales. Se utilizaron 15 crías de cerdo como animales de ensayo, que tenía de 8 a 10 semanas de edad (aproximadamente 15-20 kg).

Dosis de vacuna y diseño experimental:

Grupo 1 (6 cerdos):	mutantes A de la variante S10 de la cepa C ( $10^5$ KID <sub>50</sub> /ml)
Grupo 2 (6 cerdos):	mutantes B de la variante O11 de la cepa C ( $10^4$ KID <sub>50</sub> /ml)
Grupo 3 (3 cerdos):	control infeccioso (sin vacunar)

- 20 Grupo 1: Todos los animales de este grupo estaban completamente protegidos antes de la infección de provocación. No se detectaron síntomas asociados con la enfermedad. Todos los animales mostraban anticuerpos neutralizantes, que se detectaban con ambas pruebas de PNV y ELISA.
- 25 Grupo 2: Los animales del grupo 2 mostraban una mezcla de protección e infección. Dos animales mostraban síntomas de la enfermedad, como fiebre alta y otros síntomas típicos de la peste porcina. Los animales afectados fueron sacrificados. Los animales protegidos mostraban anticuerpos neutralizantes, que se detectaban con ambas pruebas de PNV y ELISA.
- 30 Grupo 3: Todos los animales estaban infectados y mostraban síntomas de la enfermedad. Los animales afectados fueron sacrificados.

El estudio de inmunización oral mostró que la inmunización oral, especialmente cuando se usaba el mutante S10, inducía una protección eficaz frente a la infección. La cepa aislada O11 también mostraba resultados beneficiosos, considerando que la dosis de vacunación se había reducido en comparación con el virus S10 administrado.

- 35

Bibliografía:

- 40 Council Directive 2001/89/EC of 23 October 2001 on Community measures for the control of classical swine fever (2001): Official Journal of the European Communities L 316, 5-35.
- 45 Diagnostic Techniques and Vaccines for Foot-and-Mouth Disease, Classical Swine Fever, Avian Influenza and some other important OIE List A Diseases (2003a): Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare Adopted 24-25th April 2003, 1-150.
- Report on the evaluation of a new classical swine fever discriminatory test (2003/265/EC) (2003b).
- 50 Commission Decision of 23 November 2006 approving the plans for the eradication of classical swine fever in feral pigs and the emergency vaccination of those pigs and of pigs in holdings against that disease in Romania (2006/802/EC) (2006): Official Journal of the European Union L329, 34-37.
- Beer, M, Reimann, I, Hoffmann, B, Depner, K (2007): Novel marker vaccines against classical swine fever. Vaccine 25 (30): 5665-5670.
- 55 Blome, S, Meindl-Bohmer, A, Loeffen, W, Thuer, B, Moennig, V (2006): Assessment of classical swine fever diagnostics and vaccine performance. Rev Sci Tech 25 (3): 1025-1038.

- de Smit, AJ, Bouma, A, Van Gennip, HG, de Kluijver, EP, Moormann, RJ (2001): Chimeric (marker) C-strain viruses induce clinical protection against virulent classical swine fever virus (CSFV) and reduce transmission of CSFV between vaccinated pigs. *Vaccine* 19 (11-12): 1467-1476.
- 5 Dong, XN, Chen, YH (2007): Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine* 25 (2): 205-230.
- Floegel-Niesmann, G (2003): Marker vaccines and companion diagnostic tests for classical swine fever. *Dev Biol (Basilea)* 114, 185-191.
- 10 Greiser-Wilke, I, Moennig, V (2004): Vaccination against classical swine fever virus: limitations and new strategies. *Anim Health Res Rev* 5 (2): 223-226.
- 15 Leifer, I, Lange, E, Reimann, I, Blome, S, Juanola, S, Duran, JP, Beer, M (2009): Modified live marker vaccine candidate CP7\_E2alf provides early onset of protection against lethal challenge infection with classical swine fever virus after both intramuscular and oral immunization. *Vaccine*.
- Van Oirschot, JT (2003): Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol* 96 (4): 367-384.
- 20 Vandeputte, J, Chappuis, G (1999): Classical swine fever: the European experience and a guide for infected areas. *Rev Sci Tech* 18 (3): 638-647.
- 25 Diagnostic Techniques and Vaccines for Foot-and-Mouth Disease, Classical Swine Fever, Avian Influenza and some other important OIE List A Diseases.: European Commission, Directorate-General for Health and Consumer Protection, Brussels; 2003 p. 1-150.
- Koenig P, Lange E, Reimann I, Beer M. CP7\_E2alf: a safe and efficient marker vaccine strain for oral immunisation of wild boar against Classical swine fever virus (CSFV). *Vaccine* 2007 Abr 30;25(17):3391-9.
- 30 Floegel-Niesmann G. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISAs. *Vet Microbiol* 2001 Nov 8;83(2):121-36.
- D. Luetticken, C. Drexler, N. Visser y V. Kaden, The relevance of CSF marker vaccines for field use, Proceedings of OIE symposium on classical swine fever (Hog Cholera) Birmingham, U.K., julio 9-10 (1998).
- 35 J.T. van Oirschot, Diva vaccines that reduce virus transmission, *J Biotechnol* 73 (2- 3) (1999), pág. 195-205.
- A. Uttenthal, M.F. Le Potier, L. Romero, G.M. DeMiay G. Floegel-Niesmann, Classical swine fever (CSF) marker vaccine Trial I. Challenge study in weaner pigs, *Vet Microbiol* 83 (2) (2001), pág. 85-106.
- 40 K.R. Depner, A. Bouma, F. Koenen, D. Klinkenberg, E. Lange y H. de Smit y col., Classical swine fever (CSF) marker vaccine Trial II: Challenge study in pregnant sows, *Vet Microbiol* 83 (2) (2001), pág. 107-120.
- A.J. de Smit, H.G. van Gennip, G.K. Miedema, P.A. van Rijn, C. Terpstra y R.J. Moormann, Recombinant classical swine fever (CSF) viruses derived from the Chinese vaccine strain (C-strain) of CSF virus retain their avirulent and immunogenic characteristics, *Vaccine* 18 (22) (2000), pág. 2351-2358.
- 45 Yan Li y col, A multiplex nested RT-PCR for the detection and differentiation of wild-type viruses from C-strain vaccine of classical swine fever virus.
- 50 Y. Qi, y col, Characterization of antibody responses against a neutralizing epitope on the glycoprotein E2 of classical swine fever virus.
- Jian-Jun Zhao y col., Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of Classical swine fever virus.
- 55 Susana Mendoza y col., Antigenic differentiation of classical swine fever vaccinal strain PAV250 from other strains, including field strains from Mexico.
- J. Kortekaas y col., Rational design of a classical swine fever C-strain vaccine virus that enables the differentiation between infected and vaccinated animals, 2009.
- 60

L.G. Holinka y col., Development of live attenuated antigenic marker classical swine fever vaccine, *Virology*, 2009.

- 5 Hulst y col, Passage of Classical Swine Fever Virus in Cultured Swine Kidney Cells Selects Virus Variants That Bind to Heparan Sulfate due to a Single Amino Acid Change in Envelope Protein Erns, *Journal of Virology*, Oct. 2000, p. 9553-9561 Vol. 74, No. 20.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110>RIEMSER ARZNEIMITTEL AG Martin, BEER Immanuel, LEIFER Sandra, BLOME  
 <120> Vacuna marcadora frente a la peste porcina clásica
- 15 <130> XII 76/11  
 <150> DE 10 2010 017 006.2  
 <151> 18/05/2010
- 20 <150> EP 10075207.0  
 <151> 18/05/2010  
 <150> EP 10075205.4  
 <151> 18/05/2010
- 25 <150> EP 10075206.2  
 <151> 18/05/2010
- 30 <150> EP 10075759.0  
 <151> 17/12/2010  
 <150> EP 10075760.8  
 <151> 17/12/2010
- 35 <150> EP 11159207.7  
 <151> 22/03/2011  
 <160> 5
- 40 <170> PatentIn versión 3.3  
 <210> 1  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 45 <213> *Flavivirus sp.*  
 <400> 1  
 cgggtgtcat agagtgacaca gtagtgagct caacgactct gagaacagga gtggtaaaga 60
- 50 <210> 2  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> *Flavivirus sp.*
- 55 <400> 2  
 cgggtgtcat agagtgacaca gcagtgagcc caacgactct gagaacagaa gtggtaaaga 60

ES 2 593 965 T3

<210> 3  
<211> 14  
<212> PROT  
<213> *Flavivirus sp.*

5

<400> 3

Thr Ala Val Ser Ser Thr Thr Leu Arg Thr Gly Val Val Lys  
1 5 10

10 <210> 4  
<211> 14  
<212> PROT  
<213> *Flavivirus sp.*

15 <400> 4

Thr Val Val Ser Ser Thr Thr Leu Arg Thr Gly Val Val Lys  
1 5 10

20 <210> 5  
<211> 14  
<212> PROT  
<213> *Flavivirus sp.*

<400> 5

Thr Ala Val Ser Pro Thr Thr Leu Arg Thr Glu Val Val Lys  
1 5 10

25

**REIVINDICACIONES**

1. Vacuna marcadora para el tratamiento preventivo de la peste porcina clásica que comprende virus modificados de la peste porcina clásica vivos atenuados,
- 5 **caracterizada porque** la secuencia vírica de aminoácidos del epítotope TAV de la proteína E2 comprende una secuencia diferente de la de un virus de la peste porcina clásica natural, donde la secuencia vírica de aminoácidos muestra al menos una de la siguientes sustituciones con referencia al virus de la cepa C "Riems":
- sustitución del aminoácido 830 por valina,
- 10 - sustitución del aminoácido 833 por serina,  
- sustitución del aminoácido 839 por glicina.
2. Vacuna marcadora de acuerdo con la reivindicación precedente, **caracterizada porque** el virus modificado no muestra secuencias recombinantes de ácido nucleico.
- 15
3. Vacuna marcadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** la secuencia vírica de nucleótidos muestra una o más de las siguientes sustituciones con referencia al virus de la cepa C "Riems":
- 20
- sustitución en el nucleótido de la posición 2862 por T,
  - sustitución en el nucleótido de la posición 2870 por T,
  - sustitución en el nucleótido de la posición 2889 por G.
- 25 4. Vacuna marcadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** la secuencia vírica de aminoácidos muestra una o más de las siguientes sustituciones con referencia al virus de la cepa C "Riems":
- 30
- sustitución del aminoácido 426; en la proteína E<sup>RNS</sup>, por valina,
  - sustitución del aminoácido 576; en la proteína E1; por histidina,
  - sustitución del aminoácido 583; en la proteína E1; por ácido glutámico,
  - sustitución del aminoácido 951; en la proteína E2; por isoleucina.
- 35 5. Vacuna marcadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** la secuencia vírica de nucleótidos muestra una o más de las siguientes sustituciones con referencia al virus de la cepa C "Riems":
- 40
- sustitución en el nucleótido de la posición 1649 por G,
  - sustitución en el nucleótido de la posición 2099 por C,
  - sustitución en el nucleótido de la posición 2122 por G,
  - sustitución en el nucleótido de la posición 3225 por T.
- 45 6. Vacuna marcadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** la secuencia vírica de aminoácidos del epítotope TAV comprende la secuencia de acuerdo con la SEC ID N. ° 3 o LA SEC ID N. ° 4.
- 50 7. Vacuna marcadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** la secuencia vírica de nucleótidos comprende la secuencia de acuerdo con la SEC ID N. ° 1.
8. Vacuna marcadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** los sujetos tratados con la vacuna pueden diferenciarse de los sujetos infectados con el virus de la peste porcina asociado con la enfermedad a través del análisis de muestras biológicas obtenidas a partir de dichos sujetos usando procedimientos analíticos serológicos y/o genómicos.
- 55
9. Vacuna marcadora de acuerdo con la reivindicación previa, **caracterizada porque** el procedimiento
- 60 analítico genómico se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), preferiblemente PCR en tiempo real,

en el que se utilizan cebadores y/o sondas que reconocen la secuencia vírica de nucleótidos modificada y/o asociada con la enfermedad.

10. Vacuna marcadora de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada porque**
- 5 el procedimiento analítico serológico se basa en un inmunoensayo enzimático (EIA), preferiblemente un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), en el que se utilizan anticuerpos que se unen específicamente al epítipo TAV bien modificado y/o asociado con la enfermedad.
11. Vacuna marcadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que puede
- 10 obtenerse mediante la generación de variantes de escape víricas de cepas víricas de la peste porcina asociadas con la enfermedad u otras conocidas mediante la aplicación de presión de anticuerpos.
12. Procedimiento de fabricación de una cepa para vacuna del virus modificado de la peste porcina clásica viva atenuada, preferiblemente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende la
- 15 generación de variantes de escape de cepas víricas de la peste porcina clásica asociadas con la enfermedad u otras conocidas mediante la aplicación de presión de anticuerpos.
13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado porque** el procedimiento
- 20 comprende:
- múltiples pases de células, preferiblemente células renales embrionarias de cerdo, infectadas con el virus de la peste porcina asociado con la enfermedad en cultivos celulares y
  - aplicación simultánea de anticuerpos dirigidos frente al epítipo TAV de la proteína E2 del virus de la peste porcina asociado con la enfermedad y/o suero policlonal de conejo inmunizado con el péptido
- 25 CTAVSPPTLRTEVVK.
14. Composición farmacéutica que comprende la vacuna marcadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 15. Vacuna marcadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso como medicamento en el tratamiento preventivo (vacunación), preferiblemente mediante inyección intramuscular o aplicación oral, de la peste porcina clásica.

**Fig. 1.**

**A**

Secuencia de nucleótidos de Q7/S10/O11

CGGGTGTCATAGAGTGCACAGTAGTGAGCTCAACGACTCTGAGAACAGGAGTGGTAAAGA  
|||||  
2841 CGGGTGTCATAGAGTGCACAGCAGTGAGCCCAACGACTCTGAGAACAGAAGTGGTAAAGA 2900

Secuencia de nucleótidos de la cepa C

**B**

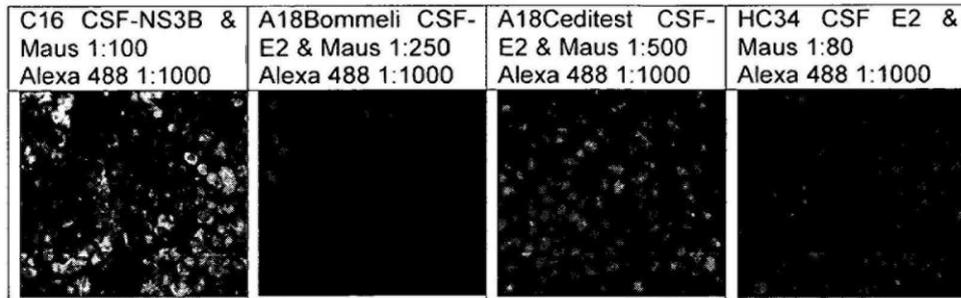
Secuencia de aminoácidos de Q7/S10/O11

TVVSSTTLRTGVVK  
| | | | | | | |  
TAVSPTTLRTEVVK

Secuencia de aminoácidos de la cepa C

Fig. 2

A



B

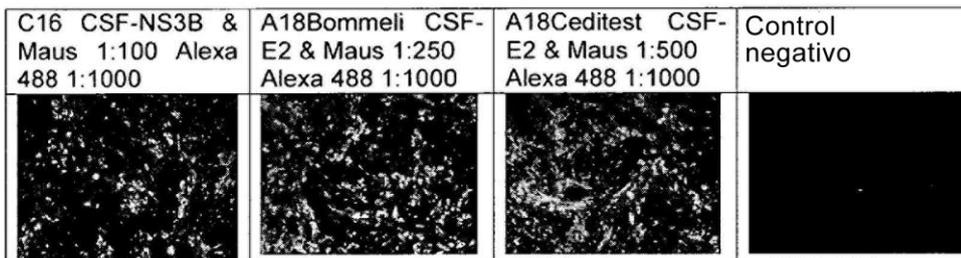


Fig. 3

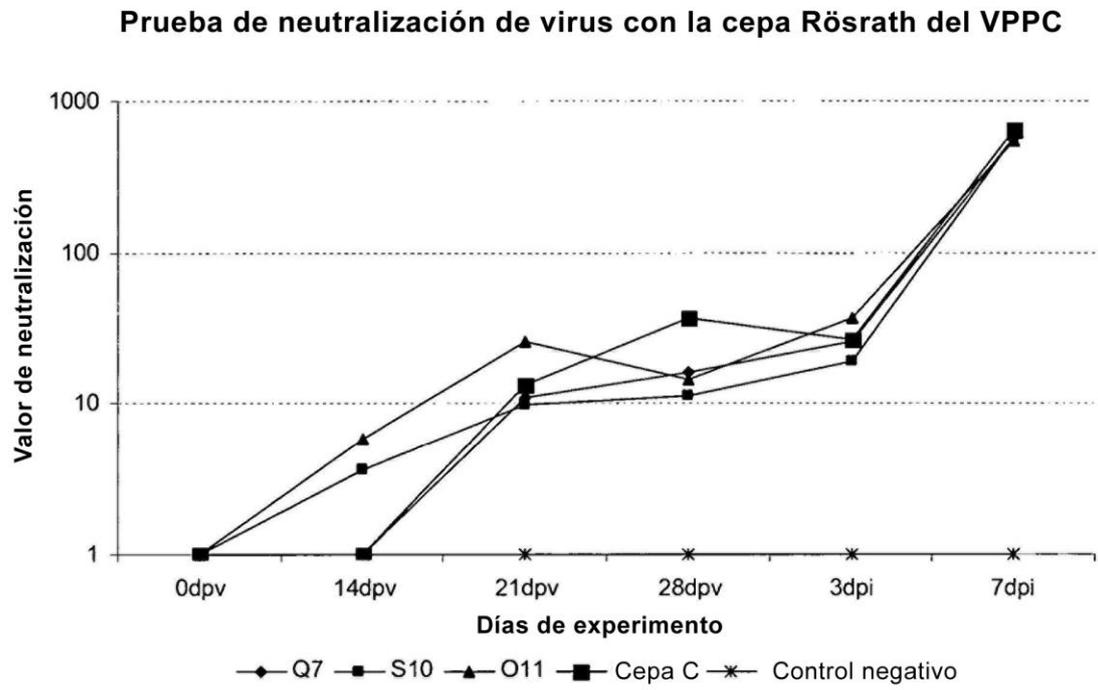


Fig. 4

