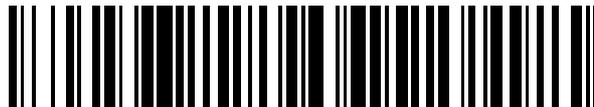


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 960**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2015 PCT/GB2015/051798**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15193685**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2015 E 15733494 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3157550**

54 Título: **Vacuna de virus de la fiebre porcina africana atenuado**

30 Prioridad:

**19.06.2014 GB 201410971**

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

**30.03.2020**

73 Titular/es:

**THE PIRBRIGHT INSTITUTE (100.0%)  
Ash Road, Pirbright  
Woking, Surrey GU24 0NF , GB**

72 Inventor/es:

**ABRAMS, CHARLES;  
REIS, ANNA-LUISA;  
NETHERTON, CHRIS;  
DIXON, LINDA;  
CHAPMAN, DAVE y  
SANCHEZ-CORDON, PEDRO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 750 960 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 de virus de la fiebre porcina africana atenuado

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a virus de la fiebre porcina africana atenuados. Los virus manipulados protegen a los cerdos contra la exposición posterior a virus virulento. La presente invención también se refiere al uso de dichos virus atenuados para tratar y/o prevenir la fiebre porcina africana. La invención se refiere además a la administración intranasal de virus de la fiebre porcina africana atenuados.

Antecedentes de la invención

15 *Fiebre porcina africana (ASF)*

La fiebre porcina africana es una enfermedad hemorrágica devastadora de los cerdos domésticos causada por un virus de ADN bicatenario, el virus de la fiebre porcina africana (ASFV). El ASFV es único miembro de la familia *Asfarviridae* y se replica predominantemente en el citoplasma de las células. Las cepas virulentas de ASFV pueden matar cerdos domésticos en aproximadamente 5-14 desde la infección con una tasa de mortalidad que se aproxima al 100 %.

La ASFV puede infectar y replicarse en facóqueros (*Phacochoerus sp.*), potamóqueros (*Potamochoerus sp.*) y garrapatas blandas de las especies *Ornithodoros*, pero en estas especies se observan pocos signos clínicos, si los hay, y pueden establecerse infecciones persistentes a largo plazo. La enfermedad actualmente es endémica en muchos países subsaharianos y en Europa en Cerdeña. Después de su introducción en la región transcaucásica de Georgia en 2007, el ASFV se ha propagado ampliamente a través de países vecinos incluyendo la Federación Rusa. En 2012 se informó del primer brote en Ucrania y en 2013 los primeros brotes en Bielorrusia. En 2014 se informó de brotes adicionales en cerdos de Ucrania y detección en jabalís en Lituania y Polonia.

Actualmente no hay tratamiento para ASF. Se ha intentado la prevención en países fuera de África a nivel nacional mediante restricciones de cerdos y productos porcinos importados, obligatoria cocción de productos de desecho animales con licencia antes de suministrarlos a cerdos y la aplicación de una política de sacrificio cuando se diagnostica la enfermedad. La prevención en África se basa en medidas para mantener a los facóqueros y los materiales contaminados por los facóqueros lejos de la piara.

Hasta la fecha, no se han desarrollado vacunas atenuadas o inactivadas eficaces (véase <http://www.thepigsite.com/pighelth/article/441/african-swine-fever-asfv>).

Por tanto, hay una necesidad de medidas mejoradas para controlar la infección por ASFV y evitar la propagación de la enfermedad.

*Virus de la fiebre porcina africana (ASFV)*

El genoma de ASFV codifica cinco familias multigénicas (MGF 100, MGF 110, MGF 360 y MGF 505/530) ubicadas dentro de las regiones variables terminales de 35 kb a mano izquierda o 15 kb a mano derecha. Las MGF constituyen entre un 17 y un 25 % de la capacidad codificante total del genoma de ASFV. Carecen de similitud con otros genes conocidos. Aunque la función de los genes MGF individuales es desconocida, se ha demostrado que las familias MGF 360 y 505 codifican genes esenciales para la función del rango de hospedador que implica promover la supervivencia de la célula infectada y suprimir la respuesta de interferón de tipo I.

50 *El aislado OURT88/3*

OURT88/3 es un aislado no patógeno de ASFV de Portugal. La infección previa con ASFV OURT88/3 ha demostrado conferir protección contra exposición a virus virulentos relacionados (Boinas et al., (2004) J Gen Virol 85:2177-2187; Oura et al., (2005) J. Gen. Virol. 86:2445-2450).

Se ha demostrado que se requieren linfocitos T CD8+ para la protección inducida por la cepa OURT88/3, ya que la reducción mediada por anticuerpos de los linfocitos T CD8+ anula la protección (Oura et al., 2005, como anteriormente).

Se realizaron estudios usando las líneas de cerdo endogámicas de NIH cc y dd. En estos estudios, se inmunizó un grupo de control de 3 cerdos dd y un grupo de control de 6 cerdos dd con OURT88/3. En el primero de estos experimentos, después de la inmunización con OURT88/3 un cerdo dd desarrolló una baja viremia transitoria de log10 2-3 de TCID 50/ml, pero nada de fiebre o signos clínicos de la enfermedad. Se observó que 3 de 6 de los cerdos endogámicos cc inmunizados con OURT88/3 no estaban protegidos después de exposición mortal con aislado OURT88/3, mientras que se indujeron respuestas protectoras en todos los cerdos dd. Estos resultados indican que el

fondo genético del cerdo influye en la respuesta a la inoculación de OURT88/3.

En experimentos posteriores, se inmunizaron 5 cerdos dd y 5 cc con OURT88/3 y se expusieron a OURT88/1 (Takamatsu et al., 2003 resultados no publicados). Esto confirmó que se inducían respuestas protectoras en todos los cerdos dd, pero no se inducían en todos los cerdos cc después de inmunización con OURT88/3 y que se inducían reacciones adversas incluyendo pirexia transitoria, inflamación articular y cojera en algunos de los cerdos cc.

Se realizaron experimentos posteriores en Francia usando la pira Anses de cerdos SPF. En estos cerdos, similares a las observaciones con cerdos cc, algunos cerdos desarrollaron reacciones adversas incluyendo fiebre transitoria, inflamación articular y cojera después de inmunización con OURT88/3 (resultados no publicados).

Aunque se ha demostrado que OURT88/3 induce una respuesta inmunitaria protectora en determinados animales, este efecto no parece ser universal. La inmunización con OURT88/3 parece ser ineficaz en proteger algunos cerdos de la exposición posterior. También está asociada con la inducción de respuestas inmunitarias adversas, tales como inflamación articular en algunos cerdos.

Dixon et al., (Developments in Biologicals; 2013; vol. 135; 147-157) describe el desarrollo de vacunas de virus de la fiebre porcina africana y describe que cerdos inmunizados con aislados naturales de baja virulencia o virus atenuados producidos por pase en cultivo tisular y por eliminaciones génicas dirigidas pueden protegerse contra la exposición a virus virulentos. King et al., (Vaccine; 2011; 29; 4593-4600) describe que la inmunización experimental de cerdos con el aislado OURT88/3 de genotipo I avirulento de Portugal seguido del aislado OURT88/1 de genotipo I virulento muy relacionado podía conferir protección contra la exposición a aislados virulentos de África, incluyendo el aislado Benin 97/1 de genotipo I y el aislado Uganda 1965 de genotipo X. Chapman et al., (Journal of General Virology; 2008; 89; 397-408) describe una comparación de las secuencias genómicas del aislado no patógeno de Portugal, OURT88/3, y un aislado altamente patógeno de África occidental, Benin 97/1, con el de un aislado adaptado a cultivo tisular, BA71V.

Por lo tanto, hay una necesidad de candidatos de vacuna de ASFV alternativos con eficacia y perfiles de seguridad mejorados.

#### Descripción de las figuras

Figura 1 - Diagrama esquemático que muestra la generación de virus recombinante Benin $\Delta$ MGF con la eliminación de cinco genes MGF 360 10L, 11L, 12L, 13L, 14L y la eliminación de tres genes MGF 505 1R, 2R, 3R. El virus recombinante Benin $\Delta$ MGF se creó mediante la recombinación homóloga entre el gen MGF 360 9L y el gen MGF 505 4R y el genoma Benin 97/1 de tipo silvestre y el plásmido de vector de transferencia p $\Delta$ MGFGUS produciendo la eliminación de los ocho genes MGF y la inserción del gen marcador GUS.

Figura 2 - Análisis de eliminaciones génicas de ADN vírico genómico e inserciones por PCR. Se extrajo el ADN vírico de Benin 97/1 de tipo silvestre y el virus recombinante Benin  $\Delta$ MGF. Se amplificaron fragmentos específicos por PCR y los productos se analizaron en un gel de TAE de agarosa al 1 %. Se usaron los siguientes conjuntos de cebadores en el carril 1 (BeninD8F y BeninD8R), los carriles 2 y 3 (BeninD8F y RGUS), los carriles 4 y 5 (BeninD8INTF y BeninD8INT). El carril 0 contiene una escala de ADN.

Figura 3 - Análisis de la secuencia de ADN del virus recombinante Benin $\Delta$ MGF en el sitio de eliminación/inserción en comparación con la secuencia publicada de Benin 97/1 de tipo silvestre. Se aisló el ADNg vírico de células infectadas por Benin $\Delta$ MGF y el flanco izquierdo de la eliminación/inserción se secuenció con el cebador 9LF y el flanco derecho se secuenció con el cebador 4RR. La secuencia de flanco izquierdo de Benin $\Delta$ MGF muestra la inserción de secuencias del promotor vp72, loxP y el gen GUS 5' y la eliminación de ocho genes MGF y la eliminación de los primeros cinco nucleótidos del gen MGF 360 9L que incluye el codón de inicio ATG. La secuencia del flanco derecho de Benin $\Delta$ MGF muestra la inserción del gen GUS 3' y la eliminación de los primeros siete nucleótidos del gen MGF 505 4R, que incluye el codón de inicio ATG.

Figura 4 - Cinética de replicación de los virus Benin 97/1 y recombinante Benin $\Delta$ MGF. Se infectaron macrófagos de médula ósea de cerdo a alta multiplicidad de infección con los virus original Benin $\Delta$ 97/1 o recombinante Benin $\Delta$ MGF. A distintas horas después de la infección, como se indica en el eje de abscisas, se recogió el virus total y se tituló el virus infeccioso en placas de 96 pocillos por análisis de hemoadsorción en cultivos de macrófagos de médula ósea de cerdo. El título del virus (HAD<sub>50</sub>/ml) es la media de tres observaciones individuales.

Figura 5 - Puntuaciones clínicas después de la primera inoculación. Puntuaciones clínicas (eje de ordenadas) de cerdos individuales en diferentes días (eje de abscisas) después de la inoculación. Los cerdos 16, 18, 19 y 20 se inocularon con 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> de virus OURT88/3. Los cerdos 21, 22, 23 se inocularon con 10<sup>2</sup> HAD<sub>50</sub> de virus Benin $\Delta$ MGFA2. Los cerdos 24 y 25 se inocularon con 10<sup>2</sup> HAD<sub>50</sub> de virus Benin $\Delta$ MGFA1. Sistema de puntuación clínica diseñado por King et al., 2011.

Figura 6 - Temperaturas después de la primera inoculación. Temperaturas (eje de ordenadas) de cerdos individuales en diferentes días (eje de abscisas) después de la inoculación. Los cerdos 16, 18, 19 y 20 se inocularon

con virus OURT88/3. Los cerdos 21, 22, 23 se inocularon con virus BeninΔMGFA2. Los cerdos 24 y 25 se inocularon con virus BeninΔMGFA1.

5 Figura 7 - Ensayos de ELISPOT de IFN-γ. Se estimularon células mononucleares de sangre periférica recogidas en el días 20 después de la inoculación *ex vivo* con medio en solitario, OURT88/3 o BeninΔMGF. Los resultados se muestran como producción de IFN-γ por 10<sup>6</sup> linfocitos (eje de ordenadas) y número de cerdo (eje de abscisas). Manchas por 10<sup>6</sup> células producidas por PBMC purificadas en el día 20 después de la inoculación con OUR T88/3 (cerdos 16 a 20) o BeninΔMGF (cerdos 21 a 25) en un ELIspot de IFNγ porcino. Las barras de error representan la desviación típica de la media de pocillos duplicados. La dilución 1 contenía dos veces las células de la dilución 2.

10 Figura 8 - Puntuaciones clínicas después de la inoculación de refuerzo. Puntuaciones clínicas (eje de ordenadas) de cerdos individuales en diferentes días (eje de abscisas) después de la inoculación de refuerzo. Los cerdos 16, 18, 19 y 20 se inocularon de refuerzo con 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> de virus OURT88/3. Los cerdos 21,22, 23 se inocularon de refuerzo con 10<sup>4</sup> HAD<sub>50</sub> de virus BeninΔMGFA2. Los cerdos 24 y 25 se inocularon de refuerzo con 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> de virus BeninΔMGFA1.

15 Figura 9 - Temperaturas después de la inoculación de refuerzo. Temperaturas (eje de ordenadas) de cerdos individuales en diferentes días (eje de abscisas) después de la inoculación. Los cerdos 16, 18, 19 y 20 se inocularon con 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> de virus OURT88/3. Los cerdos 21, 22, 23 se inocularon con 10<sup>4</sup> HAD<sub>50</sub> de virus BeninΔMGFA2. Los cerdos 24 y 25 se inocularon con 10<sup>4</sup> HAD<sub>50</sub> de virus BeninΔMGFA1.

20 Figura 10 - Puntuaciones clínicas de cerdos después de exposición a Benin 97/1. Los cerdos de los grupos 1 (cerdos 21,22, 23), grupo 2 (cerdos 24, 25), grupo 3 (cerdos 16, 18, 19, 20) y un grupo 4 no vacunado (cerdos 26, 27, 28) se expusieron a 10<sup>4</sup> HAD<sub>50</sub> de virus Benin 97/1 y las puntuaciones clínicas (eje de ordenadas) se registraron en diferentes días (eje de abscisas) después de la exposición.

25 Figura 11 - Temperaturas de cerdos después de exposición a Benin 97/1. Los cerdos de los grupos 1 (cerdos 21,22, 23), grupo 2 (cerdos 24, 25), grupo 3 (cerdos 16, 18, 19, 20) y un grupo 4 no vacunado (cerdos 26, 27, 28) se expusieron a 10<sup>4</sup> HAD<sub>50</sub> de virus Benin 97/1 y las temperaturas (eje de ordenadas) se registraron en diferentes días (eje de abscisas) después de la exposición.

30 Figura 12 - Resultados de tasas de supervivencia para los cuatro grupos de cerdos. El eje de ordenadas muestra el porcentaje de cerdos que sobrevivieron después de la inoculación inicial (día 0), la inoculación de refuerzo (día 25) y la exposición (día 46) con virus virulento Benin 97/1. Grupos 1 y 2 ★, Grupo 3 ●, Grupo 4 □

35 Figura 13 - Ensayos de ELISPOT de IFN-γ. Se estimularon células mononucleares de sangre periférica o células de homogeneizado de bazo aisladas en el día 63 después de la primera inoculación *ex vivo* con medio en solitario o virus Benin 97/1. Los resultados se muestran como producción de IFN-γ por 10<sup>6</sup> linfocitos (eje de ordenadas) y número de cerdo (eje de abscisas).

40 Figura 14 - Porcentaje de linfocitos totales en circulación en muestras de sangre periférica (en comparación con el día 0) recogidas en diferentes días después de la infección (eje de abscisas) de cerdos infectados con OURT88/3 (cerdos 16 a 20) o BeninΔMGF (cerdos 21 a 25).

45 Figura 15 - Porcentaje de células CD4+ en circulación en muestras de sangre periférica (en comparación con el día 0) recogidas en diferentes días después de la infección (eje de abscisas) de cerdos infectados con OURT88/3 (cerdos 16 a 20) o BeninΔMGF (cerdos 21 a 25).

50 Figura 16 - Porcentaje de células CD8+ totales en circulación en muestras de sangre periférica (en comparación con el día 0) recogidas en diferentes días después de la infección (eje de abscisas) de cerdos infectados con OURT88/3 (cerdos 16 a 20) o BeninΔMGF (cerdos 21 a 25).

55 Figura 17 - Porcentaje de células CD8+CD4-γδTCR- (CD8 únicamente) en circulación en muestras de sangre periférica (en comparación con el día 0) recogidas en diferentes días después de la infección (eje de abscisas) de cerdos infectados con OURT88/ 3 (cerdos 16 a 20) o BeninΔMGF (cerdos 21 a 25).

60 Figura 18 - Porcentaje de células CD8+/CD3- en circulación en muestras de sangre periférica (en comparación con el día 0) recogidas en diferentes días después de la infección (eje de abscisas) de cerdos infectados con OURT88/3 (cerdos 16 a 20) o BeninΔMGF (cerdos 21 a 25).

65 Figura 19 - Porcentaje de células gamma delta en circulación en muestras de sangre periférica (en comparación con el día 0) recogidas en diferentes días después de la infección (eje de abscisas) de cerdos infectados con OURT88/3 (cerdos 16 a 20) o BeninΔMGF (cerdos 21 a 25).

Figura 20 - Porcentaje de células gamma delta/CD8+ en circulación en muestras de sangre periférica (en

comparación con el día 0) recogidas en diferentes días después de la infección (eje de abscisas) de cerdos infectados con OURT88/3 (cerdos 16 a 20) o Benin $\Delta$ MGF (cerdos 21 a 25).

5 Figura 21 - Temperaturas de cerdos del ejemplo 6 grupos A, B, C, D, E, F en diferentes días después de la inmunización y la exposición y de un grupo de control G después de la exposición.

10 Figura 22 - Las temperaturas medias de todos los cerdos en los grupos A a F del ejemplo 6 después de inmunización y exposición se muestran en el panel A. El panel B muestra las temperaturas medias de los cerdos supervivientes en los grupos A a F y el panel C las temperaturas de los no supervivientes.

15 Figura 23 - Puntuaciones clínicas de cerdos del ejemplo 6 grupos A, B, C, D, E, F en diferentes días después de la inmunización y la exposición y de un grupo de control G después de la exposición.

20 Figure 24 - Se muestran las puntuaciones clínicas medias de todos los cerdos del ejemplo 6 grupos A a F después de la inmunización y la exposición en el panel A. El panel B muestra las temperaturas medias de los cerdos supervivientes en los grupos A a F y el panel C las temperaturas de los no supervivientes.

25 Figura 25 - Puntuación de lesiones observadas en la necropsia para diferentes grupos de cerdos del ejemplo 6. Se muestran las puntuaciones medias para varias lesiones observadas en diferentes grupos de A a F. El panel A muestra las puntuaciones de lesiones macroscópicas, el panel B de lesiones pulmonares y el panel C de lesiones cutáneas y musculoesqueléticas.

30 Figura 26 - Inducción de ARNm de IFN- $\beta$  por diferentes aislados de ASFV en macrófagos alveolares porcinos primarios.

35 Figura 27 - Sombreado en gris está la secuencia del gen DP148R que se eliminó del genoma de ASFV. Los codones de inicio y parada se muestran en negrita. Las secuencias usadas para amplificar las regiones flanqueantes izquierda y derecha están subrayadas. Las secuencias amplificadas están entre estos cebadores.

40 Figura 28 - Curvas de crecimiento de Benin97/1, Benin $\Delta$ DP148R y Benin $\Delta$ MGF en macrófagos alveolares porcinos.

45 Figura 29 - Temperaturas de cerdos inmunizados con Benin $\Delta$ MGF a dosis HAD<sub>50</sub> de 10<sup>2</sup> (A), 10<sup>3</sup> (B) y 10<sup>4</sup> (C) usando la vía IM, 10<sup>3</sup> HAD<sub>50</sub> usando la vía intranasal (D) y Benin $\Delta$ DP148R a 10<sup>3</sup> HAD<sub>50</sub> usando la vía IM (E), en diferentes días después de la inmunización y la exposición y de un grupo de control (F) después de la exposición.

50 Figura 30 - Puntuaciones clínicas de cerdos de los grupos A a E como se describe en la figura 29 en diferentes días después de la inmunización y la exposición y de un grupo de control (F) después de la exposición.

55 Figura 31 - Temperaturas medias de todos los cerdos de los grupos A a E como se describe en la figura 29 después de la inmunización y la exposición.

60 Figura 32 - Puntuaciones clínicas medias de todos los cerdos de los grupos A a E como se describe en la figura 29 después de la inmunización y la exposición

65 Sumario de aspectos de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que la eliminación de cinco genes de la familia multigénica (MGF) 360 10L, 11L, 12L, 13L, 14L y tres genes MGF 505 1R, 2R, 3R del extremo a mano izquierda del genoma del virus de ASF y la interrupción de dos genes adicionales (MGF360 9L y MGF 505 4R) provocó la atenuación de un virus virulento y la inducción de un 100 % de protección contra la exposición a virus virulento ASFV precursor.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un virus de la fiebre porcina africana (ASF) atenuado en el que están eliminados o están interrumpidos los siguientes genes de modo que el gen no se transcriba y/o traduzca:

familia multigénica 360 genes 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y  
familia multigénica 505 genes 1R, 2R, 3R y 4R.

60 Los siguientes genes pueden eliminarse:

familia multigénica 360 genes 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y  
familia multigénica 505 genes 1R, 2R y 3R.

65 Los siguientes genes pueden interrumpirse de modo que el gen no se transcriba y/o traduzca:

familia multigénica 360 gen 9L; y  
familia multigénica 505 gen 4R.

5 Los autores de la invención también han descubierto sorprendentemente que la eliminación de únicamente un gen, concretamente el gen DP148R, de una región cercana al extremo derecho del genoma de Benin97/1 virulento, provocaba la atenuación de un virus virulento y no reduce la replicación del virus en macrófagos. Un grupo de 5 cerdos inmunizados con Benin $\Delta$ DP148R por vía intramuscular con  $10^3$  unidades de HAD<sub>50</sub> desarrolló una fiebre transitoria y pérdida de apetito durante 1 o 2 días en el día 5 después de la inmunización. No se observaron signos clínicos adicionales después de 21 tras el refuerzo o en la exposición 42 días después de la primera inmunización. Los 5 cerdos sobrevivieron a la exposición.

Por consiguiente, en este documento se describe un virus de la fiebre porcina africana (ASF) atenuado que carece de una versión funcional del gen DP148R. El gen puede estar parcial o completamente eliminado, o interrumpido.

15 La mutación DP148R también puede hacerse en combinación con la mutación de los genes de la familia multigénica 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L y los genes de la familia multigénica 505 1R, 2R, 3R y 4R como se describe en este documento. Por lo tanto, en este documento se describe un virus de la fiebre porcina africana (ASF) atenuado que carece de una versión funcional de los siguientes genes:

20 familia multigénica 360 genes 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L;  
familia multigénica 505 genes 1R, 2R, 3R y 4R; y  
DP148R.

25 El virus puede obtenerse de un aislado de virus ASFV virulento. En otras palabras, el genoma del virus atenuado de la invención (distinto de los genes MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L, y los genes MGF 505 1R, 2R, 3R y 4R; y/o DP148R) puede corresponder al genoma de un aislado de virus ASFV virulento. El virus atenuado de la invención puede prepararse eliminando/interrumpiendo los genes: genes MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L y genes MGF 505 1R, 2R, 3R y 4R; y/o DP148R; de un aislado de virus ASFV virulento.

30 El virus puede obtenerse de uno de los siguientes aislados de virus ASFV virulento: Georgia 2007/1, Benin 97/1, Kenyan, Malawi Lil20/1, Pretorisuskop/96/4 y Tengani 62.

El virus puede obtenerse de Benin 97/1.

35 El virus de ASF atenuado, cuando se administra a un sujeto, puede inducir una respuesta inmunitaria que es protectora contra la posterior exposición a virus de ASF virulento.

40 El virus de ASF atenuado, cuando se administra a un sujeto, puede inducir una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T reducida en comparación con la respuesta inmunitaria inducida por el virus atenuado OURT88/3. La respuesta inmunitaria puede implicar un número inferior de linfocitos  $\gamma\delta$ T positivos CD8+

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un virus de ASF atenuado de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

45 La vacuna puede comprender una pluralidad de virus de ASF atenuados de diferentes genotipos.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una vacuna de acuerdo con el segundo aspecto de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la fiebre porcina africana. La vacuna puede inducir una respuesta inmunitaria de protección cruzada contra una pluralidad de genotipos de virus de ASF.

50 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método de atenuación de un virus de la fiebre porcina africana (ASF), que comprende la etapa de eliminar los siguientes genes, o interrumpir los siguientes genes de modo que el gen no se transcriba y/o traduzca:

55 familia multigénica 360 genes 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y  
familia multigénica 505 genes 1R, 2R, 3R y 4R.

Los siguientes genes pueden eliminarse:

60 familia multigénica 360 genes 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y  
familia multigénica 505 genes 1R, 2R y 3R.

Los siguientes genes pueden interrumpirse de modo que el gen no se transcriba y/o traduzca:

65 familia multigénica 360 gen 9L; y  
familia multigénica 505 gen 4R.

También se describe en este documento un método de atenuación de un virus de la fiebre porcina africana (ASF), que comprende la etapa de eliminar parcial o completamente, o interrumpir la expresión del gen DP148R.

5 En este documento se describe además un método para tratar y/o prevenir la fiebre porcina africana en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una vacuna de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

El sujeto puede ser, por ejemplo, un cerdo doméstico.

10

La vacuna puede administrarse siguiendo una pauta de sensibilización-refuerzo.

El virus manipulado Benin $\Delta$ MGF de la presente invención tiene varias ventajas sobre OURT88/3, por ejemplo:

- 15
- Es eficaz en inducir una respuesta inmunitaria protectora en mayor proporción de cerdos que OURT88/3
  - Tiene un perfil de seguridad mejorado en comparación con OURT88/3 y no induce reacciones inmunológicas adversas tales como inflamación articular.
  - Es más eficaz y tiene eficacia a una dosis inferior que OURT88/3
  - Induce un "mejor" tipo de respuesta inmunitaria que OURT88/3, ya que OURT88/3 induce una respuesta de IFN $\gamma$  mucho mayor. Benin $\Delta$ MGF tiene una respuesta mediada por linfocitos T reducida que OURT88/3.
- 20

El virus manipulado Benin $\Delta$ DP148R descrito en este documento también tiene varias ventajas sobre OURT88/3, por ejemplo:

- 25
- Tiene un perfil de seguridad mejorado en comparación con OURT88/3 ya que no se observaron lesiones pulmonares, musculoesqueléticas o macroscópicas en el examen tras la muerte.
  - Tiene mayor eficacia que OURT88/3 ya que un 100 % de los cerdos ensayados estaban protegidos contra la exposición a Benin 97/1.

30 Los autores de la presente invención, además, han descubierto sorprendentemente que la administración intranasal de un virus de la fiebre porcina africana (ASF) atenuado provoca protección mejorada y menos efectos secundarios en comparación con la administración mediante la vía intramuscular, y puede requerir una dosis inferior para obtener protección.

35 Por consiguiente, en este documento también se describe un virus de ASF atenuado para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la fiebre porcina africana, en el que el virus atenuado se administra por vía intranasal.

En este documento se describe además un método para tratar y/o prevenir la fiebre porcina africana en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un virus de ASF atenuado al sujeto por vía intranasal.

40

También se describe una vacuna que comprende un virus de ASF atenuado, en la que la vacuna se formula para administración intranasal.

Se proporciona además un kit para el suministro de una formulación de vacuna intranasal, que comprende:

45

- a) una vacuna de virus de ASF atenuado; y
- b) un dispositivo de suministro intranasal.

También se describe en este documento un dispositivo de suministro intranasal que comprende una vacuna de virus de ASF atenuado.

50

EL virus de ASF atenuado puede ser cualquier virus de ASF atenuado, tal como OURT88/13, Benin $\Delta$ MGF o Benin $\Delta$ DP148R.

55 Descripción detallada

#### VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA AFRICANA (ASFV)

60 El virus de la fiebre porcina africana (ASFV) es el agente causante de la fiebre porcina africana (ASF). El virus causa una fiebre hemorrágica con altas tasas de mortalidad en cerdos, pero infecta de forma persistente a sus hospedadores naturales, facóqueros, potamóqueros sin signos de enfermedad. También infecta garrapatas del género *Ornithodoros*, que se cree que se usan como portador. ASFV se replica en el citoplasma de células infectadas, y es el único miembro de la familia *Asfarviridae*. El ASFV es endémico de África subsahariana y existe en estado silvestre mediante un ciclo de infección entre garrapatas y cerdos, potamóqueros y facóqueros. La ASFV se describió por primera vez después de que los colonos europeos trajeran cerdos en zonas endémicas de ASFV y, por tanto, es un ejemplo de una "infección emergente".

65

El ASFV es un virus de ADN bicatenario, icosaédrico grande con un genoma lineal que contiene al menos 150 genes. El número de genes difiere ligeramente entre diferentes aislados del virus. El ASFV tiene similitudes con los otros virus de ADN grandes, por ejemplo, poxvirus, iridovirus y mimivirus. En común con otras fiebres hemorrágicas víricas, las células diana principales para la replicación son las del linaje de monocitos, macrófagos.

Basándose en la variación de secuencia en la región del extremo C del gen B646L que codifica la proteína principal de la cápsida p72, se han identificado 22 genotipos de ASFV (I-XXII). Todos los genotipos de p72 de ASFV han estado en circulación en África oriental y del sur. El genotipo I ha estado en circulación en Europa, América del sur, el Caribe y África occidental. El genotipo VIII está confinado a cuatro países de África oriental.

Ejemplos de cepas de algunos de los genotipos se dan a continuación:

Genotipo I: OURT88/3; Brazil/79; Lisbon/60; BA715; Pret; Benin 97/1; IC/1/96; IC/576; CAM/82; Madrid/62; Malta/78; ZAR85; Katange63; Togo; Dakar59; Ourt88/1; BEN/1/97; Dom\_Rep; VAL/76; IC/2/96; Awoshie/99; NIG/1/99; NIG/1/98; ANG/70; BEL/85; SPEC120; Lisbon/57; ASFV-Warm; GHA/1/00; GAM/1/00; Ghana; HOL/86; NAM/1/80; NUR/90/1; CAM/4/85; ASFV-Teng; Tegani; ASFV-E75.

Genotipo II: Georgia 2007/1

Genotipo III: BOT 1/99

Genotipo IV: ASFV-War; RSA/1/99/W

Genotipo VI: MOZ 94/1

Genotipo VII: VICT/90/1; ASFV-Mku; RSA/1/98

Genotipo VIII: NDA/1/90; KAL88/1; ZAM/2/84; JON89/13; KAV89/1; DEZda; AFSV-Mal; Malawi LIL 20/1

Genotipo IX: UGA/1/95

Genotipo X: BUR/1/84; BUR/2/84; BUR/90/1; UGA/3/95; TAN/Kwh12; Hindell; ASFV-Ken; Virulent Uganda 65.

## FAMILIAS MULTIGÉNICAS

El ASFV contiene cinco familias multigénicas que están presentes en las regiones variables izquierda y derecha del genoma. Las MGF se nombran seguidas del número promedio de codones presentes en cada gen: MGF100, 110, 300, 360 y 505/530. Las regiones del extremo N de los miembros de MGF 300, 360 y 505/530 comparten similitud significativa entre sí. Varios genes en MGF360 y 505/530 determinan el intervalo de hospedador y la virulencia.

Las cinco familias multigénicas del genoma de ASFV (MGF 100, MGF 110, MGF 360 y MGF 505/530) están ubicadas dentro de las regiones variables terminales de 35 kb a mano izquierda o 15 kb a mano derecha. Las MGF constituyen entre un 17 y un 25 % de la capacidad codificante total del genoma de ASFV. Carecen de similitud con otros genes conocidos.

Las secuencias genómicas completas del aislado Benin 97/1 (un virus altamente patógeno de África occidental, grupo 1), el lado OURT88/3 (no patógeno, virus atenuado de Portugal, grupo 1) y el aislado BA71V (virus no patógeno adaptado a cultivo tisular de células Vero, grupo 1) se han comparado (Chapman et al., (2008) J. Gen Virol. 89:397-408). El aislado OURT88/3 tiene una eliminación de 10007 pb en comparación con Benin 97/1 que se prolonga desde el número de nucleótido (nt n.º) 19448 hasta el nt n.º 29525 en el genoma de Benin 97/1. En total, se eliminan cinco genes MGF 360 (10L, 11L, 12L, 13L y 14L) del genoma de OURT88/3. Se eliminan dos genes MGF 505 (1R, 2R) y el gen MGF 505R 3R se trunca en el genoma de OURT88/3. Estos genes están presentes en los genomas de los otros ocho aislados patógenos de ASFV que se han secuenciado.

En el aislado BA71V adaptado a cultivo tisular atenuado, el genoma contiene el gen MGF 505 3R, pero carece de los otros siete genes MGF y además también tiene el gen MGF 360 9L truncado (eliminación total de 8250 pb).

Previamente seis genes MGF 360 (9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L) y dos genes MGF 505 (1R y 2R) se eliminaron del aislado Pr4 de África del Sur altamente patógeno. Esta eliminación redujo notablemente el crecimiento vírico en cultivos celulares de macrófagos primarios de 100 a 1000 veces (Zsak et al., 2001, como anteriormente) y dio lugar a atenuación del virus (citado como resultados no publicados, Afonso et al., 2004 J. Virol 78:1858-1864). Sin embargo, no se realizaron experimentos para exponer los cerdos recuperados para determinar si estaban protegidos. De hecho, en un seminario de virus de fiebre porcina africana en el Biosecurity Research Institute, Manhattan Kansas en mayo de 2011, se mencionó que el mutante de eliminación de Pr4 no era protector e inducía una forma crónica de la enfermedad.

## ES 2 750 960 T3

También se ha demostrado que la eliminación de tres genes MGF 360 (12L, 13L y 14L) y cuatro genes MGF 505 (1R, 2R, 3R y truncamiento de 4R) del virus patógeno Malawi $\Delta$ DP71 reduce la replicación del virus en cerdos y además atenúa el virus (Neilan et al., (2002) J. Virol. 76:3095-3104). Sin embargo, de nuevo, no se presentaron experimentos para determinar si los cerdos recuperados estaban protegidos contra la exposición.

El ASFV atenuado de acuerdo con una realización de la presente invención carece de una versión funcional de los siguientes genes:

familia multigénica 360 genes 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y familia multigénica 505 genes 1R, 2R, 3R y 4R.

La ubicación de estos genes en los genomas de una diversidad de cepas de ASFV se proporciona a continuación (tabla 1). También se proporciona la identidad de secuencia de cada gen con el correspondiente gen de Benin 97/1.

Tabla 1a - MGF 360-9L

Cepa	Número del nucleótido de inicio	Número del nucleótido de parada	% de identidad de nucleótidos
Benin 97/1	19487	18435	100
Georgia 2007/1	25215	24163	98
BA71V	17495	17057	100
OURT88/3	20355	19937	99
Kenya 1950	29478	28424	86
Malawi-Lil/20	23685	22630	86
Mkuzi 1979	26939	25887	99
Pretorisuskop/96/4	26016	24958	85
Tengani62	20398	19346	98
Warmbaths	25244	24186	86
Warthog	22020	20962	85
E75	18802	17750	99

Tabla 1b - MGF 360-10L

Cepa	Número del nucleótido de inicio	Número del nucleótido de parada	% de identidad de nucleótidos
Benin 97/1	20677	19607	100
Georgia 2007/1	26438	25368	93
BA71V	Eliminado		
OURT88/3	Eliminado		
Kenya 1950	30628	29563	82
Malawi-Lil/20	24802	23763	91
Mkuzi 1979	28139	27069	99
Pretorisuskop/96/4	27186	26116	96
Tengani 62	21600	20530	92
Warmbaths	26361	25322	94
Warthog	23130	22091	95
E75	19981	18911	100

Tabla 1c - MGF 360-11L

Cepa	Número del nucleótido de inicio	Número del nucleótido de parada	% de identidad de nucleótidos
Benin 97/1	21764	20703	100
Georgia 2007/1	27526	26465	97
BA71V	Eliminado		
OURT88/3	Eliminado		
Kenya 1950	31716	30655	84
Malawi-Lil/20	25892	24831	86

ES 2 750 960 T3

(continuación)

Cepa	Número del nucleótido de inicio	Número del nucleótido de parada	de % de identidad de
Mkuzi 1979	29225	28164	99
Pretorisuskop/96/4	28275	27214	97
Tengani62	22688	21627	97
Warmbaths	27449	26388	97
Warthog	24218	23157	97
E75	21068	20007	100

Tabla 1d- MGF 360-12L

Cepa	Número del nucleótido de inicio	Número del nucleótido de parada	de % de identidad de
Benin 97/1	24668	23616	100
Georgia 2007/1	30434	29382	96
BA71V	Eliminado		
OURT88/3	Eliminado		
Kenya 1950	34566	33549	90
Malawi-Lil/20	28731	27682	92
Mkuzi 1979	32125	31073	97
Pretorisuskop/96/4	31150	30098	95
Tengani 62	25592	24540	96
Warmbaths	30346	29294	96
Warthog	27088	26036	96
E75	23971	22920	99

Tabla 1e - MGF 360-13L

Cepa	Número del nucleótido de inicio	Número del nucleótido de parada	de % de identidad de
Benin 97/1	25901	24840	100
Georgia 2007/1	31656	30595	97
BA71V	Eliminado		
OURT88/3	Eliminado		
Kenya 1950	35812	34757	90
Malawi-Lil/20	29980	28925	91
Mkuzi 1979	33347	32286	99
Pretorisuskop/96/4	32368	31307	95
Tengani 62	26814	25753	95
Warmbaths	31559	30498	95
Warthog	28338	27277	95
E75	25204	24143	99

5

Tabla 1f - MGF 360-14L

Cepa	Número del nucleótido de inicio	Número del nucleótido de parada	de % de identidad de
Benin 97/1	27146	26073	100
Georgia 2007/1	32913	31840	99
BA71V	Eliminado		
OURT88/3	Eliminado		
Kenya 1950	37194	36121	92
Malawi-Lil/20	31266	30193	92
Mkuzi 1979	34620	33547	99
Pretorisuskop/96/4	33598	32525	97

ES 2 750 960 T3

(continuación)

Cepa	Número del nucleótido de inicio	de	nucleótido de	Número del nucleótido de parada	de	% de nucleótidos	de	identidad	de
Tengani 62	28056			26983		97			
Warmbaths	32820			31747		96			
Warthog	29568			28495		97			
E75	26449			25376		100			

Tabla 1g - MGF 505-1R

Cepa	Número del nucleótido de inicio	de	nucleótido de	Número del nucleótido de parada	de	% de nucleótidos	de	identidad	de
Benin 97/1	21971			23566		100			
Georgia 2007/1	27734			29329		95			
BA71 V	Eliminado								
OURT88/3	Eliminado								
Kenya 1950	31904			33496		91			
Malawi-Lil/20	26041			27627		93			
Mkuzi 1979	29425			31020		96			
Pretorisuskop/96/4	28449			30044		94			
Tengani 62	22891			24486		95			
Warmbaths	27651			29246		95			
Warthog	24387			25982		95			
E75	21275			22870		100			

Tabla 1h - MGF 505-2R

Cepa	Número del nucleótido de inicio	de	nucleótido de	Número del nucleótido de parada	de	% de nucleótidos	de	identidad	de
Benin 97/1	27352			28932		100			
Georgia 2007/1	33119			34699		99			
BA71V	17725			19304		99			
OURT88/3	29532			29981		76			
Kenya 1950	37419			38985		90			
Malawi-Lil/20	31541			33121		93			
Mkuzi 1979	34826			36406		99			
Pretorisuskop/96/4	33795			35374		97			
Tengani 62	28261			29830		98			
Warmbaths	33029			34597		96			
Warthog	29773			31352		97			
E75	26655			28236		99			

5

Tabla 1 i - MGF 505-3R

Cepa	Número del nucleótido de inicio	de	nucleótido de	Número del nucleótido de parada	de	% de nucleótidos	de	identidad	de
Benin 97/1	29019			29861		100			
Georgia 2007/1	34786			35625		96			
BA71V	20398			21915		100			
OURT88/3	20850			22367		100			
Kenya 1950	40295			41815		89			
Malawi-Lil/20	34322			35842		89			
Mkuzi 1979	37500			39017		99			
Pretorisuskop/96/4	36480			37985		89			
Tengani 62	30926			32443		90			
Warmbaths	35712			37232		93			

ES 2 750 960 T3

(continuación)

Cepa	Número del inicio	del nucleótido de	Número del parada	del nucleótido de	% de nucleótidos	de identidad	de
Warthog	32449		33954		90		
E75	29330		30847		100		

Tabla 1j - MGF 505-4R

Cepa	Número del inicio	del nucleótido de	Número del parada	del nucleótido de	% de nucleótidos	de identidad	de
Benin 97/1	30026		31543		100		
Georgia 2007/1	35796		37316		94		
BA71V	20394		21915		100		
OURT88/3	20850		22367		100		
Kenya 1950	40295		41815		89		
Malawi-Lil/20	34322		35842		89		
Mkuzi 1979	37500		39017		99		
Pretorisuskop/96/4	36480		37985		89		
Tengani 62	30926		32443		90		
Warmbaths	35712		37232		93		
Warthog	32449		33954		90		
E75	29330		30847		100		

Los productos de traducción de estos genes se da a continuación:

5

SEQ ID NO: 1 - traducción de 360-9L

MVLSLQTLTKKVLASQYPAKCHPHFLKCCGLWWHNGPIMYHQKK  
 IWTPYFKNGTNLNAALVKAveenNHDLIELFTEWGANINYGLLSVNTEHTRDLQRQLG  
 AKEQLNDQEILRFFYTLKRDLTSSNIIFCHEVFSNNPILDTINRFEVKGMIYEQLEGL  
 MVETDILSEMFTKYWYAMAIEFNLKEAICYFYQRYAHLHRWRLMCALFYNNVFDLHEL  
 YAKEKVRMDMDEMLRWACRKNYNYLTIYYCCVALGADINQAMFHSIQFYNIGNIFFCI  
 DLGANAFEEGKTLAHQKDNSFIASMLSLNCYSMNDLSLKETDPEVIKRMMLKDYHSKN  
 LSIHKHYINDGFNDI

10

SEQ ID NO: 2 - traducción de 360-10L

MVPSLQSFQKVLASQHVSIYHVLERCGLWWYKAPISLDCKH  
 MLIKLPNFADGLDLNTALMLATKENNYQLIKMFTDWGADINYGLICANTPPIREFCWE  
 LGAKYQVDKIMHIFFKLIHPNTTSNNIILCLKFFNDNPFSAYVIIREIKSCIHVKL  
 KNLAEDTNVLSNISDGDMLTIYCFIVALQDNLREAISVYVYQHFYLNNTWWLTCALCYN  
 KLFDLHNLYEKEKIRMDMDEMMRIACKDNNFLTIYYCFILGANINLAMIASIRFYNM  
 DNLFFCIDLGADAFEEAKALAEQQNYLISHRLSLDIYSPDSSLLTLKEADPNKIYRL  
 LKNYKSKSMLAYLNYDINDTSL

15

SEQ ID NO: 3 - traducción de 360-11L

ES 2 750 960 T3

MLPSLQSLTKKVLGQCVSVDHYHILKCCGLWWHNGPIMLHIRR  
NKLFIRSTCFSQGIELNIGLMKAVKENNHDLIKLFTEWGADINYGMICALTENTRDLC  
KELGAKEYLEREYILKIFFDTRDKTSSNIIFCHEVFSNNPNLRIIDNLDLGRGEIMWE  
LRGLMEITFMLDHDSDSFSTVLTKYWYAIADVYDLKDAIRYFYQKYPRLHRWRLMCALF  
YNNVFDLHELVEIERVRMDIDEMMHIACIQDYSYSAIYYCFIMGANINQAMLVSIQNY  
NLGNLFFCIDLGANAFEEGKALAEQKENYLIAHALSLKHYNPVISLLSNVMDPEKINY  
MLKNYHSINMGIFLDYEQR

SEQ ID NO: 4 - traducción de 360-12L

MLPSLQSLTKKVLGQCVPNTNQHLYLLKYYDLWWYNAPITFDHNL  
RLIKSSGIKEGLDLNLTALVKAVRENNYSLIKLFTEWGADINYGLVSVNTEHTRDLCQE  
LGAKEILNEEEILQIFIDLKFKHTSSNIILCHEVFSNNPILQKVNNLKLRIEIFWELR  
ELIEKTDLLNNEFLLSTLLKYYWYAIAVRYSLKEAIQYFYQKYTHMNTWRLTCALCFN  
NVFDLHEAYEKDKIHMDIEEMMRIAICKDHNLSTMYYCYMLGANINQAMLTISIYYNI  
ENMFFCMDLGADVFEEGTTALGEGYELIKNILSLKIYSPTTIPLPKSTDPEIIDHALK  
NYFSKNMMIFLSYDLR

5

SEQ ID NO: 5 - traducción de 360-13L

MSLPLSLQTLVKKTVASQCLSIDEHCILKYCGLWWHDAPLKLCM  
DRGRIQIKSGFLGEDIDLRLVALIHAVKENNYSLIKLFTEWGANINYSLLSINTKHIRE  
LCRQLGAKETLEDNDIFRIFRIMHNKTSGSIIICHEIFMNNPMLNKFVIQLRGLIY  
KRLWGLIEIKETDELNDLLVKYWYAKAVQYVCKNAICFLDEKYTDLNEWRLKCLLYYN  
KIYELHEMYHKKKVQIDVHDMICLACAKDNNLLTIYYCYALGGNINQAMLTISVQYYNV  
GNIFFCIDLGGNAFEEGRAIAEQGYNFLSHSLTLDIYSSDASLPLNLKDPEKISSLL  
KDYKSKNLSIIWEYSHNIL

10

SEQ ID NO: 6 - traducción de 360-14L

MLSLQTLAKKVACNYLSSDYDYTLQRFGLWWDLGPIHLCNNCK  
QVFSYKHLQCFSEDDLCLEAALVKAVKSDNLELIRLFVDWGANPEYGLIRVPAVYLKR  
LCAELGGLTPVSEPRLLEILKEVANLKSAGVLLGYDMFCHNPLLETVTRTTLDVTY  
TCSNIPLTGDTAHLTLTKFWFALALRHNFTKAIHYFYKRHKNQLYWRVACSLYFNNIF  
DIHELCREKEICISPNLMMKFACLREKNYAAIYYCHRLGASLDYGMNLSIYNNNTLNM  
FFCIDLGAADFDRALIAHKAYMYNLSNIFLVKQLFSRDVTLVLDVTEPQEIYDMLKT  
YTSKNMKRAEEYLTAHPEIID

15

SEQ ID NO: 7 - traducción de 505-1R

ES 2 750 960 T3

MFSLQNLCKRKTLPDCKLPEFFDDYILQLLGLYWENHGTIQRAGN  
NCVLIQQHTLIPVNEALRIAASEENYEIVGLLLAWEGNLYYAIIGALEGNRYNLIRKY  
DDQIKDHHDLIPFIDDPHFKCHIMRRCFFDCILYQAVKYSKFRVLLYFKYTLLEDDL  
PLVHLLIEKACEDHNYEVIKWIYENLHVCHIIDTFDCAIAHKDLRLYCLGYTFIYNRI  
VPYKYHHLDILILSSLQLLHKVAAKGYLDFILETLKYDHNIDNLDVILTQAATYNHRK  
ILTYFIPQSTYAQIEQCLFVAIKTKSSKKTNLNLLSHLNLSIKLIQKISQYVATFNST  
NIIGILSMKRKKKIYLDIILTKFVKNAIFNKVVRMERSINPERIVKMAARINKMM  
LVKKISEHVWKNHAARLKHHLKHAVHTMKHKDGKNRLMNFYEHYCYHMQGEEIFSLAR  
FYAIHHAPKLFDFYNCCILDITRFKSLLLDCSHIIGKNAHDATNINIVNKYIGNLFA  
MGVLSKKEILQDYPSIYSKHYMP

SEQ ID NO: 8 - traducción de 505-2R

5

MFSLQDLCKRKHILFILPDVFGHEVLQRLGLYWRCHGSLQRIGDDH  
ILIRRDILSTNEALRMAGEEGNNEVVKLLLLWKGNLHYAVIGALQGDQYDLHKYEN  
QIGDFHFILPIQDANTFEKCHALERFCGVSCLLKHATKYNMLPILQKYQEELSMRAY  
LHETLFEACLWQRYDVLKWIEQTMHVYDLKIMFNIAISKRDLTMYSLGYIFLFDGRN  
TEATLLTQHLEKTAAGLLHFVLETLKYGGNIDTVLTQAVKYNHRKLLDYFLRQLPRK  
HIEKLLLLAVQEKASKKTLNLLSHLNYSVKRIKLLRYVIEYESTLVIKILLKRVN  
LIDAMLEKMVRYSATKVRTIMDELSISPERVIKMAIQMRTDIVIHTSYVWEDDLER  
LTRLKNMVYTIKYEHGKMLIKVMHGIYKNLLYGEREKVMFHLAKLYVAQNAATQFRD  
ICKDCYKLDVARFKPRFKQLILDCLIVTKKSCYSILEILEKHIISLFTMKVMTEEEK  
NLCLEILYKVIHYKTIQC

10

SEQ ID NO: 9 - traducción de 505-3R

MSSSLQELCKRKKLPDCILPEFFDDYVLQLLGLHWQDHGSLQRIE  
KNQILVQQEPIHINEALKVAASEGNYEIVELLSWEADPRYAVVGALESKYDYLVYKY  
YDLVKDCHDILPIQNPFTEKCHELNNPCSLKCLFKHAVIHDMLPILQKYTYFLDGW  
EYCNQMLFELACSKKKYEMVWVWIEGVLGIGKVTSLFTIAISNRDLHLYSLGHILIER  
MQSCGQDPTFLLNHFLRDVSIKGLLPFVLKTIEYGGSKIEAITLAKKYQHKHILKYFE  
TGKC

SEQ ID NO: 10 - traducción de 505-4R

MFSLQDICRKYLFQLPDSFDEYTLQVLGLYWEKHGSLQRIRKDA  
VFVQRNLIISINEALRIAASEGNRVRVVKLLLSWEGNFHYVIIGALEGDHYDLIHKYGS  
QIEDYHMILSSIHNANTFEKCHELSNCDMWCLIQNAIKYNMLPILQKHRNLTHEGEN  
QELFEMACEEQKYDIVLWIGQTLMLNEPEFIFDIAFERIDFSLLTMGYSLLFNNKMSS  
IDIHDEEDLISLLTEHLEKAATKGCFFFMLETCLKHGGNVNMAVLSKAVEYNHRKILDY  
FIRQKCLSRKDIEKLLLVAISNSASKKTLNLLLSYLNHSVKNIIIGKIVQSVLKNGDFT  
IIIFLKKKKINLVEPALIGFINYYYSYCFLEQFIHEFDIRPEKMIKMAARKGKLNMI  
EFLNEKYVHKDDLGAIFKFLKNLVCTMKHKKGKETLIVLIHKIYQVIQLETKEKFKLL  
RFYVMHDATIQFISMYKDCFNLAGFKPFLLECLDIAIKKNYPDMIRNIETLLKCE

5 El genoma completo para el aislado patógeno Benin 97/1 del virus de la fiebre porcina africana se da en el sitio Genbank: AM712239.1

A partir del estudio descrito por Chapman et al., (2008 - como anteriormente) se determinó que el genoma completo del aislado BA71 codifica 151 marcos abiertos de lectura (ORF), el aislado Benin 97/1 codifica 157 ORF y el aislado OURT88/3 codifica 151 ORF.

10 En este documento se describe un ASFV atenuado que carece de una versión funcional del gen DP148R.

15 La mutación de DP148R puede hacerse por si misma, o en combinación con mutaciones de la familia multigénica 360 genes 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L, u la familia multigénica 505 genes 1R, 2R, 3R y 4R como se describe en este documento. Esta combinación de mutaciones génicas puede producir un mejor perfil de seguridad para el virus atenuado.

DP148R está ubicado en la posición genómica 177915 a 178679 en el genoma de Benin 97/1. La secuencia proteínica es: Benin 97/1 177915-178679 - SEQ ID NO: 11

20 MQNKIPNFNLFFFLLYRMLEIVLATLLGDLQRLRVLT PQQRAVAFFRANTKELEDFLR  
SDGQSEEILSGPLLNRLLEPSCPLDILTGYHLFRQNPKAGQLRGLVKMLERLYDANI  
YNILSRLRPKKVRNKAIELYWVFRAIHICHAPLVLDIVRYEEDFAELAFICAAYFGEP  
QVMYLLYKYMPLTRAVLTDIAIQISLESNNQVGICYAYLMGGSLKGLVSAPLRKRLRA  
KLRSQRKKKDVLSPHDFLLLLLQ.

25 Las secuencias ortólogas de DP148R de otros genomas comparten entre un 74 y un 99 % de identidad de aminoácidos. Los genes de DP148R ortólogos de otros aislados de ASFV están ubicados en las posiciones:

Warthog: 181103 a 181549 - SEQ ID NO: 12

30 MLERLYDANIYNILSRLRPEKVRNKAVELYWVFRAINMCHAPLVLDIVRYEEDFAEL  
AFICAAYFGEPQVMYLLYKYMPLTRAVLTDIAIQISLESNSQVGICYAYLMGGSLKGLV  
RAPLRKRLRAKLRSQRKKKDVLP PHDFLLLLLQ

Kenya: 189417 a 189872 - SEQ ID NO: 13

30 MLERLYDANIYNMLARLRPELVDRDKAIELYWLFRAILMCHSPLVLEIVRHETMDFAET  
AFICAAYFSEPQVMYALYKFIPISSRAVLADAIQMCLESNSEAGICYAYLMGGSLKGV  
PGSLRKRLRASPLRQERKKKNVLPPEHLLMLHGI

Malawi LIL20/1: 183687 a 184346 - SEQ ID NO: 14

MQRAVAFFRVNTKELEDFLYPDGQSEELLPGLLLNRLLEPSGPIDILTGYHLFRENPK  
AGRLRGLEVKLLERLYDANIYNMLAQIRPELVRIKAIELYWLFRAILMCHSPLVLEIVRH  
ETMDFAELAFICAAYFSEPQVMYALYKFIPISRAVLADAIEMSLESNSETGICYAYLMG  
GSLKKGKVPGLRKRRLRASPLRQERKKKNVLPPEFLLMLHGI

Mkuzi: 185751 a 186515 - SEQ ID NO: 15

5 MQNKIPNFNLFFFLLYRMLEIVLATLLGDLQRLRVLTPOQRAVAFFRANTKELEDFLC  
SDGQSEEILSGPLLNRLLLEPSGPLDILTGYHLFRQNPAGQLRGLEVKMLERLYDANI  
YNILSRLRPEKVRNKAIELYWVFRAIHICHAPLVLDIVRYEEDFAELAFICAAYFGEP  
QVMYLLYKYMPLTRAVLTDAIRISLESNNQVGICYAYLMGGSLKGLVSAPLRKRCAK  
LRSQRKKKDVLSPHDFLLLLQ

10 Pretoriskup: 185416 a 185862 - SEQ ID NO: 16

MLERLYDANIYNILSRLRPEKVRNKAVELYWVFRAINMCHAPLVLDIVRYEEDFAEL  
AFICAAYFGEPQVMYLLYKYMPLSRVLTDAIQISLESNSQVGICYAYLMGGSLKGLV  
RAPLRKRLRAKLRSQRKKKDVLPDFLLLLQ

Tengani: 180112 a 180558 - SEQ ID NO: 17

15 MLERLYDANIYNILSRLRPEKVRNKAVELYWVFRAINMCHAPLVLDIVRNEELDFAEL  
AFICAAYFGEPQVMYLLYKYMPLTRAVLTDIQISLESNSQVGICYAYLMGGSLKGLV  
RAPLRKRLRAKLRSQRKKKDVLPDFLLLLQ

Warmbaths: 184606 a 185052 - SEQ ID NO: 18

20 MLERLYDANIYNILSRLRPEKVRNKAIELYWVFRAIHICHAPLVLDIVRYEEDFAELAF  
ICAAYFGEPQVMYLLYKYMPLTRAVLTDAIRISLESNNQVGICYAYLMGGSLKGLVSA  
PLRKRLRAKLRSQRKKKDVLSPHDFLLLLQ

OURT88/3: 169146 a 169592 - SEQ ID NO: 19

25 MLERLYDANIYNILSRLRPEKVRNKAIELYWVFRAIHICHAPLVLDIVRYEEDFAELAF  
ICAAYFGEPQVMYLLYKYMPLTRAVLTDIQISLESNNQVGICYAYLMGGSLKGLVSA  
PLRKRLRAKLRSQRKKKDVLSPHDFLLLLQ

25 AISLADOS DE VIRUS DE ASF

30 El virus de ASF atenuado de la presente invención puede obtenerse de un aislado de virus de ASF de tipo silvestre, pero incluye mutaciones en su genoma de modo que se eliminen o se interrumpan los siguientes genes de modo que el gen no se transcriba y/o traduzca: genes MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L y genes MGF 505 1R, 2R, 3R y 4R.

35 La expresión "de tipo silvestre" indica que el virus existía (en algún punto) en el terreno, y se aisló de un hospedador natural, tal como un cerdo doméstico, garrapata o facóquero. La siguiente tabla 2 enumera aislados de virus de ASF conocidos.

La estructura genómica de los ASFV es conocida en la técnica, como se detalla en Chapman et al., (2008) J. Gen. Virol. 89:397-408.

## ES 2 750 960 T3

La expresión "corresponde a" significa que el resto del genoma es igual, o sustancialmente igual, a la cepa de tipo silvestre. Por tanto, el genoma del virus atenuado de la presente invención puede incluir los genes de la cepa de tipo silvestre, distintos de los genes MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L y los genes MGF 505 1R, 2R, 3R y 4R.

5 El genoma del virus atenuado puede comprender los ORF conservados en las 10 secuencias genómicas disponibles y completamente eliminadas o interrumpidas de modo que el gen no se transcriba y/o traduzca: genes MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L y genes MGF 505 1R, 2R, 3R y 4R.

10 El genoma del virus de ASF recombinante atenuado de la invención puede corresponder al de una cepa de virus de ASF virulenta (con la excepción de los genes MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L y los genes MGF 505 1R, 2R, 3R y 4R).

Los aislados del virus de la fiebre porcina africana descritos hasta la fecha se resumen en la tabla 2, junto con sus números de acceso a Genbank.

15 Las cepas del virus de ASF virulentas conocidas incluyen: Georgia 2007/1, Benin 97/1, Kenyan, Malawi Lil20/1, Pretorisuskop/96/4 y Tangani 62.

Tabla 2

Aislado	País	Hospedador	Año	Virulencia	N.º de acceso a GenBank
Georgia 2007/1	Georgia	Cerdo doméstico	2007	Alta	FR862468
BA71qqV	España	Cerdo doméstico	1971	Adaptada a cultivo tisular	U18466
Benin 97/1	España	Cerdo doméstico	1997	Alta	AM712239
OURT88/3	Portugal	Garrapata	1988	Baja	AM712240
Kenya	Kenia	Cerdo doméstico	1950	Alta	AY261360
Malawi Lil20/1	Malawi	Garrapata	1983	Alta	AY261361
Mkuzi	Zululandia	Garrapata	1978	Desconocida	AY261362
Pretorisuskop/96/4	Sudáfrica	Garrapata	1996	Alta	AY261363
Tangani 62	Malawi	Cerdo doméstico	1962	Alta	AY261364
Warmbaths	Sudáfrica	Garrapata	1987	Desconocida	AY261365
Warthog	Namibia	Facóquero	1980	Desconocida	AY261366

20 El genoma del virus de ASF recombinante atenuado de la invención (con la excepción de los genes MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L y los genes MGF 505 1R, 2R, 3R y 4R) puede corresponder al del aislado Benin 97/1.

25 El genoma del virus de ASF recombinante atenuado de la invención (con la excepción de los genes MGF 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L y los genes MGF 505 1R, 2R, 3R y 4R) puede corresponder al de una cepa de virus de ASF cuya virulencia actualmente es desconocida, por ejemplo: Mkuzi, Warmbaths y Warthog.

30 La presente invención también proporciona una composición de vacuna que comprende una pluralidad de virus de ASF atenuados. La pluralidad de virus de ASF atenuados puede corresponder a una pluralidad de diferentes aislados, por ejemplo, diferentes aislados de virulencia alta o desconocida.

Dicha composición de vacuna puede provocar una respuesta inmunitaria de protección cruzada contra varios o sustancialmente todos los virus de ASF.

### 35 ELIMINACIONES

En el virus de la fiebre porcina africana (ASF) atenuado de la presente invención se eliminan o se interrumpen los siguientes genes de modo que el gen no se transcriba y/o traduzca:

40 familia multigénica 360 genes 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y  
familia multigénica 505 genes 1R, 2R, 3R y 4R.

Los genes pueden, por ejemplo, eliminarse completamente.

45 En particular, pueden eliminarse los siguientes genes:

familia multigénica 360 genes 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y  
familia multigénica 505 genes 1R, 2R y 3R.

5 También se describe en este documento un ASFV atenuado que carece de versión funcional de DP148R. El gen puede estar completa o parcialmente eliminado.

#### INTERRUPCIONES

10 En el virus de la fiebre porcina africana (ASF) atenuado de una realización de la presente invención puede interrumpirse uno o más de los siguientes genes de modo que el gen no se transcriba y/o traduzca::

familia multigénica 360 genes 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y  
familia multigénica 505 genes 1R, 2R, 3R y 4R

15 En particular, los siguientes genes pueden interrumpirse de modo que el gen no se transcriba y/o traduzca:

familia multigénica 360 gen 9L; y  
familia multigénica 505 gen 4R

20 También se describe en este documento un virus de ASF atenuado en el que está interrumpido el gen DP148R.

El gen puede interrumpirse, por ejemplo, eliminando o modificando de otro modo el codón de inicio ATG del gen.

25 El genoma puede comprender uno o más cambios nucleotídicos que anulen la expresión del gen. Por ejemplo, la expresión del gen puede anularse por un desplazamiento de marco o por la introducción de uno o más codones de parada en el marco abierto de lectura del gen o una modificación de un sitio de inicio de la traducción.

30 La interrupción causa que el gen no se transcriba y/o traduzca.

#### GENES FUNCIONALES

35 Como se menciona anteriormente, la secuencia genómica completa de la cepa de ASFV atenuada OURT88/3 se ha determinado y comparado con la de virus virulentos (Chapman et al., 2008 como anteriormente). Además de las eliminaciones mencionadas anteriormente, la cepa OURT88/3 también tiene interrupciones en otros 3 genes: EP402R, EP153R y DP148R (previamente denominado MGF360 18R).

40 EP402R codifica una proteína CD2v que se incorpora en la capa externa del virus y puede tener una función en la entrada y la propagación del virus. También puede ser una diana de anticuerpos que inhiben la infección. EP153R es una lectina de tipo C. DP148R inhibe el interferón de tipo I.

45 El genoma del virus atenuado de la presente invención puede comprender versiones completas, ininterrumpidas o funcionales de uno o más de los genes EP402R y EP 153R. En el virus atenuado de la presente invención, estos dos genes pueden estar completos, ininterrumpidos y ser funcionales.

#### COMPOSICIÓN DE VACUNA/FARMACÉUTICA

La presente invención también proporciona una vacuna que comprende un virus de ASF atenuado de la invención.

50 El término "vacuna", como se usa en este documento, se refiere a una preparación que, cuando se administra a un sujeto, induce o estimula una respuesta inmunitaria protectora. Una vacuna puede hacer que un organismo sea inmune a una enfermedad particular, en el presente caso ASF. La vacuna de la presente invención, por tanto, induce una respuesta inmunitaria en un sujeto, que es protectora contra la posterior exposición al virus de ASF.

55 La vacuna puede comprender una pluralidad de virus de ASF atenuados de diferentes genotipos. Dicha vacuna puede tener la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria de protección cruzada contra una pluralidad de genotipos de virus de ASF.

La vacuna puede ser útil en la prevención de la fiebre porcina africana.

60 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más virus de ASF atenuados de la invención. La composición farmacéutica puede usarse para tratar la fiebre porcina africana.

65 La vacuna o la composición farmacéutica puede comprender uno o más virus de ASF atenuados de la invención y opcionalmente uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos y diluyentes.

La inmunización con OURT88/3 induce una alta respuesta de IFN $\gamma$ , que sugiere que está mediada por linfocitos T. El virus atenuado de la presente invención parece inducir una respuesta mediada por linfocitos T reducida (véanse las figuras 7 y 13). El virus atenuado de la presente invención, por lo tanto, parece inducir una respuesta inmunitaria celular más "útil" (es decir, más protectora) que OURT88/3.

El virus atenuado de la presente invención puede inducir una respuesta mediada por linfocitos T reducida en comparación con OURT88/3. Los métodos para analizar y comparar las respuestas mediada por linfocitos T son conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el análisis de la proliferación de linfocitos T en respuesta a un antígeno (por ejemplo, recuentos celulares, incorporación de timidina o incorporación de BrdU), ensayo de la secreción y/o expresión de citocinas en respuesta a antígeno (por ejemplo, ELISA, ELISPOT, citometría de flujo) o determinación de subpoblaciones de linfocitos presentes después de inoculación de un sujeto con el virus (por ejemplo, usando citometría de flujo).

El virus atenuado de la presente invención puede inducir una respuesta inmunitaria que comprende un porcentaje reducido de células gamma delta/CD8+ en circulación y/o un porcentaje reducido de CD8+/CD4-/ $\gamma\delta$ TCR- (células únicamente CD8) y/o un porcentaje reducido de células CD8+/CD3- (NK) en comparación con OURT88/3.

#### MÉTODOS DE PREVENCIÓN/TRATAMIENTO

En este documento se describe un método de prevención y/o tratamiento de ASF en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de un virus atenuado, vacuna o composición farmacéutica de la invención.

El término "prevención" pretende hacer referencia a evitar, retardar, impedir o dificultar el contagio de ASF. La vacuna puede, por ejemplo, prevenir o reducir la probabilidad de que un ASFV infeccioso entre en una célula.

El término "tratamiento" pretende hacer referencia a la reducción o el alivio de al menos un síntoma de una infección existente por ASF.

El sujeto puede ser cualquier animal que sea susceptible a infección por ASF. Los animales susceptibles a ASF incluyen cerdos domésticos, facóqueros, cerdos salvajes o garrapatas.

El sujeto vacunado de acuerdo con la presente invención puede ser un cerdo doméstico.

#### ADMINISTRACIÓN

La vacuna de la invención puede administrarse por cualquier vía conveniente, tal como por inyección intramuscular. Otras vías adecuadas de administración incluyen intranasal, oral, subcutánea, transdérmica y vaginal (por ejemplo, durante inseminación artificial). En una realización, la administración oral comprende añadir la vacuna al pienso para animales o al agua de beber. En otra realización, la vacuna puede añadirse a un cebo para un animal salvaje, por ejemplo, un cebo adecuado para jabalís, cerdos salvajes, potamóqueros o facóqueros.

Los autores de la presente invención han descubierto que el virus atenuado Benin $\Delta$ MGF de la invención es eficaz a una dosis inferior en comparación con OURT88/3. Por ejemplo, en el ejemplo 3, los cerdos recibieron  $10^2$  HAD de Benin $\Delta$ MGF que se comparó con una dosis de  $10^4$  TCID $_{50}$  del virus OURT88/3.

La dosis para inmunización de cerdos puede ser, por lo tanto, de menos de  $10^4$  HAD $_{50}$  o TCID $_{50}$  por cerdo. Por ejemplo, la dosis puede ser entre  $10^2$ - $10^3$  HAD $_{50}$  o TCID $_{50}$ . La dosis puede ser de aproximadamente  $10^2$  HAD $_{50}$  o TCID $_{50}$  por cerdo.

La vacuna puede administrarse siguiendo una pauta de sensibilización-refuerzo. Por ejemplo, después de la primera inoculación, los sujetos pueden recibir una segunda administración de refuerzo en algún momento (tal como aproximadamente 7, 14, 21 o 28 días) después. Típicamente, la administración de refuerzo es a una dosis mayor que la administración de sensibilización. La dosis de refuerzo puede ser de aproximadamente  $10^2$ ,  $10^3$  o  $10^4$  HAD $_{50}$  o TCID $_{50}$  del virus atenuado recombinante por cerdo.

#### MÉTODO PARA PREPARAR VIRUS ATENUADO

La presente invención también proporciona un método de atenuación de un virus de la fiebre porcina africana (ASF), que comprende la etapa de eliminar los siguientes genes y/o de interrumpir los siguientes genes de modo que el gen no se transcriba y/o traduzca:

familia multigénica 360 genes 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y  
familia multigénica 505 genes 1R, 2R, 3R y 4R.

Los siguientes genes pueden eliminarse:

familia multigénica 360 genes 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y  
familia multigénica 505 genes 1R, 2R y 3R.

Los siguientes genes pueden interrumpirse de modo que el gen no se transcriba y/o traduzca:

familia multigénica 360 gen 9L; y  
familia multigénica 505 gen 4R.

También se describe en este documento un método de atenuación de un virus de la fiebre porcina africana (ASF), que comprende la etapa de eliminar o interrumpir parcial o completamente, la expresión del gen DP148R.

La mutación DP148R también puede hacerse en combinación con mutaciones de los genes de la familia multigénica 360 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L y los genes de la familia multigénica 505 1R, 2R, 3R y 4R como se describe en este documento.

Los métodos para la eliminación de genes víricos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse recombinación homóloga, en que se crea un vector de transferencia en que se ha perdido uno o más genes relevantes y usarse para transfectar células infectadas por virus. Los virus recombinantes que expresan la nueva parte de secuencia entonces pueden seleccionarse. Pueden usarse procedimientos similares para interrumpir la expresión génica, por ejemplo, por eliminación del codón de inicio ATG.

#### ADMINISTRACIÓN INTRANASAL

Los autores de la presente invención, han descubierto sorprendentemente que la administración intranasal de un virus de la fiebre porcina africana (ASF) atenuado provoca protección mejorada y menos efectos secundarios en comparación con la administración mediante la vía intramuscular, y puede requerir una dosis inferior para obtener protección. En particular, la administración intranasal de la cepa atenuada OURT88/3 demostró protección completa (100 %) contra exposición a virus ASFV virulento precursor, que representa una mejora significativa sobre las tasas de supervivencia usando el mismo virus atenuado mediante vía intramuscular.

Por consiguiente, en este documento se describe un virus de ASF atenuado para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la fiebre porcina africana, en el que el virus atenuado se administra por vía intranasal.

También se describe en este documento un método para tratar y/o prevenir la fiebre porcina africana en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un virus de ASF atenuado al sujeto por vía intranasal.

También se describe en este documento una vacuna que comprende un virus de ASF atenuado, en la que la vacuna se formula para administración intranasal.

Se proporciona además un kit para el suministro de una formulación de vacuna intranasal, que comprende:

- a) una vacuna de virus de ASF atenuado; y
- b) un dispositivo de suministro intranasal.

También se describe en este documento un dispositivo de suministro intranasal que comprende una vacuna de virus de ASF atenuado. Los dispositivos adecuados para administración intranasal de vacunas son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, una jeringa o gotero, un dispositivo de aerosol (por ejemplo, Omron, Philips Respironics InnoSpire Deluxe, Devilbiss máscara/nebulizador y compresor BreathEasy), un dispositivo de atomización a la mucosa (por ejemplo, LMA MAD Nasal™, Teleflex VaxiNator™), una bomba rociadora monodosis o multidosis, un dispensador de polvo monodosis o un dispensador de polvo bidosis.

El virus de ASF atenuado puede ser cualquier virus de ASF adecuado. En una realización, el virus de ASF atenuado puede ser uno que no se considere adecuado para su uso en la prevención o el tratamiento de la fiebre porcina africana cuando se administre por una vía diferente de administración, tal como la vía intramuscular, por ejemplo, debido a un perfil de seguridad inaceptable o baja eficacia. En particular, el virus de ASF atenuado puede ser OURT88/3. El virus de ASF atenuado puede ser, como alternativa, un virus de ASF atenuado que carece de una versión funcional de la familia multigénica 360 genes 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L y la familia multigénica 505 genes 1R, 2R, 3R y 4R, y/o carece de una versión funcional de DP148R. El virus de ASF atenuado puede ser cualquier virus de ASF atenuado adecuado como se describe en este documento, tal como BeninΔMGF o BeninΔDP148R.

La administración intranasal puede ser en forma de gota, pulverización o polvo seco, o puede ser una formulación de vacuna nebulizada o en forma de aerosol. La dosis es típicamente de 2 ml, administrada como 1 ml por fosa nasal.

Los autores de la presente invención han descubierto que la administración intranasal de virus de ASF atenuado es eficaz a una dosis inferior en comparación con la administración intramuscular. Por ejemplo, en el ejemplo 6, cerdos inmunizados por vía intranasal con  $10^3$  o  $10^4$  del OURT883 tuvieron protección completa (100 %) contra exposición

mortal, en comparación con tasas de supervivencia mucho más bajas en cerdos inmunizados con las mismas dosis mediante vía intramuscular.

5 La dosis para inmunización intranasal puede ser, por lo tanto, de  $10^4$  HAD<sub>50</sub> o TCID<sub>50</sub> o menos por cerdo. Por ejemplo, la dosis puede ser entre  $10^2$ - $10^3$  HAD<sub>50</sub> o TCID<sub>50</sub>. La dosis puede ser de aproximadamente  $10^2$  HAD<sub>50</sub> o TCID<sub>50</sub> por cerdo.

10 La vacuna puede administrarse siguiendo una pauta de sensibilización-refuerzo. Por ejemplo, después de la primera inoculación, los sujetos pueden recibir una segunda administración de refuerzo en algún momento (tal como aproximadamente 7, 14, 21 o 28 días) después. Típicamente, la administración de refuerzo es a una dosis mayor que la administración de sensibilización. La dosis de refuerzo puede ser de aproximadamente  $10^2$ ,  $10^3$  o  $10^4$  HAD<sub>50</sub> o TCID<sub>50</sub> del virus atenuado recombinante por cerdo.

15 La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de ejemplos, que pretenden servir para ayudar a un experto en la materia a realizar la invención y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la invención.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1 - Aislamiento del virus recombinante BeninΔMGF

20 Los genes MGF 360 10L, 11L, 12L, 13L, 14L y los genes MGF 505 1R, 2R, 3R se eliminaron del aislado de ASFV Benin 97/1. Además, los codones ATG de MGF 360 9L y de MGF 505 4R se eliminaron para interrumpir la expresión de estos genes. Los genes eliminados se reemplazaron con el gen GUS bajo el control del promotor de p72 de ASFV. Esto se consiguió por recombinación homóloga entre el plásmido pΔMGFGUS y el genoma vírico (véase materiales y métodos y la fig. 1). Los virus recombinantes se identificaron por expresión del gen GUS y se purificaron por infección a dilución limitante. Se aislaron dos virus independientes BeninΔMGFA2 y BeninΔMGFA1 usando el método para reducir la posibilidad de que el fenotipo de la eliminación génica estuviera asociado con mutaciones que pueden haberse producido en otra parte en el genoma.

30 El virus recombinante BeninΔMGFA2, se caracterizó adicionalmente. Se aisló el ADN genómico de Benin 97/1 de tipo silvestre y de BeninΔMGFA2 y se analizó por PCR para ensayar la inserción del gen marcador GUS y la eliminación de los ocho genes MGF (fig. 2). Se diseñaron los cebadores BeninD8F y BeninD8R para hibridar dentro del gen MGF 360 9L y el gen MGF360 4R, que flanquean el sitio de inserción. La PCR usando estos cebadores amplificó un fragmento de 2046 pb usando el ADNg del virus recombinante BeninΔMGFA2 como molde (fig. 2, carril 1).

35 El tamaño de esta banda es coherente con la de un producto de PCR en que se han eliminado los ocho genes MGF y se han reemplazado por el gen marcador GUS bajo el control del promotor de vp72 de ASFV. Para confirmar que el virus recombinante BeninΔMGFA2 contiene el gen GUS, se realizó una PCR usando un cebador del gen GUS interno, RGUS, y el cebador BeninΔ8F. Esta PCR amplificó un fragmento coherente con el tamaño esperado de 1552 pb (fig. 2, carril 2) cuando se usaba el ADN de BeninΔMGFA2 como molde. Como se esperaba, no se detectó ningún fragmento de PCR usando estos cebadores con el ADNg de Benin 97/1 de tipo silvestre como molde (fig. 2, carril 3). Para confirmar que el virus recombinante BeninΔMGFA2 no contenía el gen MGF 360 10L, se realizaron reacciones de PCR usando los cebadores BeninΔ8INTF y BeninΔ8INTR ubicados en las posiciones 19613 y 20110 dentro del gen MGF 360 10L. No se aisló ningún fragmento de PCR usando el ADNg del virus recombinante BeninΔMGFA2 como molde (fig. 2, carril 3), pero como se esperaba se aisló un fragmento de 498 pb usando el ADNg de Benin 97/1 de tipo silvestre como molde (fig. 2, carril 4). Tomados conjuntamente, los datos de PCR mostraron que el virus recombinante BeninΔMGFA2 contiene el gen GUS en el sitio de los ocho MGF. Para confirmar adicionalmente que los ocho genes MGF se habían eliminado, se aisló el ADNg del virus BeninΔMGFA2 y se secuenció la unión en el sitio de eliminación/inserción usando los cebadores X e Y. El análisis de la secuencia reveló que lo ocho genes MGF se habían eliminado y el gen marcador GUS se había insertado (fig. 3). Las cinco primeras pb del gen flanqueante MGF 360 9L y las siete primeras pb del gen flanqueante MGF 505 4R también se habían eliminado. Como las secuencias eliminadas adicionales contenían cada una el codón de inicio ATG, puede concluirse que los genes MGF 360 9L y MGF 505 4R no se expresan por el virus recombinante BeninΔMGFA2.

#### 55 Ejemplo 2 - Características de crecimiento del virus recombinante BeninΔMGFA2

60 Para investigar si la eliminación de los ocho genes MGF afectaba a la replicación del virus, se comparó el crecimiento de BeninΔMGFA2 con el virus Benin 97/1 precursor en macrófagos primarios de médula ósea porcina. Se infectaron células a alta multiplicidad de infección (m.o.i.) ( $10$  HAD<sub>50</sub>/célula) y se recogió el virus total de los sobrenadantes en diferentes momentos después de la infección. La fig. 4 muestra que no hubo diferencias significativas entre los títulos de Benin 97/1 de tipo silvestre y los de virus BeninΔMGFA2 recuperados en cualquiera de los puntos temporales medidos. Esto muestra que la eliminación de los ocho genes MGF no afectaba significativamente a la replicación de BeninΔMGFA2 en macrófagos primarios de médula ósea porcina.

#### 65 Ejemplo 3 - Inoculación de cerdos con virus recombinante BeninΔMGF y virus atenuado OURT88/3

Un grupo de tres cerdos (grupo 1) se inmunizó por vía intramuscular con  $10^2$  HAD del virus de eliminación Benin $\Delta$ MGFA2, un segundo grupo de dos cerdos (grupo 2) se inoculó con  $10^2$  HAD del virus de eliminación Benin $\Delta$ MGFA1 y un tercer grupo de cuatro cerdos (grupo 3) se inoculó con  $10^4$  TCID<sub>50</sub> de virus atenuado OURT88/3. Se registraron las puntuaciones clínicas y las temperaturas para cada cerdo cada día y se tomaron muestras sanguíneas cada siete días. Los resultados de estos registros se muestran en la fig. 5 y en la fig. 6 y muestran que ninguno de los cerdos tenía una puntuación clínica por encima de 3 en ningún día después de la inoculación. Cuatro cerdos (grupo 1 cerdos 21 y 22, grupo 2 cerdos 23 y 25) tuvieron una temperatura por encima de 40 °C, pero esto fue durante uno o dos días únicamente.

En el día 20 después de la inoculación, se tomaron 20 ml de sangre de cada cerdo, se purificaron las PBMC y las células de cerdo de los grupos 1 y 2 se estimularon con virus Benin $\Delta$ MGFA2 y Benin $\Delta$ MGFA1, respectivamente. Las PBMC aisladas de los cerdos del grupo 3 se estimularon con aislado de virus OURT88/3 y se midieron los números de células productoras de IFN $\gamma$  de los tres grupos por ELISpot. Los resultados muestran que tres de los cuatro cerdos del grupo 3 tenían una alta respuesta de IFN $\gamma$  contra OURT88/3, mientras que ninguno de los cerdos de los grupos 1 y 2 tenían una alta respuesta de IFN $\gamma$  contra Benin $\Delta$ MGF u OURT88/3 (fig. 7). A los 21 días después de la primera inoculación, los cerdos de los grupos 1 y 2 recibieron refuerzo por vía intramuscular con  $10^4$  HAD de los virus Benin $\Delta$ MGFA2 y Benin $\Delta$ MGFA1, respectivamente, y los cerdos del grupo 3 con  $10^4$  TCID<sub>50</sub> de OURT88/3. Las observaciones clínicas mostraron que únicamente un cerdo (grupo 3, cerdo 19) tenía una puntuación clínica por encima de la puntuación 2 (fig. 8) y que únicamente un cerdo (grupo 3 cerdo 19) tenían una temperatura por encima de 40 °C durante 1 día (fig. 9).

#### Ejemplo 4 - Exposición de todos los cerdos a Benin 97/1 virulento

En el día 46 después de la inoculación inicial (21 días después del refuerzo) los tres grupos de cerdos (grupos 1, 2 y 3) se expusieron por vía intramuscular con  $10^4$  HAD de virus Benin 97/1 virulento. Además, también se expuso un grupo de control de tres cerdos no inoculados (grupo 4) con  $10^4$  HAD de virus Benin 97/1 virulento. Los tres cerdos del grupo 4 y un cerdo (cerdo 19) del grupo 3 desarrollaron altas temperaturas y altas puntuaciones clínicas (por encima de la puntuación 4) y se sacrificaron a los cinco días después de la exposición porque se había alcanzado el criterio de valoración compasivo sobre autorización en animales (fig. 10 y 11). Los cinco cerdos de los grupos 1 y 2 y los tres cerdos restantes del grupo 3 estaban protegidos contra exposición a virus virulento Benin 97/1 y siguieron estando sanos hasta el día 63 cuando se terminó el experimento (fig. 12).

En el día 63 después de la inoculación inicial, se aislaron las PBMC de sangre y se aislaron células de bazo y estas se estimularon con cepas de virus y se detectaron los números de células productoras de IFN $\gamma$  por ensayo ELISpot. Los resultados mostraron que los tres cerdos del grupo 3 mostraban alta respuestas de IFN $\gamma$  en células tanto de sangre como de bazo, mientras que únicamente un cerdo (cerdo 24, grupo 2) de los grupos 1 y 2 mostró altas respuestas de IFN $\gamma$  en sangre y bazo (fig. 13).

#### Ejemplo 5 - Caracterización de la respuesta inmunitaria generada por Benin $\Delta$ MGF

Se demostró que la infección con Benin $\Delta$ MGF disminuía el número de linfocitos T CD8+ gamma delta en circulación tan pronto como el día 10 después de la infección. Se observaron números mayores de células CD8+CD4-  $\gamma\delta$ TCR- (únicamente CD8) y CD8+CD3- (linfocitos NK) en cerdos infectados con OURT88/3 en los últimos días después de la infección (días 53 y 63). No se observaron otras diferencias significativas entre los animales infectados con OURT88/3 y Benin $\Delta$ MGF para las otras poblaciones celulares estudiadas (CD4+ total, CD4+ CD8+ y linfocitos T gamma delta totales) (véanse las figuras 14 a 20).

#### Conclusiones

La inoculación de cerdos con Benin $\Delta$ MGF demuestra que los virus están atenuados. Se inocularon cerdos de los grupos 1 y 2 con  $10^2$  HAD de los virus recombinantes aislados independientemente Benin $\Delta$ MGFA2 y Benin $\Delta$ MGFA1. Ninguno de los cerdos mostró una puntuación clínica por encima de la puntuación 3 y ninguno mostró una temperatura por encima de 40,5 °C. Esto demostró que los virus de eliminación Benin $\Delta$ MGFA2 y Benin $\Delta$ MGFA1 estaban atenuados y se detectó una corta fiebre transitoria (1 o 2 días) en 4 de los 5 cerdos, pero ningún otro signo clínico asociado con infección por ASFV.

Los cerdos de los grupos 1 y 2 recibieron refuerzo por vía intramuscular con  $10^4$  HAD de virus Benin $\Delta$ MGFA2 y Benin $\Delta$ MGFA1. Ninguno de los cerdos mostró una puntuación clínica por encima de la puntuación 2 y ningún cerdo mostró una temperatura por encima de 40,1 °C. Se observaron resultados similares después del refuerzo de los cerdos del grupo 3 con la cepa atenuada OURT88/3.

La exposición de cerdos inmunizados con Benin $\Delta$ MGF con una dosis mortal de Benin 97/1 demostró un 100 % de protección. Los cerdos de los grupos 1, 2 y 3 y tres cerdos de control no inoculados se expusieron a  $10^4$  HAD de aislado de virus virulento Benin 97/1. Los cinco cerdos (100 %) de los grupos 1 y 2 (Benin $\Delta$ MGFA2 y Benin $\Delta$ MGFA1) estaban protegidos contra exposición al virus virulento. Un 75 % de los cerdos del 3 y un 0 % de los cerdos del grupo 4 estaban

protegidos contra Benin 97/1 (fig. 12). Después de la exposición a Benin 97/1, ningún cerdo de los grupos 1 y 2 mostró una temperatura por encima de 39,6 °C y ningún cerdo tenía una puntuación clínica por encima de 2. Por el contrario, todos los cerdos del grupo 4 mostraron temperaturas por encima de 40,8 °C y tenían puntuaciones clínicas por encima de la puntuación 8.

Los virus de eliminación Benin $\Delta$ MGFA2 y Benin $\Delta$ MGFA1 mostraron un mejor nivel de protección (100 %) en comparación con la cepa atenuada OURT88/3 (75 %) frente a la exposición con Benin 97/1 virulento.

### Materiales y métodos

#### Células y virus

Se obtuvo el aislado de ASFV no hemoabsorbente avirulento OUR T88/3 de Ourique en Portugal. Se ha descrito previamente el aislado hemoabsorbente virulento Benin 97/1. Tanto OUR T88/3 como Benin 97/1 son virus de genotipo I de p72 que se cultivaron en cultivos de macrófagos primarios derivados de médula ósea. Los títulos de los virus se determinaron como la cantidad de virus que causaba hemoadsorción (para aislados HAD) o efectos citopáticos (para aislados no HAD) en un 50 % de los cultivos infectados (HAD<sub>50</sub>/ml o TCID<sub>50</sub>/ml).

#### Construcción del vector de transferencia plasmídica pDMGFGUS

Se construyó el vector plasmídico p $\Delta$ MGFGUS para facilitar la eliminación de los ocho genes MGF (MGF 360 10L, 11L, 12L, 13L, 14L y MGF 505 1R, 2R, 3R) del genoma de Benin 97/1. Usando el ADN genómico de Benin 97/1 como molde, se amplificó un fragmento de 479 pb (flanco I) ubicado en el extremo 3' del gen MGF 360 9L en la posición 19004 - 19482 inmediatamente en dirección 5' del gen MGF 360 10L usando los cebadores FlancoI directo (ACGTTGCAAAGCTTCCATTAATCCCTCCAGTTGTTTC) y FlancoI inverso (ACGTTGCAGGTACCCCTCTCTCTGCAGACTCTCACC). Usando el ADN genómico de Benin 97/1 como molde, se amplificó un fragmento de 501 pb (flanco D) ubicado en el extremo 5' del gen MGF 505 4R en la posición 30033 - 30533 inmediatamente en dirección 3' del gen MGF 505 3R usando el cebador FlancoD directo (ACGTTGCAGCGGCCCTCTCCAAGACATCTGTCCGG) y cebador FlancoD inverso (ACGTACGTCTCGAGCCTCACATGCCATCTCAAACAATTCC). El fragmento flanco I se digirió con HindIII y KpnI y se ligó en el vector pP72loxPGUS que también se digirió con HindIII y KpnI para crear el plásmido pFlancoI-GUS. El fragmento flanco D se digirió con las enzimas NotI y XhoI y se ligó en el vector pFlancoI-GUS digerido con las mismas enzimas para crear el vector de transferencia pDMGFGUS. El plásmido pDMGFGUS contiene un gen marcador GUS flanqueado en el lado a mano izquierda por la sección 3' terminal del gen MGF 360 9L, una secuencia promotora de vp72 de ASFV y una secuencia los. Al lado derecho del gen GUS está ubicada la secuencia 5' terminal del gen MGF 505 4R. (fig. 1).

#### Construcción y aislamiento del virus recombinante Benin $\Delta$ MGF

Se infectaron macrófagos alveolares porcinos primarios (placa de 35 mm, 10<sup>6</sup> células) con Benin 97/3 a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 10 y se incubaron a 37 °C durante 5 horas, y después se lavaron con solución salina de Earle (suero porcino al 10 %, penicilina/estreptomicina 10 000 u mg<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>). Se incubó una mezcla de transfección que contenía 250  $\mu$ l de Optimem (Gibco-Life Technologies), 5  $\mu$ g de pDMGFGUS y 7,5  $\mu$ l de reactivo de transfección TRANS-IT LT-1 (Mirus) a 20 °C durante 20 minutos antes de añadirla a las células infectadas. La incubación se continuó a 37 °C durante 4 horas antes de la adición de 1 ml de solución salina de Earle y se continuó la incubación a 37 °C. Se recogió el virus de las células infectadas y transfectadas 72 horas después de la infección y se retiraron los desechos celulares por centrifugación. Se usaron alícuotas del sobrenadante que contenía virus para infectar macrófagos de médula ósea en placas de 96 pocillos. A las 90 horas después de la infección, se añadió solución salina de Earle que contenía 100  $\mu$ g/ml de 5-bromo-4-cloro-1H-indol-3-ilo (ácido  $\beta$ -D-glucopiranosidurónico (X-Gluc)) y se recogieron los pocillos que aparecían "azules" que contenían virus que expresan GUS recombinantes. Se realizaron además infecciones a dilución limitante en macrófagos de médula ósea de cerdo que contenían X-Gluc hasta que se observó únicamente un pocillo azul por placa de 96 pocillos que indicaba infección con el virus de eliminación recombinante. No se observó ninguna evidencia de infección por virus (efecto citopático (cpe)) en los otros 95 pocillos. Se aislaron dos virus recombinantes independientes (Benin $\Delta$ MGFA2 y Benin $\Delta$ MGFA1) usando este método. Se cultivaron soluciones madre de alto título de los virus recombinantes Benin $\Delta$ MGFA2 y Benin $\Delta$ MGFA1 en macrófagos de médula ósea porcina.

#### Características de crecimiento del virus recombinante Benin $\Delta$ MGFA2

El crecimiento de Benin $\Delta$ MGFA2 se comparó con el del virus Benin 97/1 precursor en macrófagos primarios de médula ósea porcina. Las células se infectaron a alta multiplicidad de infección (m.o.i.) (10 HAD<sub>50</sub>/célula) y se recogió el virus total de los sobrenadantes en diferentes momentos después de la infección.

#### Purificación del ADN genómico vírico y PCR

Se purificó el ADN genómico vírico de recolecciones de virus Benin $\Delta$ MGF y Benin 97/1 de 300  $\mu$ l de sobrenadante de

células infectadas que son macrófagos infectados de médula ósea porcina usando un kit GE Healthcare Illustra Genomic Prep Mini Spin. El análisis del ADN genómico vírico se realizó por PCR usando los cebadores de ADN específicos BeninD8F (GGTGAGAGTCTGCAGAGAGAGG), BeninD8R (GCCCTAGCACTTGTAACG), RGUS (CCTTCTCTGCCGTTTCCAAATCGCCGC), BeninD8INTF (CGATGTATCATTGATGTC), BeninD8INTR (GGATAATCTTAGGGAGGCC)

Secuenciación del virus recombinante BeninΔMGFA2

Se aisló el ADNg vírico de la recolección de células infectadas BeninDMGF y se secuenció usando los siguientes cebadores 9LF (ATGACGCATTAAACCGGCG) y 4RR (CAGTATAGCCCTAGCACTTG)

ELIspot

Se realizó ELIspot de IFNg como se describe previamente (Gerner et al., 2006 Virus Res> 121:223-228).

Inoculación de cerdos y exposición

Los cerdos usados eran cruce Large white x Landrace, de un peso promedio de 15 kg en la primera inoculación. Todos los cerdos se mantuvieron en instalaciones SAPO4 de alta seguridad todo el tiempo y el experimento se realizó bajo licencia del Ministerio del Interior PPL 70/7198-. Un grupo de tres cerdos (grupo 1, cerdos 21, 22 y 23) se inoculó por vía intramuscular con  $10^2$ HAD<sub>50</sub> de virus recombinante BeninDMGFA2. Un segundo grupo de dos cerdos (grupo 2, cerdos 24 y 25) se inoculó por vía intramuscular con  $10^2$ HAD<sub>50</sub> de virus recombinante BeninΔMGFA1. un tercer grupo de cuatro cerdos (grupo 3, cerdos 16, 18, 19 y 20) se inoculó con  $10^4$  TCID<sub>50</sub> de la cepa atenuada OURT88/3. Los autores de la invención habían determinado previamente que se necesitaba una dosis de  $10^4$  TCID<sub>50</sub> de OURT88/3 para inducir protección y que  $10^3$  era menos eficaz.

Tres semanas después del refuerzo de las respuestas inmunitarias adaptativas específicas de ASFV, los cerdos de los grupos 1 y 2 se inocularon con  $10^4$ HAD<sub>50</sub> de virus recombinante BeninDMGFA2 y BeninDMGFA1, respectivamente, y los cerdos del grupo 3 se inmunizaron con  $10^4$ TCID<sub>50</sub> de OURT88/3. Tres semanas después del refuerzo, los grupos 1, 2, 3 y un cuarto grupo de tres cerdos (grupo 4, cerdos 26, 27 y 28) que contenía tres cerdos no inmunizados, se expusieron por vía intramuscular con  $10^4$ HAD<sub>50</sub> de aislado de ASFV virulento Benin 97/1. Los cerdos inoculados con ASFV y expuestos se controlaron diariamente para la temperatura corporal y los signos clínicos y estos se puntuaron como se presenta por King et al., 2011. Todos los cerdos se examinaron tras la muerte por sacrificio y se recogieron el bazo y los tejidos linfáticos.

Caracterización de subpoblaciones de linfocitos T

Se recogieron muestras de sangre de los cerdos infectados en diferentes momentos después de la infección y se identificaron las diferentes poblaciones de linfocitos T usando los siguientes anticuerpos marcados de Zenon (Invitrogen): IgG1 de ratón antiCD3 porcino (Alexa Fluor 405), IgG2b de ratón antiCD4 porcino (Alexa Fluor 647), IgG2a de ratón antiCD8aa porcino (R-PE) e IgG2b de ratón antiTCR gamma delta porcino (Alexa Fluor 488). En resumen, se incubaron 100 µl de sangre completa con 5 µl de cada anticuerpo conjugado durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los glóbulos rojos se lisaron añadiendo 4 ml de solución de lisis de FACS BD 1x (BD Biosciences) y agitando con vórtice. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1200 rpm durante 7 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células entonces se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 30 minutos, se lavaron dos veces con PBS y finalmente se analizaron por citometría de flujo (MACSQuant, Miltenyi Biotec). Se seleccionaron subconjuntos de linfocitos basándose en los marcadores de superficie celular usando el programa informático FCS express.

Ejemplo 6 -Inmunización con OUR T88/3 a través de diferentes vías

Los experimentos se realizaron en instalaciones de biocontención de nivel 3 (BSL-3) en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CReSA, Barcelona, España). Todos los experimentos con animales se realizaron según la licencia del Ministerio del Interior británico número 70/7198 con la aprobación del Comité ético para experimentos en animales de la Universidad Autónoma de Barcelona (N.º 1189R5) y el Gobierno regional de Cataluña, España (N.º 5796), y cumplía completamente los procedimientos regulados del acta sobre animales (Procedimientos científicos) 1986.

Materiales y métodos

Se usaron lechones macho cruzados Large White y Pietrain de 7 semanas de edad en buen estado de salud, vacunados frente al Circovirus porcino de tipo 2 y *Mycoplasma hyopneumoniae*, con un peso promedio de 15 kg, de una camada muy saludable que dio resultado negativo en ensayo para el síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRS) y la enfermedad de Aujeszky. Después de un periodo de aclimatación de 5 días, se inmunizaron tres grupos de seis cerdos cada uno por vía intramuscular (IM) con 1 ml que contenía  $10^3$  (grupo A),  $10^4$  (grupo C) y  $10^5$  (grupo E) TCID<sub>50</sub>/ml del aislado de ASFV de baja virulencia u OUR T88/3, respectivamente. Se inmunizaron tres grupos adicionales de seis cerdos cada uno por vía intranasal (IN), usando un dispositivo de atomización a la mucosa,

conteniendo 1 ml por fosa nasal  $10^3$  (grupo B),  $10^4$  (grupo D) y  $10^5$  (grupo F) TCID<sub>50</sub>/ml del aislado de baja virulencia OUR T88/3. Tres semanas después todos los grupos inmunizados, junto con un grupo de control (grupo G) que contenía tres cerdos no inmunizados, se expusieron por vía intramuscular con 1 ml que contenía  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml del aislado de ASFV virulento muy relacionado OUR T88/1. Este grupo de control se alojó por separado (sala 4), mientras que los cerdos inmunizados con el mismo título de ASFV, pero por diferentes vías de inoculación (IN o IM), se ubicaron en la misma sala de aislamiento separados por un tabique de 1 m de altura de la siguiente manera: experimento 1 (grupos A y B), experimento 2 (grupos C y D), experimento 3 (grupos E y F).

#### Muestreo, examen clínico y tras la muerte

El día de la inmunización se definió como el día 0 (0 dpi). Se controlaron las temperaturas rectales y los signos clínicos diariamente antes de la inmunización y durante todo el estudio, siguiendo una puntuación clínica presentada previamente (King et al., 2011). Se recogió muestras de sangre y suero con EDTA de todos los cerdos antes de la inmunización con virus (0 dpi), después de la inmunización (a 3, 5, 7, 14 y 21 dpi) y después de la exposición (a 3, 5, 7, 14 y 19 dpc).

Se realizó también un examen tras la muerte para evaluar las lesiones manifiestas de los cerdos muertos o de cerdos sacrificados durante experimento tras alcanzar un criterio de valoración compasivo predeterminado, así como el fin del experimento a los 19 días después de la exposición (dpc). Se evaluaron las lesiones macroscópicas de acuerdo con el marco patológico normalizado de infecciones por ASFV (Galindo-Cardiel et al., 2013). El criterio de valoración compasivo se determinó de acuerdo con las regulaciones de bienestar animal especificadas en la licencia del Ministerio del Interior británico, de modo que cerdos con una temperatura rectal por encima de 40,5 °C durante tres días consecutivos, o que mostraran tres o más signos clínicos de enfermedad combinados en un solo día, se sacrificaron. Se realizó eutanasia mediante inyección intravenosa de pentobarbital de sodio.

#### Detección de ASFV y evaluación de la respuesta inmunitaria.

Después de recogerlas, las muestras de sangre con EDTA se congelaron a -80 °C hasta la detección de ASFV por PCR cuantitativa (qPCR) como se describe previamente (King et al., 2003). También se analizaron muestras tisulares congeladas (bazo, amígdala, pulmón, ganglios linfáticos submandibulares, retrofaríngeos y gastrohepáticos) para la presencia de ASFV por qPCR. También se congelaron muestras de suero a -80 °C hasta que se analizaron por kits de ELISA disponibles en el mercado para la detección de anticuerpos contra la proteína estructural Vp72 de ASFV (INGEZIM PPA Compac, Ingenasa Madrid, España). Además, se usaron muestras de suero para evaluar, mediante kits de ELISA disponibles en el mercado (R&D Systems, Abingdon, R.U.), las citocinas porcinas con funciones inflamatorias e inmunológicas durante la inmunidad humoral y mediada por células en cerdos (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10). Las concentraciones de citocinas se presentaron como pg/ml.

#### Análisis estadísticos

Los datos se analizaron usando el programa de análisis estadístico GraphPad Prism Versión 6.0 (programa informático GraphPad). Los valores de temperatura rectal, signos clínicos, lesiones macroscópicas, viremia, anticuerpos contra ASFV y niveles de citocinas se evaluaron para calcular la media  $\pm$  la desviación típica (DT). Para el análisis de la temperatura y los signos clínicos, se analizaron las diferencias entre los valores iniciales (día 0) y los valores obtenidos en cada punto temporal en el grupo de control no inoculado y los grupos inoculados usando ANOVA unidireccional con ensayo *a posteriori* de Bonferroni. Además, se analizaron las diferencias entre el grupo de control no inoculado y los grupos infectados, así como las diferencias entre ambos grupos infectados en el mismo punto temporal usando un ANOVA bidireccional con ensayo *a posteriori* de Bonferroni. Para todas las comparaciones, las diferencias se consideraron significativas a  $P < 0,05$ .

#### Resultados de los cerdos no inmunes de control

Desde 3 dpc, los cerdos del grupo G de control (no inmunes) presentaban síntomas no específicos tales como fiebre (40,8-41,7 °C) y apatía (véase la figura 21 G). Estos signos clínicos aumentaron progresivamente hasta 5 dpc, con temperaturas rectales entre 41,4- 41,6 °C, postración y la presencia de eritema cutáneo y zonas cianóticas en la punta de las orejas, que se sacrificaron por razones éticas. Después de la eutanasia de los cerdos en 5 dpc, las necropsias revelaron la presencia de lesiones manifiestas características de formas agudas de ASF tales como linfadenitis hemorrágica (siendo los ganglios linfáticos gastrohepáticos y renales los más gravemente afectados), esplenomegalia hiperémica, pulmones no colapsados con edema intersticial y alveolar, así como espuma en la tráquea, Petequias en los riñones (corteza y médula) y en los pulmones, edema retroperitoneal y congestión hepática moderada.

#### Resultados de los grupos inmunizados por vía intranasal

De aquellos cerdos inmunizados con OURT88/3 por vía intranasal, el 100 % (n = 6) de los de los grupos B ( $10^3$  TCID<sub>50</sub>) y D ( $10^4$  TCID<sub>50</sub>) sobrevivieron a la exposición. Algunos de los cerdos que sobrevivieron presentaban una inflamación articular moderada transitoria antes y después de la exposición. Dos cerdos del grupo B (B3 y B4) y 3 del grupo D (D2, D4 y D5) mostraron otros signos clínicos transitorios cortos después de la exposición (temperatura, inapetencia,

apatía). En el grupo F ( $10^5$  TCID<sub>50</sub>) un 66 % sobrevivieron a la exposición. Los dos cerdos que no sobrevivieron (F3 y F5) se sacrificaron en el día 5 después de la exposición, que mostraban lesiones manifiestas características de ASF y algunos otros signos clínicos (inflamación del codo y erosión de la piel de la nariz). Tres cerdos supervivientes (F1, F2 y F4) también mostraban signos clínicos y lesiones que incluyen inflamación articular grave, dificultad respiratoria, eritema en las orejas, conjuntivitis así como erosiones/úlceras cutáneas en la nariz, los flancos y las extremidades que duraban hasta el final del experimento.

#### Resultados de grupos inmunizados por vía intramuscular

De los cerdos inmunizados por vía intramuscular, 3 (E2, E3 y E6) del grupo E ( $10^5$  TCID<sub>50</sub>) se sacrificaron o se encontraron muertos entre 13 y 14 dpi y antes de la exposición, que mostraban signos típicos de ASF. De los cerdos expuestos, un 50 % (3/6) del grupo A ( $10^3$  TCID<sub>50</sub>), un 66 % (4/6) del grupo C ( $10^4$  TCID<sub>50</sub>) y un 33 % (2/6) del grupo E ( $10^5$  TCID<sub>50</sub>) sobrevivieron a la exposición.

#### Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico comparativo de las puntuaciones clínicas (5 días antes de la muerte) desarrollados por cerdos que murieron o se sacrificaron dentro de cada grupo experimental (incluyendo cerdos muertos antes de la exposición en el grupo E y cerdos de control no inmunizados), reveló una cinética similar, así como diferencias no significativas en las temperaturas alcanzadas entre los grupos (fig. 22). Además, la cinética de las puntuaciones clínicas fue similar, aparecieron diferencias significativas junto entre cerdos muertos en el grupo F (IN,  $10^5$ ) y el grupo A (IM,  $10^3$ ) (fig. 24). Por otro lado, el análisis estadístico de las puntuaciones clínicas en cerdos que sobrevivieron reveló que después de la exposición, los cerdos supervivientes en el grupo F (IN,  $10^5$ ) mostraban diferencias significativas en las puntuaciones clínicas con respecto a los cerdos supervivientes que se incluyen en otros grupos hasta el final del estudio (fig. 24).

Durante la evaluación macroscópica de los cerdos supervivientes, se observaron principalmente lesiones en el sistema cardiorrespiratorio, el sistema cutáneo y musculoesquelético. En general, los cerdos supervivientes inmunizados por vía intramuscular (9 cerdos en total) no presentaban lesiones o presentaban lesiones pulmonares mínimas (6/9 cerdos), mientras que los cerdos supervivientes inmunizados por vía intranasal (16 cerdos en total) mostraban lesiones cardiorrespiratorias (12/16 cerdos), así como lesiones en la piel y las articulaciones (7/16 cerdos). En este sentido, aunque las lesiones eran moderadas en los cerdos supervivientes inmunizados por vía intranasal con  $10^3$  y  $10^4$  (grupos B y D), los cerdos supervivientes inoculados por vía intranasal con  $10^5$  (grupo F) presentaban las lesiones cardiorrespiratorias y musculoesqueléticas más intensas (pleuritis fibrinosa, pleuroneumonía fibrinonecrótica, pericarditis fibrinosa y periartitis serofibrinosa/purulenta), lesiones cardiorrespiratorias que con compatibles con la presencia de infecciones bacterianas secundarias. El análisis estadístico de las puntuaciones de lesiones macroscópicas confirmó las diferencias significativas entre los cerdos supervivientes en el grupo F (IN,  $10^5$ ) y los otros grupos de animales supervivientes (fig. 25).

#### Discusión

Estos resultados han demostrado una protección completa (100 %) en cerdos inmunizados por vía intranasal con  $10^3$  y  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml del aislado de ASFV de baja virulencia OUR T88/3. Los cerdos presentaban reacciones clínicas adversas mínimas y transitorias antes y después de la exposición al aislado de ASFV virulento OUR T88/1, así como lesiones leves en los pulmones, asociadas con infecciones bacterianas secundarias, y las articulaciones principalmente. Se predice a partir de nuestros resultados que una dosis inferior (por ejemplo,  $10^2$  TCID<sub>50</sub>) también puede inducir altos niveles de protección contra exposición mortal.

Sin embargo, tanto en el grupo de cerdos inmunizados por vía intranasal con  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml como en todos los grupos inmunizados por vía intramuscular, la tasa de protección conferida fue inferior. Las tasas de supervivencia más bajas se observaron en cerdos inmunizados por vía intramuscular con  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml, donde 3 de los 6 cerdos inmunizados (E2, E3 y E6) murieron antes de la exposición. Los resultados muestran que la inmunización intranasal en cerdos con vacunas de ASFV atenuado vivo es una alternativa a la vía intramuscular previamente presentada. La inmunización intranasal indujo menos signos clínicos antes de la exposición en comparación con la vía intramuscular y estuvo protegido un porcentaje mayor de cerdos.

#### Ejemplo 7 - Inmunización con BeninΔMGF por diferentes vías

Esto implicó ensayar el suministro de ASFV atenuado con el gen eliminado BeninΔMGF a tres dosis diferentes usando la vía IM ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  HAD<sub>50</sub>) y mediante una dosis ( $10^3$  HAD<sub>50</sub>) usando la vía intranasal y exposición con virus virulento precursor.

#### Materiales y métodos

Los experimentos se realizaron en instalaciones de biocontención SAPO-4 en The Pirbright Institute. Todos los experimentos con animales se realizaron según la licencia del Ministerio del Interior Británico número 70/7198 y cumplían completamente los procedimientos regulados del acta de animales (Procedimientos científicos) 1986.

Se usaron lechones hembra cruzados Large White Landrace en buen estado de salud, con un peso promedio de 15 - 20 kg, de una piara muy sana. Después de un periodo de aclimatación de 5 días, se inmunizaron tres grupos de seis cerdos cada uno por vía intramuscular (IM) con 1 ml que contenía  $10^2$  (grupo A),  $10^3$  (grupo B) y  $10^4$  (grupo C) HAD<sub>50</sub> de la cepa de ASFV atenuado con eliminación génica Benin $\Delta$ MGF, respectivamente. Se inmunizó un grupo adicional de seis cerdos por vía intranasal (IN), usando un dispositivo de atomización a la mucosa, con 1 ml por fosa nasal que contenía  $10^3$  Benin $\Delta$ MGF (grupo D). Tres semanas después, todos los grupos inmunizados recibieron refuerzo con la misma dosis de virus por la misma vía. Después de 19 días más, los cerdos de los grupos A a D, junto con un grupo de control (grupo F) que contenía seis cerdos no inmunizados, se expusieron por vía intramuscular con 1 ml que contenía  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml del aislado de ASFV virulento precursor Benin 97/1. Este grupo de control se alojó por separado, mientras que los otros cerdos se ubicaron en la misma sala de aislamiento separados por un tabique de 1 m de altura de la siguiente manera: sala 1 (grupos A y B), sala 2 (grupos C y D).

Muestreo, examen clínico y tras la muerte.

El día de la inmunización se definió como el día 0 (0 dpi). Se controlaron las temperaturas rectales y los signos clínicos diariamente antes de la inmunización y durante todo el estudio, siguiendo una puntuación clínica presentada previamente (King et al., 2011). Se recogió muestras de sangre y suero con EDTA de todos los cerdos antes de la inmunización con virus (0 dpi), después de la inmunización (a 2, 4, 7, 10, 14 y 21 dpi) y después de la exposición (a 3, 5, 7, 14 y 19 dpc).

Se realizó también un examen tras la muerte para evaluar las lesiones manifiestas de los cerdos muertos o sacrificados durante experimento tras alcanzar un criterio de valoración compasivo predeterminado, así como al final del experimento. Se evaluaron las lesiones macroscópicas de acuerdo con el marco patológico normalizado de infecciones por ASFV (Galindo-Cardiel et al., 2013). El criterio de valoración compasivo se determinó de acuerdo con las regulaciones de bienestar animal especificadas en la licencia del Ministerio del Interior británico, de modo que cerdos con una temperatura rectal por encima de 40,5 °C durante tres días consecutivos, o que mostraran tres o más signos clínicos de enfermedad combinados en un solo día, se sacrificaron. Se realizó eutanasia mediante inyección intravenosa de pentobarbital de sodio.

#### Resultados

Los cerdos se inmunizaron y observaron diariamente para los signos clínicos incluyendo las temperaturas. Los resultados se muestran en la figura 29. De los cerdos en los grupos A ( $10^2$ ) y B ( $10^3$ ), 4/6 desarrollaron una fiebre baja transitoria durante 1 o 2 días desde el día 4 o 5 después de la inmunización. En el grupo C (IM  $10^4$ ), 3/6 cerdos desarrollaron una fiebre baja transitoria durante 1 o 2 días. En el grupo D (IN  $10^3$ ), 1/6 cerdos desarrolló una fiebre baja transitoria en el día 5 después de la inmunización. No se observaron otros signos clínicos.

Los resultados confirman que aumentar la dosis de Benin $\Delta$ MGF no aumenta los signos clínicos después de la inmunización por vía IM. La figura 29 muestra que se observaron signos clínicos en estos cerdos y en los cerdos restantes después del refuerzo y hasta después de la exposición. Después de la exposición, se sacrificaron varios cerdos porque alcanzaron el criterio de valoración de gravedad moderada (3 días de fiebre por encima de 40,5 o 2 días sin comer). Estos incluyeron 3 de los 6 cerdos del grupo inmunizado con  $10^2$  IM, 2 cerdos inmunizados con  $10^3$  IM, 1 cerdo inmunizado con  $10^4$  IM y 2 cerdos inmunizados con  $10^3$  IN. Después de la muerte, no se observaron lesiones en ningún excepto para 1 cerdo del grupo de Benin $\Delta$ MGF  $10^2$  IM que tenía una única lesión pulmonar.

Una comparación de las temperaturas medias de los diferentes grupos (figura 31) mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo inmunizado con Benin $\Delta$ MGF  $10^2$  IM y otros grupos después de la inmunización en el día 4 (mayor en comparación con todos los demás grupos), día 15 (mayor en comparación con Benin $\Delta$ MGF  $10^3$  IM,  $10^3$  IN y  $10^4$  IM). Se observaron diferencias estadísticamente significativas después del refuerzo entre Benin $\Delta$ MGF  $10^2$  IM (mayor en comparación con Benin $\Delta$ MGF  $10^3$  IN y Benin $\Delta$ DP148R). En el día 12 después de la exposición, los cerdos inmunizados con Benin $\Delta$ MGF  $10^2$  IM tenían una temperatura significativamente mayor en comparación con cerdos inmunizados con Benin $\Delta$ MGF  $10^4$  IM.

Los cerdos inmunizados con Benin $\Delta$ MGF  $10^3$  IN tenían temperaturas significativamente diferentes en el día 4 después de la inmunización (inferior en comparación con Benin $\Delta$ MGF  $10^3$  IM,  $10^4$  IM y Benin $\Delta$ DP148R), día 6 después de la inmunización (mayor en comparación con Benin $\Delta$ DP148R), día 11 después de la exposición (mayor en comparación con Benin $\Delta$ MGF  $10^4$  IM). Los cerdos inmunizados con Benin $\Delta$ MGF  $10^4$  IM tenían temperaturas estadísticamente significativas en el día 8 después de la inmunización (mayor en comparación con Benin $\Delta$ MGF  $10^3$  IM,  $10^3$  IN) y día 9 después de la inmunización (mayor en comparación con Benin $\Delta$ DP148R). Los cerdos inmunizados con Benin $\Delta$ MGF  $10^3$  IM tenían temperaturas significativamente diferentes en el día 12 después de la inmunización (inferior en comparación con Benin $\Delta$ MGF  $10^4$  IM y  $10^3$  IN).

Una comparación de las medias de las puntuaciones clínicas de los diferentes grupos (figura 32) mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo inmunizado con Benin $\Delta$ MGF  $10^2$  IM y otros grupos después de la inmunización en el día 2 (mayor que Benin $\Delta$ MGF  $10^3$  IM,  $10^3$  IN, Benin $\Delta$ DP148R), día 4 (mayor que Benin $\Delta$ MGF  $10^3$

IM,  $10^4$  IM,  $10^3$  IN) y día 5 (inferior que Benin $\Delta$ DP148R, mayor que Benin $\Delta$ MGF  $10^3$  IM,  $10^3$  IN).

En conclusión, Benin $\Delta$ MGF  $10^2$  IM mostró puntuaciones clínicas significativamente mayores y temperaturas menores que otros grupos después de la inmunización.

5

Ejemplo 8 - Inducción de ARNm de IFN- $\beta$  por diferentes aislados de ASFV

Se infectaron macrófagos alveolares porcinos con aislados de ASFV indicados a multiplicidad de infección 3 (Benin 97/1, Benin $\Delta$ MGF, OURT88/3) o se infectaron de forma simulada. En diferentes momentos después de la infección (2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 horas), se recogió el ARN de las células infectadas y se midieron los niveles de ARNm para ARN de IFN- $\beta$ , GAPDH y el gen B646L de ASFV (VP72) por PCR con transcriptasa inversa cuantitativa. La figura 26, panel A, muestra los niveles de IFN- $\beta$  en comparación con el gen constitutivo de control GAPDH. El panel B muestra los niveles de ARNm para el gen B646L de ASFV (VP72).

10

15

El mutante de eliminación Benin $\Delta$ MGF tiene una eliminación o interrupción de 6 miembros de MGF360 y 4 miembros de MGF 505 de una región cercana al extremo izquierdo del genoma de Benin 97/1. La eliminación de estos genes aumenta la inducción de ARNm de IFN - $\beta$  en macrófagos infectados con Benin $\Delta$ MGF360 en comparación con el virus virulento precursor en que apenas se detectaba ARNm de IFN- $\beta$  (véase la figura 26). Los IFN de tipo I inducen expresión de genes estimulados por IFN que están implicados en la activación de las rutas de respuesta inmunitaria innata y adaptativa y en la creación de un estado antivírico. Nuestra hipótesis es que la inducción de IFN de tipo I es importante para la atenuación del ASFV virulento y la inducción de una respuesta inmunitaria protectora.

20

Ejemplo 9 - Mutante de eliminación Benin $\Delta$ DP148R

25

Un único gen, DP148R, se eliminó de una región cercana al extremo derecho del genoma de Benin97/1 virulento. Para conseguir esto, se amplificó un fragmento de 529 pb de la región izquierda y un fragmento de 740 pb de la región derecha que flanquean el gen MGF36018R por PCR. La fig. 27 muestra los cebadores usados para amplificar la región flanqueante izquierda (360-18RFlancoI) y aquellos para amplificar la región flanqueante derecha (360-18RFlancoD). Las secuencias amplificadas están entre estos cebadores. Está sombreada en gris la secuencia del gen MGF360 - 18R que se eliminó del genoma de ASFV. Los codones de inicio y parada se muestran en negrita. Las regiones flanqueantes se clonaron a cada lado de un gen indicador que consistía en el gen de la  $\beta$ -glucorimidasa ( $\beta$ -GUS) en dirección 3' del promotor de VP72 de ASFV. Este plásmido se transfeció en macrófagos de cerdo infectados con el aislado Benin 97/1. El virus descendiente se ensayó para la expresión del gen  $\beta$ -GUS y se aislaron virus recombinantes en que el gen  $\beta$ -GUS remplazaba el gen MGF360-18R por dilución limitante. La eliminación del gen y la ubicación de la inserción se confirmaron por análisis de PCR usando cebadores que eran del genoma de ASFV fuera de las regiones clonadas en el plásmido de transferencia (véase la fig. 27).

30

35

La eliminación del gen DP148R no reduce la replicación vírica en macrófagos

La replicación de la cepa del virus Benin $\Delta$ MGF36018R en macrófagos porcinos se comparó con el virus Benin 97/1 precursor. Se infectaron macrófagos alveolares porcinos a una multiplicidad de 3 y en diferentes momentos después de la infección (0, 24, 48, 72, 96 horas) el virus de las células y los sobrenadantes se recogió y tituló usando macrófagos alveolares porcinos. Los resultados (figura 28) mostraron que la eliminación del gen MGF360 18R no reducía la replicación del virus en macrófagos.

40

45

La eliminación del gen DP148R atenúa el ASFV en cerdos

Se inmunizó un grupo de 5 cerdos cruzados Large white/landrace macho (15-20 kg) por vía intramuscular con  $10^3$  HAD<sub>50</sub> de Benin $\Delta$ DP148R y se observaron para los signos clínicos. Los 5 cerdos presentaban signos clínicos transitorios durante 1 o 2 días en los días 4 o 5 después de la inmunización. Estos signos incluían fiebre transitoria, pérdida de apetito y letargia.

50

Los cerdos recibieron refuerzo con la misma dosis de virus por la misma vía en el día 21 después de la inmunización y se expusieron a Benin97/1 virulento en paralelo con cerdos no inmunizados de control en el día 39 después de la inmunización. No se observaron signos clínicos adicionales después del refuerzo y todos los cerdos sobrevivieron a la exposición (sacrificados a los 19-21 días después de la exposición). No se observaron lesiones después de la muerte.

55

Una comparación de las temperaturas medias de los diferentes grupos (figura 31) mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo inmunizado con Benin $\Delta$ DP148R y otros grupos después de la inmunización en el día 2 (inferior en comparación con los grupos Benin $\Delta$ MGF  $10^2$  IM y  $10^4$  IM) y día 5 (mayor en comparación con los grupos Benin $\Delta$ MGF  $10^3$  IM,  $10^4$  IM y  $10^3$  IN). En los días después del refuerzo, se observaron temperaturas significativamente inferiores entre Benin $\Delta$ DP148R y otros grupos: 5, (Benin $\Delta$ MGF $10^2$  IM,  $10^3$  IM) 6 (Benin $\Delta$ MGF  $10^2$  IM), 12 (Benin $\Delta$ MGF  $10^2$  IM,  $10^3$  IN), 13 (Benin $\Delta$ MGF  $10^4$  IM,  $10^3$  IN), 14 (Benin $\Delta$ MGF  $10^2$  IM,  $10^3$  IM,  $10^3$  IN), 15 (Benin $\Delta$ MGF  $10^2$  IM,  $10^3$  IM), 17 -19 todos los grupos (Benin $\Delta$ MGF). Después de la exposición, se observaron temperaturas significativamente inferiores entre cerdos inmunizados con Benin $\Delta$ DP148R y otros grupos inmunizados en el día 3 (Benin $\Delta$ MGF  $10^3$  IN), 5 ( $10^2$  IM), 6 ( $10^3$  IM).

60

65

Una comparación de las medias de las puntuaciones clínicas de los diferentes grupos (figura 32) mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo inmunizado con Benin $\Delta$ DP148R y otros grupos después de la inmunización en el día 4 (mayor que Benin $\Delta$ MGF 10<sup>2</sup> IM, 10<sup>3</sup> IM, 10<sup>3</sup> IN), día 5 (Benin $\Delta$ MGF 10<sup>2</sup>IM, 10<sup>3</sup>IM, 10<sup>3</sup>IN, 10<sup>4</sup>IM), día 6 (Benin $\Delta$ MGF 10<sup>3</sup>IM, 10<sup>3</sup>IN, 10<sup>4</sup>IM) y día 6 (Benin $\Delta$ MGF 10<sup>3</sup>IM, 10<sup>3</sup>IN, 10<sup>4</sup>IM).

5 En conclusión, Benin $\Delta$ DP148R demostró puntuaciones clínicas significativamente mayores y temperaturas inferiores que los otros grupos después de la muerte, y ninguna lesión después de la muerte.

10 Aunque la invención se ha descrito en relación con las realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención reivindicada no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para realizar la invención que son obvios para los expertos en biología, biología molecular o campos relacionados, estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> The Pirbright Institute
- <120> Vacuna
- 20 <130> P103441PCT
- <150> GB 1410971.4
- <151> 19-06-2014
- 25 <160> 45
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 30 <211> 350
- <212> PRT
- <213> Virus de la fiebre porcina africana
- <400> 1
- 35

ES 2 750 960 T3

Met Val Leu Ser Leu Gln Thr Leu Thr Lys Lys Val Leu Ala Ser Gln  
 1 5 10 15

Tyr Pro Ala Lys Cys His Pro His Phe Leu Lys Cys Cys Gly Leu Trp  
 20 25 30

Trp His Asn Gly Pro Ile Met Tyr His Gln Lys Lys Ile Trp Thr Pro  
 35 40 45

Tyr Phe Lys Asn Gly Thr Asn Leu Asn Ala Ala Leu Val Lys Ala Val  
 50 55 60

Glu Glu Asn Asn His Asp Leu Ile Glu Leu Phe Thr Glu Trp Gly Ala  
 65 70 75 80

Asn Ile Asn Tyr Gly Leu Leu Ser Val Asn Thr Glu His Thr Arg Asp  
 85 90 95

Leu Cys Arg Gln Leu Gly Ala Lys Glu Gln Leu Asn Asp Gln Glu Ile  
 100 105 110

Leu Arg Phe Phe Tyr Thr Leu Lys Arg Asp Leu Thr Ser Ser Asn Ile  
 115 120 125

Ile Phe Cys His Glu Val Phe Ser Asn Asn Pro Ile Leu Asp Thr Ile  
 130 135 140

Asn Arg Phe Glu Val Lys Gly Met Ile Tyr Glu Gln Leu Glu Gly Leu  
 145 150 155 160

Met Val Glu Thr Asp Ile Leu Ser Glu Met Phe Thr Lys Tyr Trp Tyr

ES 2 750 960 T3

165

170

175

Ala Met Ala Ile Glu Phe Asn Leu Lys Glu Ala Ile Cys Tyr Phe Tyr  
180 185 190

Gln Arg Tyr Ala His Leu His Arg Trp Arg Leu Met Cys Ala Leu Phe  
195 200 205

Tyr Asn Asn Val Phe Asp Leu His Glu Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Val  
210 215 220

Arg Met Asp Met Asp Glu Met Leu Arg Trp Ala Cys Arg Lys Asn Tyr  
225 230 235 240

Asn Tyr Leu Thr Ile Tyr Tyr Cys Cys Val Ala Leu Gly Ala Asp Ile  
245 250 255

Asn Gln Ala Met Phe His Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Ile Gly Asn Ile  
260 265 270

Phe Phe Cys Ile Asp Leu Gly Ala Asn Ala Phe Glu Glu Gly Lys Thr  
275 280 285

Leu Ala His Gln Lys Asp Asn Ser Phe Ile Ala Ser Met Leu Ser Leu  
290 295 300

Asn Cys Tyr Ser Met Asn Asp Ser Leu Ser Leu Lys Glu Thr Asp Pro  
305 310 315 320

Glu Val Ile Lys Arg Met Leu Lys Asp Tyr His Ser Lys Asn Leu Ser  
325 330 335

Ile Ala His Lys His Tyr Ile Asn Asp Gly Phe Asn Asp Ile  
340 345 350

<210> 2  
<211> 356  
<212> PRT  
<213> Virus de la fièvre porcine africaine  
  
<400> 2

5

Met Val Pro Ser Leu Gln Ser Phe Ala Lys Lys Val Leu Ala Ser Gln  
1 5 10 15

His Val Ser Ile Asp Tyr His Val Ile Leu Glu Arg Cys Gly Leu Trp  
20 25 30

Trp Tyr Lys Ala Pro Ile Ser Leu Asp Cys Lys His Met Leu Ile Lys

10



ES 2 750 960 T3

Ala Phe Glu Glu Ala Lys Ala Leu Ala Glu Gln Gln Asn Tyr Tyr Leu  
 290 295 300

Ile Ser His Arg Leu Ser Leu Asp Ile Tyr Ser Pro Asp Ser Ser Leu  
 305 310 315 320

Leu Thr Leu Lys Glu Ala Asp Pro Asn Lys Ile Tyr Arg Leu Leu Lys  
 325 330 335

Asn Tyr Lys Ser Lys Ser Met Leu Ala Tyr Leu Asn Tyr Asp Ile Asn  
 340 345 350

Asp Thr Ser Leu  
 355

- <210> 3
- <211> 353
- <212> PRT
- <213> Virus de la fiebre porcina africana
- <400> 3

5

Met Leu Pro Ser Leu Gln Ser Leu Thr Lys Lys Val Leu Ala Gly Gln  
 1 5 10 15

Cys Val Ser Val Asp His Tyr His Ile Leu Lys Cys Cys Gly Leu Trp  
 20 25 30

Trp His Asn Gly Pro Ile Met Leu His Ile Arg Arg Asn Lys Leu Phe  
 35 40 45

Ile Arg Ser Thr Cys Phe Ser Gln Gly Ile Glu Leu Asn Ile Gly Leu  
 50 55 60

Met Lys Ala Val Lys Glu Asn Asn His Asp Leu Ile Lys Leu Phe Thr  
 65 70 75 80

Glu Trp Gly Ala Asp Ile Asn Tyr Gly Met Ile Cys Ala Leu Thr Glu  
 85 90 95

Asn Thr Arg Asp Leu Cys Lys Glu Leu Gly Ala Lys Glu Tyr Leu Glu  
 100 105 110

Arg Glu Tyr Ile Leu Lys Ile Phe Phe Asp Thr Thr Arg Asp Lys Thr  
 115 120 125

Ser Ser Asn Ile Ile Phe Cys His Glu Val Phe Ser Asn Asn Pro Asn  
 130 135 140

10

ES 2 750 960 T3

Leu Arg Ile Ile Asp Asn Leu Asp Leu Arg Gly Glu Ile Met Trp Glu  
 145 150 155 160

Leu Arg Gly Leu Met Glu Ile Thr Phe Met Leu Asp His Asp Asp Ser  
 165 170 175

Phe Ser Thr Val Leu Thr Lys Tyr Trp Tyr Ala Ile Ala Val Asp Tyr  
 180 185 190

Asp Leu Lys Asp Ala Ile Arg Tyr Phe Tyr Gln Lys Tyr Pro Arg Leu  
 195 200 205

His Arg Trp Arg Leu Met Cys Ala Leu Phe Tyr Asn Asn Val Phe Asp  
 210 215 220

Leu His Glu Leu Tyr Glu Ile Glu Arg Val Arg Met Asp Ile Asp Glu  
 225 230 235 240

Met Met His Ile Ala Cys Ile Gln Asp Tyr Ser Tyr Ser Ala Ile Tyr  
 245 250 255

Tyr Cys Phe Ile Met Gly Ala Asn Ile Asn Gln Ala Met Leu Val Ser  
 260 265 270

Ile Gln Asn Tyr Asn Leu Gly Asn Leu Phe Phe Cys Ile Asp Leu Gly  
 275 280 285

Ala Asn Ala Phe Glu Glu Gly Lys Ala Leu Ala Glu Gln Lys Glu Asn  
 290 295 300

Tyr Leu Ile Ala His Ala Leu Ser Leu Lys His Tyr Asn Pro Val Ile  
 305 310 315 320

Ser Leu Leu Ser Asn Val Met Asp Pro Glu Lys Ile Asn Tyr Met Leu  
 325 330 335

Lys Asn Tyr His Ser Ile Asn Met Gly Ile Phe Leu Asp Tyr Glu Gln  
 340 345 350

Arg

- <210> 4
- <211> 350
- <212> PRT
- <213> Virus de la fièvre porcine africaine
- <400> 4

5

ES 2 750 960 T3

Met Leu Pro Ser Leu Gln Ser Leu Thr Lys Lys Val Leu Ala Gly Gln  
1 5 10 15

Cys Val Pro Thr Asn Gln His Tyr Leu Leu Lys Tyr Tyr Asp Leu Trp  
20 25 30

Trp Tyr Asn Ala Pro Ile Thr Phe Asp His Asn Leu Arg Leu Ile Lys  
35 40 45

Ser Ser Gly Ile Lys Glu Gly Leu Asp Leu Asn Thr Ala Leu Val Lys  
50 55 60

Ala Val Arg Glu Asn Asn Tyr Ser Leu Ile Lys Leu Phe Thr Glu Trp  
65 70 75 80

Gly Ala Asp Ile Asn Tyr Gly Leu Val Ser Val Asn Thr Glu His Thr  
85 90 95

Arg Asp Leu Cys Gln Glu Leu Gly Ala Lys Glu Ile Leu Asn Glu Glu  
100 105 110

Glu Ile Leu Gln Ile Phe Ile Asp Leu Lys Phe His Lys Thr Ser Ser  
115 120 125

Asn Ile Ile Leu Cys His Glu Val Phe Ser Asn Asn Pro Ile Leu Gln  
130 135 140

Lys Val Asn Asn Leu Lys Leu Arg Ile Glu Ile Phe Trp Glu Leu Arg  
145 150 155 160

Glu Leu Ile Glu Lys Thr Asp Leu Leu Asn Asn Glu Phe Leu Leu Ser  
165 170 175

Thr Leu Leu Leu Lys Tyr Trp Tyr Ala Ile Ala Val Arg Tyr Ser Leu  
180 185 190

Lys Glu Ala Ile Gln Tyr Phe Tyr Gln Lys Tyr Thr His Met Asn Thr  
195 200 205

Trp Arg Leu Thr Cys Ala Leu Cys Phe Asn Asn Val Phe Asp Leu His  
210 215 220

Glu Ala Tyr Glu Lys Asp Lys Ile His Met Asp Ile Glu Glu Met Met  
225 230 235 240

Arg Ile Ala Cys Ile Lys Asp His Asn Leu Ser Thr Met Tyr Tyr Cys  
245 250 255

ES 2 750 960 T3

Tyr Met Leu Gly Ala Asn Ile Asn Gln Ala Met Leu Thr Ser Ile Gln  
260 265 270

Tyr Tyr Asn Ile Glu Asn Met Phe Phe Cys Met Asp Leu Gly Ala Asp  
275 280 285

Val Phe Glu Glu Gly Thr Thr Ala Leu Gly Glu Gly Tyr Glu Leu Ile  
290 295 300

Lys Asn Ile Leu Ser Leu Lys Ile Tyr Ser Pro Thr Thr Ile Pro Leu  
305 310 315 320

Pro Lys Ser Thr Asp Pro Glu Ile Ile Asp His Ala Leu Lys Asn Tyr  
325 330 335

Phe Ser Lys Asn Met Met Ile Phe Leu Ser Tyr Asp Leu Arg  
340 345 350

<210> 5  
<211> 353  
<212> PRT  
<213> Virus de la fièvre porcine africaine

5

<400> 5

Met Ser Leu Pro Leu Ser Leu Gln Thr Leu Val Lys Lys Thr Val Ala  
1 5 10 15

Ser Gln Cys Leu Ser Ile Asp Glu His Cys Ile Leu Lys Tyr Cys Gly  
20 25 30

Leu Trp Trp His Asp Ala Pro Leu Lys Leu Cys Met Asp Arg Gly Arg  
35 40 45

Ile Gln Ile Lys Ser Gly Phe Leu Gly Glu Asp Ile Asp Leu Arg Val  
50 55 60

Ala Leu Ile Ile Ala Val Lys Glu Asn Asn Tyr Ser Leu Ile Lys Leu  
65 70 75 80

Phe Thr Glu Trp Gly Ala Asn Ile Asn Tyr Ser Leu Leu Ser Ile Asn  
85 90 95

Thr Lys His Ile Arg Glu Leu Cys Arg Gln Leu Gly Ala Lys Glu Thr  
100 105 110

Leu Glu Asp Asn Asp Ile Phe Arg Ile Phe Thr Arg Ile Met His Asn  
115 120 125

10

ES 2 750 960 T3

Lys Thr Ser Gly Ser Ile Ile Leu Cys His Glu Ile Phe Met Asn Asn  
 130 135 140

Pro Met Leu Glu Asn Lys Phe Val Ile Gln Leu Arg Gly Leu Ile Tyr  
 145 150 155 160

Lys Arg Leu Trp Gly Leu Ile Glu Ile Lys Glu Thr Asp Glu Leu Asn  
 165 170 175

Asp Leu Leu Val Lys Tyr Trp Tyr Ala Lys Ala Val Gln Tyr Val Cys  
 180 185 190

Lys Asn Ala Ile Cys Phe Leu Asp Glu Lys Tyr Thr Asp Leu Asn Glu  
 195 200 205

Trp Arg Leu Lys Cys Leu Leu Tyr Tyr Asn Lys Ile Tyr Glu Leu His  
 210 215 220

Glu Met Tyr His Lys Lys Lys Val Gln Ile Asp Val His Asp Met Ile  
 225 230 235 240

Cys Leu Ala Cys Ala Lys Asp Asn Asn Leu Leu Thr Ile Tyr Tyr Cys  
 245 250 255

Tyr Ala Leu Gly Gly Asn Ile Asn Gln Ala Met Leu Thr Ser Val Gln  
 260 265 270

Tyr Tyr Asn Val Gly Asn Ile Phe Phe Cys Ile Asp Leu Gly Gly Asn  
 275 280 285

Ala Phe Glu Glu Gly Arg Ala Ile Ala Glu Gln Lys Gly Tyr Asn Phe  
 290 295 300

Leu Ser His Ser Leu Thr Leu Asp Ile Tyr Ser Ser Asp Ala Ser Leu  
 305 310 315 320

Pro Leu Asn Leu Lys Asp Pro Glu Lys Ile Ser Ser Leu Leu Lys Asp  
 325 330 335

Tyr Lys Ser Lys Asn Leu Ser Ile Ile Trp Glu Tyr Ser His Asn Ile  
 340 345 350

Leu

- <210> 6
- <211> 357
- <212> PRT
- <213> Virus de la fièvre porcine africaine
- <400> 6

ES 2 750 960 T3

Met Leu Ser Leu Gln Thr Leu Ala Lys Lys Val Val Ala Cys Asn Tyr  
1 5 10 15

Leu Ser Ser Asp Tyr Asp Tyr Thr Leu Gln Arg Phe Gly Leu Trp Trp  
20 25 30

Asp Leu Gly Pro Ile His Leu Cys Asn Asn Cys Lys Gln Val Phe Ser  
35 40 45

Tyr Lys His Leu Gln Cys Phe Ser Glu Asp Asp Leu Cys Leu Glu Ala  
50 55 60

Ala Leu Val Lys Ala Val Lys Ser Asp Asn Leu Glu Leu Ile Arg Leu  
65 70 75 80

Phe Val Asp Trp Gly Ala Asn Pro Glu Tyr Gly Leu Ile Arg Val Pro  
85 90 95

Ala Val Tyr Leu Lys Arg Leu Cys Ala Glu Leu Gly Gly Leu Thr Pro  
100 105 110

Val Ser Glu Pro Arg Leu Leu Glu Ile Leu Lys Glu Val Ala Asn Leu  
115 120 125

Lys Ser Cys Ala Gly Val Leu Leu Gly Tyr Asp Met Phe Cys His Asn  
130 135 140

Pro Leu Leu Glu Thr Val Thr Arg Thr Thr Leu Asp Thr Val Thr Tyr  
145 150 155 160

Thr Cys Ser Asn Ile Pro Leu Thr Gly Asp Thr Ala His Leu Leu Leu  
165 170 175

Thr Lys Phe Trp Phe Ala Leu Ala Leu Arg His Asn Phe Thr Lys Ala  
180 185 190

Ile His Tyr Phe Tyr Lys Arg His Lys Asn Gln Leu Tyr Trp Arg Val  
195 200 205

Ala Cys Ser Leu Tyr Phe Asn Asn Ile Phe Asp Ile His Glu Leu Cys  
210 215 220

Arg Glu Lys Glu Ile Cys Ile Ser Pro Asn Leu Met Met Lys Phe Ala  
225 230 235 240

ES 2 750 960 T3

Cys Leu Arg Glu Lys Asn Tyr Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys His Arg Leu  
 245 250 255

Gly Ala Ser Leu Asp Tyr Gly Met Asn Leu Ser Ile Tyr Asn Asn Asn  
 260 265 270

Thr Leu Asn Met Phe Phe Cys Ile Asp Leu Gly Ala Ala Asp Phe Asp  
 275 280 285

Arg Ala Gln Leu Ile Ala His Lys Ala Tyr Met Tyr Asn Leu Ser Asn  
 290 295 300

Ile Phe Leu Val Lys Gln Leu Phe Ser Arg Asp Val Thr Leu Val Leu  
 305 310 315 320

Asp Val Thr Glu Pro Gln Glu Ile Tyr Asp Met Leu Lys Thr Tyr Thr  
 325 330 335

Ser Lys Asn Met Lys Arg Ala Glu Glu Tyr Leu Thr Ala His Pro Glu  
 340 345 350

Ile Ile Val Ile Asp  
 355

- <210> 7
- <211> 531
- <212> PRT
- <213> Virus de la fiebre porcina africana
- <400> 7

5

Met Phe Ser Leu Gln Asn Leu Cys Arg Lys Thr Leu Pro Asp Cys Lys  
 1 5 10 15

Leu Pro Glu Phe Phe Asp Asp Tyr Ile Leu Gln Leu Leu Gly Leu Tyr  
 20 25 30

Trp Glu Asn His Gly Thr Ile Gln Arg Ala Gly Asn Asn Cys Val Leu  
 35 40 45

Ile Gln Gln His Thr Leu Ile Pro Val Asn Glu Ala Leu Arg Ile Ala  
 50 55 60

Ala Ser Glu Glu Asn Tyr Glu Ile Val Gly Leu Leu Leu Ala Trp Glu  
 65 70 75 80

Gly Asn Leu Tyr Tyr Ala Ile Ile Gly Ala Leu Glu Gly Asn Arg Tyr  
 85 90 95

10

ES 2 750 960 T3

Asn Leu Ile Arg Lys Tyr Asp Asp Gln Ile Lys Asp His His Asp Ile  
 100 105 110

Leu Pro Phe Ile Asp Asp Pro Ile Ile Phe His Lys Cys His Ile Met  
 115 120 125

Arg Arg Cys Phe Phe Asp Cys Ile Leu Tyr Gln Ala Val Lys Tyr Ser  
 130 135 140

Lys Phe Arg Val Leu Leu Tyr Phe Lys Tyr Thr Leu Glu Asp Asp Leu  
 145 150 155 160

Pro Leu Val His Leu Leu Ile Glu Lys Ala Cys Glu Asp His Asn Tyr  
 165 170 175

Glu Val Ile Lys Trp Ile Tyr Glu Asn Leu His Val Cys His Ile Ile  
 180 185 190

Asp Thr Phe Asp Cys Ala Ile Ala His Lys Asp Leu Arg Leu Tyr Cys  
 195 200 205

Leu Gly Tyr Thr Phe Ile Tyr Asn Arg Ile Val Pro Tyr Lys Tyr His  
 210 215 220

His Leu Asp Ile Leu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Leu Leu His Lys Val  
 225 230 235 240

Ala Ala Lys Gly Tyr Leu Asp Phe Ile Leu Glu Thr Leu Lys Tyr Asp  
 245 250 255

His Asn Ile Asp Asn Leu Asp Val Ile Leu Thr Gln Ala Ala Thr Tyr  
 260 265 270

Asn His Arg Lys Ile Leu Thr Tyr Phe Ile Pro Gln Ser Thr Tyr Ala  
 275 280 285

Gln Ile Glu Gln Cys Leu Phe Val Ala Ile Lys Thr Lys Ser Ser Lys  
 290 295 300

Lys Thr Leu Asn Leu Leu Leu Ser His Leu Asn Leu Ser Ile Lys Leu  
 305 310 315 320

Ile Gln Lys Ile Ser Gln Tyr Val Ala Thr Phe Asn Ser Thr Asn Ile  
 325 330 335

Ile Gly Ile Leu Ser Met Lys Arg Lys Lys Lys Ile Tyr Leu Asp Ile

ES 2 750 960 T3

340 345 350  
 Ile Leu Thr Lys Phe Val Lys Asn Ala Ile Phe Asn Lys Phe Val Val  
 355 360 365  
 Arg Cys Met Glu Arg Phe Ser Ile Asn Pro Glu Arg Ile Val Lys Met  
 370 375 380  
 Ala Ala Arg Ile Asn Lys Met Met Leu Val Lys Lys Ile Ser Glu His  
 385 390 395 400  
 Val Trp Lys Asn His Ala Ala Arg Leu Lys His Leu Lys His Ala Val  
 405 410 415  
 His Thr Met Lys His Lys Asp Gly Lys Asn Arg Leu Met Asn Phe Ile  
 420 425 430  
 Tyr Glu His Cys Tyr Tyr His Met Gln Gly Glu Glu Ile Phe Ser Leu  
 435 440 445  
 Ala Arg Phe Tyr Ala Ile His His Ala Pro Lys Leu Phe Asp Val Phe  
 450 455 460  
 Tyr Asn Cys Cys Ile Leu Asp Thr Ile Arg Phe Lys Ser Leu Leu Leu  
 465 470 475 480  
 Asp Cys Ser His Ile Ile Gly Lys Asn Ala His Asp Ala Thr Asn Ile  
 485 490 495  
 Asn Ile Val Asn Lys Tyr Ile Gly Asn Leu Phe Ala Met Gly Val Leu  
 500 505 510  
 Ser Lys Lys Glu Ile Leu Gln Asp Tyr Pro Ser Ile Tyr Ser Lys His  
 515 520 525  
 Tyr Met Pro  
 530

<210> 8  
 <211> 526  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la fiebre porcina africana

<400> 8

Met Phe Ser Leu Gln Asp Leu Cys Arg Lys His Leu Phe Ile Leu Pro  
 1 5 10 15

Asp Val Phe Gly Glu His Val Leu Gln Arg Leu Gly Leu Tyr Trp Arg

5

10



ES 2 750 960 T3

Leu Pro Arg Lys His Ile Glu Lys Leu Leu Leu Leu Ala Val Gln Glu  
 275 280 285

Lys Ala Ser Lys Lys Thr Leu Asn Leu Leu Leu Ser His Leu Asn Tyr  
 290 295 300

Ser Val Lys Arg Ile Lys Lys Leu Leu Arg Tyr Val Ile Glu Tyr Glu  
 305 310 315 320

Ser Thr Leu Val Ile Lys Ile Leu Leu Lys Lys Arg Val Asn Leu Ile  
 325 330 335

Asp Ala Met Leu Glu Lys Met Val Arg Tyr Phe Ser Ala Thr Lys Val  
 340 345 350

Arg Thr Ile Met Asp Glu Leu Ser Ile Ser Pro Glu Arg Val Ile Lys  
 355 360 365

Met Ala Ile Gln Lys Met Arg Thr Asp Ile Val Ile His Thr Ser Tyr  
 370 375 380

Val Trp Glu Asp Asp Leu Glu Arg Leu Thr Arg Leu Lys Asn Met Val  
 385 390 395 400

Tyr Thr Ile Lys Tyr Glu His Gly Lys Lys Met Leu Ile Lys Val Met  
 405 410 415

His Gly Ile Tyr Lys Asn Leu Leu Tyr Gly Glu Arg Glu Lys Val Met  
 420 425 430

Phe His Leu Ala Lys Leu Tyr Val Ala Gln Asn Ala Ala Thr Gln Phe  
 435 440 445

Arg Asp Ile Cys Lys Asp Cys Tyr Lys Leu Asp Val Ala Arg Phe Lys  
 450 455 460

Pro Arg Phe Lys Gln Leu Ile Leu Asp Cys Leu Glu Ile Val Thr Lys  
 465 470 475 480

Lys Ser Cys Tyr Ser Ile Leu Glu Ile Leu Glu Lys His Ile Ile Ser  
 485 490 495

Leu Phe Thr Met Lys Val Met Thr Glu Glu Glu Lys Asn Leu Cys Leu  
 500 505 510

Glu Ile Leu Tyr Lys Val Ile His Tyr Lys Thr Ile Gln Cys  
 515 520 525

<210> 9  
 <211> 280  
 <212> PRT

ES 2 750 960 T3

<213> Virus de la fiebre porcina africana

<400> 9

Met Ser Ser Ser Leu Gln Glu Leu Cys Arg Lys Lys Leu Pro Asp Cys  
 1 5 10 15

Ile Leu Pro Glu Phe Phe Asp Asp Tyr Val Leu Gln Leu Leu Gly Leu  
 20 25 30

His Trp Gln Asp His Gly Ser Leu Gln Arg Ile Glu Lys Asn Gln Ile  
 35 40 45

Leu Val Gln Gln Glu Pro Ile His Ile Asn Glu Ala Leu Lys Val Ala  
 50 55 60

Ala Ser Glu Gly Asn Tyr Glu Ile Val Glu Leu Leu Leu Ser Trp Glu  
 65 70 75 80

Ala Asp Pro Arg Tyr Ala Val Val Gly Ala Leu Glu Ser Lys Tyr Tyr  
 85 90 95

Asp Leu Val Tyr Lys Tyr Tyr Asp Leu Val Lys Asp Cys His Asp Ile  
 100 105 110

Leu Pro Leu Ile Gln Asn Pro Glu Thr Phe Glu Lys Cys His Glu Leu  
 115 120 125

Asn Asn Pro Cys Ser Leu Lys Cys Leu Phe Lys His Ala Val Ile His  
 130 135 140

Asp Met Leu Pro Ile Leu Gln Lys Tyr Thr Tyr Phe Leu Asp Gly Trp  
 145 150 155 160

Glu Tyr Cys Asn Gln Met Leu Phe Glu Leu Ala Cys Ser Lys Lys Lys  
 165 170 175

Tyr Glu Met Val Val Trp Ile Glu Gly Val Leu Gly Ile Gly Lys Val  
 180 185 190

Thr Ser Leu Phe Thr Ile Ala Ile Ser Asn Arg Asp Leu His Leu Tyr  
 195 200 205

Ser Leu Gly His Leu Ile Ile Leu Glu Arg Met Gln Ser Cys Gly Gln  
 210 215 220

ES 2 750 960 T3

Asp Pro Thr Phe Leu Leu Asn His Phe Leu Arg Asp Val Ser Ile Lys  
225 230 235 240

Gly Leu Leu Pro Phe Val Leu Lys Thr Ile Glu Tyr Gly Gly Ser Lys  
245 250 255

Glu Ile Ala Ile Thr Leu Ala Lys Lys Tyr Gln His Lys His Ile Leu  
260 265 270

Lys Tyr Phe Glu Thr Gly Lys Cys  
275 280

<210> 10

<211> 505

<212> PRT

<213> Virus de la fiebre porcina africana

<400> 10

Met Phe Ser Leu Gln Asp Ile Cys Arg Lys Tyr Leu Phe Gln Leu Pro  
1 5 10 15

Asp Ser Phe Asp Glu Tyr Thr Leu Gln Val Leu Gly Leu Tyr Trp Glu  
20 25 30

Lys His Gly Ser Leu Gln Arg Ile Arg Lys Asp Ala Val Phe Val Gln  
35 40 45

Arg Asn Leu Ile Ile Ser Ile Asn Glu Ala Leu Arg Ile Ala Ala Ser  
50 55 60

Glu Gly Asn Gly Arg Val Val Lys Leu Leu Leu Ser Trp Glu Gly Asn  
65 70 75 80

Phe His Tyr Val Ile Ile Gly Ala Leu Glu Gly Asp His Tyr Asp Leu  
85 90 95

Ile His Lys Tyr Gly Ser Gln Ile Glu Asp Tyr His Met Ile Leu Ser  
100 105 110

Ser Ile His Asn Ala Asn Thr Phe Glu Lys Cys His Glu Leu Ser Asn  
115 120 125

Cys Asp Met Trp Cys Leu Ile Gln Asn Ala Ile Lys Tyr Asn Met Leu  
130 135 140

Pro Ile Leu Gln Lys His Arg Asn Ile Leu Thr His Glu Gly Glu Asn  
145 150 155 160

5

10

ES 2 750 960 T3

Gln Glu Leu Phe Glu Met Ala Cys Glu Glu Gln Lys Tyr Asp Ile Val  
 165 170 175

Leu Trp Ile Gly Gln Thr Leu Met Leu Asn Glu Pro Glu Phe Ile Phe  
 180 185 190

Asp Ile Ala Phe Glu Arg Ile Asp Phe Ser Leu Leu Thr Met Gly Tyr  
 195 200 205

Ser Leu Leu Phe Asn Asn Lys Met Ser Ser Ile Asp Ile His Asp Glu  
 210 215 220

Glu Asp Leu Ile Ser Leu Leu Thr Glu His Leu Glu Lys Ala Ala Thr  
 225 230 235 240

Lys Gly Cys Phe Phe Phe Met Leu Glu Thr Leu Lys His Gly Gly Asn  
 245 250 255

Val Asn Met Ala Val Leu Ser Lys Ala Val Glu Tyr Asn His Arg Lys  
 260 265 270

Ile Leu Asp Tyr Phe Ile Arg Gln Lys Cys Leu Ser Arg Lys Asp Ile  
 275 280 285

Glu Lys Leu Leu Leu Val Ala Ile Ser Asn Ser Ala Ser Lys Lys Thr  
 290 295 300

Leu Asn Leu Leu Leu Ser Tyr Leu Asn His Ser Val Lys Asn Ile Ile  
 305 310 315 320

Gly Lys Ile Val Gln Ser Val Leu Lys Asn Gly Asp Phe Thr Ile Ile  
 325 330 335

Ile Phe Leu Lys Lys Lys Lys Ile Asn Leu Val Glu Pro Ala Leu Ile  
 340 345 350

Gly Phe Ile Asn Tyr Tyr Tyr Ser Tyr Cys Phe Leu Glu Gln Phe Ile  
 355 360 365

His Glu Phe Asp Ile Arg Pro Glu Lys Met Ile Lys Met Ala Ala Arg  
 370 375 380

Lys Gly Lys Leu Asn Met Ile Ile Glu Phe Leu Asn Glu Lys Tyr Val  
 385 390 395 400

His Lys Asp Asp Leu Gly Ala Ile Phe Lys Phe Leu Lys Asn Leu Val  
 405 410 415

ES 2 750 960 T3

Cys Thr Met Lys His Lys Lys Gly Lys Glu Thr Leu Ile Val Leu Ile  
 420 425 430

His Lys Ile Tyr Gln Val Ile Gln Leu Glu Thr Lys Glu Lys Phe Lys  
 435 440 445

Leu Leu Arg Phe Tyr Val Met His Asp Ala Thr Ile Gln Phe Ile Ser  
 450 455 460

Met Tyr Lys Asp Cys Phe Asn Leu Ala Gly Phe Lys Pro Phe Leu Leu  
 465 470 475 480

Glu Cys Leu Asp Ile Ala Ile Lys Lys Asn Tyr Pro Asp Met Ile Arg  
 485 490 495

Asn Ile Glu Thr Leu Leu Lys Cys Glu  
 500 505

<210> 11  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la fièvre porcine africaine  
 <400> 11

5

Met Gln Asn Lys Ile Pro Asn Phe Asn Leu Phe Phe Phe Phe Leu Tyr  
 1 5 10 15

Arg Met Leu Glu Ile Val Leu Ala Thr Leu Leu Gly Asp Leu Gln Arg  
 20 25 30

Leu Arg Val Leu Thr Pro Gln Gln Arg Ala Val Ala Phe Phe Arg Ala  
 35 40 45

Asn Thr Lys Glu Leu Glu Asp Phe Leu Arg Ser Asp Gly Gln Ser Glu  
 50 55 60

Glu Ile Leu Ser Gly Pro Leu Leu Asn Arg Leu Leu Glu Pro Ser Cys  
 65 70 75 80

Pro Leu Asp Ile Leu Thr Gly Tyr His Leu Phe Arg Gln Asn Pro Lys  
 85 90 95

Ala Gly Gln Leu Arg Gly Leu Glu Val Lys Met Leu Glu Arg Leu Tyr  
 100 105 110

Asp Ala Asn Ile Tyr Asn Ile Leu Ser Arg Leu Arg Pro Lys Lys Val  
 115 120 125

10

ES 2 750 960 T3

Arg Asn Lys Ala Ile Glu Leu Tyr Trp Val Phe Arg Ala Ile His Ile  
 130 135 140

Cys His Ala Pro Leu Val Leu Asp Ile Val Arg Tyr Glu Glu Pro Asp  
 145 150 155 160

Phe Ala Glu Leu Ala Phe Ile Cys Ala Ala Tyr Phe Gly Glu Pro Gln  
 165 170 175

Val Met Tyr Leu Leu Tyr Lys Tyr Met Pro Leu Thr Arg Ala Val Leu  
 180 185 190

Thr Asp Ala Ile Gln Ile Ser Leu Glu Ser Asn Asn Gln Val Gly Ile  
 195 200 205

Cys Tyr Ala Tyr Leu Met Gly Gly Ser Leu Lys Gly Leu Val Ser Ala  
 210 215 220

Pro Leu Arg Lys Arg Leu Arg Ala Lys Leu Arg Ser Gln Arg Lys Lys  
 225 230 235 240

Lys Asp Val Leu Ser Pro His Asp Phe Leu Leu Leu Gln  
 245 250

<210> 12  
 <211> 148  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la fièvre porcine africaine  
 <400> 12

5

Met Leu Glu Arg Leu Tyr Asp Ala Asn Ile Tyr Asn Ile Leu Ser Arg  
 1 5 10 15

Leu Arg Pro Glu Lys Val Arg Asn Lys Ala Val Glu Leu Tyr Trp Val  
 20 25 30

Phe Arg Ala Ile Asn Met Cys His Ala Pro Leu Val Leu Asp Ile Val  
 35 40 45

Arg Tyr Glu Glu Pro Asp Phe Ala Glu Leu Ala Phe Ile Cys Ala Ala  
 50 55 60

Tyr Phe Gly Glu Pro Gln Val Met Tyr Leu Leu Tyr Lys Tyr Met Pro  
 65 70 75 80

Leu Thr Arg Ala Val Leu Thr Asp Ala Ile Gln Ile Ser Leu Glu Ser  
 85 90 95

10

ES 2 750 960 T3

Asn Ser Gln Val Gly Ile Cys Tyr Ala Tyr Leu Met Gly Gly Ser Leu  
 100 105 110

Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Leu Arg Lys Arg Leu Arg Ala Lys Leu  
 115 120 125

Arg Ser Gln Arg Lys Lys Lys Asp Val Leu Pro Pro His Asp Phe Leu  
 130 135 140

Leu Leu Leu Gln  
 145

5 <210> 13  
 <211> 151  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la fiebre porcina africana  
 <400> 13

Met Leu Glu Arg Leu Tyr Asp Ala Asn Ile Tyr Asn Met Leu Ala Arg  
 1 5 10 15

Leu Arg Pro Glu Leu Val Arg Asp Lys Ala Ile Glu Leu Tyr Trp Leu  
 20 25 30

Phe Arg Ala Ile Leu Met Cys His Ser Pro Leu Val Leu Glu Ile Val  
 35 40 45

Arg His Glu Thr Met Asp Phe Ala Glu Thr Ala Phe Ile Cys Ala Ala  
 50 55 60

Tyr Phe Ser Glu Pro Gln Val Met Tyr Ala Leu Tyr Lys Phe Ile Pro  
 65 70 75 80

Ile Ser Arg Ala Val Leu Ala Asp Ala Ile Gln Met Cys Leu Glu Ser  
 85 90 95

Asn Ser Glu Ala Gly Ile Cys Tyr Ala Tyr Leu Met Gly Gly Ser Leu  
 100 105 110

Lys Gly Lys Val Pro Gly Ser Leu Arg Lys Arg Leu Arg Ala Ser Pro  
 115 120 125

Leu Arg Gln Glu Arg Lys Lys Lys Asn Val Leu Pro Pro His Glu Phe  
 130 135 140

10 Leu Leu Met Leu His Gly Ile  
 145 150

15 <210> 14  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la fiebre porcina africana

ES 2 750 960 T3

<400> 14

Met Gln Arg Ala Val Ala Phe Phe Arg Val Asn Thr Lys Glu Leu Glu  
 1 5 10 15

Asp Phe Leu Tyr Pro Asp Gly Gln Ser Glu Glu Leu Leu Pro Gly Leu  
 20 25 30

Leu Leu Asn Arg Leu Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Asp Ile Leu Thr  
 35 40 45

Gly Tyr His Leu Phe Arg Glu Asn Pro Lys Ala Gly Arg Leu Arg Gly  
 50 55 60

Leu Glu Val Lys Leu Leu Glu Arg Leu Tyr Asp Ala Asn Ile Tyr Asn  
 65 70 75 80

Met Leu Ala Gln Ile Arg Pro Glu Leu Val Arg Ile Lys Ala Ile Glu  
 85 90 95

Leu Tyr Trp Leu Phe Arg Ala Ile Leu Met Cys His Ser Pro Leu Val  
 100 105 110

Leu Glu Ile Val Arg His Glu Thr Met Asp Phe Ala Glu Leu Ala Phe  
 115 120 125

Ile Cys Ala Ala Tyr Phe Ser Glu Pro Gln Val Met Tyr Ala Leu Tyr  
 130 135 140

Lys Phe Ile Pro Ile Ser Arg Ala Val Leu Ala Asp Ala Ile Glu Met  
 145 150 155 160

Ser Leu Glu Ser Asn Ser Glu Thr Gly Ile Cys Tyr Ala Tyr Leu Met  
 165 170 175

Gly Gly Ser Leu Lys Gly Lys Val Pro Gly Pro Leu Arg Lys Arg Leu  
 180 185 190

Arg Ala Ser Pro Leu Arg Gln Glu Arg Lys Lys Lys Asn Val Leu Pro  
 195 200 205

Pro His Glu Phe Leu Leu Met Leu His Gly Ile  
 210 215

5 <210> 15  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la fiebre porcina africana

10 <400> 15

ES 2 750 960 T3

Met Gln Asn Lys Ile Pro Asn Phe Asn Leu Phe Phe Phe Phe Leu Tyr  
 1 5 10 15

Arg Met Leu Glu Ile Val Leu Ala Thr Leu Leu Gly Asp Leu Gln Arg  
 20 25 30

Leu Arg Val Leu Thr Pro Gln Gln Arg Ala Val Ala Phe Phe Arg Ala  
 35 40 45

Asn Thr Lys Glu Leu Glu Asp Phe Leu Cys Ser Asp Gly Gln Ser Glu  
 50 55 60

Glu Ile Leu Ser Gly Pro Leu Leu Asn Arg Leu Leu Glu Pro Ser Gly  
 65 70 75 80

Pro Leu Asp Ile Leu Thr Gly Tyr His Leu Phe Arg Gln Asn Pro Lys  
 85 90 95

Ala Gly Gln Leu Arg Gly Leu Glu Val Lys Met Leu Glu Arg Leu Tyr  
 100 105 110

Asp Ala Asn Ile Tyr Asn Ile Leu Ser Arg Leu Arg Pro Glu Lys Val  
 115 120 125

Arg Asn Lys Ala Ile Glu Leu Tyr Trp Val Phe Arg Ala Ile His Ile  
 130 135 140

Cys His Ala Pro Leu Val Leu Asp Ile Val Arg Tyr Glu Glu Pro Asp  
 145 150 155 160

Phe Ala Glu Leu Ala Phe Ile Cys Ala Ala Tyr Phe Gly Glu Pro Gln  
 165 170 175

Val Met Tyr Leu Leu Tyr Lys Tyr Met Pro Leu Thr Arg Ala Val Leu  
 180 185 190

Thr Asp Ala Ile Arg Ile Ser Leu Glu Ser Asn Asn Gln Val Gly Ile  
 195 200 205

Cys Tyr Ala Tyr Leu Met Gly Gly Ser Leu Lys Gly Leu Val Ser Ala  
 210 215 220

Pro Leu Arg Lys Arg Leu Cys Ala Lys Leu Arg Ser Gln Arg Lys Lys  
 225 230 235 240

Lys Asp Val Leu Ser Pro His Asp Phe Leu Leu Leu Leu Gln  
 245 250

5 <210> 16  
 <211> 148  
 <212> PRT

ES 2 750 960 T3

<213> Virus de la fiebre porcina africana

<400> 16

Met Leu Glu Arg Leu Tyr Asp Ala Asn Ile Tyr Asn Ile Leu Ser Arg  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Glu Lys Val Arg Asn Lys Ala Val Glu Leu Tyr Trp Val  
20 25 30

Phe Arg Ala Ile Asn Met Cys His Ala Pro Leu Val Leu Asp Ile Val  
35 40 45

Arg Tyr Glu Glu Pro Asp Phe Ala Glu Leu Ala Phe Ile Cys Ala Ala  
50 55 60

Tyr Phe Gly Glu Pro Gln Val Met Tyr Leu Leu Tyr Lys Tyr Met Pro  
65 70 75 80

Leu Ser Arg Ala Val Leu Thr Asp Ala Ile Gln Ile Ser Leu Glu Ser  
85 90 95

Asn Ser Gln Val Gly Ile Cys Tyr Ala Tyr Leu Met Gly Gly Ser Leu  
100 105 110

Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Leu Arg Lys Arg Leu Arg Ala Lys Leu  
115 120 125

Arg Ser Gln Arg Lys Lys Lys Asp Val Leu Pro Pro His Asp Phe Leu  
130 135 140

Leu Leu Leu Gln  
145

5

<210> 17

<211> 148

<212> PRT

10 <213> Virus de la fiebre porcina africana

<400> 17

ES 2 750 960 T3

Met Leu Glu Arg Leu Tyr Asp Ala Asn Ile Tyr Asn Ile Leu Ser Arg  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Glu Lys Val Arg Asn Lys Ala Val Glu Leu Tyr Trp Val  
20 25 30

Phe Arg Ala Ile Asn Met Cys His Ala Pro Leu Val Leu Asp Ile Val  
35 40 45

Arg Asn Glu Glu Leu Asp Phe Ala Glu Leu Ala Phe Ile Cys Ala Ala  
50 55 60

Tyr Phe Gly Glu Pro Gln Val Met Tyr Leu Leu Tyr Lys Tyr Met Pro  
65 70 75 80

Leu Thr Arg Ala Val Leu Thr Asp Ala Ile Gln Ile Ser Leu Glu Ser  
85 90 95

Asn Ser Gln Val Gly Ile Cys Tyr Ala Tyr Leu Met Gly Gly Ser Leu  
100 105 110

Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Leu Arg Lys Arg Leu Arg Ala Lys Leu  
115 120 125

Arg Ser Gln Arg Lys Lys Lys Asp Val Leu Pro Pro His Asp Phe Leu  
130 135 140

Leu Leu Leu Gln  
145

<210> 18

<211> 148

5 <212> PRT

<213> Virus de la fiebre porcina africana

<400> 18

Met Leu Glu Arg Leu Tyr Asp Ala Asn Ile Tyr Asn Ile Leu Ser Arg  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Glu Lys Val Arg Asn Lys Ala Ile Glu Leu Tyr Trp Val  
20 25 30

Phe Arg Ala Ile His Ile Cys His Ala Pro Leu Val Leu Asp Ile Val  
35 40 45

Arg Tyr Glu Glu Pro Asp Phe Ala Glu Leu Ala Phe Ile Cys Ala Ala  
50 55 60

10

ES 2 750 960 T3

Tyr Phe Gly Glu Pro Gln Val Met Tyr Leu Leu Tyr Lys Tyr Met Pro  
65 70 75 80

Leu Thr Arg Ala Val Leu Thr Asp Ala Ile Arg Ile Ser Leu Glu Ser  
85 90 95

Asn Asn Gln Val Gly Ile Cys Tyr Ala Tyr Leu Met Gly Gly Ser Leu  
100 105 110

Lys Gly Leu Val Ser Ala Pro Leu Arg Lys Arg Leu Arg Ala Lys Leu  
115 120 125

Arg Ser Gln Arg Lys Lys Lys Asp Val Leu Ser Pro His Asp Phe Leu  
130 135 140

Leu Leu Leu Gln  
145

<210> 19

<211> 148

<212> PRT

<213> Virus de la fiebre porcina africana

<400> 19

Met Leu Glu Arg Leu Tyr Asp Ala Asn Ile Tyr Asn Ile Leu Ser Arg  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Glu Lys Val Arg Asn Lys Ala Ile Glu Leu Tyr Trp Val  
20 25 30

Phe Arg Ala Ile His Ile Cys His Ala Pro Leu Val Leu Asp Ile Val  
35 40 45

Arg Tyr Glu Glu Pro Asp Phe Ala Glu Leu Ala Phe Ile Cys Ala Ala  
50 55 60

Tyr Phe Gly Glu Pro Gln Val Met Tyr Leu Leu Tyr Lys Tyr Met Pro  
65 70 75 80

Leu Thr Arg Ala Val Leu Thr Asp Ala Ile Gln Ile Ser Leu Glu Ser  
85 90 95

Asn Asn Gln Val Gly Ile Cys Tyr Ala Tyr Leu Met Gly Gly Ser Leu  
100 105 110

Lys Gly Leu Val Ser Ala Pro Leu Arg Lys Arg Leu Arg Ala Lys Leu  
115 120 125

5

10

# ES 2 750 960 T3

Arg Ser Gln Arg Lys Lys Lys Asp Val Leu Ser Pro His Asp Phe Leu  
 130 135 140

Leu Leu Leu Gln  
 145

5 <210> 20  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador FlancoL directo

<400> 20  
 acgttgcaaa gcttcatta atccctccag ttgttc 36

15 <210> 21  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador FlancoL inverso

<400> 21  
 acgttgacagg taccctctc tctgcagact ctcacc 36

25 <210> 22  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador FlancoD directo

<400> 22  
 acgttgacgc ggccgcctct ccaagacatc tgtcgg 36

35 <210> 23  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cebador FlancoD inverso

45 <400> 23  
 acgtacgtct cgagcctcac atgcatctc aaacaattcc 40

50 <210> 24  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador BeninD8 directo

55 <400> 24  
 ggtgagagtc tgcagagaga gg 22

60 <210> 25  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador BeninD8 inverso  
 5 <400> 25  
 gccctagcac ttgtaacg 18  
 <210> 26  
 <211> 27  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador RGUS  
 15 <400> 26  
 ccttctctgc cgttccaaa tcgccgc 27  
 <210> 27  
 <211> 18  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador BeninD8INT directo  
 25 <400> 27  
 cgatgatca ttgatgtc 18  
 <210> 28  
 <211> 19  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador BeninD8INT inverso  
 <400> 28  
 40 ggataatctt agggaggcc 19  
 <210> 29  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador 9L directo  
 <400> 29  
 50 atgacgcatt aaaccggcg 19  
 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador 4R inverso  
 60 <400> 30  
 cagtatagcc cttagcactg 20  
 <210> 31  
 <211> 96  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

# ES 2 750 960 T3

	<220>		
	<223> Secuencia del virus recombinante (flanco izquierdo de la eliminación/inserción)		
5	<400> 31		
	agagaggggt accatttaat aaaaacaata aattatTTTT tataacatta tatataactt	60	
	tgtatagcat acattatacg aagttatatg ttacgt	96	
10	<210> 32		
	<211> 96		
	<212> ADN		
	<213> Virus de la fiebre porcina africana		
15	<400> 32		
	agagaggacc atatttcttt ttttgaaaa atcaaattaa aaaaaaacat gcttgtttgg	60	
	catacatgta actatgttat aaccatgta taacca	96	
20	<210> 33		
	<211> 73		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Secuencia del virus recombinante (flanco derecho de la eliminación/inserción)		
	<400> 33		
	cagccagggga ggcaacaat gaggaattct gcagatatcc atcactggcg gccgcctctc	60	
	caagacatct tgt	73	
30	<210> 34		
	<211> 77		
	<212> ADN		
	<213> Virus de la fiebre porcina africana		
35	<400> 34		
	ttttatcata cattaaaatt ccagtaaaat ttatatTTTT ttggtaaac aaatgttttc	60	
	tctccaagac atcttgt	77	
40	<210> 35		
	<211> 2160		
	<212> ADN		
	<213> Virus de la fiebre porcina africana		
45	<400> 35		

ES 2 750 960 T3

aaatgaatag atttaatcca agtagtatta aaatTTTTTTT gaaatagtgt tctacaaata 60  
 atgaaatgaa tagcccaaaa aaaataaggt gtacattaat gtaatatatt gttaggctaa 120  
 gtaaatttaa tatttaaagt acttgaaaa atatTTTTTTT acatatgctg tctaggaatt 180  
 ttttttagaca tttaaaacca tatagttact ttatttatta cacttaactt gaaaagaatt 240  
 attgcctaaa atattaatag atgaagtaat attgtgtaat tgagtccata acatgggtgg 300  
 gaaacaaaa tctcgtata tgaaaaataa acatcctaaa aagagtgcaa ttgttataag 360  
 tttatgtaac tttatTTTTT agtaagaata taaaaatatg agtacaagag gaataggggc 420  
 cactactaat attggctcca acatcctggt gtctacaaaa aaaaatattt ttttggcaaa 480  
 aaaaaatcca tggaaggata ttaatacaca taattgTTTg acatcatatt ggtatactta 540  
 ccaaatagta atatacaacc atcctaatat tcactttatg aaatgacccc cccccacc 600  
 tatacagtaa aatagtatag gttttaataa agaaaaaaga tattatgtag tttttatttt 660  
 tgtatagtgc gtgaatgcaa aataaaatcc caaattTTTaa ccttttcttt ttttttctat 720  
 acaggatggt agaaatagta ttggcaacgc tgctaggcga cctgcagcgg ctccgggttc 780  
 ttaccctca gcagcgggcg gttgccttct ttcgagccaa tactaaggag ctagaggact 840  
 tcttacgctc agatgggcaa tctgaggaga tactgtctgg cccctcctt aaccgtctac 900  
 tagaacctc atgccctctt gatattTTTaa ccggatatca cctatttctg cagaatccca 960  
 aggcaggtca gttgcgcggc cttgaggtca agatgcttga acggttatac gatgctaata 1020  
 tttacaatat attgtctcgg ctgcgacctt aaaaagtccg caacaaggct attgagctat 1080  
 actgggtttt ccgagctatc catatttgtc atgctccttt agttttagat attgtacgat 1140  
 atgaggaacc ggactttgct gaactggcct ttatttgtgc tgcttacttt ggtgaacctc 1200  
 aggtaatgta tttgctctac aaatatatgc ctctgacccg cgcagttctt acggatgcca 1260  
 tccagataag tcttgagagc aacaaccagg tagggatttg ctatgcttac ttgatgggag 1320  
 gcagcctcaa gggactagtc tccgccccac tgcgtaaacg tctgcgcgcc aaactacgct 1380  
 cgcagcgcga aaagaaggac gttctttcac cccacgactt cttactgctg ctccagtagc 1440  
 tttttttgcc gcaggagcac cgtggatagg agctcctcca cgtcgcgat ccggcgctgg 1500  
 aagcggaaacc gatcgaccgc cacctgctcc cagggacctt tgcgctcgat gtcgctggct 1560  
 tcccatacct cgacggctgc agcaaagcgg acgtgcttctg tgcattcgt ccgttttttg 1620  
 cgccgcgcc cccccccat tattcctgta agattagtgt ttaataccta taataacata 1680

# ES 2 750 960 T3

```

atTTtaagat ttaatatacc aaaacttaaa ctatTTTTgt atagtaacta ttagcatgtc      1740
tacacatgat tgTTTTcaa aagagaaacc agttgatatg aacgatatat ctgagaaatc      1800
atctgtcgtg gataatgcac ccgagaaacc agctggagcg aatcatatac ctgagaagtc      1860
ggcccgcgaa atgacatcat cagaatggat tgctgaatat tggaaaggta taaaacgtgg      1920
aatgacgtg ccatgttgtt gtccaagaaa aatgaccagt gcagacaaaa agTTTTcagt      1980
atTtggtaaG ggatccctaa tacgctccat ccagaagaat aattaaaaaa aatTTTTTTT      2040
ttggtaaGtt tataaactat atagtTaaat atggTaaaaa aatcacata ataattaaac      2100
tgaacgtgtt agaattaata tTTTTTTata atcggatata atatccatta aatcaataaa      2160

```

```

5  <210> 36
   <211> 38
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
   <223> Cebador 360-18RFlancoI-dir-Benin

   <400> 36
   gctatccaag cttctacaaa taatgaaatg aatagccc      38

15 <210> 37
   <211> 38
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

20 <220>
   <223> Cebador 360-18RFlancoI-inv-Benin2

   <400> 37
   gctatccggt acccataaag tgaatattag gatggttg      38

25 <210> 38
   <211> 37
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

30 <220>
   <223> Cebador 360-18RFlancoD-dir

   <400> 38
   gctatccgcg gccgccgact tcttactgct gctccag      37

35 <210> 39
   <211> 36
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

40 <220>
   <223> Cebador 360-18RFlancoD-inv

45 <400> 39
   gctatcctct agatcttctg gatggagcgt attagg      36

50 <210> 40
   <211> 22
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

   <220>

```

# ES 2 750 960 T3

<223> Cebador 18R-Benin-Par1-directo

5 <400> 40  
gagtacaaga ggaatagggg cc 22

<210> 41  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cebador 18R-OURT-Par1-inverso

15 <400> 41  
gcatgacaaa tatggatagc tcg 23

<210> 42  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cebador 18R-OURT-Par2-directo

25 <400> 42  
gtccgcaaca aggctattga g 21

<210> 43  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Cebador 18R-OURT-Par2-inverso

35 <400> 43  
gacgtttacg cagtggggc 19

40 <210> 44  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Cebador 18R-OURT-Par3-directo

<400> 44  
caaccaggta gggatttgct atgc 24

50 <210> 45  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Cebador 18R-OURT-Par3-inverso

<400> 45  
gctgcagccg tcgagg 16

**REIVINDICACIONES**

1. Un virus de la fiebre porcina africana (ASF) atenuado, en el que se eliminan los siguientes genes o se interrumpen de modo que los genes no se transcriban y/o traduzcan:
- 5 familia multigénica 360 genes 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y familia multigénica 505 genes 1R, 2R, 3R y 4R.
2. Un virus de ASF atenuado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se eliminan los siguientes genes:
- 10 familia multigénica 360 genes 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y familia multigénica 505 genes 1R, 2R y 3R.
3. Un virus atenuado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que se interrumpen los siguientes genes de modo que los genes no se transcriban y/o traduzcan:
- 15 familia multigénica 360 gen 9L; y familia multigénica 505 gen 4R.
- 20 4. Un virus de ASF atenuado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la interrupción comprende eliminación o modificación del codón de inicio ATG del gen; o una modificación de un sitio de inicio de la traducción; o un desplazamiento del marco; o introducción de uno o más codones de parada en el marco abierto de lectura del gen.
- 25 5. Un virus de ASF atenuado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en que el resto del genoma corresponde al genoma de un aislado de virus ASFV virulento, preferiblemente en el que el resto del genoma corresponde al genoma de uno de los siguientes aislados de virus ASFV virulento: Georgia 2007/1, Benin 97/1, Kenyan, Malawi Lil20/1, Pretoriuskop/96/4 y Tengani 62, mucho más preferiblemente en que el resto del genoma corresponde al genoma del virus Benin 97/1.
- 30 6. Una vacuna que comprende un virus de ASF atenuado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
7. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una pluralidad de virus de ASF atenuados de diferentes genotipos.
- 35 8. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la fiebre porcina africana.
9. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 6 o reivindicación 7, para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria de protección cruzada contra una pluralidad de genotipos de virus de ASF.
- 40 10. Un método *in vitro* de atenuación de un virus de la fiebre porcina africana (ASF), que comprende la etapa de eliminar los siguientes genes, o interrumpir los siguientes genes de modo que los genes no se transcriban y/o traduzcan:
- 45 familia multigénica 360 genes 9L, 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y familia multigénica 505 genes 1R, 2R, 3R y 4R.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que se eliminan los siguientes genes:
- 50 familia multigénica 360 genes 10L, 11L, 12L, 13L y 14L; y familia multigénica 505 genes 1R, 2R y 3R.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que se interrumpen los siguientes genes de modo que los genes no se transcriban y/o traduzcan:
- 55 familia multigénica 360 gen 9L; y familia multigénica 505 gen 4R.
- 60 13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que la interrupción comprende: eliminación de modificación del codón de inicio ATG de los genes o una modificación de un sitio de inicio de la traducción; o un desplazamiento del marco; o introducción de uno o más codones de parada en el marco abierto de lectura del gen.
- 65 14. Una vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el sujeto es un cerdo doméstico y/o en la que la vacuna se administra siguiendo una pauta de sensibilización-refuerzo.

FIGURA 1

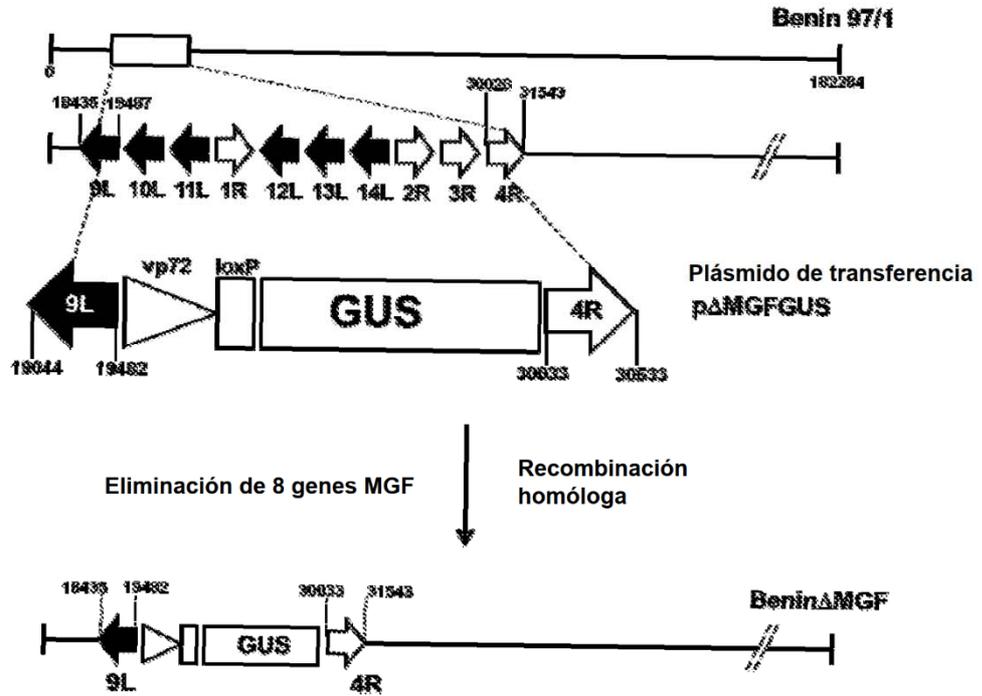


FIGURA 2

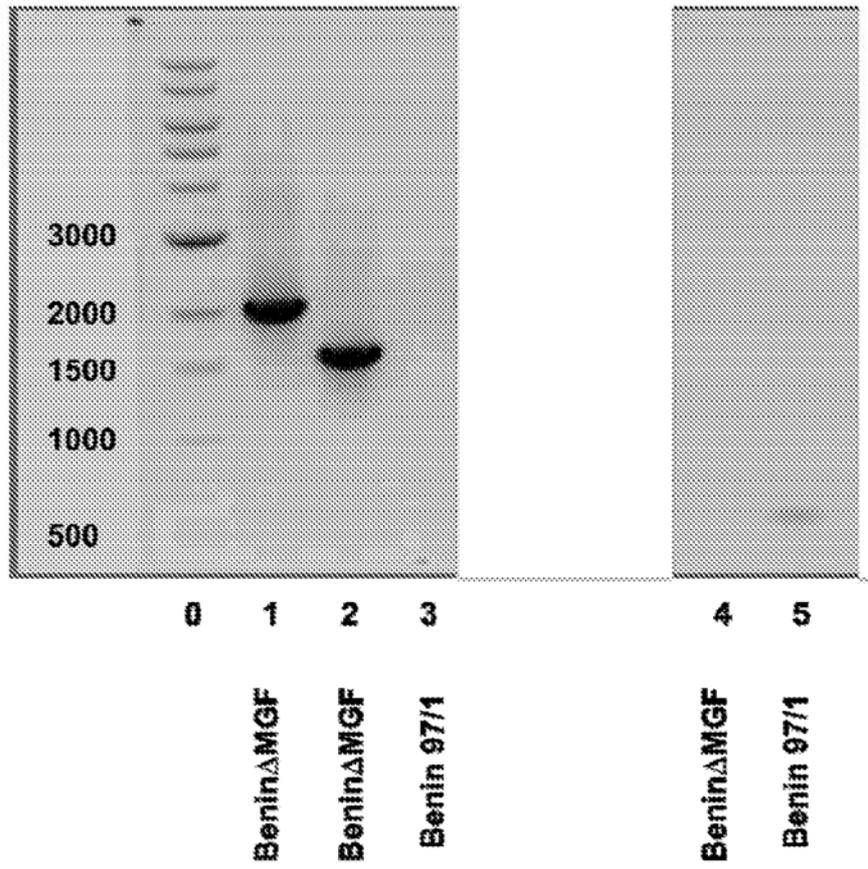


FIGURA 3

Secuencia en el flanco izquierdo de la eliminación/inserción

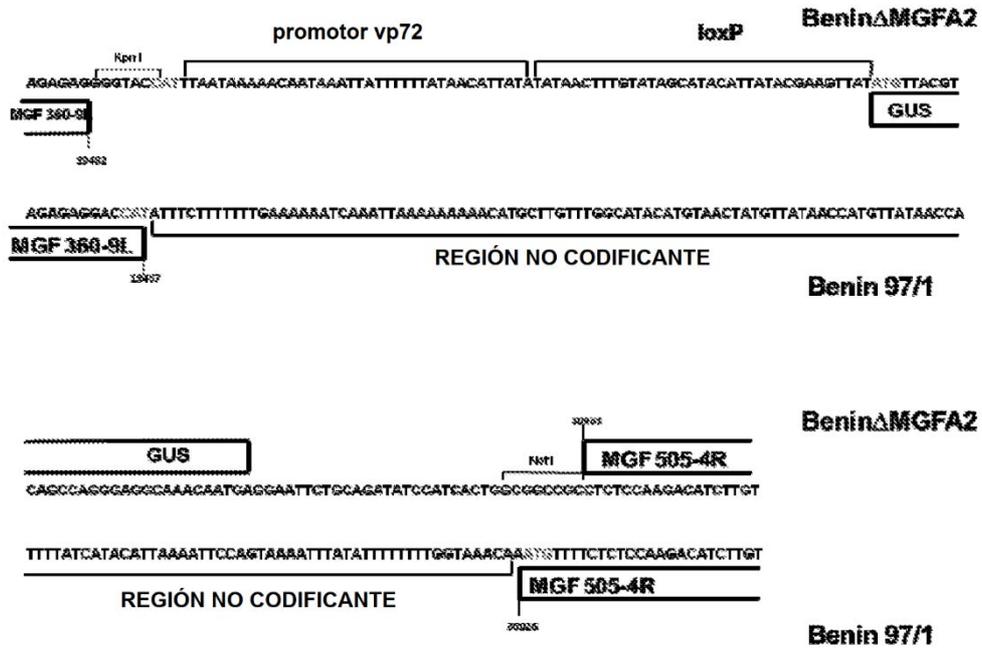


Figura 4

**Curvas de crecimiento de 97/1 y Benin $\Delta$ MGF**

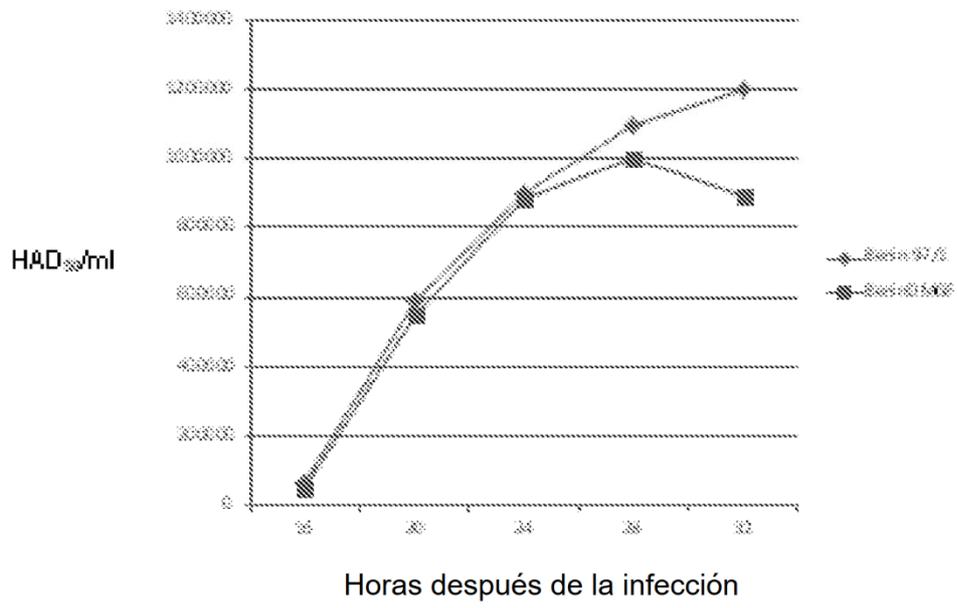


Figura 5

**Puntuaciones clínicas después de la 1.<sup>a</sup> inoculación**

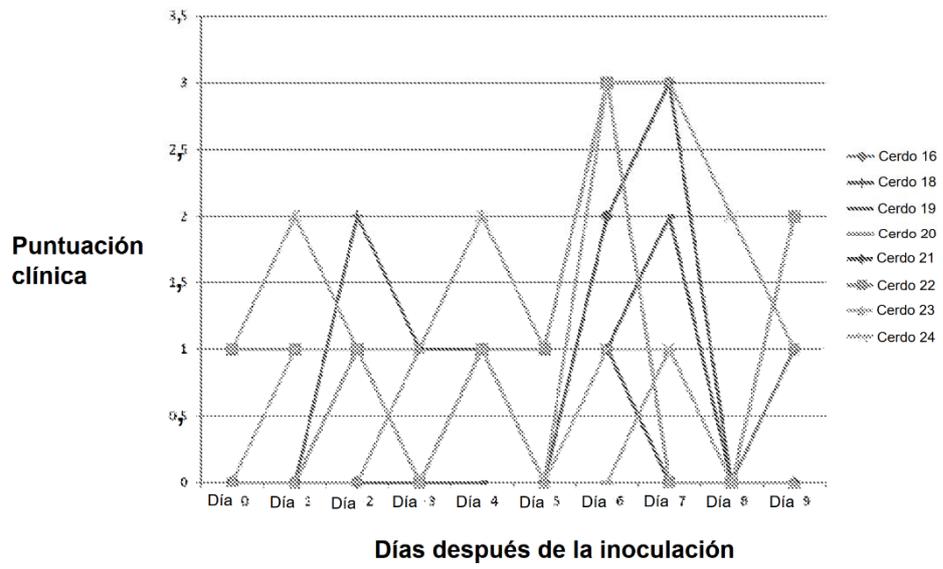


Figura 6

Temperaturas después de la 1.<sup>a</sup> inoculación

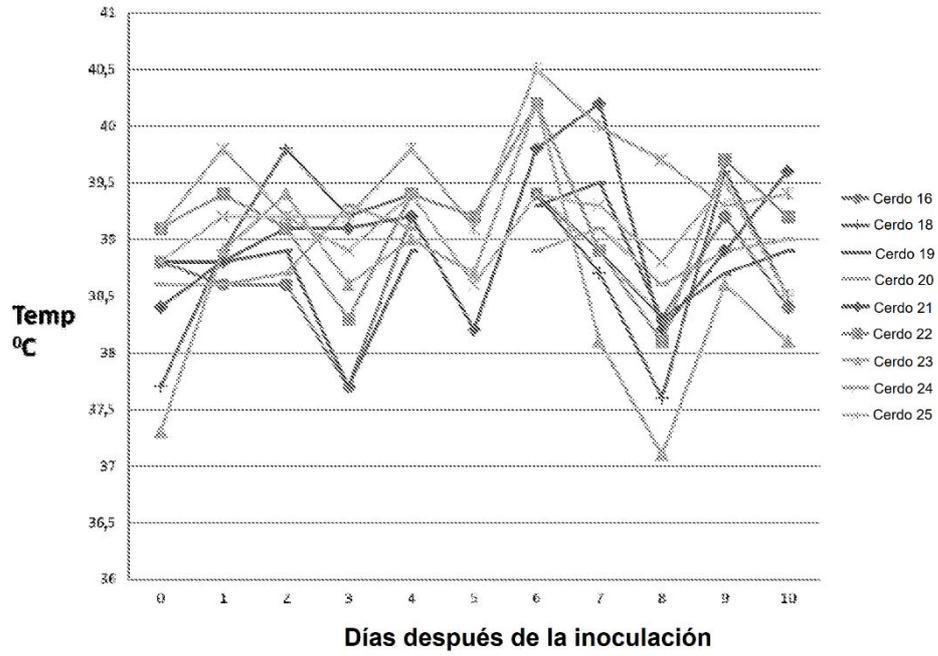


Figura 7

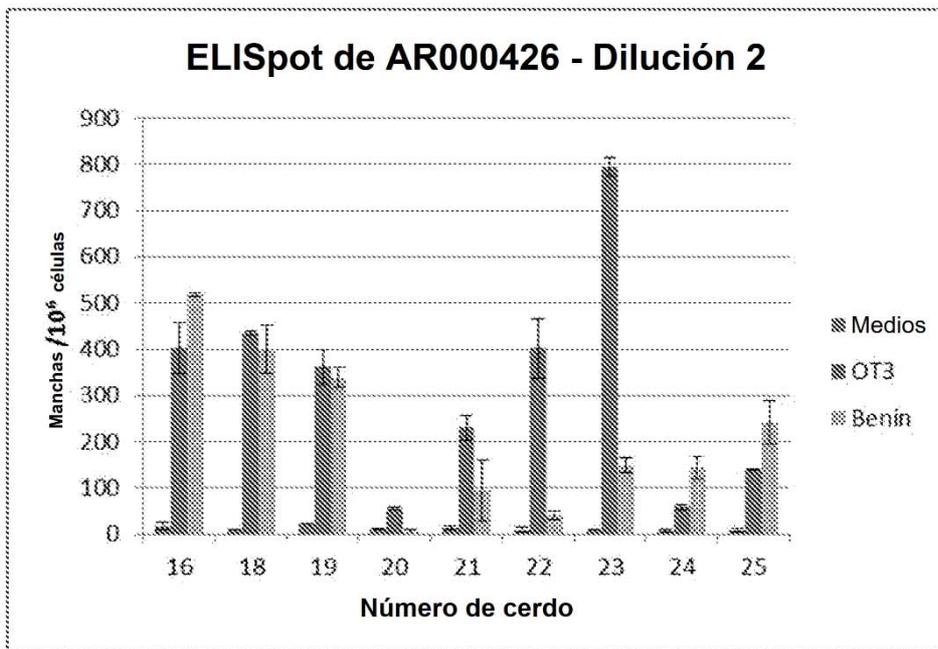
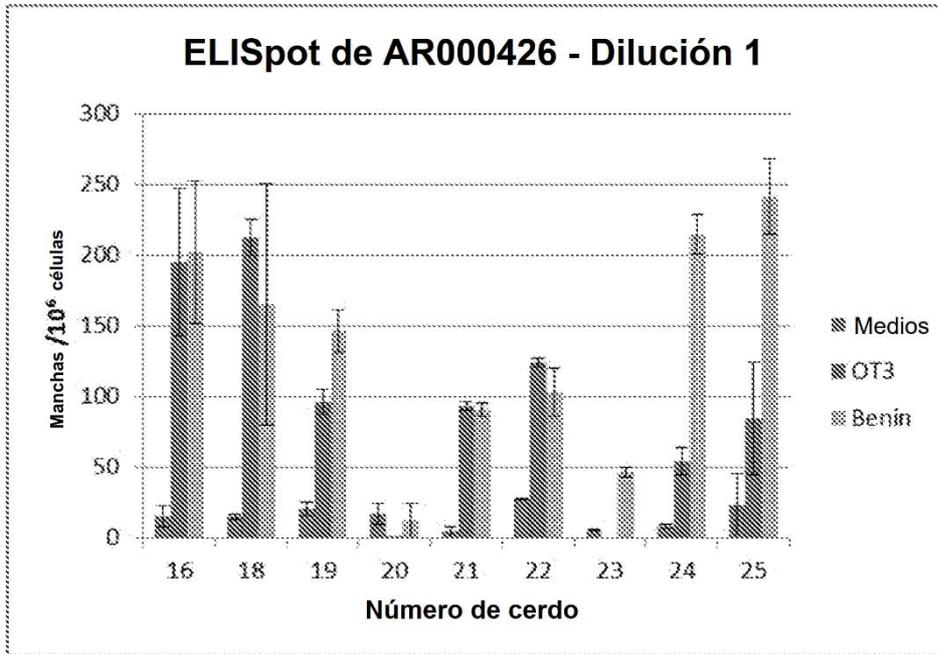


Figura 8

**Puntuación clínica después del refuerzo**

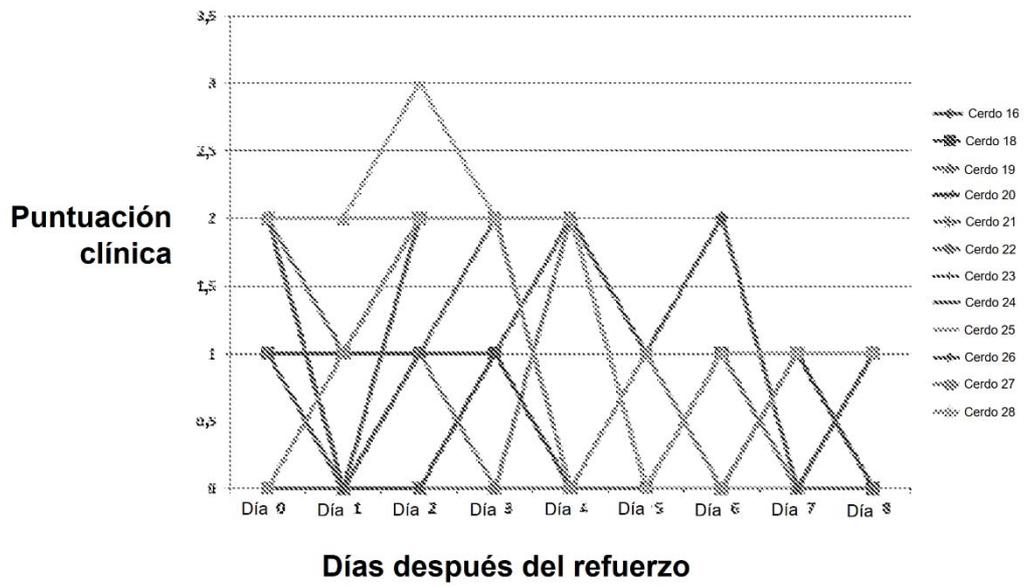


Figura 9

Temperaturas después del refuerzo

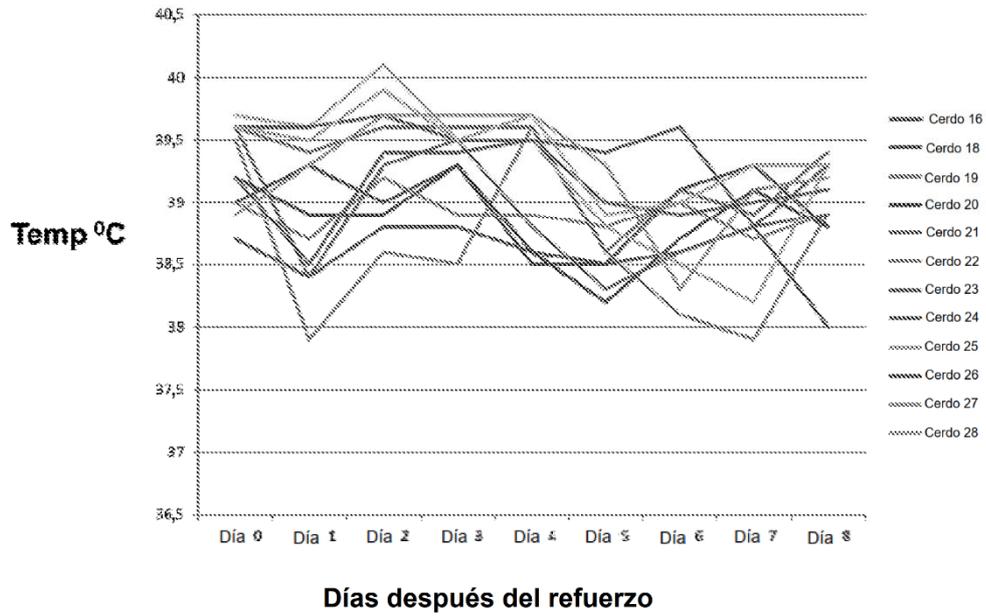


Figura 10

**Puntuaciones clínicas después de exposición a Benin 97/1**

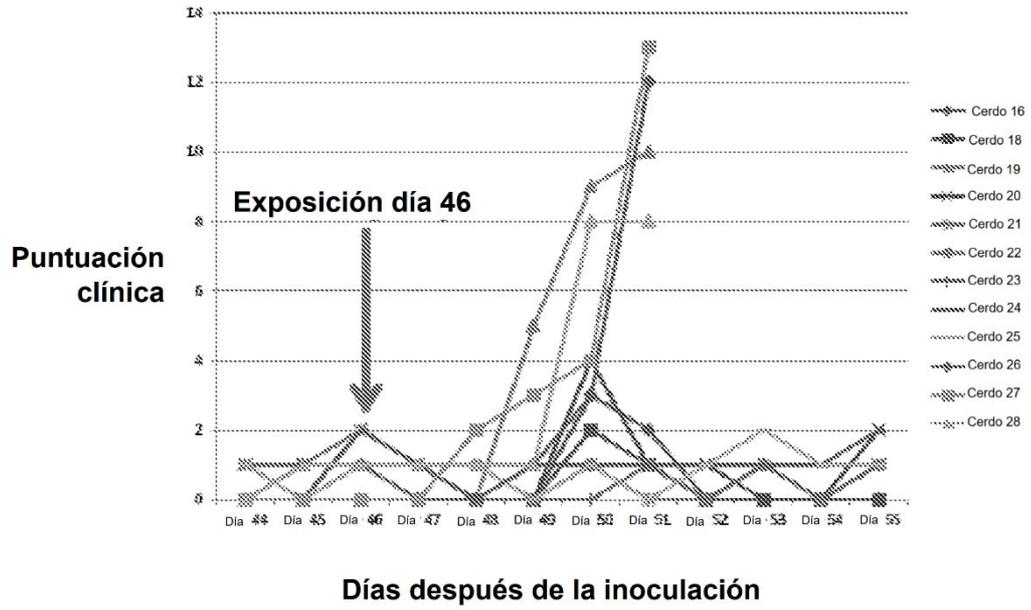


Figura 11

Temperaturas después de exposición a Benin 97/1

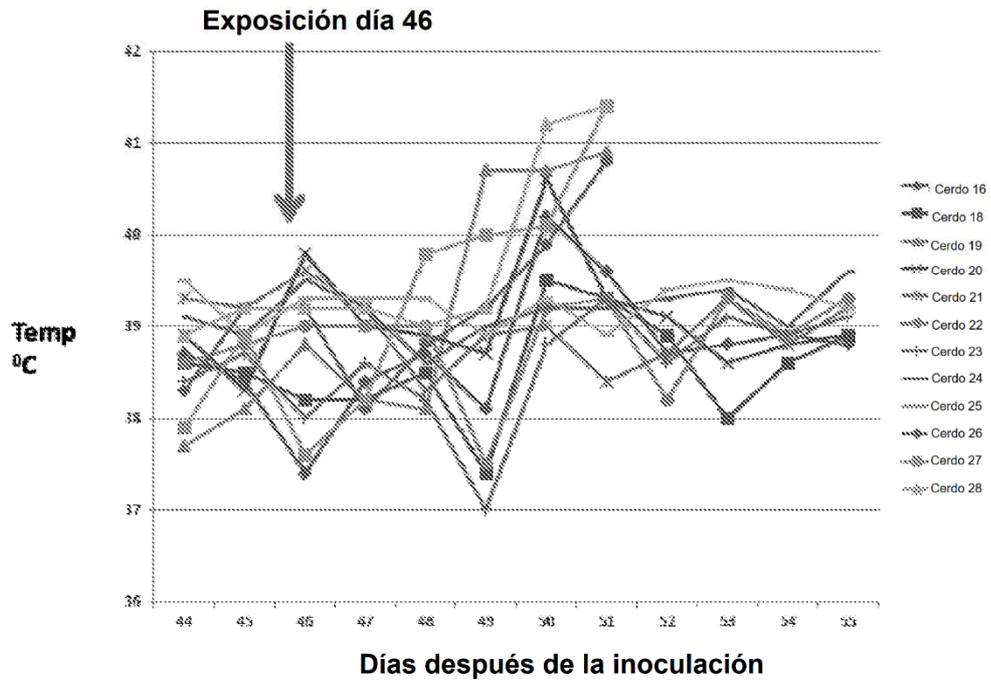


Figura 12

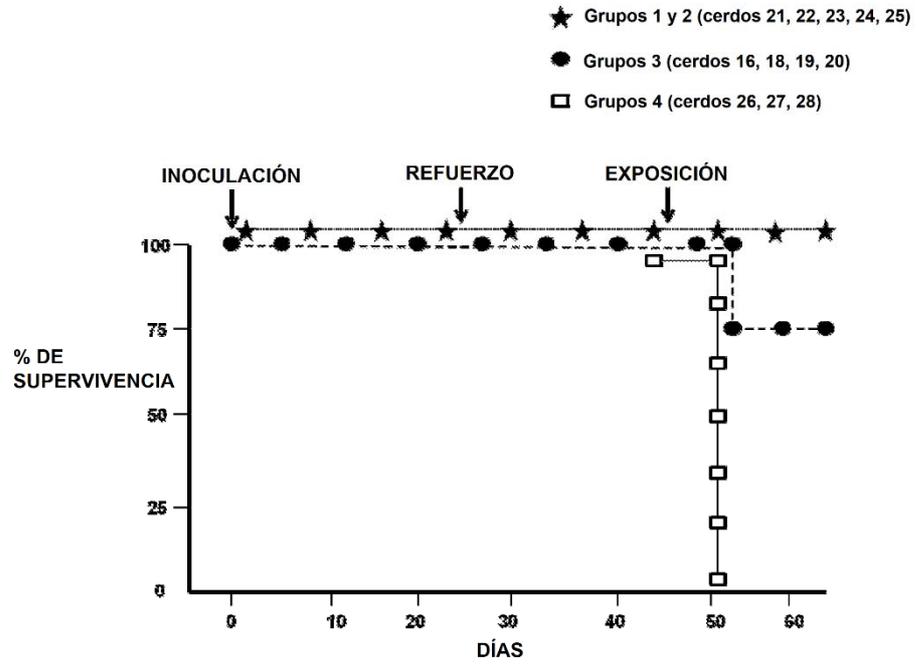


Figura 13

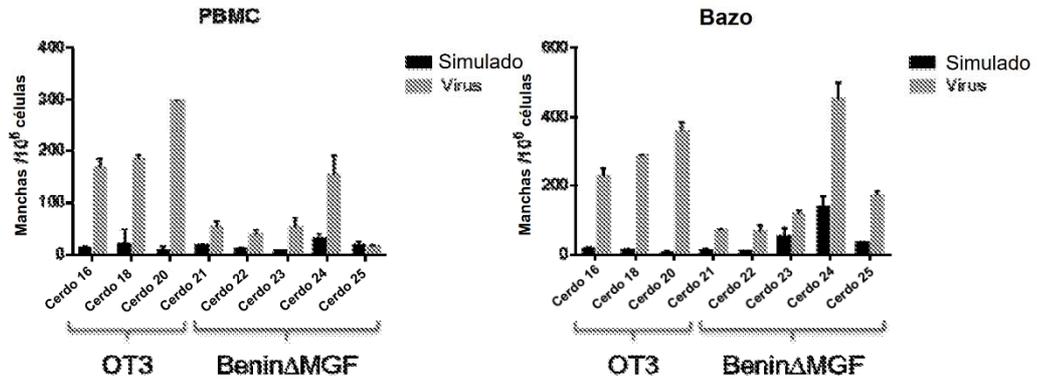


Figura 14

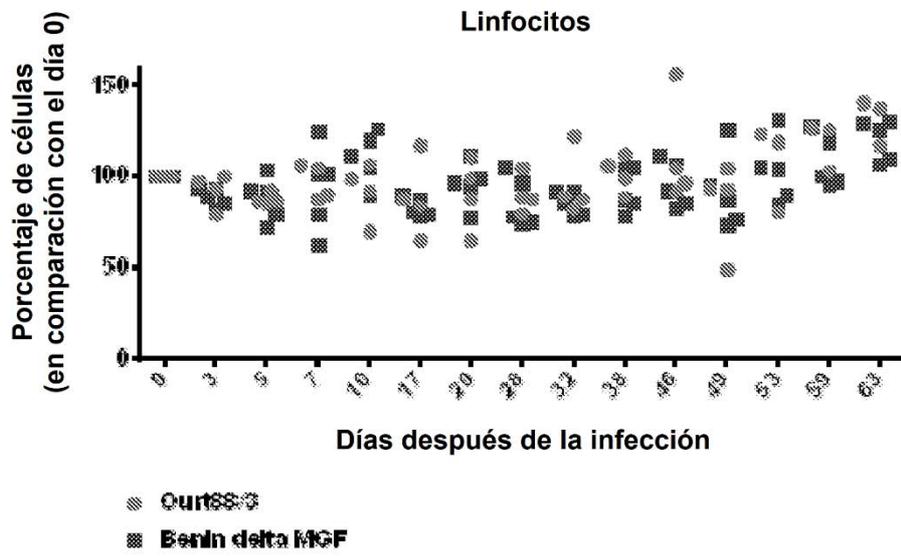


Figura 15

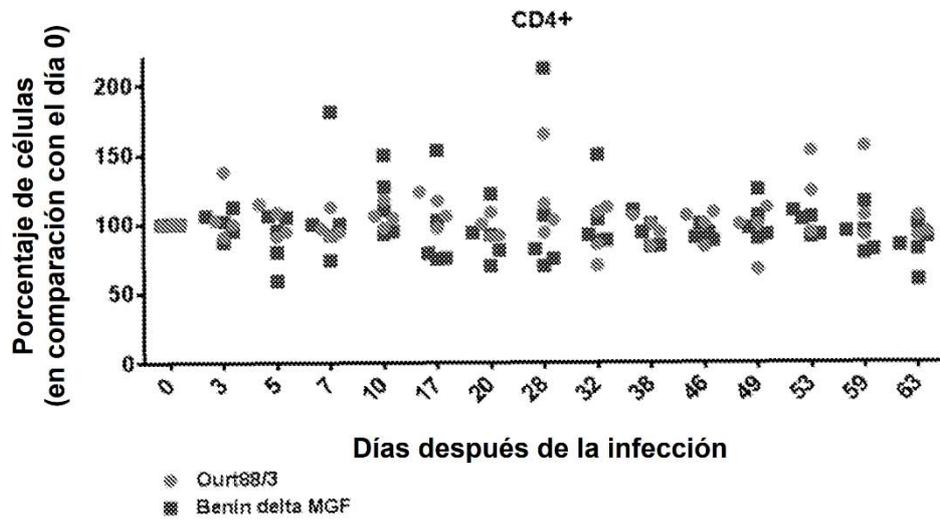


Figura 16

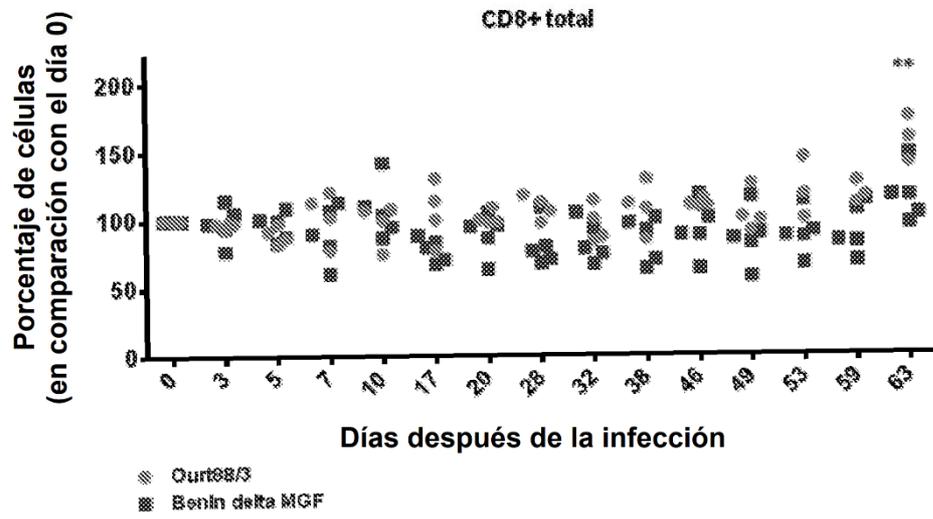


Figura 17

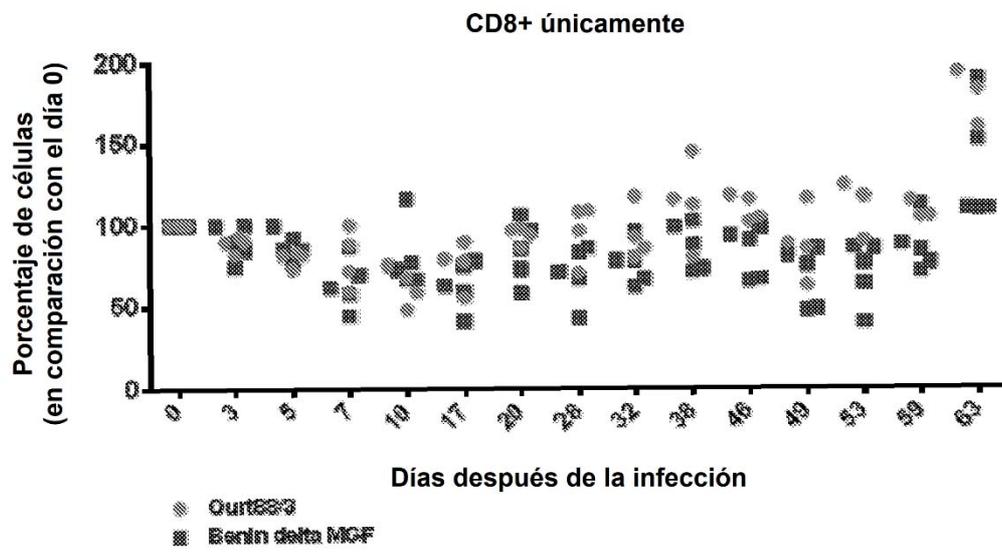


Figura 18

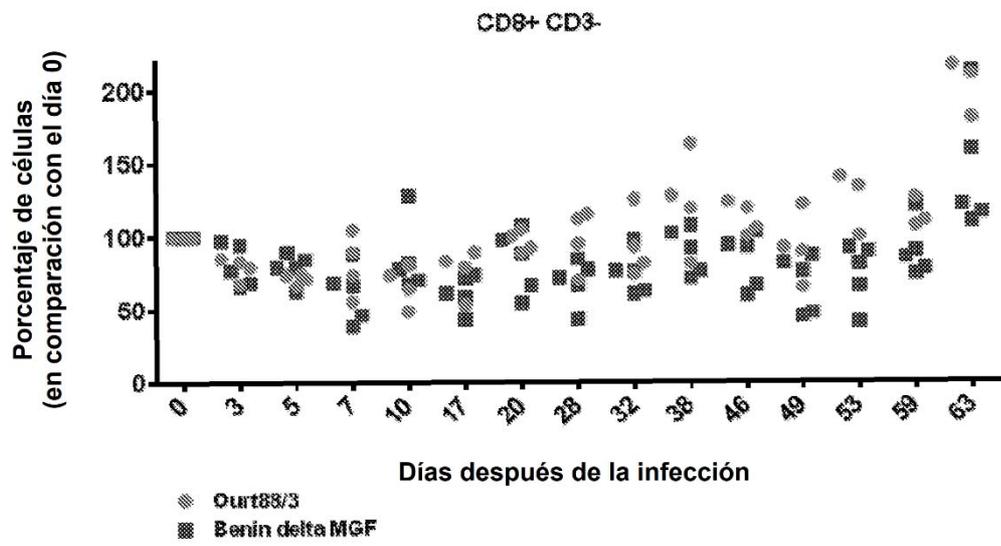


Figura 19

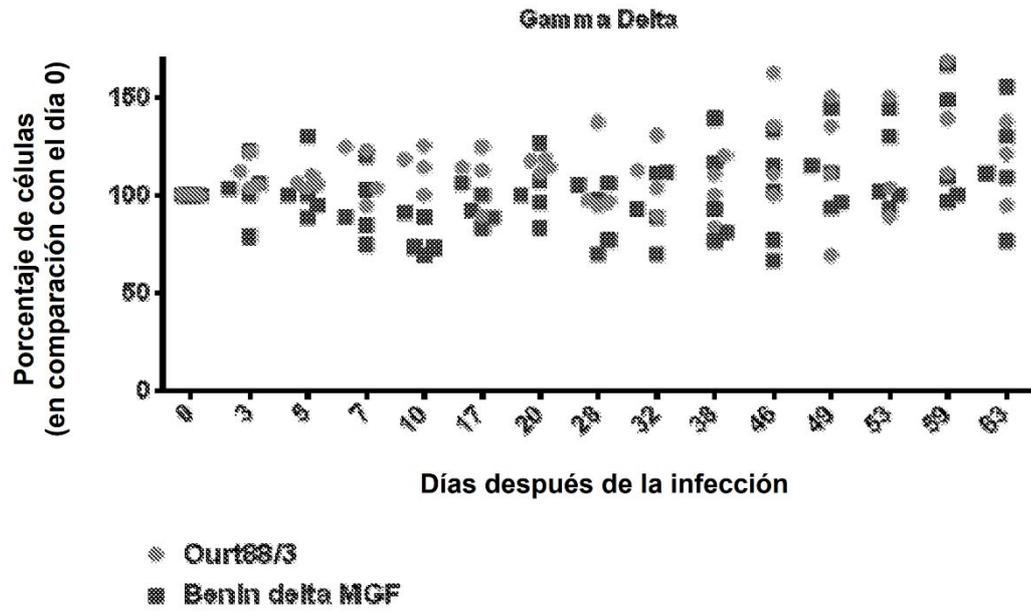


Figura 20

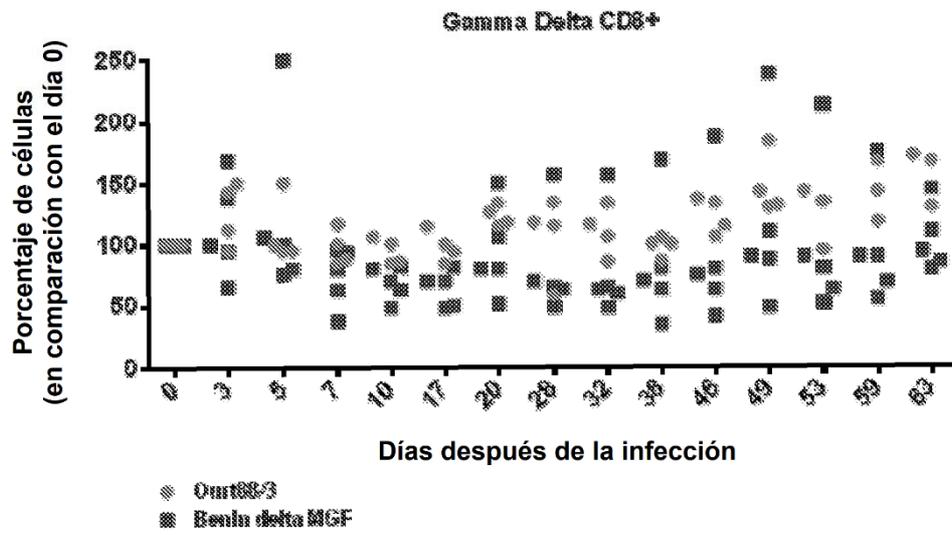
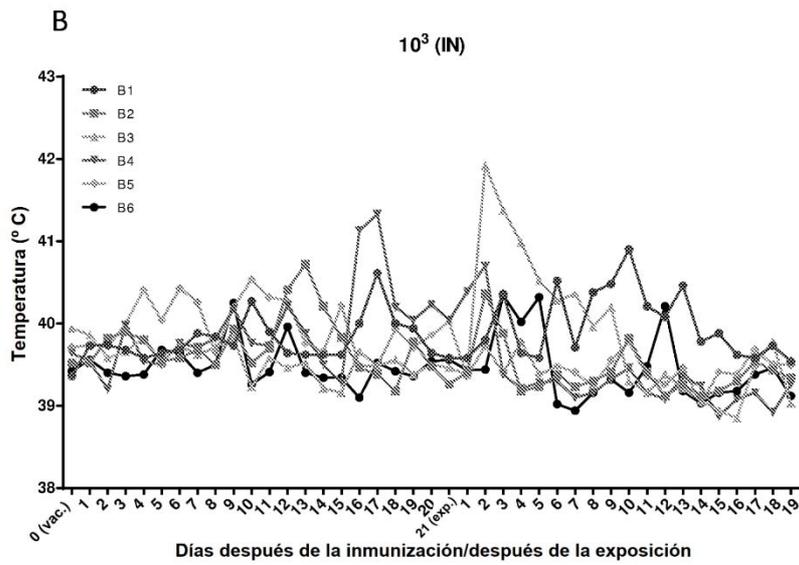
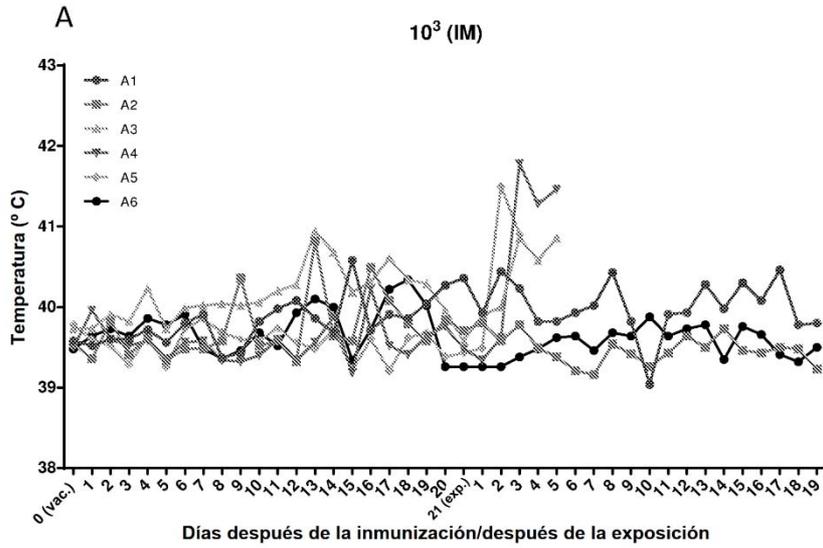
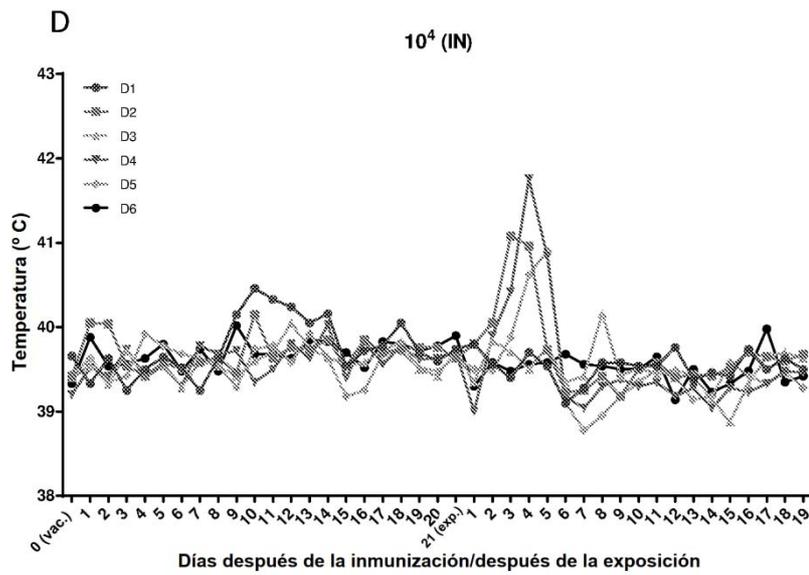
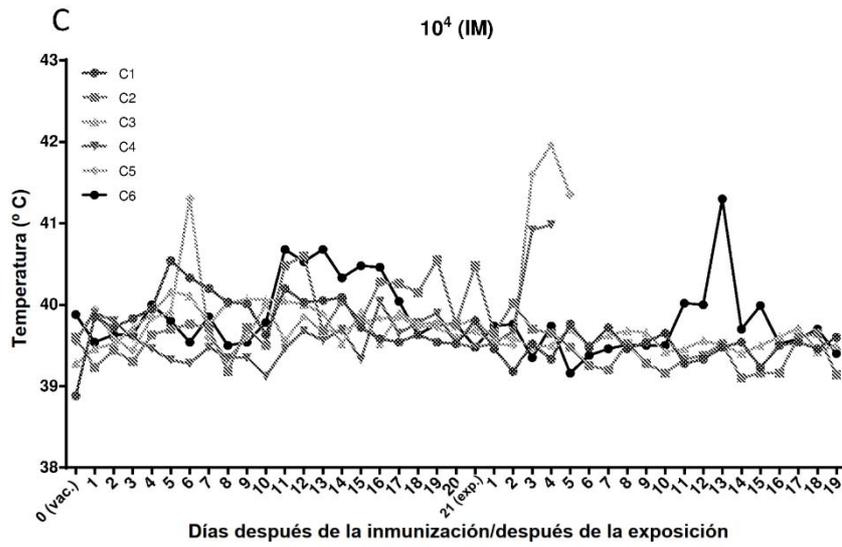
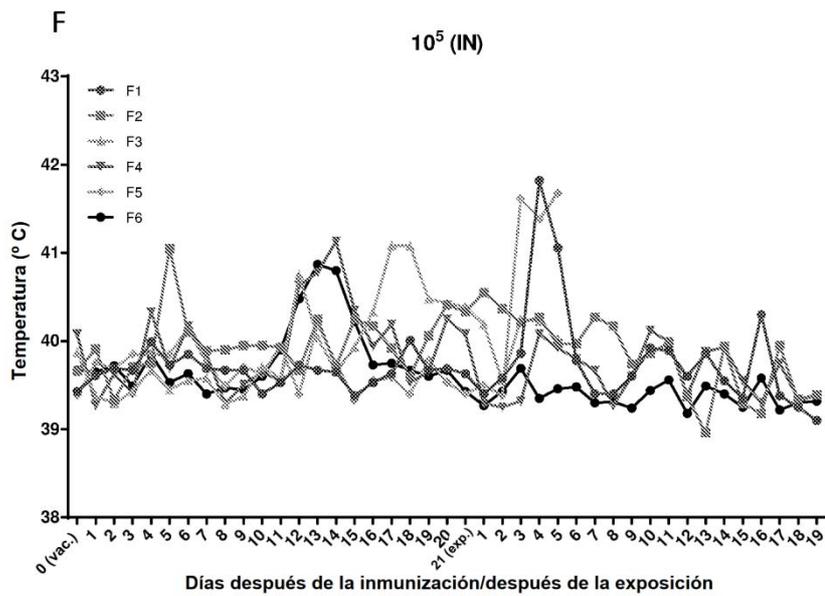
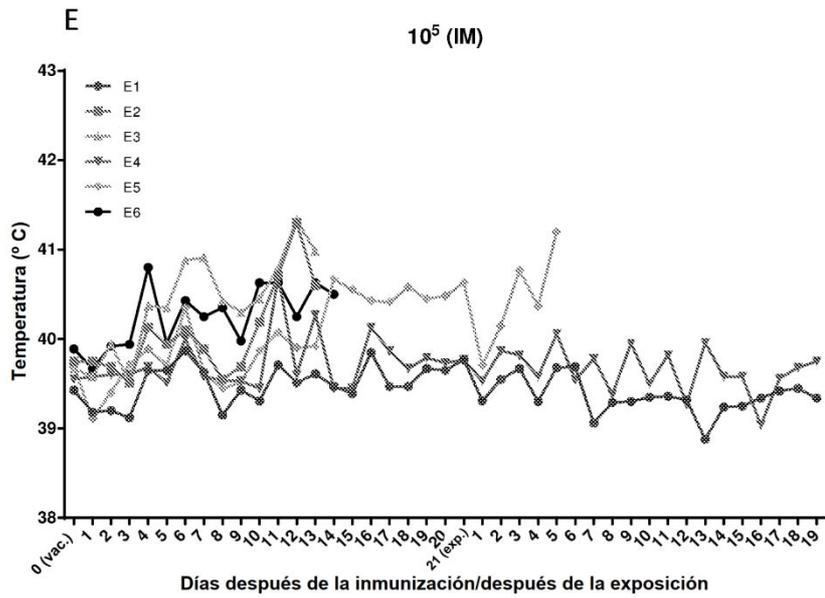


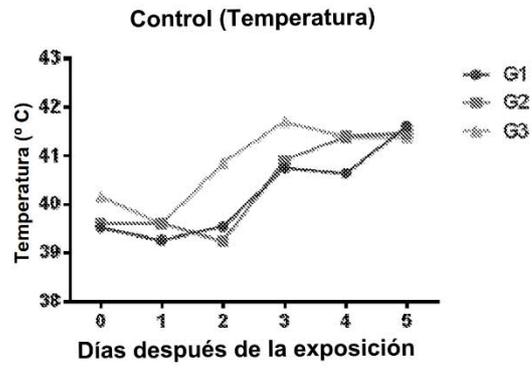
Figura 21







G



H

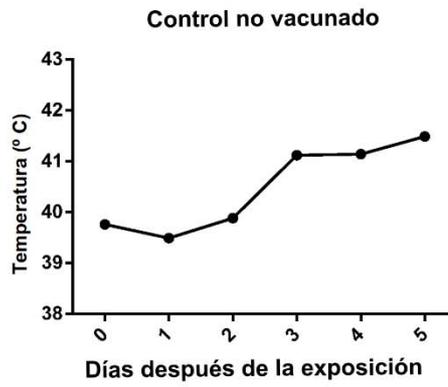
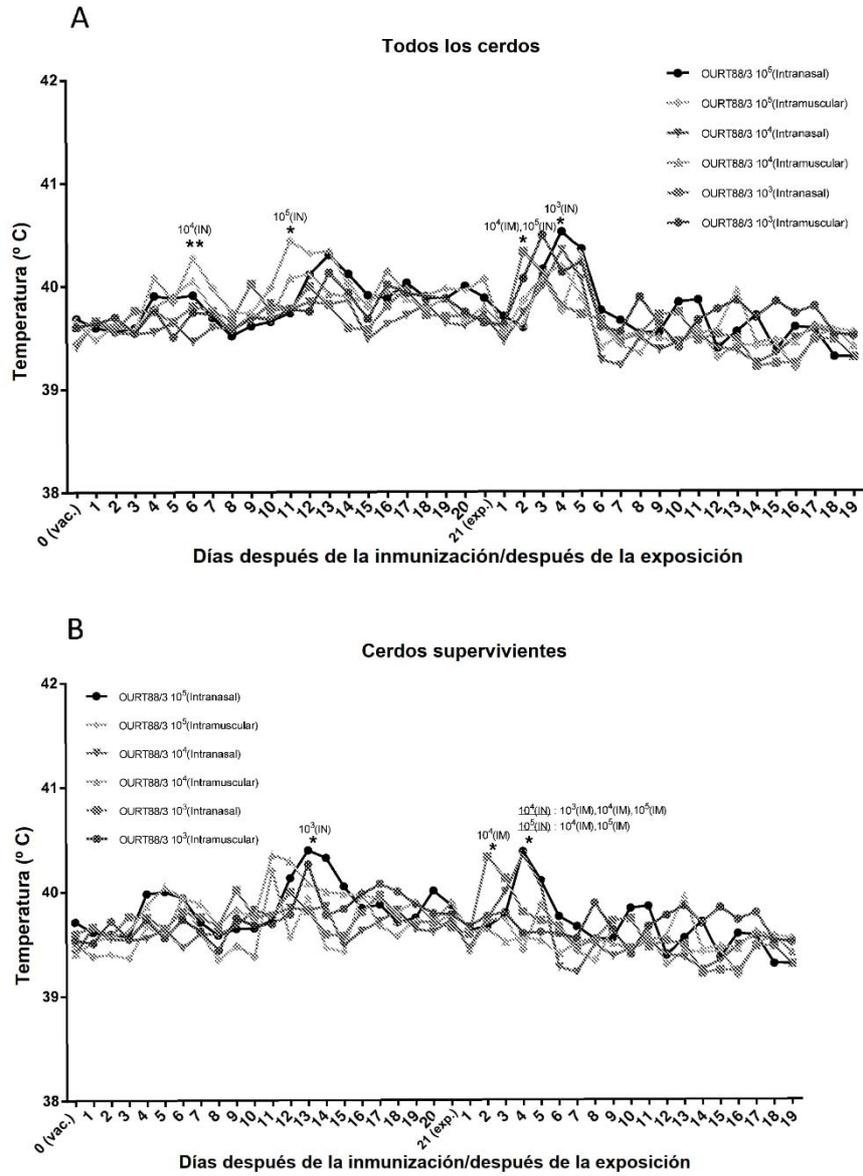


Figura 22



C

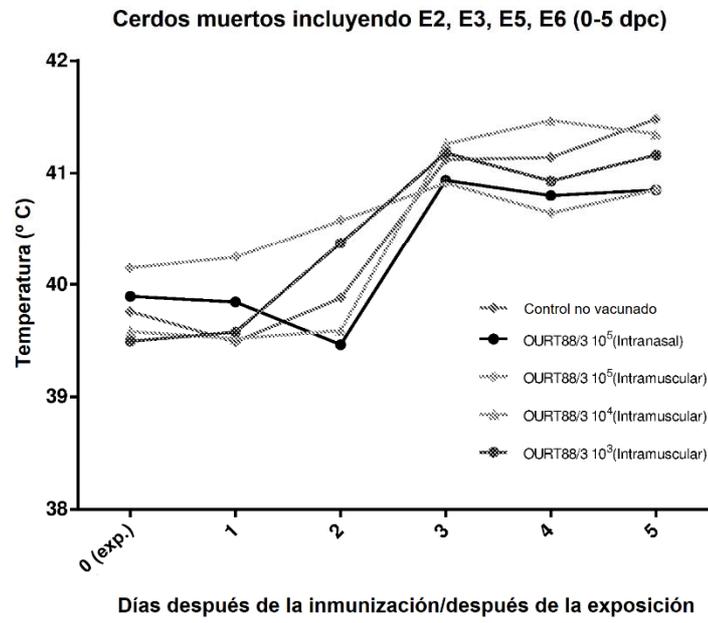
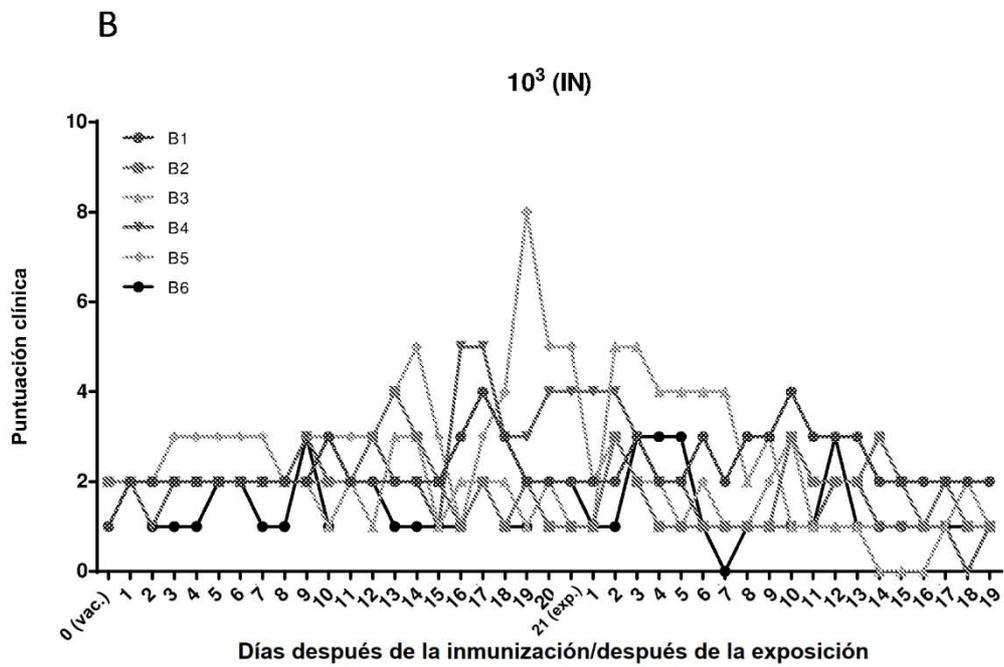
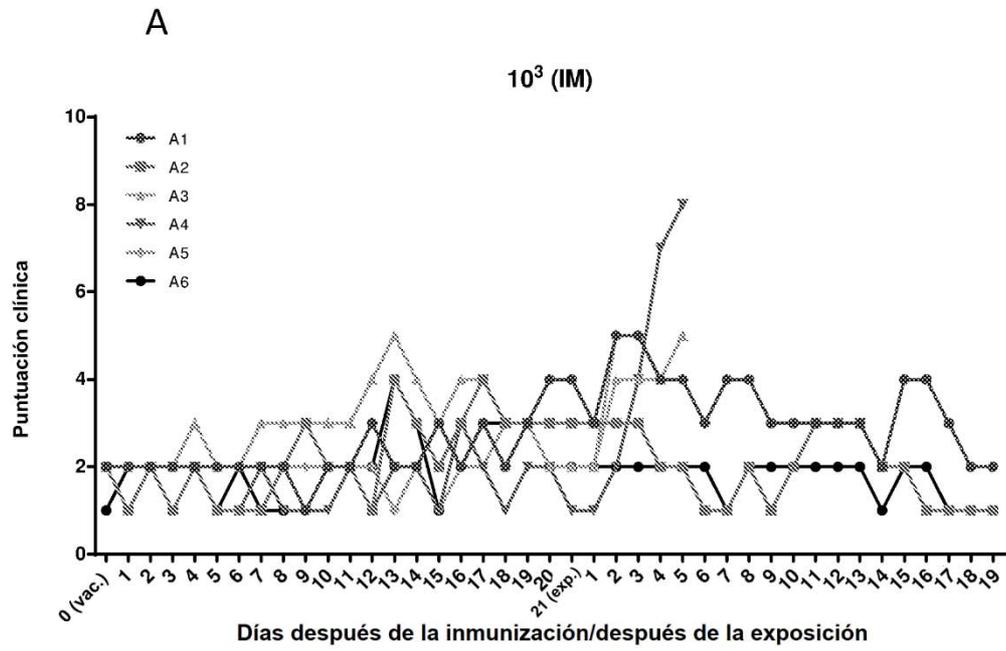
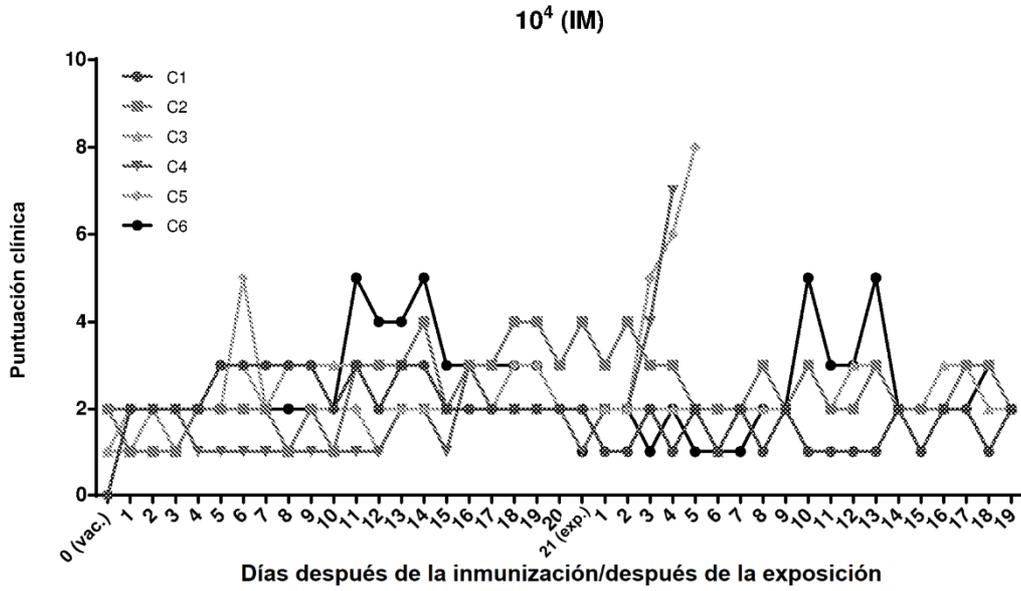


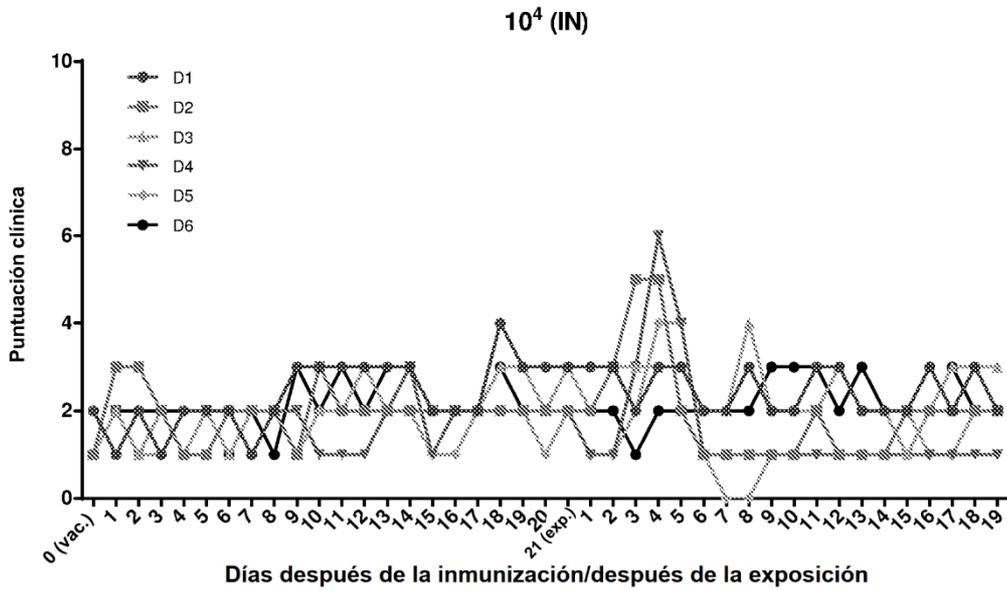
Figura 23

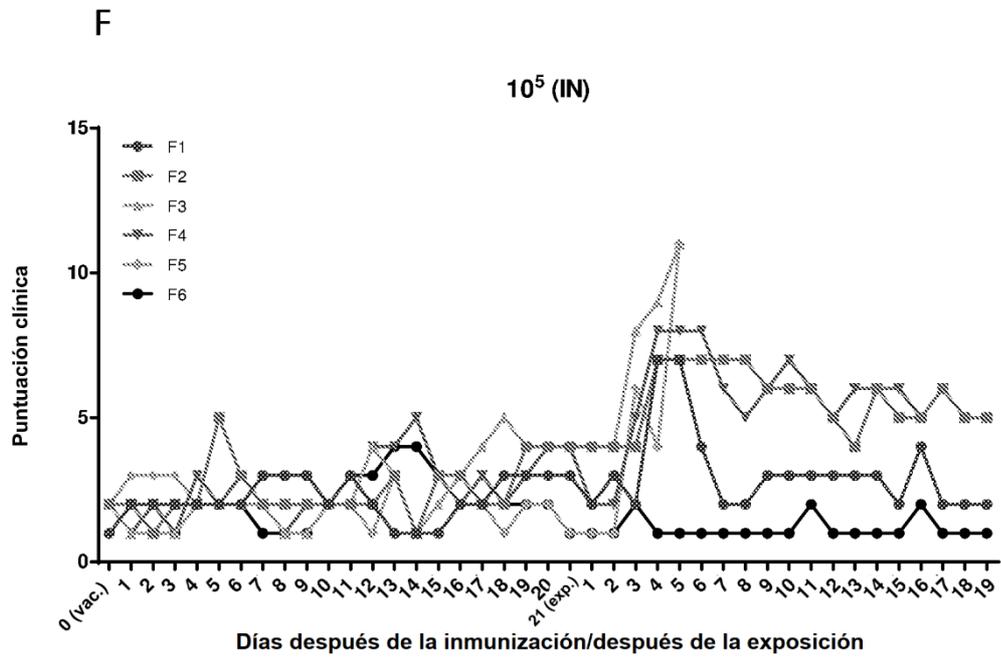
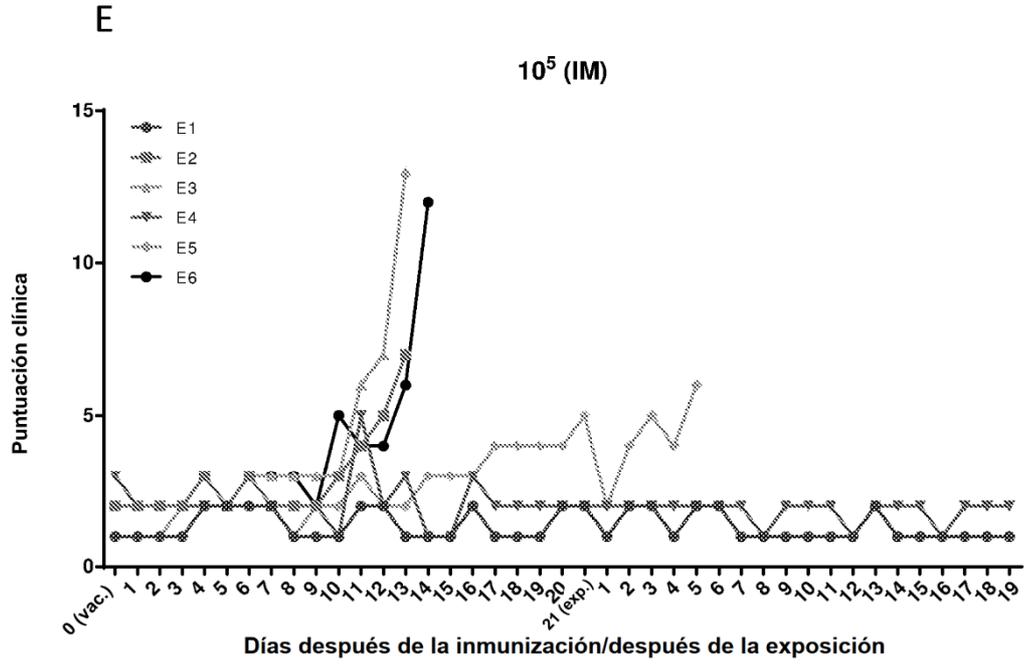


C



D





G



H

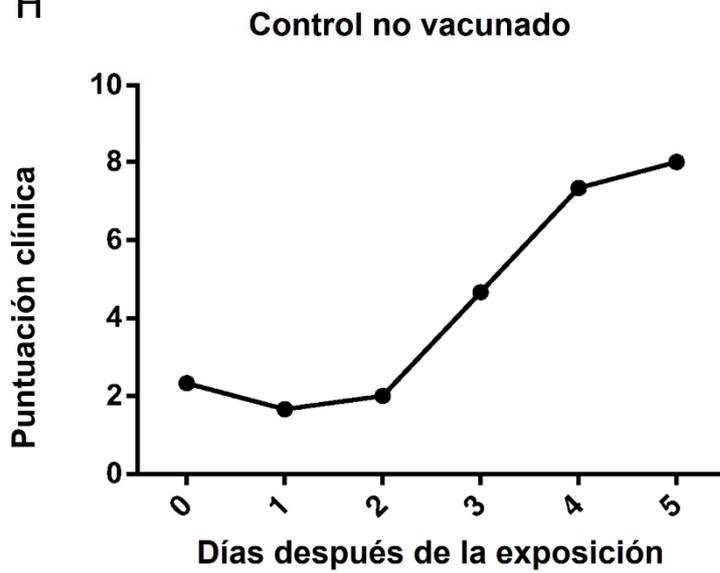
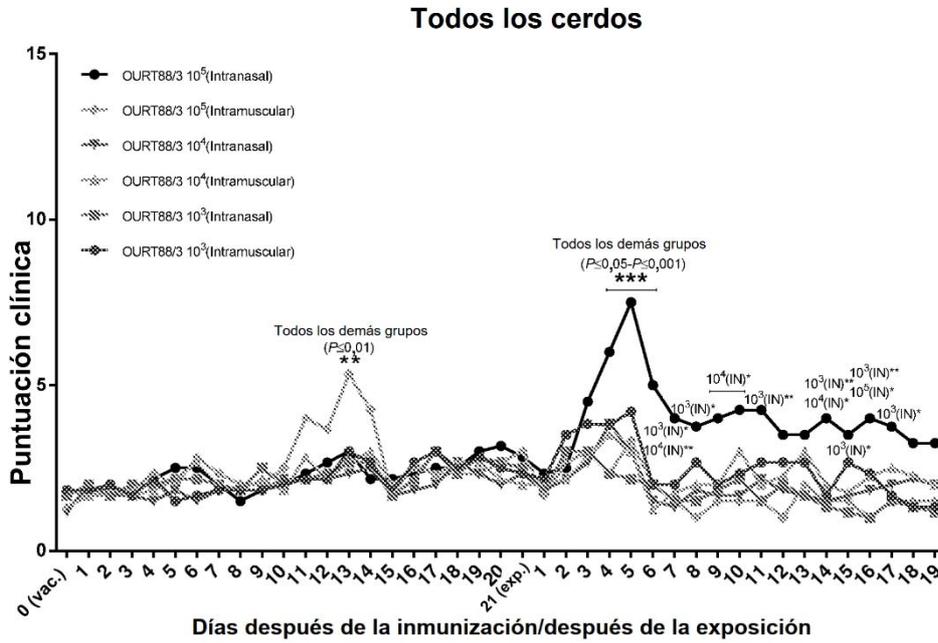
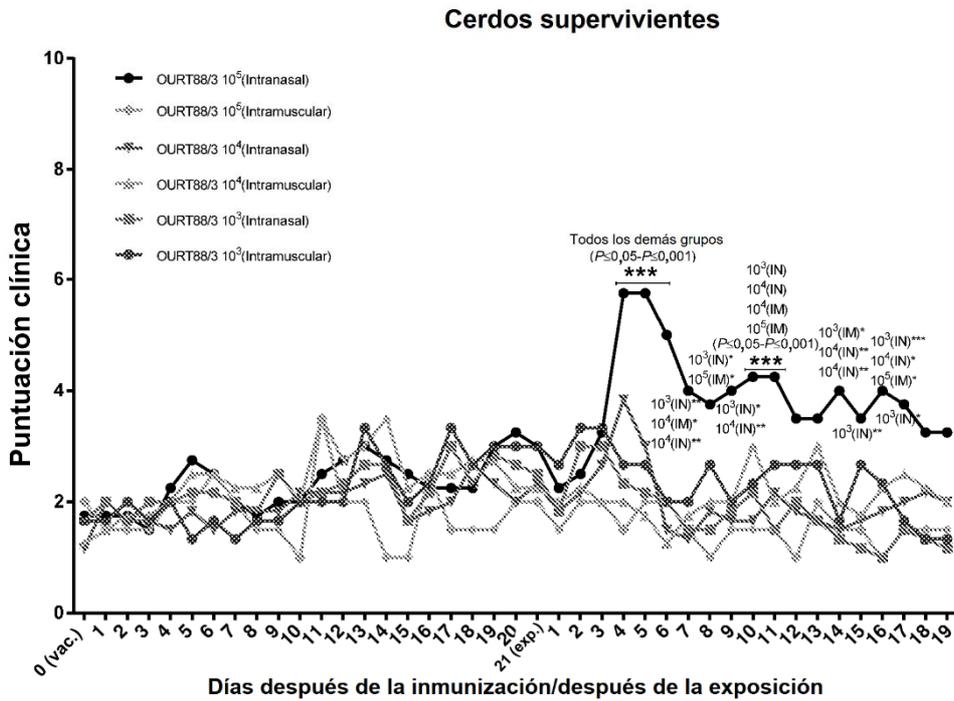


Figura 24

A



B



C

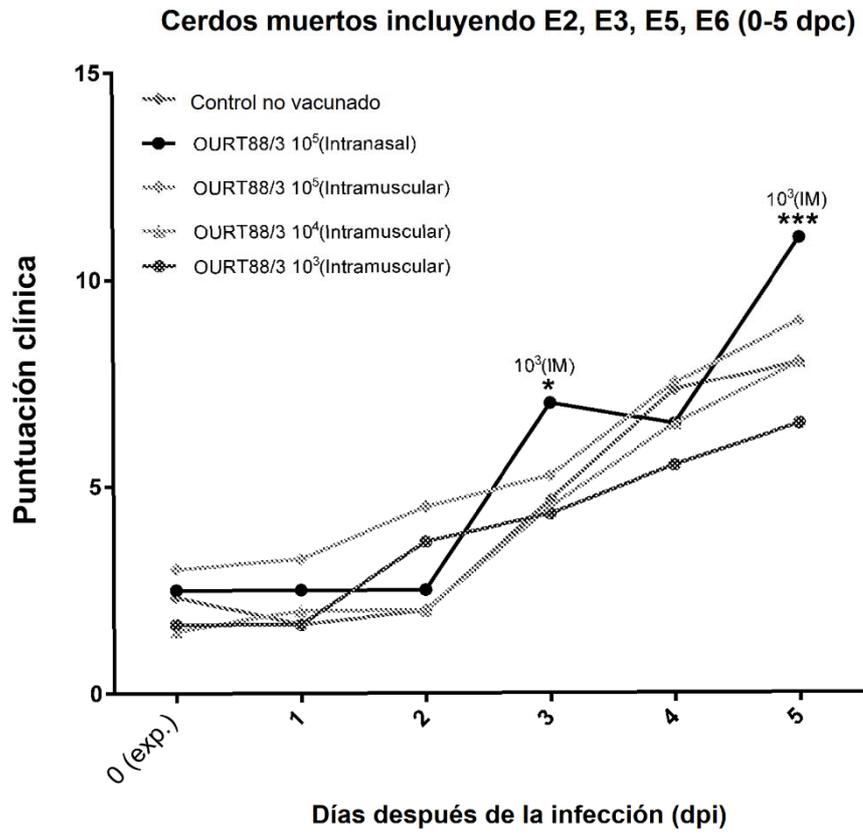
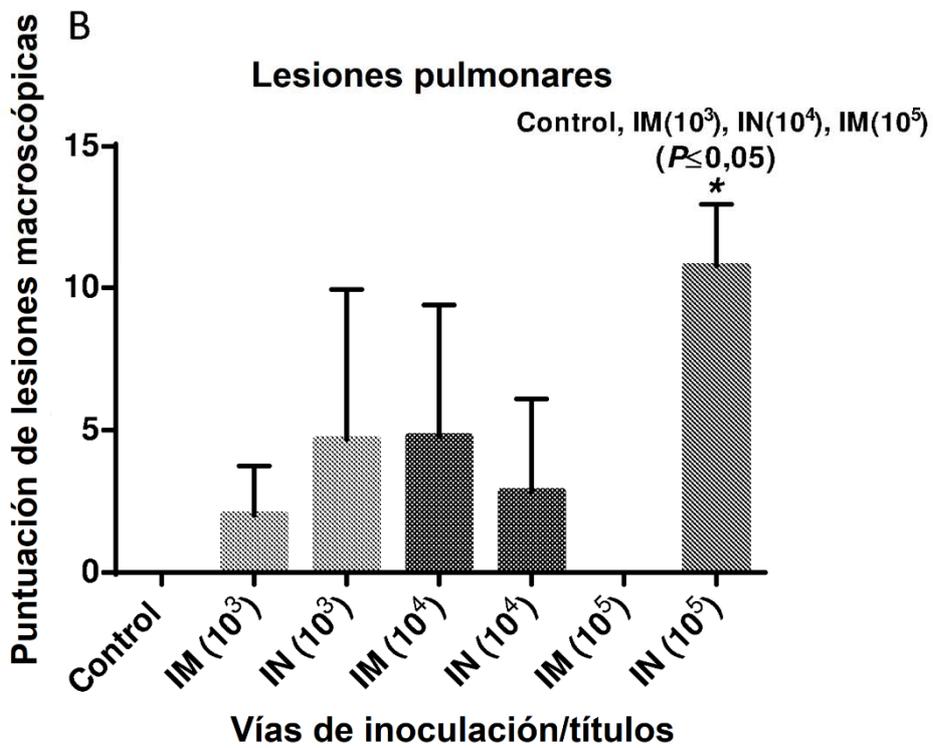
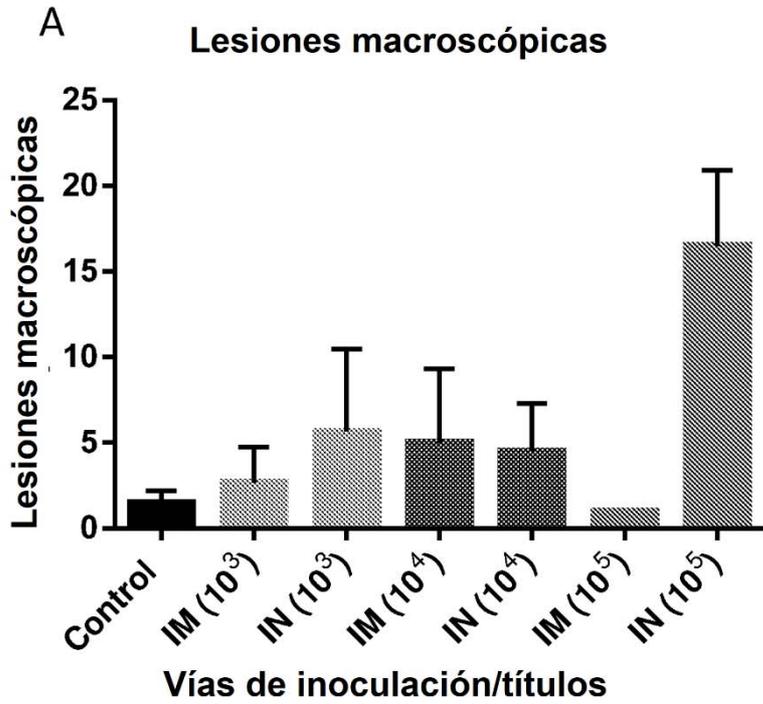


Figura 25



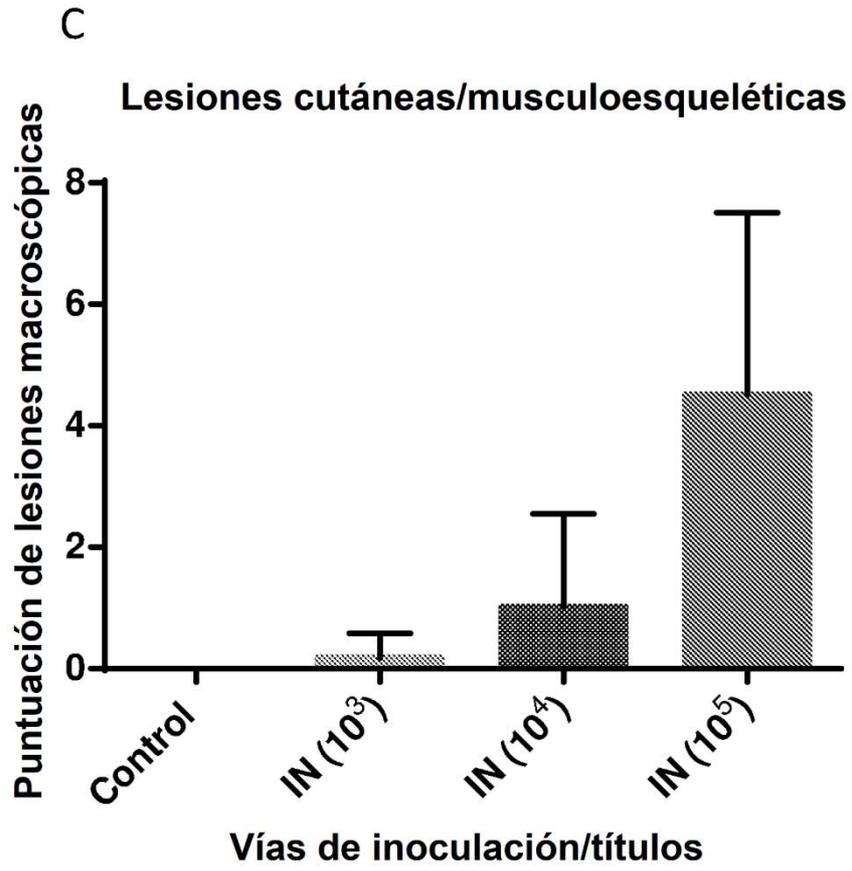
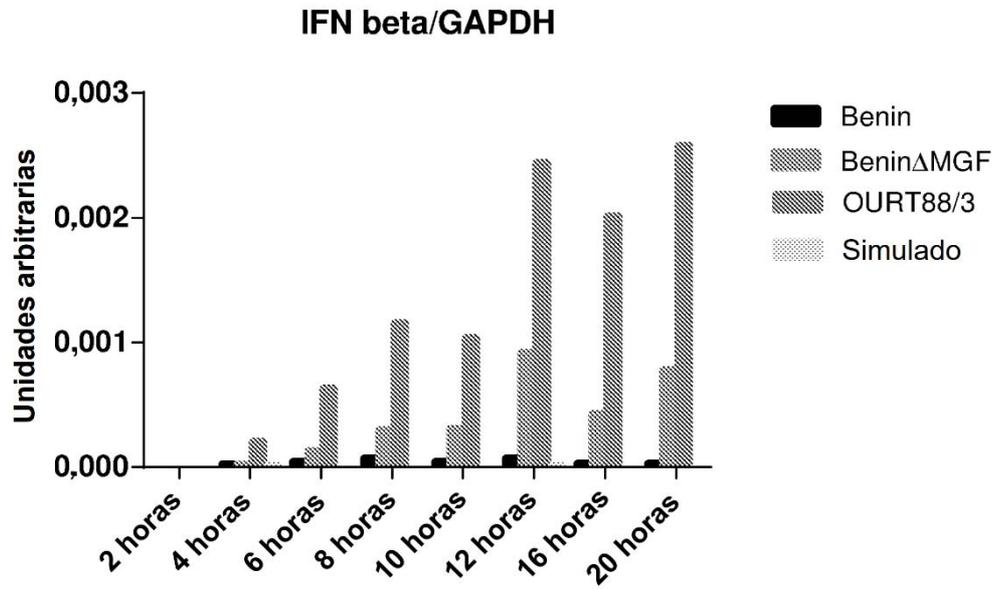


Figura 26

A



B

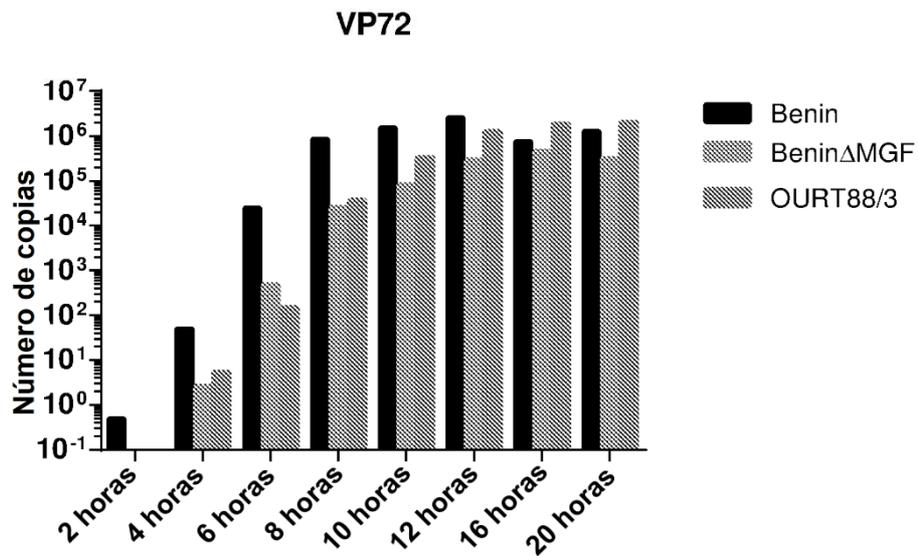


Figura 27

AAATGAATAGATTTAATCCAAGTAGTATTAATAATTTTTAGAAAATAGTGTCTACAAAATAATGAAATGA  
 ATAGCCCAAAAAAAAAAATAGGTGTACATTAATGTAATATATTGTTAGGCTAAGTAAATTTAATATTTAAA  
 GTACTTGGAAAAATATTTTTTAACATATGCTGTCTAGGAATTTTTTAGACATTTAAAACCATATAGTT  
 ACTTTAATTATTACACTTAACTTGAAGAATATTGCTTAAAATATTAATAGATGAAGTAATATTGTG  
 TAATTGAGTCCATAACATGGGTGGGAAACAAAAATCTCGTAATATGAAAAATAAACATCCTAAAAAGAG  
 TGCAATTTGTTATAAGTTTATGTAACTTTATTTTAAAGTAAGAAATATAAAAAATATGAGTACAAGAGGAAT  
 AGGGGCCATTACTAATATTGGCTCCAA**CA**TCTGTTGTCTACAAAAAAAATATTTTTTTGGCAAAAA  
 AAATCCATGGAAGGATATTAATACACATAATTGTTTGACATCATATTGGTATACTTACCAATAGTAAT  
 ATACAACCATCCTAATATTCACTTTATGAAAAGACCCCCCCCCACCCTATACAGTAAAAATAGTATAGG  
 TTTAAATAAGAAAAAGAATATGAGTTTAAATTTGTAAGTCCGTCATG**ATG**CAAAAATAAAAATCC  
 CAAATTTAAACCTTTCTTTTTTTTCTATACAGGAGTTAGAAATAGTATGGCAACCGCTGCAGGGC  
 ACCCGCAGCGGCTCCGGGTCTTACCCTCAGCAGCGGCGGTTGCCCTCTTTCGAGCCAATACAAAGG  
 AGCTAGAGGACTTCTTACGCTCAGATGGGCAATCTGAGGAGATACTGCTGGCCCCCTCTTTAACCGTC  
 TACAGAACCCTCATGCCCTCTTGATAATTTAACCGGATACACCTATTTCCGTCAGAAATCCCAAGGCAG  
 CTCAGTTGGCGGCTTGAGGTCAAGATGCTTGAACGGTTATACGATGCTAAATATTACAATATATTGT  
 CTCGGCTCCGACCAAAAAAGTCCGCAACAAGGCTATGAGCTTACTGGGTTTTCCGAGCTATCCATA  
 TTTCTCATGCTCTTACTTTAGTATAGATTTGACGATATGAGGAACCGGACTTTGCTGAACCTGGCTTTA  
 TTTGTGCTGCTTACTTTGGTGAACCICAGGTAATGTAATTTGCTCTACAAAATATATGCTCTGACCCGG  
 CAGTCTTACGGATGCCATCCAGATAAGTCTTGAGAGCAACAACCAGGTAGGGATTTGCTATGCTTAC  
 TGAAGGAGGAGGCTCAAGGGACTAGTCTCGCCCTTCTGGCAAGCTCTGGCGCCAAACATCCG  
 CGCAGCGCAAAAAGAAGGACGTTCTTTCACCCACCGACTTCT**TTACT**GTCTGCTCCAG**TAG**CTTTTTTTGC  
 CGCAGGAGCACCGTGGATAGGAGCTCTCCAGCTCGCGATCCGGCGCTGGAAGCGGAACCGATCGACC  
 GCCACCTGCTCCAGGGACCCCTTGGCTCGATGTCGTCGGCTTCCCATACCTCGACGGCTGCAGCAAAG  
 CGGACGTGCTTCGTGTCAATTCGTCCGTTTTTTGGCGCCGCGCCCCCC**CCAT**TATTCCTGTAAGATTA  
 GTGTTAATACCTATAATAACATAATTTAAGATTTAATATACCAAACTTAAACTATTTTTGTATAGT  
 AACTATTAGCATGCTACACATGATTTGTTTTTCAAAGAGAAACCAGTTGATATGAACGATATCTGA  
 GAAATCATCTGTGTTGATAATGCACCCGAGAAACCAGCTGGAGCGAATCATATACCTGAGAAGTCGGC  
 CCGCAAAATGACATCATCAGAATGGATTGCTGAATATTGAAAGGTATAAAACGTGGAATGACGTGCC  
 ATGTTGTTGTCCAAGAAAAATGACCAGTGCAGACAAAAAGTTTTTCACTATTGGTAAGGGATCCCTAAT  
 ACGCTCCATCCAGAAGAATAATTAATAAAAAATATTTTTTTGGTAAGTTTATAAATATATAGTTAAT  
 ATGGTAAAAAAAATCACATAATAATTAACCTGAACGTTAGAAATTAATATTTTTTTATAATCGGATAT  
 AATATCCATTAATCAATAAA

Flanco izquierdo - 529 pb Flanco derecho - 740 pb

**CEBADORES PARA CLONACIÓN**

360-18RflancoI-directo-Benin: GCTATCC**AAGCTT**CTACAAAATAATGAAATGAATAGCCC  
 360-18RflancoI-inverso-Benin2: GCTATCC**GGTACC**CATAAAGTGAATATTAGGATGGTTG  
 360-18RflancoD-directo: GCTATCC**CGGCGCGC**CGACTTCTTACTGCTGCTCCAG  
 360-18RflancoD-inverso: GCTATCC**TCTAGA**TCTTCTGGATGGAGCGTATTAGG

**CEBADORES PARA CRIBADO**

18R-Benin-Par1-directo:: GAGTACAAGAGGAATAGGGGCC  
 18R-OURT-Par1-inverso: GCATGACAAAATATGGATAGCTCG  
 Par 1: 715 pb  
 18R-OURT-Par2-directo: **GTCCGCAACAAGGCTATTGAG**  
 18R-OURT-Par2-inverso: GACGTTTACGCAGTGGGGC  
 Par 2: 307 pb  
 18R-OURT-Par3-directo: **CAACCAGGTAGGGATTGCTATGC**  
 18R-OURT-Par3-inverso: GCTGCAGCCGTCGAGG  
 Par 3: 301 pb

Figura 28

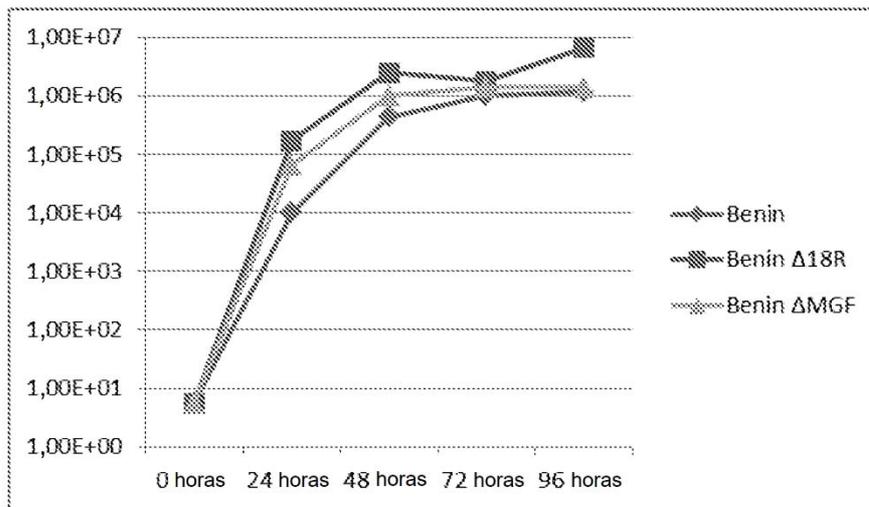
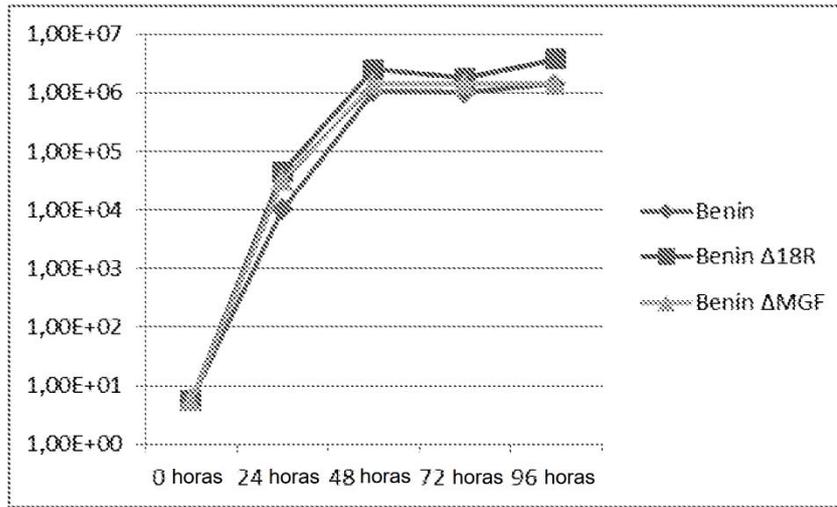
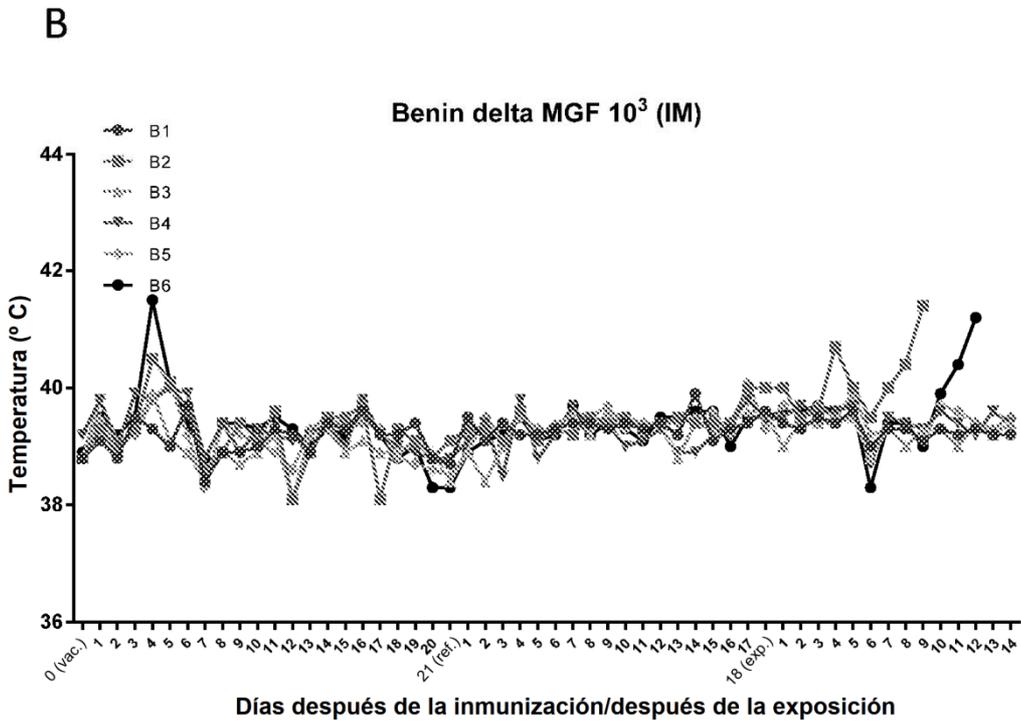
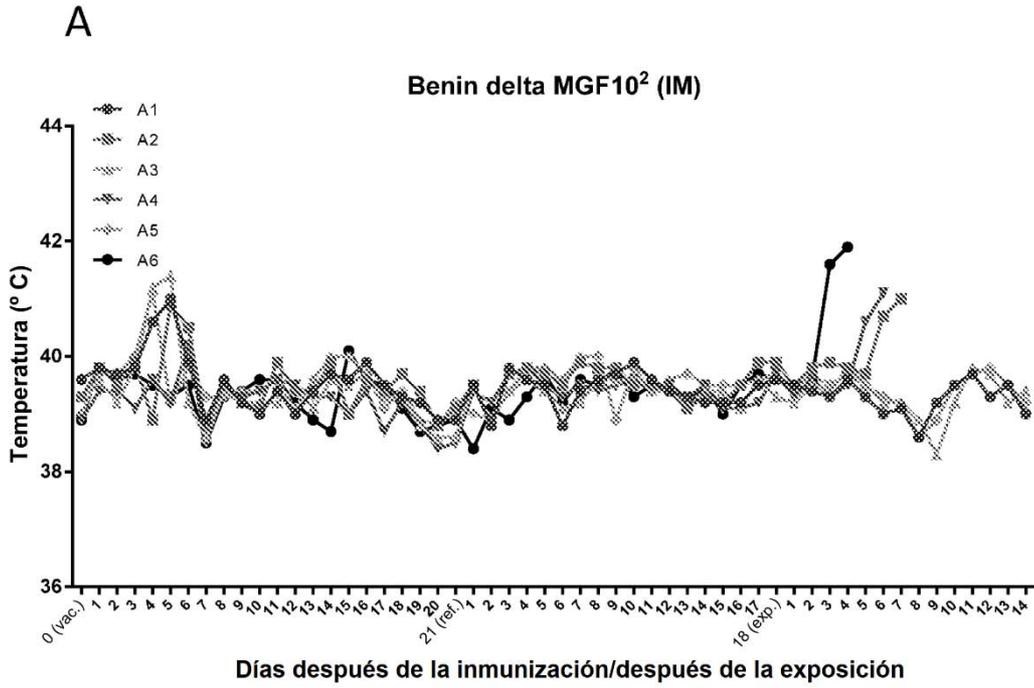
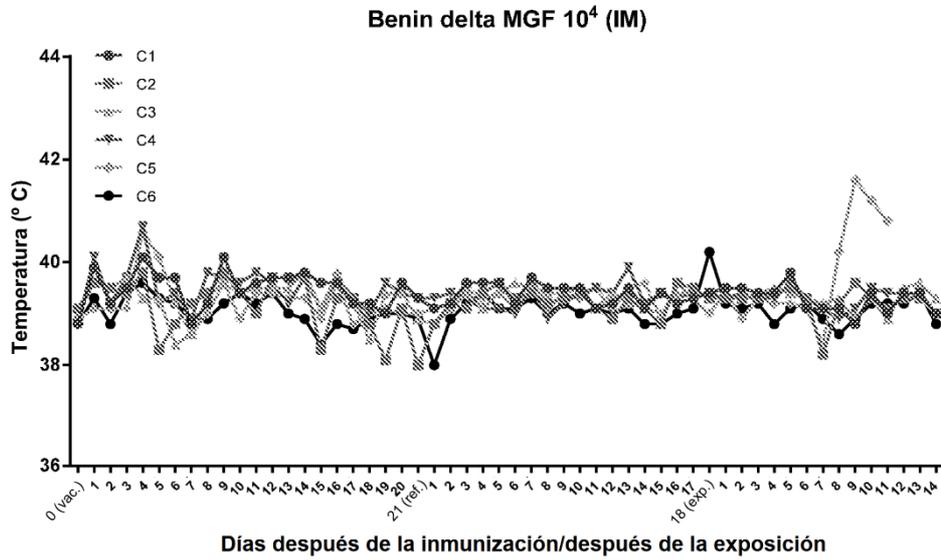


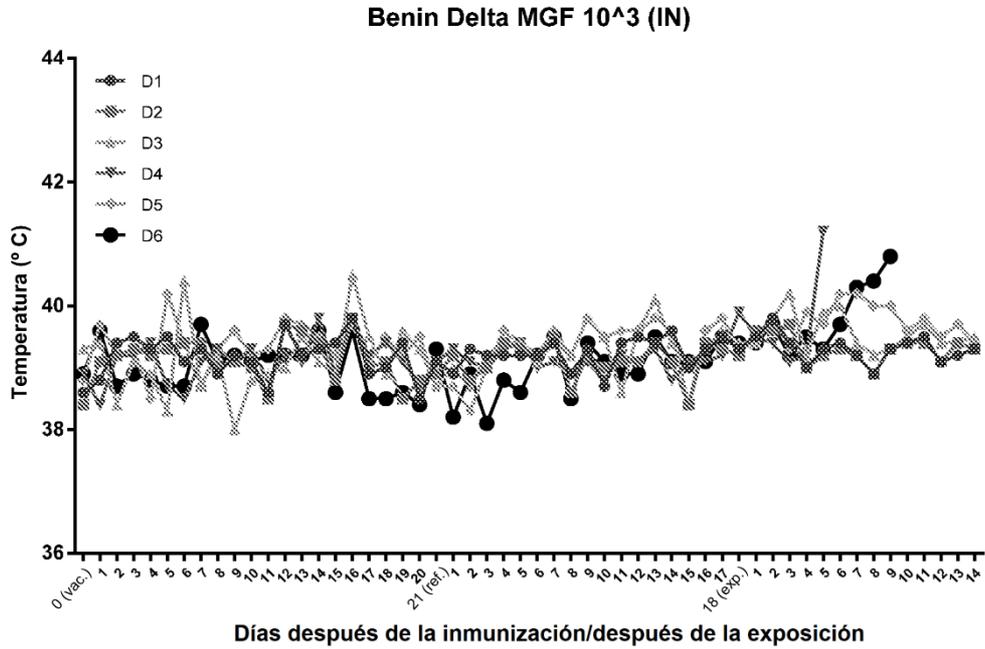
Figura 29



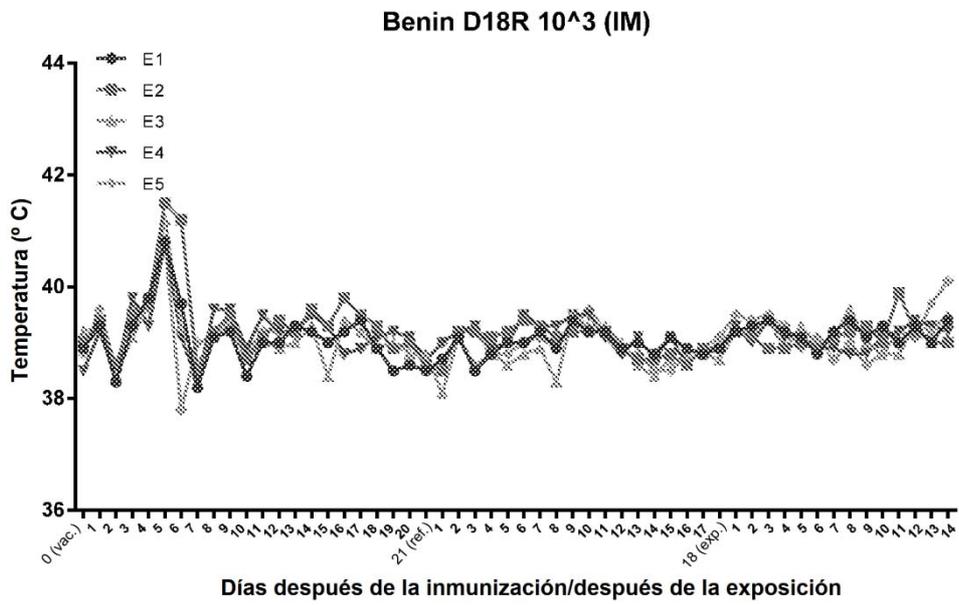
C



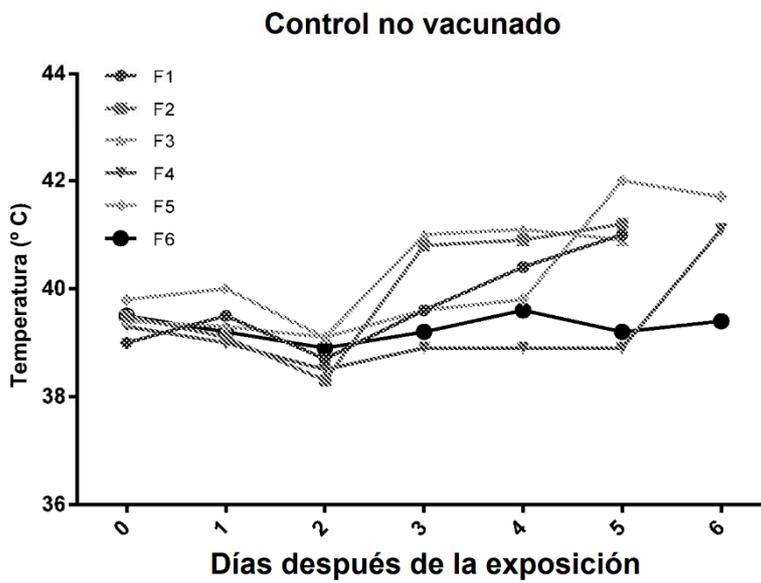
D



E

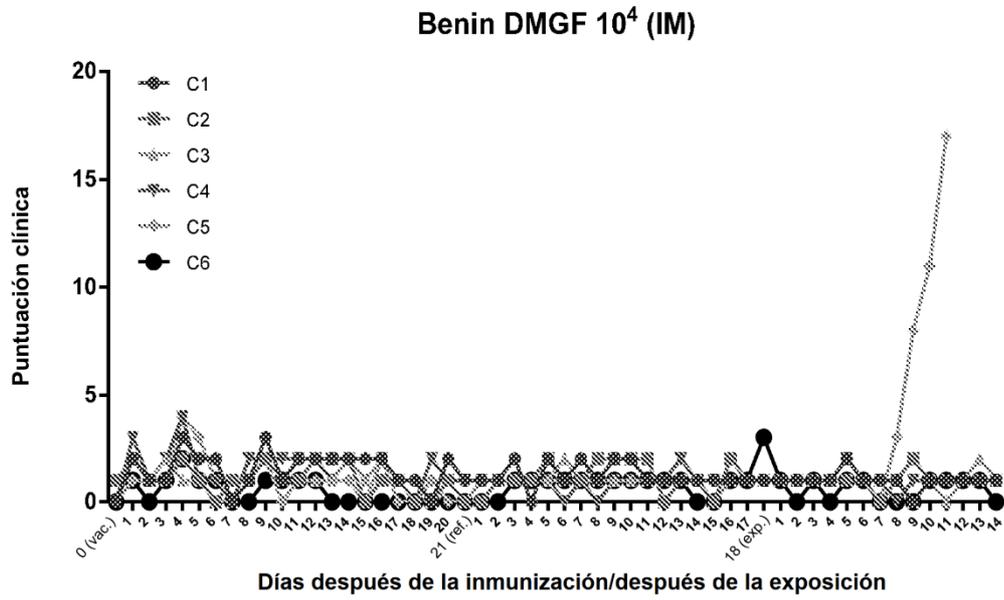


F

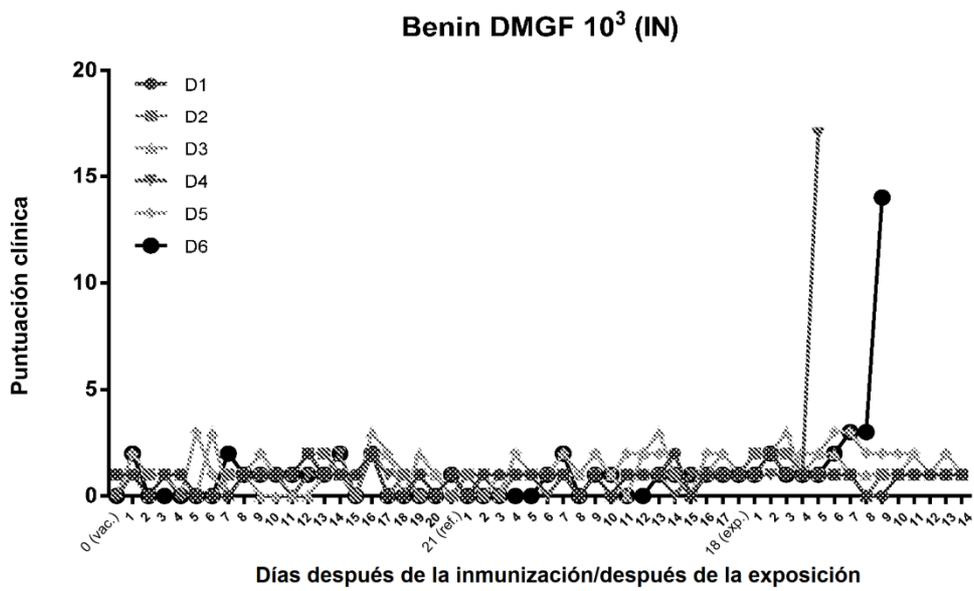




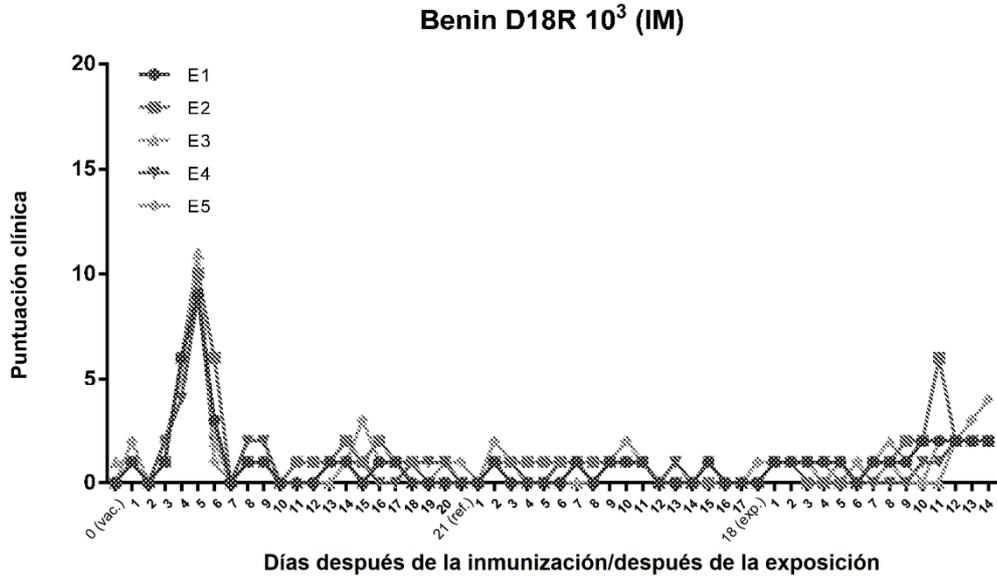
C



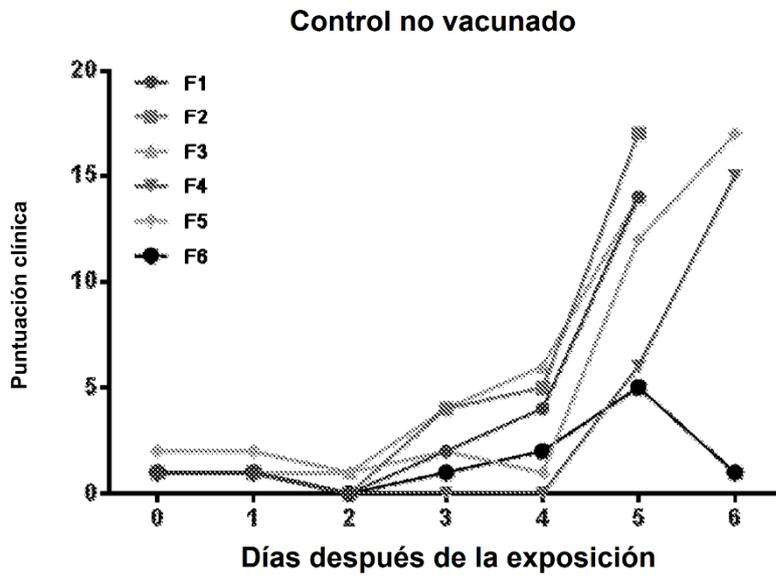
D



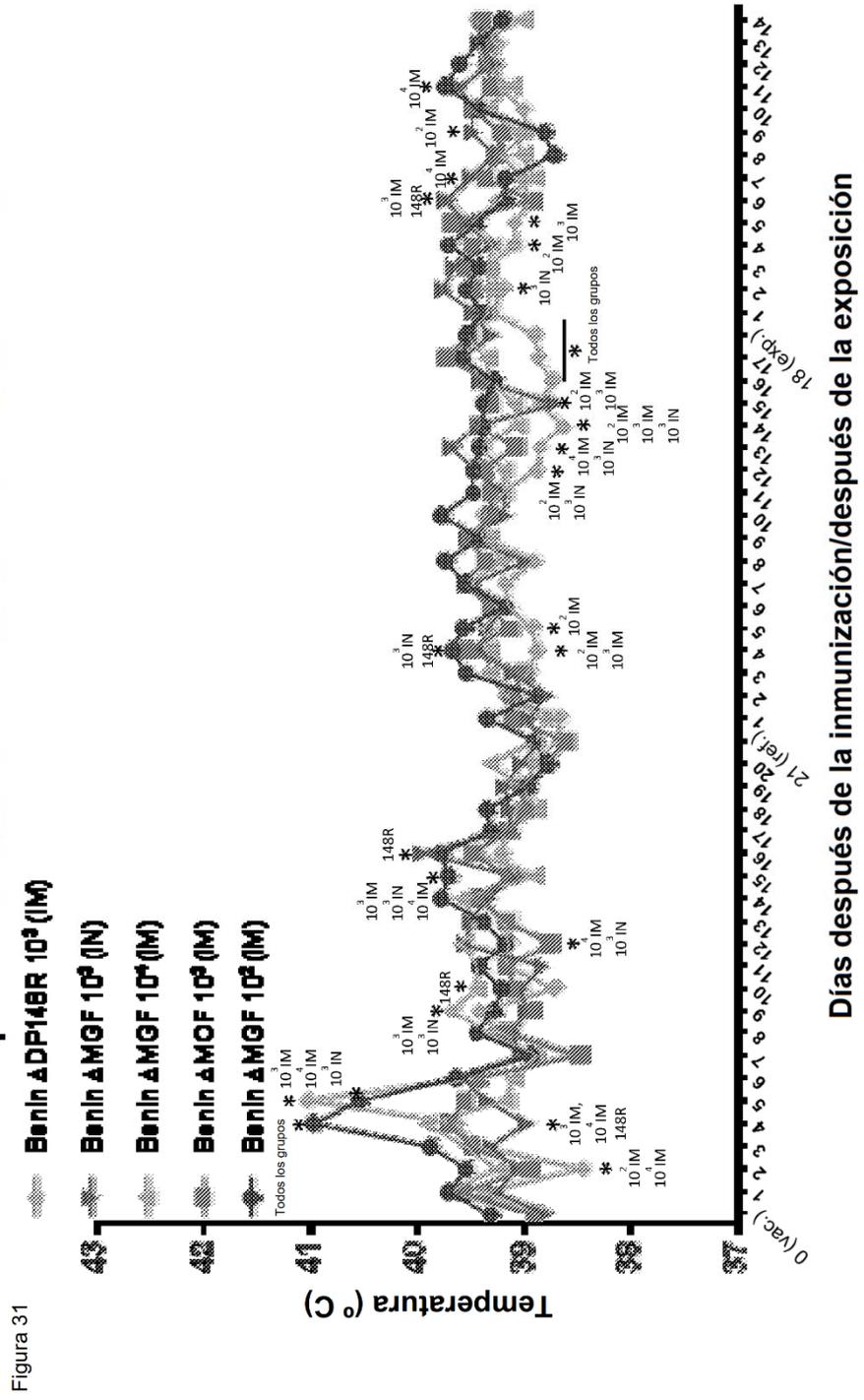
E



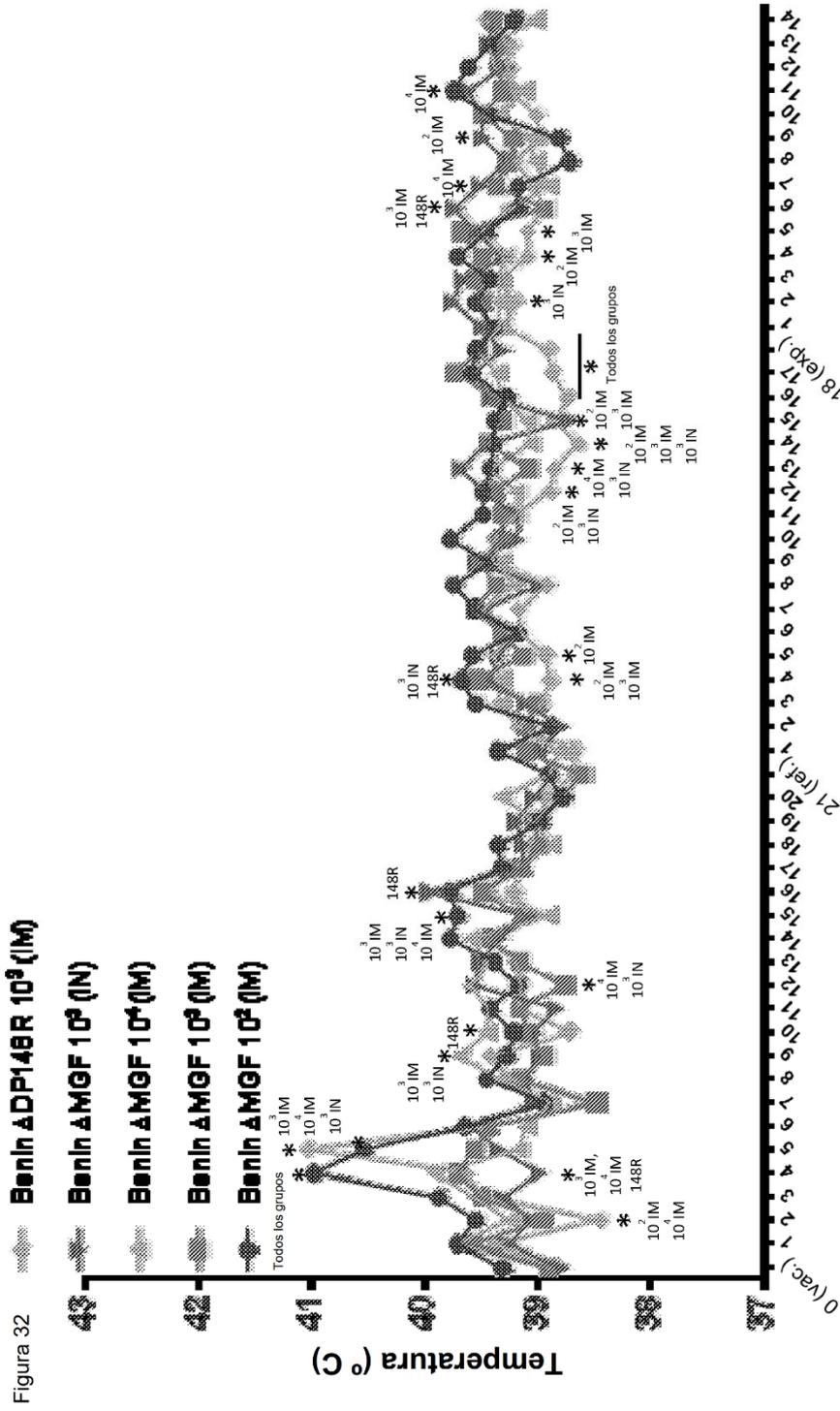
F



### Cerdos supervivientes Benin Delta MGF/Delta DP148R



### Cerdos supervivientes Benin Delta MGF/Delta DP148R



Días después de la inmunización/después de la exposición