

VACUNA CONTRA EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA

CAMPO

La invención se refiere al campo de los virus, más concretamente al campo del virus de la peste porcina africana (ASFV). La invención se refiere a métodos para la generación de una vacuna que protege contra la infección con el virus de la peste porcina africana y al uso de dicha vacuna para prevenir o mejorar la infección y/o la propagación del virus de la peste porcina africana en los cerdos.

ANTECEDENTES

La peste porcina africana (ASFV) es una enfermedad viral a la que solo son susceptibles los cerdos y los jabalíes. Después de la infección inicial, los síntomas pueden tardar de dos a diez días en aparecer. Dependiendo de la patogenicidad del virus, mueren del 30 % al 100 % de los animales infectados. Los síntomas comunes incluyen: pérdida de apetito, debilidad, piel enrojecida, membranas mucosas oculares inflamadas, vómitos, diarrea con sangre y fiebre. Además, la piel puede volverse azul, áreas de la piel pueden morir (manchas negras) y pueden producirse hemorragias. Además, la enfermedad puede provocar abortos espontáneos en cerdas gestantes. También puede darse la muerte súbita, sin ningún síntoma apreciable previo. Los síntomas de la peste porcina africana se parecen a los de la peste porcina clásica.

Los cerdos pueden sobrevivir a la fase aguda y parecer recuperados, y se convierten en portadores del virus a largo plazo (desde unos pocos meses hasta toda la vida), y así excretar el virus nuevamente e infectar a otros animales.

El virus se transmite directamente de un animal a otro e indirectamente a través de materiales contaminados como heces, carne de cerdo y otros productos porcinos, moscas y garrapatas que pican, especialmente a través de una especie de garrapata blanda, *Ornithodoros moubata*, en la que se multiplica el virus. Los desperdicios de comida o los despojos de los cerdos infectados también pueden contener peste porcina africana que contribuye a la propagación del virus. Se están realizando intentos tales como medidas internacionales y el mantenimiento de la vigilancia en las granjas de cerdos para prevenir una mayor propagación de la enfermedad. Desde 2007, ha habido varios brotes de peste porcina africana en Europa del Este, China y Rusia. La peste porcina africana se diagnosticó recientemente en una población de jabalíes en Bélgica.

La peste porcina africana es causada por un gran virus de ADN bicatenario que

pertenece a la familia Asfarviridae. El genoma del ADN muestra variaciones significativas de longitud de 160 a 210 kpb, dependiendo del aislado. El genoma abarca entre 150 y 167 marcos de lectura abiertos, especificando las 54 proteínas estructurales de la partícula de ASFV y más de 100 proteínas de infección [Dixon et al., 2013. *virus Res* 173: 3–14]. Hasta ahora se han identificado ocho serogrupos, denominados serogrupos 1-8, pero es probable que existan más. La complejidad y variabilidad del virus ha complicado la generación de una vacuna que proteja contra las infecciones con ASF. Se han utilizado varios enfoques diferentes, que incluyen vacunas inactivadas, vacunas de subunidades, vacunas vivas atenuadas y vacunas vivas atenuadas recombinantes [Arias et al., 2017. *Vaccines* 5, 35; doi:10.3390/vaccines5040035].

Se descubrió que las vacunas inactivadas no proporcionan protección, incluso en presencia de adyuvantes [Stone et al., 1967. *Am J Vet Res* 28: 475–481; Blome et al., 2014. *Vaccine* 32: 3879–3882].

Las vacunas de subunidades han proporcionado protección parcial o nula. Esto puede deberse en parte a la gran cantidad de proteínas codificadas (~ 160) y la dificultad para seleccionar proteínas relevantes. Además, la secuencia de un gran número de proteínas de ASFV no se parece a las proteínas conocidas [Dunigan et al., 2006. *virus Research* 117: 119-132], lo que dificulta predecir una función de estas proteínas.

Las vacunas vivas atenuadas se obtienen de cepas virulentas o de cepas de virulencia naturalmente baja como OURT88/3 [Boinas et al., 2004. *J Gen Virol* 85: 2177-2187] y NH/68 [Gil et al., 2008. *Arch Virol* 153: 1845–1854]. Estas vacunas vivas atenuadas a menudo proporcionan hasta un 100 % de protección contra cepas homólogas, pero solo una protección cruzada parcial contra cepas heterólogas. Además, suelen inducir efectos secundarios inaceptables como neumonía, alteraciones locomotoras, focos necróticos, abortos e incluso la muerte [Sánchez-Cordón et al., 2018. *Vet J* 233: 41–48; Arias et al., 2017. *Vaccines* 5, 35; doi:10.3390/vaccines5040035].

Los resultados más prometedores se han obtenido recientemente con vacunas vivas atenuadas recombinantes en las que se han introducido delecciones de genes, o combinaciones de delecciones de genes, para lograr niveles aceptables de seguridad y eficacia. Se observó protección frente a ciertos aislamientos, aunque combinada con distintos niveles de virulencia residual, aparentemente dependiendo de la cepa individual que se utilizó [Sánchez-Cordón et al., 2018. *Vet J* 233: 41–48; Arias et al., 2017. *Vaccines* 5, 35; doi:10.3390/vaccines5040035]. Se desconoce la estabilidad genética a largo plazo de estos mutantes por delección, al igual que los resultados de un ensayo más amplio en condiciones de campo.

Por tanto, existe la necesidad de proporcionar una vacuna que sea eficaz y segura y que proporcione protección contra la infección con un gran número de cepas diferentes de ASFV.

2. COMPENDIO DE LA INVENCION

Por lo tanto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante, preferiblemente una molécula de ADN recombinante, que comprende un casete génico que codifica un poliepítipo que comprende antígenos de células T de proteínas del virus de la peste porcina africana, en el que los antígenos de las células T están separados por espaciadores, preferiblemente por espaciadores de 1-10 residuos de aminoácidos, que contienen señales para la escisión del proteasoma. Dicho poliepítipo comprende preferiblemente 2-50 péptidos como antígenos de células T. Dicho poliepítipo preferiblemente comprende 2-50 nonapéptidos como antígenos de células T, preferiblemente nonapéptidos 1-13 y 15-20 como se muestra en la Tabla 1, que están separados por espaciadores de aproximadamente 1-5 residuos de aminoácidos, preferiblemente secuencias de espaciadores 1-11 como se muestra en la Tabla 2.

Una molécula recombinante de la invención puede codificar además un epítipo universal de células T. Dicha molécula recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de nucleótidos para ubiquitina, preferiblemente en el extremo 5'-terminal del poliepítipo.

La invención proporciona además una partícula viral que comprende la molécula recombinante de la invención. Dicha partícula viral puede comprender además una proteína marcadora.

La invención proporciona además un método para estimular una respuesta inmune en un cerdo que comprende administrar la molécula recombinante de la invención y/o la partícula viral de la invención. Preferiblemente, dicha administración se realiza en combinación con una partícula viral que comprende antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionados entre proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L de virus de la peste porcina africana, al cerdo en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria. Dicha molécula recombinante se administra preferiblemente por vía parenteral, preferiblemente por vía intramuscular y/o intradérmica, preferiblemente por electroporación inmune. Preferiblemente, dicha molécula recombinante y/o la partícula viral se administran de 2 a 4 veces, preferiblemente con intervalos de aproximadamente 2 semanas. Se prefiere

que al menos una de las administraciones de la molécula de ácido nucleico recombinante y/o la partícula viral se combine con la administración de antígenos sintéticos de células T de proteínas del virus de la peste porcina africana. Al menos una de las administraciones repetidas de la molécula recombinante y/o la partícula viral se combina con la administración de una partícula viral que comprende antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionados entre proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L de virus de la peste porcina africana.

La invención proporciona además una composición que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante de la invención y/o la partícula viral de la invención y un excipiente veterinario aceptable.

La invención proporciona además una vacuna, que comprende una cantidad inmunizante eficaz de la composición que comprende la molécula recombinante de la invención y/o la partícula viral de la invención y un excipiente veterinario aceptable.

La invención proporciona además un método para prevenir o mejorar la infección y/o la propagación del virus de la peste porcina africana en cerdos, que comprende administrar una molécula recombinante de la invención y/o una partícula viral de la invención a al menos un cerdo. Dicha administración de la molécula recombinante y/o la partícula viral se combina preferiblemente con la administración de una partícula viral que comprende antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionados entre proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L de virus de la peste porcina africana.

La invención proporciona además una partícula viral que comprende antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionados entre proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L de virus de la peste porcina africana.

La invención proporciona además un conjunto de partículas virales y un kit de partes que comprenden antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionados entre proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L de virus de la peste porcina africana.

La invención proporciona además un conjunto de partículas virales que comprenden una partícula viral que comprende la molécula recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y una o más partículas virales que comprenden antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionados entre proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L de virus de la peste porcina

africana.

La invención proporciona además un kit de partes, que comprende una partícula viral, que comprende una molécula recombinante de la invención y una o más partículas virales que comprenden antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionados entre proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L de virus de la peste porcina africana.

La invención proporciona además un kit de partes que comprende una partícula viral que comprende una molécula recombinante de la invención y antígenos sintéticos de células T de proteínas del virus de la peste porcina africana.

La invención proporciona además una partícula viral que comprende antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, o el conjunto de partículas virales que comprenden antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, para su uso en un método para proteger a un cerdo de una infección posterior con el virus de la peste porcina africana.

3. LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1. Secuencias

1A. Inserto de molécula de ácido nucleico recombinante, que indica epítomos de ubiquitina y células T.

1B. Inserción de ASFDEVAC2. En negrita están las secuencias de aminoácidos de ubiquitina y los antígenos de células T 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 11 y 18, como se indica en la Tabla 1. Las cursivas indican las secuencias de aminoácidos PADRE y las secuencias de ácidos nucleicos CpG.

1C. Secuencias de ácido nucleico MVA-p30 + B602L (3106 pb). Se indican, desde el extremo 5', un sitio Swal en mayúsculas, el flanco izquierdo de TK, el promotor MVA 13.5L en negrita y subrayado, una secuencia Kozak, en negrita la secuencia codificante del gen p30 de la cepa E75, subrayado una secuencia de etiqueta-FLAG, un codón de terminación en cursiva, en mayúsculas secuencias de terminación de mH5, secuencias promotoras tempranas/tardías de mH5 en negrita y subrayadas, una secuencia Kozak, secuencias codificantes para BA71V-B602L (9RL) en negrita, subrayada una secuencia de etiqueta-FLAG triple, un codón de parada en cursiva, en mayúsculas secuencias de terminación de C11R, el flanco derecho de TK y un sitio Swal en mayúsculas.

1D.. Secuencias de ácido nucleico de MVA-p54 + EP402R + K205R (3309 pb). Se indican, desde el extremo 5', un sitio Swal en mayúsculas, el flanco izquierdo de TK,

el promotor MVA 13.5L en negrita y subrayado, una secuencia Kozak, en negrita la secuencia codificante del gen p54, subrayado una secuencia de etiqueta-FLAG, un codón de terminación en cursiva, en mayúsculas secuencias de terminación de mH5, secuencias promotoras tempranas/tardías de mH5, secuencias codificantes para BA71V-B602L (9RL) en negrita, una secuencia de etiqueta-FLAG triple subrayada, un codón de terminación en cursiva, en mayúsculas secuencias de terminación de C11R, las secuencias promotoras de LEO en negrita y subrayadas, una secuencia de Kozak, en negrita la secuencia codificante del gen BA71V-K205R, subrayada una secuencia de etiqueta-FLAG, un codón de terminación en cursiva, en mayúsculas secuencias de terminación de M2L, el flanco derecho de TK y un sitio Swal en mayúsculas.

1E. Secuencias de ácido nucleico de MVA-p72 + A104R (2992 pb). Se indican, desde el extremo 5', un sitio Swal en mayúsculas, el flanco izquierdo de TK, el promotor MVA 13.5L en negrita y subrayado, una secuencia Kozak, en negrita la secuencia codificante del gen p72, subrayada una secuencia de etiqueta-FLAG, un codón de terminación en cursiva, en mayúsculas secuencias de terminación de mH5, secuencias promotoras tempranas/tardías de mH5 en negrita y subrayadas, una secuencia Kozak, secuencias codificantes para BA71V-A140R en negrita, subrayada una secuencia de etiqueta-FLAG, un codón de terminación en cursiva, en mayúsculas, secuencias de terminación de C11R, el flanco derecho de TK y un sitio Swal en mayúsculas.

Figura 2. Resultados de la vacunación con la construcción de ácido nucleico recombinante

2A. Curvas de supervivencia. 2B. Puntuaciones clínicas por grupo en los días indicados tras la exposición (DPC). Las columnas blancas indican animales que murieron. 2C. El ELISPOT resulta de células mononucleares de sangre periférica que se aislaron de los cerdos en los DPC indicados. Las células se estimularon con medio, virus y péptidos (vacuna) como se indica.

Figura 3. Resultados de la vacunación con construcciones virales

3A. Curvas de supervivencia. 3B. Índices de morbilidad promedio de cerdos en diferentes grupos. 3C. Respuesta inmune mediada por células de tres grupos de tratamiento. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de los cerdos en los días indicados después de la exposición (eje X: DPC). Eje Y: producción de interferón gamma determinada con ELISPOT. Las células se estimularon con medio (control negativo), virus (AVP) y péptidos como se indica.

4. DESCRIPCIÓN DETALLADA

4.1. Definiciones

Como se usa en este documento, el término "epítipo de células T" o "antígeno de células T", se refiere a un epítipo que puede ser reconocido por el sistema inmunológico después del procesamiento intracelular de un antígeno. Después del procesamiento, un epítipo de células T se une a al menos una molécula de MHC y se expresa en la superficie de la célula presentadora de antígeno como un complejo MHC-péptido. Los epítopos de células T presentados por moléculas de MHC de clase I tienen típicamente entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, mientras que las moléculas de MHC de clase II pueden presentar péptidos de aproximadamente 12-25 aminoácidos, preferiblemente aproximadamente 13-17 aminoácidos de longitud. Hay programas de software disponibles que pueden predecir los epítopos potenciales de las células T dentro de las proteínas sobre la base de, por ejemplo, perfiles de anfipaticidad de proteínas, motivos de secuencia, matrices cuantitativas, redes neuronales artificiales, máquinas de vectores de apoyo, relación de actividad de estructura cuantitativa y simulaciones de acoplamiento molecular [Desai y Kulkarni-Kale, 2014. *Methods Mol Biol* 1184: 333-64]. Estos programas incluyen IEDB Analysis Resource, ELISpot (PepScan, Lelystad, Holanda), RANKPEP [Reche et al., 2004. *Immunogenetics* 56: 405-19], nHLAPred [Bhasin and Raghava, 2007. *J Biosci* 32: 31-42], y NetMHC [Lundegaard et al., 2008. *Nucleic Acids Res* 36: W509-12].

Un epítipo de células T preferido, o antígeno de células T, como se usa este término en esta solicitud, es un epítipo de MHC de clase I, también denominado epítipo de células T citotóxicas, que comprende 8-11 residuos de aminoácidos, preferiblemente aproximadamente 9 residuos de aminoácidos.

Como se usa en este documento, el término "poliepítipo" se refiere a una biomolécula, preferiblemente un péptido o proteína, que tiene múltiples epítopos tales como epítopos de células T, preferiblemente epítopos de MHC de clase I. Dichos epítopos individuales preferiblemente están separados por secuencias enlazadoras. Dichas secuencias enlazadoras permiten flexibilidad y pueden participar en el procesamiento del poliepítipo en los epítopos individuales.

Como se usa en el presente documento, el término "casete génico" se refiere a una molécula de ácido nucleico que proporciona la expresión de uno o más marcos de lectura abiertos que están presentes en dicho casete. Un casete génico comprende preferiblemente una secuencia promotora, al menos un marco de lectura abierto y una región no traducida 3' que preferiblemente comprende una señal de poliadenilación. Un

casete génico puede comprender además secuencias potenciadoras, uno o más elementos reguladores postranscripcionales y/o una o más secuencias intrónicas. Para la expresión en células eucariotas, dichos elementos reguladores postranscripcionales y/o una o más secuencias de intrones pueden potenciar la exportación nuclear de productos de transcripción, es decir, un ARN mensajero, del casete génico para permitir la traducción del ARN en el citoplasma. Preferiblemente, dicho casete génico está optimizado para la expresión en cerdos.

Como se usa en este documento, el término "péptido" se refiere a una molécula proteica que comprende 2-50 residuos de aminoácidos. Un péptido puede estar presente en una proteína más grande, antes del procesamiento de la proteína en péptidos individuales.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína" se refiere a una molécula proteica que comprende más de 50 residuos de aminoácidos.

Como se usa en este documento, el término "nonapéptido" se refiere a un péptido que comprende nueve residuos de aminoácidos.

Como se usa en este documento, el término "espaciador" se refiere a péptidos pequeños, preferiblemente 1-10 residuos de aminoácidos, más preferiblemente 1-5 residuos de aminoácidos, que están presentes entre los epítomos individuales de un poliepítomo y permiten la flexibilidad y el procesamiento de los epítomos por el proteasoma y presentación de los epítomos individuales por MHC. Las secuencias de aminoácidos de espaciadores adecuados se proporcionan, por ejemplo, en el documento US20130011424 y en Toes et al., 2001. J Exp Med 194: 1-12, que se incorporan al presente documento como referencia.

Como se usa en este documento, el término "epítomo universal de células T" se refiere a una secuencia de péptidos que está unida y es mostrada por muchas moléculas de MHC diferentes y, por lo tanto, se supone que activa el sistema inmunológico de muchos individuos. Dicho epítomo universal de células T es preferiblemente un epítomo del MHC de clase II, también denominado epítomo de células T colaboradoras.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de nucleótidos para ubiquitina" se refiere a una molécula de nucleótidos que codifica ubiquitina. La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos cuya secuencia está muy conservada a lo largo de la evolución desde los invertebrados hasta los mamíferos. La ubiquitina participa en la proteólisis no lisosómica dependiente de ATP. Dicha secuencia de nucleótidos expresa preferiblemente la secuencia de aminoácidos N-MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNI

QKESTLHLVLRLRG.

Como se usa en este documento, el término "partícula viral" se refiere a una partícula de virus infeccioso o una partícula similar a un virus que está atenuada y no es capaz de propagarse de forma autónoma. El genoma de una partícula de virus comprende preferiblemente delecciones en genes que son relevantes para el desprendimiento de dicha partícula de una célula infectada. La delección de dichos genes proporciona espacio para la inserción de genes extraños que codifican, por ejemplo, una molécula de ADN recombinante, que comprende un casete génico que codifica epítomos de células B y/o epítomos de células T según la invención.

Como se usa en el presente documento, el término "cerdo" se refiere a un animal de la familia *Suidae* de biungulados. El término cerdo incluye un cerdo doméstico y su antepasado, el jabalí común euroasiático (*Sus scrofa*), el cerdo barbudo de Palawan, el cerdo barbudo de Borneo, el cerdo de Heude o el cerdo verrugoso vietnamita, el cerdo verrugoso de Visayan, el cerdo verrugoso de Celebes, el cerdo verrugoso de Flores, el cerdo verrugoso de Mindoro, el cerdo verrugoso filipino, cerdo verrugoso de Java, el babirusa y el jabalí.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una molécula recombinante de acuerdo con la invención y/o una o más partículas virales de acuerdo con la invención, que produce un efecto sobre la infección posterior de un cerdo con virus de la peste porcina africana.

4.2. Molécula de ácido nucleico recombinante

La invención proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante, que comprende un casete génico que codifica un poliepítipo que comprende antígenos de células T de proteínas del virus de la peste porcina africana, donde los antígenos de células T están separados por espaciadores, preferiblemente por espaciadores de 1-10 residuos de aminoácidos, que contienen señales para la escisión del proteasoma.

Dicha molécula de ácido nucleico, preferiblemente ARN o ADN, se produce preferiblemente mediante tecnologías recombinantes, que incluyen el uso de polimerasas, enzimas de restricción y ligasas, como sabe un experto en la técnica. Alternativamente, dicho ácido nucleico se proporciona mediante síntesis de genes artificiales, por ejemplo, mediante síntesis de oligonucleótidos que se solapan parcial o completamente, o mediante una combinación de química orgánica y tecnologías recombinantes, como sabe un experto en la técnica. Preferiblemente, dicho ácido nucleico tiene codones optimizados para mejorar la expresión del casete génico que

codifica un poliepítopo en un cerdo vacunado. La optimización adicional puede incluir la eliminación de sitios de empalme crípticos, la eliminación de colas de poliA crípticas y/o la eliminación de secuencias que conducen a un plegamiento desfavorable del ARNm. La presencia de un intrón flanqueado por sitios de empalme puede estimular la exportación desde un núcleo de células infectadas.

En una realización, dicha molécula de ácido nucleico es ARN, que incluye ARN no modificado, ARN modificado y, preferiblemente, ARN autorreplicante. Dicho ARN autorreplicante puede basarse en sistemas virales para la amplificación de la molécula de ARN, tales como los derivados de alfavirus, flavivirus, rabdovirus, virus del sarampión y/o flavivirus. Dicho ARN puede estar complejoado o condensado con moléculas tales como nanopartículas, polietilenimina, lípidos catiónicos que incluyen lípidos catiónicos sintéticos tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), lipfectamina y SAINT®, y/o quitosanos.

El casete génico comprende preferiblemente medios para altos niveles de expresión tales como promotores fuertes, por ejemplo de origen viral (p. ej., citomegalovirus humano) o promotores derivados de genes que están altamente expresados en una célula como una célula de cerdo (Running Deer y Allison, 2004. *Biotechnol Prog* 20: 880–889; Patente de Estados Unidos núm.: 5888809).

Se proporciona además una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante, que comprende un casete génico según la invención. Dicha célula huésped puede cultivarse o almacenarse para la producción futura de una molécula de ácido nucleico recombinante según la invención. Preferiblemente, dicha célula es una célula bacteriana, por ejemplo *Escherichia coli*.

El ácido nucleico preferiblemente se solubiliza, por ejemplo, en una solución tamponada tal como PBS, antes de la administración a un cerdo. La administración comprende preferiblemente entre 1 µg y 1 mg de ácido nucleico en total por animal.

Dicha molécula de ácido nucleico recombinante, que comprende un casete génico que codifica un poliepítopo, expresa 2-50 antígenos de células T, preferiblemente 5-30 antígenos de células T, más preferiblemente aproximadamente 20 antígenos de células T tal como 18 antígenos de células T, 19 antígenos de células T, 20 antígenos de células T y 21 antígenos de células T, de proteínas del virus de la peste porcina africana. Los antígenos de células T adecuados se predicen preferiblemente usando programas de software disponibles. Los antígenos de células T preferidos tienen una afinidad de unión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Un programa de software preferido que se incluye en el análisis de antígenos de células T

adecuados se denomina NetMHC [Andreatta y Nielsen, 2016. Bioinformatics 32: 511-7], que se basa en redes neuronales artificiales que permiten inserciones y deleciones en la alineación. Es capaz de aprender el perfil de longitud de diferentes moléculas de MHC. Se prefiere que los autopéptidos no se seleccionen como antígenos de células T adecuados, ya que estos pueden causar enfermedades autoinmunes.

Dichos 2-50 antígenos de células T son péptidos de 6-15 residuos de aminoácidos, preferiblemente 8 y 11 residuos de aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente 9 residuos de aminoácidos, que están separados por espaciadores, preferiblemente por espaciadores de 1-10 residuos de aminoácidos, que contienen señales para la escisión del proteasoma. Los antígenos de células T preferidos se derivan de las proteínas del virus de la peste porcina africana mgF_505-7R, NP1450L, G1340L, B385R, G1211R, E423R, NP1450L, mgF_5059R, E301R, C717R, EP424R, F778R, CP530R, R298L, CP2475L, O174L, mgF_360-2L, NP1450L, M1249L, y/o mgF_360-1L.

Los antígenos de células T preferidos se seleccionan de los péptidos indicados en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de antígenos de células T preferidos

1	TLNLLLSY	11	YTLNHAFTL
2	KTFCKNLPY	12	SMSLNYYFY
3	MSVSTFWPY	13	FINSTDFLY
4	RINRNYYPY	14	YYYGYYYQL
5	ITYLNNMGY	15	AINTFMYYY
6	RTASSAELY	16	YQLDLFTAL
7	ATQQLALNY	17	CIDLGANAF
8	SIITRHLEY	18	FSFGRTLVIY
9	KTFSDLSNY	19	SSMDDISAY
10	YRFVWYQPF	20	CIDLGADAF

Una molécula de ácido nucleico recombinante preferida, que comprende un casete génico según la invención, codifica preferiblemente los péptidos 1-20 de la Tabla 1, más preferiblemente los péptidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, más preferiblemente, desde el extremo N-terminal, en este orden, los péptidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 11, 18.

Dichos espaciadores son preferiblemente de aproximadamente 1 a 5 residuos

de aminoácidos, incluidos 2 residuos de aminoácidos, 3 residuos de aminoácidos y 4 residuos de aminoácidos. Los espaciadores preferidos incluyen los péptidos indicados en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de espaciadores

1	ARY	7	AQW
2	NQF	8	ADRRY
3	ADRRF	9	ADNQF
4	ADAQW	10	ADRIW
5	RRW	11	ADARY
6	ADARW		

Una molécula de ácido nucleico recombinante preferida, que comprende un casete génico según la invención, codifica preferiblemente un epítipo universal de células T. Dicho epítipo universal de células T se localiza preferiblemente delante de los epítopos de células T del virus de la peste porcina africana, por lo tanto es N-terminal para estos epítopos de células T. Ejemplos de tales epítopos universales de células T se proporcionan en Khatun et al., 2017. Chemistry 23: 4233-4254. Un epítipo de células T universal preferido lo proporciona un epítipo pan-DR no natural denominado PADRE, que tiene la secuencia de aminoácidos aKXVAAWTLKAAaZC, en donde X indica L-ciclohexilalanina y Z indica ácido aminocaproico ((Alexander et al., 2000. J Immunol 164: 1625-1633). Por motivos relacionados con la expresión, se usa preferiblemente un derivado que tiene la secuencia AKFVAAWTLKAAAARY.

Una molécula de ácido nucleico recombinante preferida, que comprende un casete génico según la invención, preferiblemente comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica ubiquitina, preferiblemente en el extremo 5'-terminal del poliepítipo. La fusión de ubiquitina con el poliepítipo que comprende antígenos de células T mejora la orientación al proteasoma, lo que da como resultado un procesamiento mejorado del poliepítipo y respuestas mejoradas de células T.

Una molécula de ácido nucleico recombinante preferida comprende la secuencia de nucleótidos representada en la Figura 1B.

4.3. Partículas virales

La invención proporciona además una partícula viral, que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante, que comprende un casete génico que codifica

un poliepítipo que comprende antígenos de células T de proteínas del virus de la peste porcina africana según la invención.

La invención proporciona además una partícula viral, que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que expresa antígenos de células B del virus de la peste porcina africana. Dichos antígenos de células B se seleccionan preferiblemente de las proteínas p30, p54, p72, EP402R (pEP402R), A104R (pA104R) y/o B602L (pB602L) del virus de la peste porcina africana. Un experto en la técnica entenderá que el término "proteína EP402R" se refiere a pEP402R; el término "proteína A104R" se refiere a pA104R; y el término "proteína B602L" se refiere a pB602L. Dichos antígenos de células B comprenden preferiblemente una secuencia de aminoácidos de las proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L del virus de la peste porcina africana, preferiblemente comprenden secuencias de aminoácidos sustancialmente completas de las proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L del virus de la peste porcina africana. Se proporcionan ejemplos de tales secuencias de aminoácidos mediante el número de acceso de UniProt P34204 (P30_ASFB7) para la fosfoproteína p30 de la cepa Badajoz 1971; número de acceso de UniProt Q65194 para la proteína de la envoltura p54 de la cepa Badajoz 1971; número de acceso de UniProt P22776 para la proteína mayor de cápside p70 de la cepa Badajoz 1971; número de acceso de UniProt Q89501 para el homólogo de CD2 EP402R de la cepa Badajoz 1971; número de acceso de UniProt P68742 para la proteína de tipo histona viral A104R de la cepa Badajoz 1971; y número de acceso de UniProt Q65169 para la proteína B602L de la cepa Badajoz 1971.

Dichos antígenos de células B se expresan preferiblemente usando casetes de expresión en tándem, por ejemplo para la expresión de p30 y B602L; p72 y A104R) y/o p54 y EP402R, o casetes de expresión triple, por ejemplo para la expresión de casetes de expresión p54 y EP402R y K205R). Las construcciones de ADN que codifican los antígenos de células B pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, obtenidas de GenScript, como lo sabe un experto en la técnica. Las regiones que codifican un antígeno de células B preferiblemente se clonan con diferentes secuencias promotoras de MVA y de terminación de la transcripción para impulsar la expresión de estos genes. Además, dichos antígenos de células B preferiblemente se proporcionan con una etiqueta de secuencia para permitir la detección de la expresión de proteínas. Las etiquetas adecuadas incluyen una etiqueta 6xHis, dominio c-myc (EQKLISEEDL), etiqueta de hemaglutinina (YPYDVPDYA), proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa, proteína de unión a maltosa, péptido de etiqueta-FLAG, péptido aceptor de

biotina, péptido de unión a estreptavidina y péptido de unión a calmodulina, como se presenta en Chatterjee, 2006. Cur Opin Biotech 17, 353–358. Una etiqueta-FLAG es una etiqueta preferida. Preferiblemente, dicha etiqueta está presente en el extremo C-terminal de un antígeno de células B.

Las partículas virales que pueden usarse como vectores para la transmisión de dichas moléculas de ácido nucleico recombinante, preferiblemente moléculas de ADN, incluyen partículas basadas en virus adenoasociados, lentivirus por ejemplo, un vector basado en retrovirus como el basado en virus de la leucemia murina de Moloney, virus formador de foco del bazo, virus del sarcoma mieloproliferativo, virus de células madre murinas o retrovirus gamma SFG (Rivière et al., 1995. PNAS 92: 6733-6737), adenovirus, virus del herpes simple, poxvirus como Vaccinia Ankara modificada (MVA; Mackowiak et al., 1999. Adv Vet Med 41: 571–583; Cottingham et al., 2008. PLoS One 20: e1638) o poxvirus canario, arenavirus, virus del sarampión, virus de la enfermedad de Newcastle [Kortekaas et al., 2010. Vaccine 28: 2271-2276] y/o bunyavirus como el virus de la fiebre del Valle del Rift (Wichgers Schreur et al., 2014. J Virol 88: 10883–10893).

Una partícula de virus preferida se basa en poxvirus. Preferiblemente, dicha partícula de virus es una partícula basada en Vaccinia Ankara modificada (MVA) tal como se describe en Cottingham et al., 2008. PLoS One 20:e1638). Un casete génico preferido en MVA comprende la secuencia promotora de MVA 13.5, como se describe, por ejemplo, en el documento US20150299267. El casete génico se inserta preferiblemente en el gen TK del vector de vacuna MVA (viruela atenuada) mediante recombinación de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) de acuerdo con procedimientos conocidos por un experto en la técnica.

Preferiblemente, dicha partícula de virus se produce en una célula eucariota. Preferiblemente, dicha célula eucariota es una célula que se puede infectar y/o transfectar fácilmente usando métodos estándar conocidos por el experto, tales como, por ejemplo, células de levadura y células de fibroblastos de pollo. Preferiblemente, dicha célula eucariota es una célula de insecto o una célula de mamífero. Las células de insectos adecuadas comprenden, por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda* de ovarios tales como Sf9 y Sf21, células de Drosophila Schneider 2 y células de *Aedes albopictus* C6/36. Las células de mamífero adecuadas comprenden, por ejemplo, células de riñón de hámster bebé, células de riñón embrionario humano como HEK293 y células HEK293FTM de estilo libre (ThermoFisher Scientific), células VERO, células MDCK, células CHO, células HeLa y PER.C6 (Fallaux, FJ et al. 1998. Hum Gene Ther

9: 1909-1917). Las células preferidas son las células de riñón embrionario humano tales como las células HEK293 y las células HEK293FTM de estilo libre.

En una realización, dicha partícula viral comprende además una proteína marcadora. Dicha proteína marcadora permite la identificación de cerdos que han recibido una partícula de virus según la invención. Dicha proteína marcadora permite discriminar un cerdo vacunado de un cerdo infectado con el virus de la peste porcina africana de tipo salvaje. Preferiblemente, dicha proteína marcadora es una proteína fluorescente, beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, luciferasa de *Gaussia*, luciferasa de *Renilla* y/o fosfatasa alcalina secretada. Una persona experta en la técnica entenderá que la secuencia codificante de dicha proteína marcadora está presente en el genoma de una partícula de virus según la invención, de manera que la proteína marcadora se expresa en la célula que ha recibido una partícula de virus de la invención.

La invención proporciona además un conjunto de partículas virales que comprenden antígenos de células B del virus de la peste porcina africana.

La invención proporciona además un conjunto de partículas virales que comprenden una partícula viral que comprende la molécula recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y una o más partículas virales que comprenden antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionados entre proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L de virus de la peste porcina africana.

La invención proporciona además un kit de partes, que comprende partículas virales que comprenden antígenos de células B del virus de la peste porcina africana.

Dichos antígenos de células B se seleccionan preferiblemente entre las proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L del virus de la peste porcina africana. Dichos antígenos de células B comprenden preferiblemente una secuencia de aminoácidos de las proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L del virus de la peste porcina africana, preferiblemente comprenden secuencias de aminoácidos sustancialmente completas de las proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L del virus de la peste porcina africana. Se proporcionan ejemplos de tales secuencias de aminoácidos mediante el número de acceso de UniProt P34204 (P30_ASFB7) para la fosfoproteína p30 de la cepa Badajoz 1971; número de acceso de UniProt Q65194 para la proteína de la envoltura p54 de la cepa Badajoz 1971; número de acceso de UniProt P22776 para la proteína mayor de cápside p70 de la cepa Badajoz 1971; número de acceso de UniProt Q89501 para el homólogo de CD2 EP402R de la cepa Badajoz 1971; número de acceso de UniProt P68742 para la proteína de tipo histona viral A104R de la

cepa Badajoz 1971; y número de acceso de UniProt Q65169 para la proteína B602L de la cepa Badajoz 1971.

La invención proporciona además un kit de partes, que comprende una partícula viral, que comprende la molécula recombinante que comprende un casete génico que codifica un poliepítipo que comprende antígenos de células T de proteínas del virus de la peste porcina africana según la invención y una o más partículas virales que comprenden antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionados entre las proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L del virus de la peste porcina africana según la invención.

La invención proporciona además un kit de partes que comprende una partícula viral, que comprende la molécula recombinante que comprende un casete génico que codifica un poliepítipo que comprende antígenos de células T de proteínas del virus de la peste porcina africana según la invención y antígenos sintéticos de células T de proteínas de virus de la peste porcina africana.

4.4. Métodos para estimular una respuesta inmune en un cerdo

La invención proporciona un método para estimular una respuesta inmune en un cerdo que comprende administrar la molécula recombinante de la invención, y/o una partícula viral de la invención, al cerdo en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmune.

La invención proporciona un método para estimular una respuesta inmune en un cerdo que comprende administrar la molécula recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y/o la partícula viral de la reivindicación 6 o 7, en combinación con una partícula viral que comprende antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionado de proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L de virus de la peste porcina africana, al cerdo en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria.

La molécula recombinante de la invención y/o una partícula viral de la invención se proporciona preferiblemente en una composición, preferiblemente una composición farmacéutica.

La molécula de ácido nucleico recombinante y/o la partícula de virus se puede administrar a un cerdo mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, incluyendo inyección, parches para difusión pasiva tópica o iontoforesis, electroporación, microporación térmica, atomizadores nasales, inhalación pulmonar y del tracto respiratorio superior de aerosol,, sonoporación, productos químicos y abrasión

mecánica, y administración cinética/balística [Weniger et al., 2018. Vaccine 36: 427-437].

Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico recombinante y/o una partícula de virus se administran por vía parenteral, tal como mediante inyección. La molécula de ácido nucleico recombinante y/o la partícula viral de acuerdo con la invención se formula preferiblemente con portadores, adyuvantes o vehículos convencionales, no tóxicos y farmacéuticamente aceptables. El término parenteral, como se usa en este documento, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea o intradérmica, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

La molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la invención se administra más preferiblemente por electroporación, más preferiblemente por electroporación intramuscular/intradérmica, a cerdos. La electroporación se puede realizar utilizando, por ejemplo, una matriz de electrodos que consta de una matriz de aguja de trocar chapada en oro de 0,43 mm de diámetro con un espacio de 1,5 mm (Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA) que se presiona sobre la ampolla de piel hecha mediante el método Mantoux de 50 µl de formulación plasmídica y aplicación de pulsos de 100 ms de 25 V; un generador de pulsos portátil (CUIY21 EDIT; Nepa Gene, Ichikawa, Japón) y electrodos de pinza (6 pulsos de 10 mseg con corriente de salida de 300–600 mA); un generador de pulsos BTX ECM 830 con el electrodo redondo de microparche sin aguja montado en un mango (Modelo MP 35) (Genetronics, San Diego, CA) y aplicando seis pulsos de onda cuadrada a 60, 70 u 80 V, respectivamente, con duración del pulso de 60 ms, intervalo de pulso de 200 ms e inversión de polaridad después de tres pulsos.

Otro método preferido emplea la administración intramuscular en el muslo derecho en dos sitios separados por unos tres cm en un volumen de 0,25 ml por sitio de inyección. Inmediatamente después de la inyección, se puede aplicar un procedimiento de electroporación in vivo usando un Cliniporator (IGEA) con electrodos de aguja lineales/hexagonales en el lugar de las inyecciones. El espacio entre las agujas es preferiblemente de aproximadamente 2 cm y el electroporador se ajusta preferiblemente a 100V. Se utiliza una corriente de 50 V/cm para mantener un amperaje medio de 0,6 A. Se aplican con intervalos de dos a veinte pulsos, preferiblemente de cinco a diez pulsos, preferiblemente de aproximadamente ocho pulsos, de aproximadamente 5-50 milisegundos, preferiblemente de aproximadamente 20 milisegundos, de 50 a 500 milisegundos, preferiblemente aproximadamente 200 milisegundos.

Preferiblemente, dicha administración se repite, preferiblemente 1-3 veces de manera que la molécula recombinante y/o la partícula viral se administren un total de 2-4 veces. La administración repetida se realiza preferiblemente con intervalos de aproximadamente 2 semanas.

La respuesta inmune protectora puede requerir inmunidad tanto celular como serológica. Por lo tanto, en un método preferido para estimular una respuesta inmune en un cerdo, al menos una de las administraciones de la molécula recombinante y/o la partícula viral se combina con la administración de péptidos sintéticos que comprenden antígenos de células T de proteínas del virus de la peste porcina africana, preferiblemente 2-50 péptidos, más preferiblemente aproximadamente 10-30 péptidos tal como aproximadamente 20 péptidos tal como 18 péptidos, 19 péptidos, 20 péptidos y 21 péptidos.

Dichos péptidos que comprenden antígenos de células T son preferiblemente péptidos de 6-15 residuos de aminoácidos, preferiblemente de 8 y 11 residuos de aminoácidos, más preferiblemente de aproximadamente 9 residuos de aminoácidos. Los péptidos preferidos se seleccionan de los péptidos indicados en la Tabla 1.

Dichos péptidos se administran preferiblemente por vía parenteral, tal como mediante inyección, más preferiblemente mediante inyección intramuscular.

En un método preferido para estimular una respuesta inmune en un cerdo, al menos una de las administraciones de la molécula recombinante y/o la partícula viral se combina con la administración de una partícula viral que comprende antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionados de las proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L del virus de la peste porcina africana.

La cantidad de una partícula viral de la invención que se administra a un cerdo se encuentra, en general, en el rango de 1000 a 1 000 000 000 de partículas de virus infecciosos por animal. La cantidad de partículas infecciosas se puede determinar usando técnicas estándar conocidas por el experto en la técnica como, por ejemplo, una curva de respuesta a la dosis.

La invención proporciona además una composición, preferiblemente una composición veterinario aceptable, que comprende la molécula recombinante y/o la partícula viral de la invención, y un excipiente veterinario aceptable.

Preferiblemente, dicha composición es una suspensión acuosa u oleaginosa. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes de dispersión o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo,

Tween 80) y agentes de suspensión. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados glicéridos, son útiles en la preparación de una composición adecuada, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, o un alcohol similar al descrito en Pharmacopoea Helvetica.

La invención proporciona además una vacuna que comprende una cantidad inmunizante eficaz de la composición que comprende la molécula recombinante y/o la partícula viral de la invención, y un excipiente veterinario aceptable. Preferiblemente, dicha vacuna comprende además una partícula viral que comprende antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionados entre proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L de virus de la peste porcina africana.

Una composición que comprende una partícula viral de la invención preferiblemente comprende además adyuvantes que incluyen citocinas tales como interferón-gamma, secuencias de ácidos nucleicos inmunoestimuladores tales como oligonucleótidos CpG, liposomas, partículas similares a virus, tensioactivos tales como hexadecilamina, polianiones tales como pirano y sulfato de dextrano.

Un adyuvante preferido es ISCOM, como se describe en la solicitud de patente internacional WO2002026255A1. La tecnología de ISCOM tiene varias ventajas sobre otros adyuvantes. Los ISCOM estimulan respuestas inmunitarias tanto humorales como mediadas por células. Los ISCOM son adyuvantes altamente eficaces, que permiten una reducción adicional de las cantidades de un inactivado o parte de este según la invención. Un ISCOM preferido es ISCOM Matrix-M.

Otro adyuvante preferido es BLP. Los BLP son vehículos de administración de vacunas autoadyuvantes, derivados de la bacteria *Lactococcus lactis* inactivada. *L. lactis* es una bacteria segura comúnmente utilizada en la industria alimentaria, como para la producción de queso y bebidas probióticas. Los BLP se producen mediante un simple tratamiento con ácido caliente, lo que da como resultado una matriz robusta en forma de célula que consiste predominantemente en una superficie de peptidoglicano.

Dicho peptidoglicano preferiblemente comprende el dominio de unión de peptidoglicano C-terminal LysM de AcmA la hidrolasa de la pared celular de *Lactococcus lactis* como se describe en el documento WO 2010/033031. Esta superficie induce una inmunidad duradera necesaria para la protección contra patógenos que causan enfermedades. La naturaleza no viva de las partículas de BLP permite una dosificación precisa sin riesgo de diseminación.

Los BLP también proporcionan una estructura segura y versátil que puede cargarse eficazmente con antígenos particulares de elección, por ejemplo, una o más partículas virales de la invención que comprenden antígenos de células T y/o antígenos de células B del virus de la peste porcina africana. La carga completa de BLP con antígenos se logra utilizando una tecnología de acoplamiento no covalente como se describe en el documento WO2010/033031. Esta tecnología permite una mezcla simple de la fusión del antígeno con los BLP, lo que resulta en una unión robusta e inmediata del antígeno a la superficie de las partículas. Los BLP cubiertos con antígeno resultantes se administran preferiblemente a un cerdo a través de las capas mucosas de la nariz (aerosol) o boca (cápsula), sin necesidad de una inyección.

La invención proporciona además un método para prevenir o mejorar la infección y/o propagación del virus de la peste porcina africana en cerdos, que comprende administrar la molécula recombinante que comprende un casete génico que codifica un poliepítopo que comprende antígenos de células T de proteínas del virus de la peste porcina africana, y o una partícula viral que comprende dicha molécula recombinante, a al menos un cerdo. Dicha administración de la molécula recombinante y/o la partícula viral se combina preferiblemente con la administración de una partícula viral que comprende antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, preferiblemente seleccionados entre proteínas p30, p54, p72, EP402R, A104R y/o B602L de virus de la peste porcina africana.

Dicho método proporciona protección contra una infección posterior con un virus virulento de la peste porcina africana de tipo salvaje. La protección se define como la supervivencia y la ausencia de manifestaciones clínicas de la enfermedad, y una reducción de la propagación progresiva del virus de tipo salvaje por cualquier vía de transmisión, incluida la propagación horizontal y vertical. El tiempo hasta el inicio de la protección y la protección duradera son parte de la eficacia de una vacuna. Además, una amplia protección contra diferentes especies de virus o serotipos también es parte de la eficacia de una vacuna según la invención.

La invención proporciona además una partícula viral que comprende antígenos

de células T, preferiblemente que comprende un casete génico que codifica un poliepítipo que comprende antígenos de células T de proteínas del virus de la peste porcina africana, o antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, o un conjunto de partículas que comprenden antígenos de células T y antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, para su uso en un método de protección de un cerdo contra una infección posterior con el virus de la peste porcina africana.

La invención proporciona además un kit de partes que comprende partículas virales que comprenden antígenos de células T, preferiblemente que comprenden un casete génico que codifica un poliepítipo que comprende antígenos de células T de proteínas del virus de la peste porcina africana y antígenos de células B del virus de la peste porcina africana, para su uso en un método para proteger a un cerdo de una infección posterior con el virus de la peste porcina africana.

Para mayor claridad y una descripción concisa, las características se describen en este documento como parte de esta o de modalidades separadas, sin embargo, se apreciará que el alcance de la invención puede incluir realizaciones que tengan combinaciones de todas o algunas de las características descritas.

5. Ejemplos

Ejemplo 1: Vacunación con ADN basada en la expresión de epítomos de células T de ASFV

Método:

Sobre la base de las secuencias del genoma completo de los aislados de ASF conocidos y la secuencia del genoma del cerdo, se utilizó el programa de predicción de epítomos NetMHCpan para proporcionar una lista de epítomos de células T que son independientes de la cepa del virus o la raza porcina (ver Tabla 1). Los diecinueve epítomos de células T mejor clasificados se utilizaron para generar una vacuna de ADN sintético de poliepítipo. La secuencia de ADN codificaba 19 epítomos nonapeptídicos, separados por espaciadores de 3 a 5 aminoácidos que contienen señales para la escisión del proteasoma y su posterior procesamiento (ver Figura 1A). El epítipo 14 no se usó ya que probablemente interferiría con el procesamiento correcto. También se incluyó una secuencia de epítipo de células T universal denominada PADRE para este propósito (ver Figura 1B). Para potenciar la degradación proteasómica, se añadió la secuencia de nucleótidos de la ubiquitina en el extremo 5'-terminal del gen sintético. Esto conduce a una degradación más eficaz por parte del proteasoma y una mejor presentación de los epítomos a las células T huésped. Finalmente, se añadió una

secuencia de adyuvante CpG a la 3'UTR del gen sintético. GenScript Corporation sintetizó químicamente una versión optimizada para codones del gen sintético y la clonó detrás del promotor CMV en el plásmido pCVI (un derivado de pCI-neo [Promega] obtenido al eliminar un fragmento de restricción ClaI) utilizando los sitios de restricción NheI y NotI. El plásmido resultante se denominó pCVI-ASF DVAC2.

Se utilizaron tres grupos de 6 cerdos cada uno para un estudio de prueba de provocación de vacunación. Los animales del grupo 1 se vacunaron tres veces con pCVI-ASF DVAC2. Los animales del grupo 2 también se vacunaron tres veces pero simultáneamente con la 3ª vacunación con ADN también recibieron un refuerzo con una mezcla de nonapéptidos sintéticos correspondientes a los epítomos de células T del gen sintético. Los animales del grupo de control (grupo 3) se vacunaron tres veces con el plásmido pCVI vacío. Los cerdos se vacunaron con intervalos de 2 semanas. La vacuna se aplicó por vía intramuscular/intradérmica mediante inmunoelectroporación utilizando un dispositivo cliniporator (IGEA Clinical Biophysics, Carpi, Italia). Los pulsos eléctricos generados por el aparato de electroporación mejoran la captación de ADN por el tejido circundante. Los péptidos se aplicaron mediante vacunación intramuscular. Dos semanas después de la vacunación final, los cerdos fueron sometidos a prueba de provocación con la cepa ASFV Netherlands '86 (Wageningen Bioveterinary Research, Países Bajos; ver Terpstra y Wensvoort, 1986. Tijdschrift voor diergeneeskunde 111: 389-392). La cepa se cultivó en macrófagos alveolares porcinos. Los cerdos infectados fueron estudiados durante 2 semanas más para detectar síntomas clínicos. Los niveles de virus en sangre se determinaron mediante PCR. Las respuestas de los anticuerpos se examinaron mediante ELISA utilizando el virus completo como antígeno. Los niveles de células secretoras de IFN- γ se determinaron mediante ELISPOT después de la estimulación in vitro con virus o el cóctel de veinte nonapéptidos.

Resultados:

La infección de la prueba de provocación del grupo de control no vacunado (grupo 3) dio como resultado una supervivencia del 40 %. La vacunación dio como resultado una supervivencia de aproximadamente el 83 % en los grupos 1 y 2 (ver Figura 2A). Los cerdos del grupo 2 tuvieron puntuaciones clínicas totales significativamente más bajas que los cerdos de los otros grupos (Figura 2B). Los cerdos de este grupo también tuvieron una respuesta celular secretora de IFN- γ significativa contra el cóctel de nonapéptidos desde el día 42 después de la primera vacunación (p.v.) (día 0 de la prueba de provocación [p.c.]) hasta el final del experimento (ver Figura 2C). Los cerdos

del grupo 2 tuvieron una respuesta celular secretora de IFN- γ significativa frente al cóctel de nonapéptidos desde el día 49 p.v. (día 7 p.c.). No se observó respuesta de células secretoras de IFN- γ contra el cóctel de nonapéptidos en el grupo de control. Todos los grupos mostraron una respuesta celular secretora de IFN- γ significativa contra el virus en el día 56 p.v. (día 14 p.c.). No hubo diferencias significativas en los niveles de ADN viral en sangre entre los grupos. No se observaron diferencias significativas en los niveles de porcentaje de bloqueo del ELISA de anticuerpos contra la ASF.

Ejemplo 2: Vacunación usando vectores MVA que expresan epítomos de células T y B de ASFV

Método:

Sobre la base de los resultados prometedores de la vacuna de ADN de poliepítomo, se proporcionó al gen ASFDVAC2 sintético con la secuencia promotora MVA 13.5 y se insertó en el gen TK del vector de la vacuna MVA (viruela atenuada) mediante recombinación de BAC de acuerdo con los procedimientos publicados. (Cottingham, 2012. *Methods Mol Biol* 890: 37-57). El virus resultante se denominó MVA-VAC2. El inserto de MVA-VAC2 comprende, desde el extremo 5', un flanco izquierdo de TK, el promotor MVA 13.5L, una secuencia Kozak, el gen ASFDVAC2 sintético, secuencias de terminación de mH5 y el flanco derecho de TK.

Además, se utilizó la combinación de BAC para insertar los genes que codifican seis antígenos principales de células B de ASFV bien conocidos (p30, p54, p72, EP402R, A104R y B602L) en el vector MVA utilizando casetes de expresión génica en tándem (p30 + B602L; p72 + A104R) o triple (p54 + EP402R + K205R) (MVA-p30/B602L, MVA-p72/A104R y MVA-p54/EP402R/K205R, respectivamente. Con este fin, se generaron construcciones de ADN sintético (GenScript) y las regiones codificantes de proteínas se proporcionaron con diferentes secuencias promotoras de MVA y de terminación de la transcripción para impulsar la expresión de estos genes. Además, para permitir la detección de la expresión de la proteína, se proporcionó a cada una de las regiones codificantes de la proteína una secuencia de etiqueta-FLAG C-terminal.

Se utilizaron tres grupos de 10 cerdos cada uno para un experimento de prueba de provocación de vacunación. Los animales del grupo 1 se vacunaron dos veces por vía intramuscular usando 10^8 TCID₅₀ MVA-VAC2. Los animales del grupo 2 se vacunaron dos veces con una combinación de los 4 recombinantes de MVA que expresan epítomos de células T y epítomos de células B (10^8 DICT₅₀ cada uno). Los animales no vacunados del grupo 3 sirvieron como controle. Dos semanas después de

la segunda vacunación, los animales se sometieron a prueba de provocación de la cepa ASFV Netherlands '86.

Resultados:

La infección por prueba de provocación de animales no vacunados (grupo 3) dio como resultado una supervivencia del 0 % (véase la Figura 3A). Sorprendentemente, 9 de cada 10 cerdos que fueron vacunados con la combinación de los 4 recombinantes MVA (grupo 2) sobrevivieron y mostraron solo una morbilidad leve durante solo unos pocos días. De los animales del grupo 1, que fueron vacunados únicamente con MVA-VAC2, sobrevivieron 4 cerdos. Los animales de este grupo mostraron más morbilidad y durante un período de tiempo más largo, en comparación con los animales del grupo 2 (ver Figura 3B). Estos resultados se corresponden positivamente con la inmunidad mediada por células (CMI) medida con la respuesta de las células secretoras de IFN- γ contra el cóctel de epítomos nonapeptídicos de células T o antígeno de ASFV completo (Figura 3C).

Conclusión:

En este estudio se obtuvieron resultados prometedores para el desarrollo de una vacuna contra el ASFV mediante el uso de una vacuna combinada que consta de virus vectores MVA que expresan epítomos de células T y B de ASFV. La vacuna combinada proporcionó protección contra la mortalidad y la enfermedad clínica después de la prueba de provocación.