

# DESARROLLO DE UNA VACUNA NOVEDOSA ATENUADA VIVA CONTRA LA PESTE PORCINA AFRICANA BASADA EN LA ELIMINACIÓN DEL GEN I177L

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

### Campo de la invención

5 La presente descripción proporciona detalles sobre la construcción de una vacuna atenuada viva contra el virus de la peste porcina africana (VPPA) recombinante para la prevención de la PPA ocasionada por varias cepas del VPPA, tales como el aislado de Georgia 2007 extremadamente virulento («VPPA-G»). Una vacuna de ejemplo comprende el virus VPPA-GΔI177L modificado, un VPPA-G recombinante modificado al eliminar una parte del ORF (marco de lectura abierto, por sus  
10 siglas en inglés) de I177L que representa el gen I177L no funcional.

### Antecedentes

La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad viral contagiosa del cerdo. El agente causante, el virus de la PPA (VPPA), es un virus grande envuelto que contiene un genoma del ADN bicatenario de aproximadamente 190 pares de kilobases. El VPPA comparte aspectos de la estructura genómica  
15 y la estrategia de replicación con otros virus ADN bicatenario grande, lo que incluye *Poxviridae*, *Iridoviridae* y *Phycodnaviridae* (Costard et ál, Phil. Trans. Royal Soc. B, (2009) 364:2683-96). Las infecciones por VPPA en cerdos domésticos son a menudo fatales y se caracterizan por fiebre, hemorragias, ataxia y depresión grave. Sin embargo, el curso de la infección varía, de Altamente letal a sub-clínico, dependiendo de las características del hospedador y la cepa del virus particular  
20 (Tulman et al, Curr. Top. Microbial. Immunol. (2009) 328:43-87).

Actualmente, la enfermedad es endémica en más de veinte países africanos subsaharianos. En Europa, la PPA continúa siendo endémica en la isla de Cerdeña (Italia) y se han declarado nuevos brotes en la región del Cáucaso desde 2007, que afectan Georgia, Armenia, Azerbaiyán y Rusia. Recientemente, se han informado brotes en Ucrania, Bielorrusia, Lituania, Letonia y Polonia, que  
25 afectan granjas de cerdos y jabalíes. En 2018-2019, la PPA se propagó a China, Mongolia, Vietnam, Camboya y Corea del Norte, en tanto granjas de cerdos domésticos como de jabalíes. En 2019, la PPA también se propagó a poblaciones de jabalíes en Bélgica, donde la PPA actualmente solo afecta una pequeña zona de confinamiento en el país. Los brotes recientes de PPA presentan el riesgo de una mayor propagación hacia países vecinos. El virus VPPA de Georgia 2007/1 epidémico  
30 original es un aislado altamente virulento que pertenece al genotipo II (Chapman et ál, Emerging Infect. Dis. (2011) 17:599-605) y es responsable por todos los brotes actuales en Asia y Europa; los virus de los brotes tienen una similitud de 90 % o más con respecto a la cepa original.

Actualmente, no existe una vacuna comercial disponible para la PPA y los brotes de la enfermedad son controlados mediante cuarentena y sacrificios de animales. Los intentos de vacunar animales  
35 usando extractos de células infectadas, sobrenadantes de leucocitos de sangre periférica de cerdo

infectada, viriones purificados e inactivados, macrófagos fijados por glutaraldehído infectados o macrófagos alveolares infectados tratados con detergente no lograron inducir una inmunidad protectora (Coggins, L., *Prag. Med. Viral.* (1974) 18:48-63; Forman et ál, *Arch. Viral.*, (1982) 74:91-100; Kihm et ál, (1987) En: *African Swine Fever*, Becker, Y. (ed), Martinus Nijhoff, Boston, págs. 127-44; Mebus, C. A., *Adv. Virus Res.*, (1988) 35:251-69). La inmunidad protectora homóloga sí se desarrolla en cerdos que sobreviven la infección viral. Los cerdos que sobreviven la infección aguda con variantes moderadamente virulentas o atenuadas del VPPA desarrollan resistencia a largo plazo a la exposición con el virus homóloga, pero, raras veces, heteróloga (Hamdy y Dardiri, *Am. J. Vet. Res.* (1984) 45:711-14; Ruiz-Gonzalvo et ál, (1981) In: *FAO/CEC Expert Consultation in ASF Research*, Wilkinson, P. J. (ed), Rome, págs. 206-16). En la presente, informamos el desarrollo de una vacuna recombinante en la cual se eliminó una parte del gen I177L del genoma del VPPA-G. La vacunación de cerdos con este virus protegió a los cerdos contra el desarrollo de la PPA. Dado que actualmente no existen vacunas contra el VPPA disponibles, el desarrollo de cualquier vacuna que pueda inducir protección contra la presentación letal de la enfermedad es de gran interés.

#### COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente descripción proporciona un virus genéticamente modificado, en donde el virus comprende un genoma viral al menos 99 % idéntico a la SEQ ID NO: 2. En una modalidad particular, el genoma viral comprende la SEQ ID NO: 2.

En la presente también se proporciona una composición de vacuna contra el virus de la peste porcina africana (VPPA), que comprende un virus modificado genéticamente que comprende un genoma viral al menos 99 % idéntico a la SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, la cepa del VPPA es el aislado de VPPA-Georgia 2007.

En la presente se proporciona además un método para proteger cerdos contra el VPPA que comprende administrar a un cerdo una vacuna atenuada viva que comprende un virus genéticamente modificado, en donde el virus comprende un genoma viral al menos 99 % idéntico a la SEQ ID NO: 2 en una cantidad eficaz para proteger al cerdo de la enfermedad por VPPA clínica. En algunas modalidades, el VPPA es VPPA-G. En modalidades particulares, la cantidad eficaz para proteger al cerdo de la enfermedad por VPPA clínica es una vacuna que comprende  $10^2$ - $10^6$  HAD<sub>50</sub> del virus genéticamente modificado.

Una modalidad adicional provista en la presente es un virus mutante del VPPA recombinante, que comprende una mutación sintética en el marco de lectura abierto de I177L o en un elemento regulador que controla la expresión de la proteína I177L, lo que da como resultado un gen I177L genómico no funcional. En modalidades particulares, la mutación sintética es una mutación de eliminación que da como resultado la eliminación de uno o más nucleótidos entre las posiciones

174471 y 175004 de la SEQ ID NO:1. En otras modalidades, la mutación sintética es una mutación de desplazamiento de marco, una mutación de inserción, una mutación sin sentido de uno o más nucleótidos entre las posiciones 174471 y 175004 de la SEQ ID NO:1. En algunas modalidades, el VPPA mutante es un aislado de VPPA-Georgia. En modalidades específicas, el VPPA mutante comprende un genoma al menos 95 % idéntico o al menos 99 % idéntico a la SEQ ID NO: 2.

En la presente se proporciona además una composición de vacuna contra el VPPA-G que comprende un virus mutante VPPA recombinante, que comprende una mutación sintética en el marco de lectura abierto de I177L o en un elemento regulador que controla la expresión de la proteína I177L, lo que da como resultado un gen I177L genómico no funcional.

En la presente también se proporciona un método para proteger cerdos contra el VPPA que comprende administrar a un cerdo una vacuna atenuada viva que comprende un virus mutante VPPA recombinante, que comprende una mutación sintética en el marco de lectura abierto de I177L o en un elemento regulador que controla la expresión de la proteína I177L, lo que da como resultado un gen I177L genómico no funcional en una cantidad eficaz para proteger a dicho cerdo de la enfermedad del VPPA clínica. En modalidades particulares, el VPPA es VPPA-G. En algunas modalidades, la cantidad eficaz para proteger al cerdo de la enfermedad del VPPA clínica es una vacuna que comprende  $10^2$ - $10^6$  HAD<sub>50</sub> del virus genéticamente modificado.

### INCORPORACIÓN MEDIANTE REFERENCIA

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan en la presente mediante referencia en la misma medida que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se indicara de forma individual como incorporada mediante referencia.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

El archivo de solicitud de patente contiene al menos un dibujo a color. Si se solicitara, y una vez efectuado el pago de la tasa necesaria, la oficina proporcionará copias de la presente publicación de patente o solicitud de patente con el o los dibujos a color.

En las reivindicaciones se establecen particularmente las características novedosas de la invención. Las características y ventajas de la presente invención se contemplan en la siguiente descripción detallada y las figuras adjuntas de las cuales:

La **Figura 1** proporciona una representación gráfica del casete usado para crear el virus mutante recombinante VPPA-G  $\Delta$ I177L.

La **Figura 2** proporciona una representación gráfica de características de crecimiento *in vitro* del VPPA-G- $\Delta$ I177L y el VPPA-G original. Se infectaron cultivos celulares de macrófagos de cerdo primarios (MOI=0.01) con cada uno de los virus y el rendimiento de los virus se tituló en los

momentos indicados después de la infección. Los datos representan las medias de tres experimentos independientes. Sensibilidad de detección viral:  $\geq 1.8 \log_{10}$  HAD<sub>50</sub>/ml.

La **Figura 3** proporciona una representación gráfica de titulaciones de viremia detectada en cerdos IM inoculados con 10<sup>2</sup> HAD<sub>50</sub> de VPPA-G-ΔI177L o 10<sup>2</sup> HAD<sub>50</sub> de VPPA-G. Cada curva representa valores de animales individuales en cada uno del grupo. Sensibilidad de detección viral:  $\geq \log_{10} 1.8$  log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml.

La **Figura 4** proporciona una representación gráfica de la cinética de los valores de temperatura corporal en cerdos IM inoculados con 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup> o 10<sup>6</sup> HAD<sub>50</sub> de VPPA-G-ΔI177L (símbolos rellenos), inoculados de forma simulada (centinelas, se muestran en rojo) o 10<sup>2</sup> HAD<sub>50</sub> de VPPA-G (símbolos vacíos) (paneles a la izquierda) y después de la exposición con 10<sup>2</sup> HAD<sub>50</sub> de VPPA-G (paneles a la derecha). Cada curva representa los valores de un animal individual en cada uno del grupo.

La **Figura 5** proporciona una representación gráfica de titulaciones de viremia detectada en cerdos IM inoculados con 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup> o 10<sup>6</sup> HAD<sub>50</sub> de VPPA-G-ΔI177L o 10<sup>2</sup> HAD<sub>50</sub> de VPPA-G. Viremia después de la exposición con 10<sup>2</sup> HAD<sub>50</sub> de VPPA-G. Cada curva representa valores de animales individuales en cada uno del grupo. Sensibilidad de detección viral:  $\geq \log_{10} 1.8$  TCID<sub>50</sub>/ml.

La **Figura 6** proporciona una representación gráfica de titulaciones de anticuerpo anti-VPPA (mediado por IgM se muestra en los paneles en la columna izquierda y mediado por IgG se muestra en los paneles en la columna derecha) detectada mediante ELISA en cerdos IM inoculados con 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup> o 10<sup>6</sup> HAD<sub>50</sub> de VPPA-G-ΔI177L. Respuesta del anticuerpo mediada por IgM. Cada curva representa valores para animales individuales en cada uno del grupo.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El virus de la peste porcina africana (VPPA) es el agente etológico de una enfermedad viral contagiosa y a menudo letal de cerdos domésticos que tiene consecuencias económicas significativas para la industria porcina. El control de la peste porcina africana (PPA) se ha visto obstaculizado por la inexistencia de vacunas. Se han informado previamente vacunas experimentales que se derivaban de VPPA atenuado vivo genéticamente modificado, adaptado por cultivo celular o de origen natural. Sin embargo, ninguna de estas vacunas se ha desarrollado para uso comercial. En la presente informamos el descubrimiento de que la eliminación de un gen previamente no caracterizado, I177L, del aislado de Georgia del aislado del VPPA (VPPA-G) altamente virulento produce su atenuación completa en cerdos. Los animales inoculados con el virus que carece de un gen I177L funcional – tal como el VPPA-G-ΔI177L mutante específico descrito en la presente – administrado de manera intramuscular (IM) sigue siendo clínicamente normal durante un período de observación de 28 días. Cabe destacar que los animales infectados con VPPA-G-ΔI177L se protegieron al exponerse con la cepa original virulenta VPPA-G.

En la presente se muestran y describen modalidades preferidas de la presente invención. Será evidente para los expertos en la técnica que tales modalidades se proporcionan solamente a modo de ejemplo. Resultará evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar diversas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Se pueden emplear diversas alternativas a las modalidades de la invención que se describen en la presente al poner en práctica la invención. Se pretende que las reivindicaciones incluidas definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes sean abarcados por estas.

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen los significados comúnmente entendidos por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. En la presente, se hace referencia a diversos materiales y metodologías conocidos por los expertos en la técnica. Los trabajos de referencia estándar que establecen los principios generales de la tecnología de ADN recombinante incluyen Sambrook et ál., «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y., 1989; Kaufman et ál., eds., «Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine», CRC Press, Boca Raton, 1995; y McPherson, ed., «Directed Mutagenesis: A Practical Approach», IRL Press, Oxford, 1991.

Se puede utilizar cualquier material y/o método adecuado conocido por los expertos en la técnica para llevar a cabo la presente invención. Se describen los materiales y/o métodos para practicar la presente invención. Es posible adquirir los materiales, reactivos y similares a los que se hace referencia en la descripción y los ejemplos que se encuentran más adelante de fuentes comerciales, salvo que se indique lo contrario. La presente invención explica los métodos y describe las herramientas para producir cepas genéticamente alteradas de VPPA.

Tal como se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el uso de las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluye referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Las expresiones «aislado», «purificado» o «biológicamente puro», tal como se utiliza en la presente, se refieren a un material que está básica o esencialmente libre de compuestos que normalmente acompañan el material mencionado cuando se encuentra en su estado original.

La expresión «alrededor de» se define como más o menos diez por ciento de un valor establecido. Por ejemplo, «alrededor de 1.0 g» significa «de 0.9 g a 1.1 g» y todos los valores dentro de ese intervalo, se indique de manera específica o no.

La expresión «un ácido nucleico que consiste esencialmente en», y las variaciones gramáticas de esta, significa ácidos nucleicos que difieren de una secuencia de ácido nucleico de referencia en 20

o menos residuos de ácido nucleico y también realizan la función de la secuencia de ácido nucleico de referencia. Tales variantes incluyen secuencias que son más cortas o largas que la secuencia de ácido nucleico de referencia, tienen residuos diferentes en posiciones particulares, o una combinación de estos.

5 El término «adyuvante» significa una sustancia o un vehículo que mejora la respuesta inmunitaria a un antígeno de manera no específica. Los adyuvantes pueden incluir una suspensión de minerales (alúmina, hidróxido de aluminio o fosfato) en los cuales se absorbe el antígeno; o una emulsión de agua en aceite en la cual la solución de antígeno se emulsiona en aceite mineral (por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund), a veces con la inclusión de micobacterias eliminadas (adyuvante  
10 completo de Freund) para mejorar aún más la antigenicidad. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores también pueden usarse como adyuvantes (por ejemplo, ver las patentes estadounidenses n.º 6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116; 6,339,068; 6,406,705; y 6,429,199). Los adyuvantes también incluyen moléculas biológicas, tales como moléculas coestimuladoras.

15 La expresión «administrar»/«administración» significa cualquier método para proporcionarle a un sujeto una sustancia, tal como un agente terapéutico mediante cualquier vía eficaz. Las vías de administración de ejemplo incluyen, de modo no taxativo, vías de inyección (tal como subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal e intravenosa), oral, intraductal, sublingual, rectal, transdérmica, intranasal, vaginal y de inhalación.

20 Las expresiones «secuencia de codificación» y «región de codificación» como se usan en la presente se refieren a secuencias de nucleótidos y secuencias de ácido nucleico, lo que incluye tanto ARN como ADN, que codifican información genética para la síntesis de un ARN, una proteína o cualquier parte de un ARN o proteína.

La expresión «cantidad eficaz» de una composición proporcionada en la presente se refiere a la  
25 cantidad de la composición capaz de realizar la función especificada para la cual se expresa una cantidad eficaz. La cantidad exacta requerida puede variar de composición a composición y de función a función, dependiendo de variables reconocidas tales como las composiciones y procesos implicados. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más aplicaciones. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad exacta, sin embargo, un experto en la técnica puede determinar  
30 una «cantidad eficaz» adecuada mediante experimentación de rutina.

Las expresiones «I177L», «VPPA I177L» y «I177L genómico» son sinónimos y se refieren al gen definido en la presente como la SEQ ID NO: 3 o cualquier versión de la SEQ ID NO: 3 con sustituciones de bases que dan como resultado una proteína con una secuencia idéntica a la SEQ ID NO: 4). Estas expresiones, en el contexto adecuado, también pueden referirse a versiones

modificadas de estas SEQ ID NO, tales como aquellas que comprenden eliminaciones, inserciones y otras modificaciones recombinantes. El marco de lectura abierto de I177L del VPPA-G codifica una proteína de 177 aminoácidos (SEQ ID NO: 4) y se ubica en la cadena inversa entre las posiciones de nucleótido 174471 y 175004 de la SEQ ID NO:1.

- 5 En el contexto de la presente invención, la expresión «I177L genómico no funcional» se refiere a un gen I177L modificado, ubicado en el genoma de un VPPA, en donde tal modificación del gen I177L del VPPA no da como resultado ningún producto génico de VPPA I177L o un producto génico VPPA I177L biológicamente no funcional en comparación con un gen I177L del VPPA funcional no modificado. Tales modificaciones pueden incluir, de manera no taxativa, la eliminación completa o
- 10 parcial de la secuencia de codificación, la interrupción del marco de lectura abierto (p. ej., mediante la inserción de una mutación de desplazamiento o inserción de un codón sin sentido), la modificación de elementos reguladores anteriores o posteriores y/o cualquier otro método conocido o concebible para inactivar o desactivar la expresión funcional del gen I177L del VPPA.

El término «inmuniza» significa tornar un sujeto protegido de una enfermedad infecciosa, tal como

15 mediante vacunación.

Para el fin de la presente invención, la «identidad de secuencia» de dos secuencias de ácido nucleico o nucleótidos relacionadas, expresada como un porcentaje, se refiere a la cantidad de posiciones en las dos secuencias alineadas de manera óptima que tienen residuos idénticos (x100) dividida entre la cantidad de posiciones comparadas. Un hueco, es decir, una posición en una alineación

20 donde un residuo está presente en una secuencia, pero no en la otra se considera una posición con residuos no idénticos. La alineación de las dos secuencias se realiza mediante el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, J Mol Biol, (1970) 48:3, 443-53). Una alineación de secuencias asistida por computadora puede realizarse de manera conveniente usando un programa de software estándar tal como GAP que es parte de Wisconsin Package Version 10.1 (Genetics

25 Computer Group, Madison, Wisconsin, EUA) usando la matriz de puntuación por defecto con una penalización por creación de huecos de 50 y una penalización por extensión de huecos de 3.

La frase «alto porcentaje de identidad» o «porcentaje de identidad alto», y variaciones gramáticas de esta en el contexto de dos polinucleótidos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos alrededor de 80 % de identidad, al menos alrededor de 81 %,

30 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de nucleótido o aminoácido, cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima, según se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En una modalidad de ejemplo, las secuencias tienen un alto porcentaje de identidad a lo largo de todas las secuencias de polipéptidos o polipéptidos.

El término «cerdo» puede generalmente referirse a cualquier miembro de la familia Suidae e incluye cerdos, puercos y jabalíes domesticados y salvajes.

Una «vacuna» se define en la presente como un agente biológico capaz de proporcionar una respuesta protectora en un animal al cual se le administró, pero que no es capaz de ocasionar una enfermedad grave. La administración de la vacuna da como resultado la inmunidad de la enfermedad. Por lo tanto, la vacuna estimula la producción de anticuerpos o la inmunidad celular contra el patógeno que ocasiona la enfermedad (p. ej., VPPA). La inmunidad se define en la presente como la inducción de niveles significativamente más altos de protección contra letalidad y síntomas clínicos después de la vacunación en una población de cerdos, en comparación con el grupo no vacunado. En particular, la vacuna de acuerdo con la invención protege a la mayoría de los animales vacunados contra el desarrollo de síntomas clínicos y letalidad de la enfermedad. La vacuna de la presente descripción es típicamente una vacuna contra virus mutante genéticamente modificado (recombinante).

En el contexto de la presente descripción, la expresión «no deficiente en su replicación» se refiere a un VPPA recombinante de origen no natural capaz de replicarse *in vitro* y/o *in vivo* y/o capaz de producir progenie viral, aunque tal producción de replicación y/o progenie viral puede ocurrir también a niveles reducidos en comparación con la cepa original no modificada. Por lo tanto, puede ser el caso que tal VPPA no sea deficiente en su replicación *in vitro*, p. ej., en un cultivo celular, aunque *in vivo* en un mamífero tal VPPA es parcialmente deficiente en su replicación, p. ej., dando como resultado una replicación y/o producción de progenie viral por debajo de los límites de detección.

Tal como se usa en la presente, la expresión «dosis mínima» o «dosis mínima eficaz» se refiere a una dosis que demuestra la ausencia de, o presencia mínima de, toxicidad al receptor, pero igual produce un resultado deseado (p. ej., inmunidad protectora).

#### Virus/Vacunas

En la presente se proporciona un virus VPPA-G  $\Delta$ I177L mutante novedoso (SEQ ID NO: 2), que resulta de la eliminación recombinante de una parte del gen I177L (SEQ ID NO: 3) del genoma del VPPA-G original (SEQ ID NO: 1). La secuencia de nucleótidos genómica de un VPPA-G  $\Delta$ I177L mutante recombinante específico (SEQ ID NO: 2) se describe en la presente y difiere de la secuencia de nucleótidos genómica que codifica el VPPA-G original (SEQ ID NO: 1). La proteína codificada por VPPA-G I177L de 177 aminoácidos (SEQ ID NO: 4) difiere de la proteína I177L mutante predicha codificada por la secuencia de nucleótidos mutante del VPPA-G  $\Delta$ I177L. Se prevé que la proteína I177L (SEQ ID NO: 6) del VPPA-G $\Delta$ I177L carece de los aminoácidos 112 a 150 de la proteína I177L de tipo salvaje. Dado que el casete p72Mcherry se inserta en esta posición (ver la sección de

Ejemplos), no se cree que se transcriba la región de codificación restante después de esta inserción, lo que resulta en la producción de la proteína I177L no funcional durante la infección viral.

La cepa mutante de ejemplo (VPPA-G  $\Delta$ I177L (SEQ ID NO: 2)) representa el género de las vacunas recombinantes en las que el gen I177L del VPPA no es funcional, lo que incluye, de modo no taxativo, mutantes de eliminación, mutantes sin sentido, mutantes de inserción, mutantes de desplazamiento de marco y otros mutantes que dan como resultado la no expresión de la proteína I177L o la expresión de una proteína I177L no funcional. Otros virus recombinantes previstos incluyen mutantes en elementos reguladores que dan como resultado la no expresión o no traducción de la proteína I177L.

Las modificaciones que se pretende impidan la expresión funcional de una proteína diana (p. ej., I177L) o la expresión reducida o la actividad reducida de una proteína diana pueden implicar mutaciones del ADN o el gen que codifica la proteína diana, lo que incluye la eliminación de todo o una parte de un gen diana, lo que incluye, de modo no taxativo, el marco de lectura abierto de un locus diana, reguladores transcripcionales tales como promotores de un locus diana, y cualesquiera otras secuencias de ácido nucleico reguladoras ubicadas 5' o 3' del marco de lectura abierto, la inserción de codones de terminación prematuros en el marco de lectura abierto e inserciones o eliminaciones que desplazan el marco de lectura lo que lleva a la terminación prematura de la traducción. Tales mutaciones de eliminación pueden lograrse usando cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Los niveles reducidos de la proteína diana o la actividad reducida de la proteína diana también pueden lograrse con mutaciones o inserciones puntuales en el ADN o la codificación genética de la proteína diana. Las variantes de mutación, inserción y eliminación de los genes y las secuencias de nucleótidos descritos pueden prepararse fácilmente mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las técnicas usadas para lograr niveles reducidos y/o actividad reducida de la proteína diana pueden incluir CRISPR/Cas, TALEN y nucleasa de dedos de Zn. Se encuentra dentro del conocimiento del experto en esta técnica elaborar mutaciones de mutación, de inserción y de eliminación que son equivalentes en función a las específicas descritas en la presente.

Los enfoques descritos en la presente que se usaron para crear una mutación de eliminación de I177L en VPPA-G se pueden usar en diferentes aislados del VPPA (tales como aislados que circulan en Asia, Europa o África), donde un I177L funcional se encuentra presente. Tales enfoques se pueden variar mediante metodologías conocidas en la técnica, tal como usando diferentes marcadores de selección que pueden seleccionar virus recombinantes mediante purificación tales como, de modo no taxativo, proteínas fluorescentes, enzimas tales como beta-glucuronidasa o beta-galactosida que pueden usarse con sustratos cromogénicos y marcadores de selección de fármacos.

Tales enfoques también pueden usarse para crear cualquier mutación al ORF de I177L, así como elementos reguladores que controlan la expresión y traducción del gen I177L que da como resultado una proteína I177L no funcional.

- Los mutantes de I177L (y alelos específicos de la cepa relacionados) en otras cepas y genotipos de VPPA también están comprendidos por la presente descripción. Las cepas de VPPA que comprenden mutaciones sintéticas en secuencias de ácido nucleico que exhiben al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 3 están comprendidos en la presente invención. Las cepas de VPPA que comprenden genomas completos con 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o una mayor identidad con la SEQ ID NO: 2 también están comprendidos en la presente invención.
- La presente descripción contempla además la combinación de un gen I177L no funcional con otras mutaciones recombinantes. Como tal, no son solo los virus de tipo salvaje que pueden modificarse como se describe en la presente, sino también cepas que contienen mutaciones de origen no natural en otros genes o regiones genómicas (ver, p. ej., la patente estadounidense n.º 9,814,771).
- La presente descripción dispone que tal VPPA-G  $\Delta$ I177L atenuado vivo diseñado de manera racional puede incorporarse a composiciones inmunogénicas para producir una vacuna eficaz para proteger un animal, tal como un cerdo, de una enfermedad de PPA clínica cuando se expone al VPPA-G. Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar un método para proteger un animal contra el VPPA-G al administrar una cantidad eficaz de vacuna contra el VPPA-G  $\Delta$ I177L atenuada viva diseñada de manera racional. En otra modalidad, la presente descripción proporciona un método para suscitar una respuesta inmunitaria en un animal, preferentemente de la familia Suidae (p. ej., cerdos domésticos (*Sus scrofa domesticus*), cerdos salvajes (*Sus scrofa scrofa*), jabalíes verrugosos (*Potamochoerus porcus*), potamoqueros de río (*Potamochoerus larvatus*), grandes cerdos de bosque (*Hylochoerus meinertzhageni*) así como porcinos salvajes). Tales métodos típicamente comprenderán administrar a tal animal las una o más composiciones inmunogénicas y vacunas contra el VPPA descritas en la presente.

- Un objeto adicional de la presente descripción es proporcionar un método para distinguir animales infectados con un VPPA de tipo salvaje de animales vacunados con un virus recombinante descrito en la presente. Tales metodologías para diferenciar animales infectados de vacunados (DIVA, por sus siglas en inglés) se pueden lograr mediante análisis serológicos que detectan la diferencia entre la proteína I177L de tipo salvaje y una proteína I177L mutante. De manera alternativa, tales metodologías pueden incluir enfoques de análisis genéticos tales como amplificación por PCR y la detección de diferentes productos basados. Típicamente, tales enfoques utilizan uno o más

conjuntos de cebadores que flanquean el sitio de una mutación y expanden la misma región, lo que da como resultado productos de diferentes longitudes o secuencias.

La o las composiciones inmunogénicas de la invención de la presente, sin importar los otros componentes incluidos, comprenden un VPPA recombinante con un gen/proteína I177L no funcional. Las proteínas I177L de la presente invención pueden comprender la totalidad de la SEQ ID NO: 4 y proteínas con 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad con respecto a la proteína de la SEQ ID NO: 4.

Las cantidades inmunogénicamente eficaces de las composiciones inmunogénicas descritas en la presente pueden variar en función de múltiples parámetros. En general, sin embargo, las cantidades eficaces por unidad de dosificación para la aplicación intramuscular pueden ser de alrededor de  $10^2$  de 50 % de dosis de hemadsorción («HAD<sub>50</sub>») a  $10^6$  HAD<sub>50</sub>. Se pueden usar una, dos o más unidades de dosificación para practicar las metodologías de la presente invención. Un experto en la técnica puede modificar fácilmente una unidad de dosificación para que se ajuste a un volumen o maza deseados. Sin importar los parámetros de unidad de dosificación, las composiciones inmunogénicas descritas en la presente se pueden administrar en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunitaria.

Un experto en la técnica puede variar los niveles de dosificación de ingredientes activos en vacunas descritas en la presente para lograr un resultado deseado en un sujeto o por aplicación. Como tal, un nivel de dosificación seleccionado puede depender de una variedad de factores que incluyen, de manera no taxativa, formulación, combinación con otros tratamientos, gravedad de una condición preexistente y la presencia y ausencia de adyuvantes. En modalidades preferidas, se administra una dosis mínima de una composición inmunogénica. La determinación de una dosis mínima se encuentra dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

Las vacunas de la presente invención pueden prepararse mediante métodos convencionales usados para vacunas contra el VPPA atenuadas vivas disponibles comercialmente. En una modalidad específica, un sustrato susceptible es inoculado con un mutante del VPPA-G ΔI177L y se propaga hasta que el virus se replica a una titulación deseada después de lo cual se cosecha material que contenía VPPA-G ΔI177L. Luego de esto, el material cosechado se puede formular en una preparación de vacuna con propiedades inmunogénicas. Todo sustrato que puede admitir la replicación de los virus recombinantes proporcionados en la presente se puede usar en la presente invención, lo que incluye cultivos primarios de macrófagos de sangre periférica de cerdo o sangre de un cerdo infectado.

Formulaciones y administración

Una vacuna provista en la presente comprende uno de los virus recombinantes como se definió anteriormente en forma viva y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable habitualmente usado para tales composiciones. Los portadores incluyen estabilizantes, conservantes y amortiguadores. Los estabilizantes adecuados incluyen, por ejemplo, SGPA (sacarosa, fosfato, glutamato y albúmina, por sus siglas en inglés), carbohidratos (sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrano, glutamato y glucosa), proteínas (leche el polvo, suero, albúmina, caseína) o productos de la degradación de estos. Los amortiguadores adecuados incluyen, por ejemplo, fosfatos metálicos alcalinos. Los conservantes que se pueden usar incluyen, de modo no taxativo, timerosal, mertiolato y gentamicina. Los diluyentes incluyen agua, amortiguadores acuosos (p. ej., solución salina amortiguada), alcoholes y polioles (p. ej., glicerol).

En algunos casos, las vacunas de la presente invención también contienen o comprenden uno o más adyuvantes, lo que incluye cualquier material incluido en la formulación de composición inmunogénica que mejora una respuesta inmunitaria en el receptor que es inducida mediante la composición inmunogénica. En algunos casos, tales adyuvantes pueden incluir proteínas, otros componentes incluidos con el virus recombinante. Otros adyuvantes pueden incluirse como un componente extra de las composiciones inmunogénicas e incluyen tales categorías como sales de aluminio (alúmina), emulsiones de aceite, saponinas, complejos inmunoestimuladores (ISCOM, por sus siglas en inglés), liposomas, micropartículas, copolímeros de bloque no iónicos, polisacáridos derivados, citocinas y una amplia variedad de derivados bacterianos. Se puede usar cualquier adyuvante conocido en la técnica para practicar las invenciones descritas en la presente. Los factores que influyen la selección de un adyuvante incluyen especies de animales, el patógeno específico, el antígeno, la vía de inmunización y el tipo de inmunidad necesaria y los puede determinar fácilmente un experto en la técnica.

Las composiciones inmunogénicas de la presente descripción también pueden comprender portadores además del virus recombinante. Los portadores usados para practicar las composiciones inmunogénicas provistas en la presente pueden ser cualquiera conocido en la técnica y ser líquidos, sólidos, semisólidos o geles. El tipo de formulación se puede modificar dependiendo de la vía de administración del antígeno. Preferentemente, los portadores no son tóxicos para el receptor. Un experto en la técnica puede fácilmente elegir tales portadores para aplicar a animales receptores tales como aves de corral.

La presente descripción proporciona composiciones inmunogénicas para introducir un VPPA recombinante que carece un gen/proteína I177L funcional en una composición que contiene, como mínimo, el virus recombinante, en dianas (p. ej., cerdo). Por lo tanto, las composiciones provistas en la presente se pueden usar para inducir la inmunidad o la resistencia a la enfermedad del VPPA.

Las vacunas provistas en la presente se pueden administrar mediante vía intramuscular, subcutánea, intranasal o inyección en una cantidad que sea eficaz para proteger el animal contra la exposición mediante una cepa virulenta del VPPA. La vacuna se puede administrar de manera oral, a través de la inoculación oral directa, dosificada en agua potable o a través de sistemas de administración de cebo. La cantidad eficaz de virus recombinante puede variar de acuerdo con los parámetros considerados por los expertos en la técnica. Las cantidades eficaces se pueden determinar de manera experimental según sea necesario por los expertos en la técnica siguiendo cualquier método conocido o la orientación provista en los Ejemplos de la presente.

Luego de describir en términos generales la presente invención, esta será comprendida mejor mediante referencia a determinados ejemplos específicos, que se incluyen en la presente para ilustrar adicionalmente la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### 15 Cultivo celular y virus.

Los cultivos celulares de macrófagos de cerdo primarios se prepararon a partir de sangre de cerdo defibrinada como se describió previamente (Zsak et ál, J.Virol., (1998) 72:1028-35). En resumen, la sangre de cerdo tratada con heparina se incubó a 37 °C durante 1 hora para permitir la sedimentación de la fracción de eritrocitos. Los leucocitos mononucleares se separaron mediante flotación sobre un gradiente de densidad Ficoll-Paque (Pharmacia, Piscataway, N.J.) (gravedad específica, 1.079). La fracción celular de monocito/macrófago se cultivó en matraces de cultivo de tejido Primaria (Falcon; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, N.J.) de plástico que contenían medios de macrófago, compuestos de medio RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) con 30 % de sobrenadante L929 y 20 % de suero bovino fetal (HI-FBS, Thermo Scientific, Waltham, MA) durante 48 horas a 37 °C a 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células adherentes se separaron del plástico al usar EDTA 10 mM en solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) y luego se volvieron a sembrar en placas de 6 o 96 pocillos Primaria T25 a una densidad de 5x10<sup>6</sup> células por ml para uso en ensayos 24 horas después.

La titulación del virus se realizó en cultivos celulares de macrófagos de cerdo primarios en placas de 96 pocillos. Las diluciones y los cultivos de virus se realizaron usando medio de macrófagos. La presencia de virus se evaluó mediante hemadsorción (HA) y las titulaciones de virus se calcularon mediante el método de Reed y Muench (Amer. J. Hygiene, (1938) 27:493-497).

El VPPA Georgia (VPPA-G) usado para este estudio fue un aislado de campo provisto de manera amable por Dr. Nino Vepkhvadze, del Laboratorio del Ministerio de Agricultura (LMA, por sus siglas en inglés) de Tiflis, República de Georgia.

## Ejemplo 2

### 5 Construcción de un VPPA-G $\Delta$ I177L recombinante

Los VPPA recombinantes se generaron mediante recombinación homóloga secuencial entre el genoma del VPPA original y vectores de transferencia de recombinación en procedimientos de transfección e infección usando cultivos celulares de macrófagos de cerdo (Neilan et ál, Virol., (2004) 319:337-42; Zsak et ál, *supra*). Se usaron el vector de transferencia recombinante (p72GUS $\Delta$ I177L) que contenía las regiones genómicas flanqueantes que incluyen partes de mapeo de I177L a la izquierda (1 kbp) y la derecha (1 kbp) del gen y un casete de gen indicador que contenía el gen mCherry con el promotor del gen tardío p72 del VPPA, p72mCherry. Esta construcción creó una eliminación de 112 nucleótidos en el ORF de I177L (los residuos de aminoácidos 112 a 150) (**Figura 1**). El vector de transferencia recombinante p72mCherry $\Delta$ I177L se obtuvo mediante síntesis de ADN (Epoch Biosciences, Bothwell, WA, EUA). Los cultivos celulares de macrófagos se infectaron con VPPA-G y se transfectaron con p72mCherry $\Delta$ I177L. Los virus recombinantes que representan placas primarias independientes se purificaron hasta homogeneidad mediante rondas sucesivas de purificación de ensayo de placas. El virus recombinante se obtuvo después de 14 eventos de purificación por placa sucesiva en monocapas de cultivos celulares de macrófagos de cerdo primario.

## Ejemplo 3

Análisis de secuencia de genoma completo de VPPA-G  $\Delta$ I177L con respecto al VPPA-G original. Para evaluar la precisión de la modificación genética y la integridad del genoma del virus recombinante, las secuencias genómicas completas del VPPA-G  $\Delta$ I177L y el VPPA-G original fueron obtenidas usando secuencia de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) y se compararon. Como una primera etapa, se realizó una comparación de genoma de longitud completa entre la cepa de laboratorio de VPPA-G original usada para construir el virus mutante VPPA-G  $\Delta$ I177L y el VPPA Georgia 2007/1 original (Chapman et al, Emerg. Infect. Dis., (2001) 17:599-605; acceso de GenBank FR682468). Se obtuvo ADN del VPPA del citoplasma de células infectadas usando el método Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). La concentración de ADN se determinó usando el kit de ensayo HS de ADNcd Qubit® (Life Technologies) y se leyó en un fluorómetro 2 Qubit® (Life Technologies). En resumen, el ADN viral se cizalló usando reacciones enzimáticas evaluadas para la distribución de fragmentación de tamaño, luego el ligado de códigos de barra se agregó usando una secuencia del adaptador a los fragmentos de ADN. Usando un Pippin Prep™ (Sage Science,

Beverly, MA), se recolectó el intervalo de tamaño requerido de la biblioteca y se normalizó. Luego usamos esta biblioteca de ADN para secuenciación de NGS usando el NextSeq (Illumina, San Diego, CA) siguiendo el protocolo de los fabricantes. El análisis de secuencia se realizó usando software CLC Genomics Workbench (CLCBio, Waltham, MA).

- 5 Se observaron las siguientes diferencias entre estos dos virus (las ubicaciones de nucleótidos se proporcionaron en función del VPPA Georgia 2007/1, acceso GenBank FR682468?): (i) tres inserciones de nucleótido, T en la posición 433, un A en la posición 441 en un segmento no codificante del genoma y un A en la posición 174954 en el gen I177L, que ocasiona que I177L se fusione con el ORF ASFV\_G\_ACD\_01760, este nucleótido adicional permite que el ORF de I177L
- 10 se asemeje a un gen de longitud completa similar como otros aislados, como con el A adicional, no hay un codón de terminación temprano y una mutación fuera de marco como se describe en el genoma de referencia; (ii) dos eliminaciones de nucleótidos, T en la posición 1602 y T en la posición 1603 en el ORF del gen MGF 360-1L lo que da como resultado un desplazamiento de marco; (iii) una eliminación de nucleótido, T en la posición 1620 en el ORF del gen MGF 360-1L lo que da como
- 15 resultado un desplazamiento de marco; (iv) una mutación de nucleótido, A a G en la posición 97391 lo que da como resultado una mutación silenciosa en el ORF de B438L; (v) una mutación de nucleótido, C a G en la posición 166192 lo que da como resultado una sustitución de residuo (Ala a Pro) en la posición de residuo 85 en el ORF de E199L; y (vi) una inserción de nucleótido, en la posición 183303, un segmento no codificante del genoma.
- 20 Para determinar si el virus recombinante adquirió cambios genéticos adicionales de la cepa original, se realizó una comparación de genoma de longitud completa entre VPPA-G  $\Delta$ I177L y el VPPA-G original. Los ensamblajes de secuencia de ADN del VPPA-G  $\Delta$ I177L y el VPPA-G revelaron la eliminación de 112 nucleótidos en el gen I177L que corresponde con la modificación introducida. La secuencia de consenso del genoma del VPPA-G  $\Delta$ I177L mostró una inserción de 3944 nucleótidos
- 25 en el gen I177L que corresponde a la secuencia de casete de p72-mcherry introducida para generar una eliminación de 112 nucleótidos en el gen diana. Además de la inserción del casete, no se observaron diferencias adicionales entre genomas del VPPA-G  $\Delta$ I177L y el VPPA-G. En resumen, el virus VPPA-G  $\Delta$ I177L no acumuló ninguna mutación significativa durante el proceso de recombinación homóloga y purificación de placas.

#### 30 **Ejemplo 4**

Evaluación de virulencia del VPPA-G  $\Delta$ I177L en cerdos.

Los experimentos en animales se realizaron en condiciones de nivel de bioseguridad 3 en las instalaciones de animales en PIADC siguiendo por un protocolo aprobado por el Institutional Animal Care and Use Committee.

- Se evaluó VPPA-G  $\Delta$ I177L para detectar su fenotipo de virulencia con respecto al virus VPPA-G original virulento usando cerdo de raza comercial de 80-90 libras. Se inocularon cinco cerdos de manera intramuscular (IM) con  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  HAD<sub>50</sub> de VPPA-G  $\Delta$ I177L o con  $10^2$  HAD<sub>50</sub> de virus VPPA-G. Los signos clínicos (anorexia, depresión, fiebre, decoloración de piel violeta, marcha tambaleante, diarrea y tos) y los cambios en la temperatura corporal se registraron diariamente a lo largo del experimento. En los experimentos de protección, los animales se inocularon IM con  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  HAD<sub>50</sub> de VPPA-G  $\Delta$ I177L y 28 días después se expusieron IM a  $10^2$  HAD<sub>50</sub> de la cepa de VPPA-Georgia 2007 virulenta original. La presencia de signos clínicos asociados con la enfermedad se evaluó como se describió anteriormente.
- Todos los cerdos que se inocularon mediante IM con  $10^4$  HAD<sub>50</sub> del VPPA-G exhibieron mayor temperatura corporal ( $>104$  °F) a de 3 a 4 días después de la infección. Los cerdos presentaron signos clínicos asociados con la enfermedad, lo que incluye anorexia, depresión, decoloración de piel violeta, marcha tambaleante y diarrea (**Tabla 1**). Los signos de la enfermedad se agudizaron de manera progresiva a lo largo del tiempo y los animales murieron o se sometieron a eutanasia *in extremis* a 7 o 9 días después de la infección. Por el contrario, los animales inoculados mediante IM con  $10^2$ ,  $10^4$  o  $10^6$  HAD<sub>50</sub> de VPPA-G  $\Delta$ I177L no presentaron signos de enfermedad clínica durante el período de observación completo (21 días). Por lo tanto, la eliminación del gen I177L produjo una atenuación completa del VPPA-G virulento original. Todos los animales en el grupo vacunado de forma simulada se sometieron a eutanasia debido a razones humanitarias siguiendo el protocolo de IACUC correspondiente.

**Tabla 1.** Supervivencia de los cerdos y respuesta a la fiebre luego de la infección con dosis de  $10^2$  HAD<sub>50</sub> del VPPA-G- $\Delta$ I177L o el VPPA-G original.

| Virus                                           | N.º de supervivientes /total | Tiempo medio hasta la muerte (días $\pm$ SD) | Fiebre                                      |                                      |                                         |
|-------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|
|                                                 |                              |                                              | N.º de días hasta el inicio (días $\pm$ SD) | Duración N.º de días (días $\pm$ SD) | Temperatura diaria máxima (°F $\pm$ SD) |
| VPPA-G                                          | 0/5                          | 4.8 (0.84)                                   | 4.8 (0.84)                                  | 0.8 (0.84)                           | 105.2 (0.6)                             |
| VPPA-G- $\Delta$ I177L $10^2$ HAD <sub>50</sub> | 5/5                          | -                                            | -                                           | -                                    | 102.9 (0.5)                             |
| VPPA-G- $\Delta$ I177L $10^4$ HAD <sub>50</sub> | 5/5                          | -                                            | -                                           | -                                    | 102.8 (0.57)                            |
| VPPA-G- $\Delta$ I177L $10^6$ HAD <sub>50</sub> | 5/5                          | -                                            | -                                           | -                                    | 102.8 (0.49)                            |

Los animales infectados con VPPA-G presentaron titulaciones homogéneas elevadas esperadas ( $10^{7.5}$  -  $10^{8.5}$  HAD<sub>50</sub>/ml) el día 4 pi, aumentando (alrededor de  $10^{8.5}$  HAD<sub>50</sub>/ml) el día 7 pi cuando todos

los animales se sometieron a eutanasia. Por otro lado, el VPPA-G-ΔI177L reveló un patrón diferente con viremia baja ( $10^{1.8}$  -  $10^{2.3}$  HAD<sub>50</sub>/ml) el día 4 pi, llegando a valores pico ( $10^{3.8}$  -  $10^{7.5}$  HAD<sub>50</sub>/ml) el día 11 pi y luego titulaciones decrecientes ( $10^{2.3}$  -  $10^4$  HAD<sub>50</sub>/ml) hasta el día 28 pi (**Figura 3**). Nótese que uno de los cinco animales inoculados con VPPA-G-ΔI177L mostró una viremia notablemente menor (1,000 a 10,000 veces menor dependiendo del momento considerado) que los valores de viremia promedio de los otros animales en el grupo. Por lo tanto, la eliminación del gen I177L produjo la atenuación completa del virus VPPA-G altamente virulento original cuando se inocula a una dosis baja y los animales infectados presentan viremias prolongadas con valores relativamente bajos.

### Ejemplo 5

El efecto protector del VPPA-G ΔI177L contra la exposición con el VPPA-G original.

Dado que los cerdos inoculados por vía IM con  $10^2$  HAD<sub>50</sub>- $10^6$  HAD<sub>50</sub> de VPPA-G ΔI177L sobrevivieron la infección sin signos de la enfermedad, grupos de animales (n=5) inoculados con  $10^2$  HAD<sub>50</sub>- $10^6$  HAD<sub>50</sub> del VPPA-G ΔI177L se expusieron por vía IM a  $10^2$  HAD<sub>50</sub> de VPPA-G original el día 28 después de la inoculación (exposición homóloga). Cinco animales sin tratamiento que se expusieron usando la misma vía y dosis funcionaron como un grupo de control no inoculado/expuesto. Todos los animales se vacunaron IM con  $10^2$  HAD<sub>50</sub> del VPPA-G ΔI177L y se expusieron IM 28 días después a  $10^2$  HAD<sub>50</sub> del virus VPPA-G. Todos los animales en el grupo vacunado de forma simulada se sometieron a eutanasia por razones humanitarias siguiendo el protocolo de IACUC correspondiente. Todos los animales en el grupo vacunado con VPPA-G ΔI177L se mantuvieron clínicamente normales durante el período observacional de 21 días después de la exposición.

Los cinco animales expuestos e inoculados con VPPA-G ΔI177L se mantuvieron completamente asintomáticos durante el período observacional completo (21 días) (**Tabla 2**). Todos los animales en el grupo de control expuesto/inoculado de forma simulada desarrollaron la enfermedad con un curso clínico similar al observado en animales inoculados con  $10^2$  HAD<sub>50</sub> del VPPA-G (ver más arriba). Por lo tanto, el VPPA-G ΔI177L puede inducir protección contra la presentación de la enfermedad clínica cuando se expone al virus original extremadamente virulento.

**Tabla 2.** Supervivencia de los cerdos y respuesta a la fiebre en animales expuestos al virus VPPA-G a 28 días después de la infección con VPPA-G-ΔI177L.

| Virus | N.º de supervivientes/ total | de | Tiempo medio hasta la muerte (días ± SD) | Fiebre                                  |                                  |  | Temperatura diaria máxima (°F ± SD) |
|-------|------------------------------|----|------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|--|-------------------------------------|
|       |                              |    |                                          | N.º de días hasta el inicio (días ± SD) | Duración N.º de días (días ± SD) |  |                                     |

|                                   |       |                           |            |            |              |
|-----------------------------------|-------|---------------------------|------------|------------|--------------|
| Simulacro                         | 0/5   | 5.6 (0.55) <sup>(1)</sup> | 4.2 (0.84) | 1.4 (0.88) | 105.6 (0.78) |
| VPPA-G-ΔI177L                     | 10/10 | -                         | -          | -          | 102.7 (0.68) |
| 10 <sup>2</sup> HAD <sub>50</sub> |       |                           |            |            |              |
| VPPA-G-ΔI177L                     | 5/5   | -                         | -          | -          | 102.9 (0.37) |
| 10 <sup>4</sup> HAD <sub>50</sub> |       |                           |            |            |              |
| VPPA-G-ΔI177L                     | 5/5   | -                         | -          | -          | 103 (0.43)   |
| 10 <sup>6</sup> HAD <sub>50</sub> |       |                           |            |            |              |

El análisis de viremia en animales infectados con VPPA-G demostró titulaciones elevadas esperadas ( $10^{7.3}$  -  $10^{8.3}$  HAD<sub>50</sub>/ml) el día 4 pi, aumentando (con promedio de  $10^{8.5}$  HAD<sub>50</sub>/ml) al día 7 pi cuando todos los animales se sometieron a eutanasia. Después de la exposición, ninguno de los animales infectados con VPPA-G-ΔI177L tuvo viremias con valores mayores que los presentes en el momento de la exposición y los valores de viremia disminuyeron de manera progresiva hasta el final del período experimental (21 días después de la exposición) cuando, de manera importante, no se pudo detectar virus circulante en la sangre de ninguno de estos animales (**Figura 5**).

En resumen, en la presente presentamos evidencia de que la eliminación del gen I177L altera drásticamente la virulencia del VPPA-G lo que produce un virus completamente atenuado denominado VPPA-G ΔI177L. Los animales inmunizados con el VPPA-G ΔI177L se protegieron contra la exposición con el VPPA-G original virulento.

### Ejemplo 6

La capacidad del VPPA-G-I177L de crecer en macrófagos de cerdos

Las características de crecimiento *in vitro* del VPPA-G-ΔI177L se evaluaron en cultivos celulares de macrófagos de cerdo primarios, la célula primaria a la que se dirige el VPPA durante la infección en cerdos y se compararon con respecto al VPPA-G original en curvas de crecimiento de múltiples etapas (**Figura 2**). Los cultivos celulares se infectaron a un MOI (multiplicidad de infección, por sus siglas en inglés) de 0.01 y las muestras se recolectaron a 2, 24, 48, 72 y 96 horas después de la infección (hpi, por sus siglas en inglés). Los resultados demostraron que el VPPA-G-ΔI177L exhibió una disminución significativa en el crecimiento cinético en comparación con el VPPA-G original. La producción del VPPA-G-ΔI177L es aproximadamente de 100 a 1,000 veces menor que la del VPPA-G dependiendo del momento considerado.

Por lo tanto, la eliminación del gen I177L disminuyó significativamente la capacidad del VPPA-G-ΔI177L, con respecto al aislado de VPPA-G original, de replicar *in vitro* en cultivo celulares de macrófagos de cerdo primarios.

### Ejemplo 7

Los animales infectados con el VPPA-G-ΔI177L no diseminan el virus de la vacuna

En el ejemplo que precede donde diferentes grupos de cinco cerdos se infectaron IM con  $10^2$ ,  $10^4$  o  $10^6$  HAD<sub>50</sub> de VPPA-G-ΔI177L, un animal infectado de forma simulada cohabitó en cada uno de los grupos como centinela para detectar la liberación de virus potencial de los animales infectados. Todos los animales centinela se mantuvieron clínicamente normales (**Figura 4**). No se detectó virus en ninguna de las muestras obtenidas de animales centinela (todos los momentos de toma de muestras de sangre así como muestras de bazo y amígdalas se obtuvieron a 28 días pi), lo que indica que los animales infectados con VPPA-G-ΔI177L no pueden liberar suficiente virus para infectar cerdos sin tratamiento durante 28 días, un período de tiempo de cohabitación relativamente largo.

En resumen, un animal no vacunado que se mezcló con animales vacunados durante 28 días no presentó ningún síntoma clínico y toda la sangre muestreada, muestras de amígdalas y bazo fueron negativas para virus de la vacuna, lo que indica que el virus de la vacuna no pudo liberarse a un animal no vacunado.

### **Ejemplo 8**

La respuesta del anticuerpo hospedador en animales infectados con VPPA-G-ΔI177L

Todos los animales infectados con VPPA-G-ΔI177L, sin importar la dosis del virus recibido poseen titulaciones elevadas similares de anticuerpos anti-VPPA circulantes (**Figura 6**). La respuesta al anticuerpo, mediada por los isotipos IgM e IgG, comienza a detectarse en los tres grupos al día 12 pi. Al día 14 pi la respuesta mediada mediante ambos isotipos de anticuerpos alcanzaron niveles máximos en todos los grupos. La respuesta del anticuerpo mediada por IgM desapareció en todos los animales al día 21 pi, mientras que la respuesta mediada por IgG se mantuvo elevada con fluctuación mínima hasta el día 28 pi sin diferencias significativas entre animales en los tres grupos inoculados con VPPA-G-ΔI177L. Por lo tanto, existe una correlación cercana entre la presencia de los anticuerpos anti-VPPA en el momento de la exposición y la protección. Debería mencionarse que no se detectó ningún anticuerpo en ninguna muestra de suero obtenida de los animales centinela con la excepción de la muestra a 28 días después de la infección con VPPA en el grupo que recibe  $10^6$  HAD<sub>50</sub> de G-ΔI177L donde se observó la titulación de anticuerpo baja (**Figura 6**).

### **Ejemplo 9**

Inducción de inmunidad estéril

Usando una PCR en tiempo real específica I177L para detectar específicamente solo virus de exposición (lo que permite la detección de aproximadamente 10 HAD<sub>50</sub>) todas las muestras de sangre fueron negativas para la presencia de virus de exposición. Además, se obtuvieron muestras de las amígdalas y bazo de todos los animales al final del período observacional (21 días después de la exposición) y se analizaron para detectar la presencia del virus mediante el aislamiento del

virus en cultivos de macrófagos de cerdo. La mayoría de los animales en cada grupo mostraron presencia de virus infeccioso en las amígdalas o en el bazo (no se muestran los datos). Luego todas las muestras positivas se evaluaron usando la PCR en tiempo real específica para I177L lo que detectó la presencia del virus de exposición en solo un bazo que pertenece a uno de los animales infectados inicialmente con  $10^2$  HAD<sub>50</sub>/ml de VPPA-G-ΔI177L. Estos resultados sugieren que la replicación del virus de exposición estuvo ausente en todos los animales infectados que recibieron  $10^4$  HAD<sub>50</sub>/ml o más y la mayoría de los animales que recibieron  $10^2$  HAD<sub>50</sub>/ml de VPPA-G-ΔI177L. En resumen, la inmunidad estéril (inmunidad que no permite la replicación del virus de exposición) se logró parcialmente en animales vacunados con  $10^2$  HAD<sub>50</sub>/ml de VPPA-G-ΔI177L y se logró por completo a una dosis de  $10^4$  HAD<sub>50</sub>/ml o  $10^6$  HAD<sub>50</sub>/ml de VPPA-G-ΔI177L.

Mientras que la invención se describió con referencia a detalles de las modalidades ilustradas, esos detalles no pretenden limitar el alcance de la invención como se definió en las reivindicaciones adjuntas. Las modalidades de la descripción en la cual se reivindica la propiedad o privilegio exclusivo se definen como figura a continuación: