(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 971 606**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2017 PCT/US2017/039277**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.01.2018 WO18005358**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2017 E 17821008 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2023 EP 3478705**

(54) Título: **Cepa atenuada del virus de la peste porcina africana desarrollada racionalmente que protege contra la exposición al aislado del virus parental Georgia 2007**

(30) Prioridad:

01.07.2016 US 201615200407

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2024

(73) Titular/es:

THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE (50.0%)
1400 Independence Avenue, S.W.
Washington, DC 20250, US y
THE UNIVERSITY OF CONNECTICUT (50.0%)

(72) Inventor/es:

BORCA, MANUEL V.;
GLADUE, DOUGLAS P.;
HOLINKA-PATTERSON, LAUREN G.;
RISATTI, GUILLERMO R. y
O'DONNELL, VIVIAN K.

(74) Agente/Representante:

ANGOLOTI BENAVIDES, Joaquín

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepa atenuada del virus de la peste porcina africana desarrollada racionalmente que protege contra la exposición al aislado del virus parental Georgia 2007

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una vacuna recombinante de cepa candidata viva atenuada del virus de la peste porcina africana (ASFV, por sus siglas en inglés) para el aislado ASFV-G altamente virulento de Georgia 2007. La vacuna comprende el virus Δ9GLΔUK ASFV-G modificado, un virus recombinante ASFV-G modificado mediante la deleción de una gran parte del gen *9GL (8 119L)* y el gen *UK (OP96R)*.

Descripción del estado de la técnica

La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad vírica contagiosa de los cerdos. El agente causal, el virus ASF (ASFV), es un virus de gran tamaño, con envoltura, que contiene un genoma de ADN bicatenario de aproximadamente 190 pares de kilobases. El ASFV comparte aspectos de la estructura del genoma y de la estrategia de replicación con otros grandes virus de ADN bicatenario, incluyendo *Poxviridae*, *Iridoviridae* y *Phycodnaviridae* (Costard *et al.* 2009. Phil. Trans. Royal Soc. B 364:2683-2696). Las infecciones por ASFV en cerdos domésticos suelen ser mortales y se caracterizan por fiebre, hemorragias, ataxia y depresión grave. Sin embargo, el curso de la infección varía, desde altamente letal hasta subclínico, dependiendo de las características del huésped y de la cepa del virus en particular (Tulman *et al.* 2009. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 328:43-87).

Actualmente, la enfermedad es endémica en más de veinte países del África subsahariana. En Europa, la PPA sigue siendo endémica en la isla de Cerdeña (Italia) y desde 2007 se han declarado nuevos brotes en la región del Cáucaso, que afectan a Georgia, Armenia, Azerbaiyán y Rusia. Recientemente se han notificado brotes aislados en Ucrania, Bielorrusia, Lituania, Letonia y Polonia, lo que supone un riesgo de una mayor propagación a países vecinos. El virus epidémico, ASFV Georgia 2007/1, es un aislado altamente virulento que pertenece al genotipo II (Chapman *et al.* 2011. Emerging Infect. Ois. 17:599-605).

En la actualidad, no se dispone de una vacuna contra la PPA y los brotes de la enfermedad se controlan mediante la cuarentena y el sacrificio de los animales. Los intentos de vacunar animales utilizando extractos de células infectadas, sobrenadantes de leucocitos de sangre periférica de cerdos infectados, viriones purificados e inactivados, macrófagos infectados fijados con glutaraldehído o macrófagos alveolares infectados tratados con detergente no lograron inducir inmunidad protectora (Coggins, L. 1974. Prog. Med Virol. 18:48-63; Forman *et al.* 1982. Arch. Virol. 74:91-100; Kihm *et al.* 1987. En: African Swine Fever, Becker, Y. (ed), Martinus Nijhoff, Boston, págs. 127-144; Mebus, C. A. 1988. Adv. Virus Res. 35:251-269). Los cerdos que sobreviven a una infección vírica desarrollan una inmunidad protectora homóloga. Los cerdos que sobreviven a una infección aguda con variantes moderadamente virulentas o atenuadas del ASFV desarrollan resistencia a largo plazo a la exposición a virus homólogos, pero rara vez a virus heterólogos (Hamdy y Dardiri. 1984. Am. J. Vet. Res. 45:711-714; Ruiz- Gonzalvo *et al.*, 1981. En: FAOICEC Expert Consultation in ASF Research, Wilkinson, P. J. (ed), Roma, págs. 206-216). Los cerdos inmunizados con virus vivos atenuados de la PPA que contenían deleciones genéticamente modificadas de genes específicos asociados a la virulencia del virus de la PPA fueron protegidos cuando se expusieron a virus parentales homólogos. Concretamente, la deleción individual de los genes *UK (OP69R)*, *23-NL (DP71L)*, *TK (A240L)* o *9GL (B119L)* de los genomas de virus patógenos de la PPA (Malawi Lil-20/1, Pretoriuskop/96/4, E70 y Georgia 2007) atenuó notablemente el virus en cerdos y los animales inmunizados con estos virus atenuados fueron protegidos contra la exposición a virus homólogos (Moore *et al.* 1998. J. Virol. 72:10310-10315; Lewis *et al.* 2000. J. Virol. 74: 1275-1285; Zsak *et al.* 1996. J. Virol. 70: 8865-8871; Zsak *et al.* 1998. J. Virol. 72: 1028-1035). Estas observaciones constituyen la única prueba experimental que describe el desarrollo racional de un virus vivo atenuado eficaz contra el ASFV. El documento US 2016/082099 A1 y O'Donnell *et al.* 2015, J. Virol 89:8556-8566 se refieren a la construcción de un virus recombinante Δ9GL derivado del aislado altamente virulento ASFV Georgia 2007 (ASFV-G) en el que se han diseñado deleciones ΔUK adicionales. Zsak *et al* 2015, J. Virol 72:1028-1035 se refiere al uso de ΔUK ASFV-G como posible vacuna. O'Donnel *et al.* 2016, Virus Research 221:8-14 divulga que ΔGL ASFV-G con mutaciones adicionales da lugar a un virus atenuado con una protección subóptima.

En particular, la deleción de *9GL (B119L)* en aislados de ASFV altamente virulentos Malawi Lil-20/1, Pretoriuskop/96/4 y Georgia2007 (Lewis *et al.*, *supra*; Neilan *et al.* 2004. Virol. 319: 337-342; O'Donnell *et al.* 2015. J. Virol. 89: 8556-8566) dieron como resultado una atenuación completa de estos virus en cerdos. La administración de Malawi Lil-20/1Δ9GL o Pretoriuskop/96/4 Δ9GL o los mutantes E70 ΔUK a cerdos mediante inyección IM en una dosis de virus relativamente alta no indujo signos clínicos, y todos los animales sobrevivieron a la infección. Además, la inoculación IM de cerdos con estos virus indujo protección contra la exposición a virus parentales virulentos (Zsak *et al.* 1998, *supra*; Lewis *et al.*, *supra*; O'Donnell *et al.*, *supra*). Estas observaciones constituyen la única prueba experimental que describe el desarrollo racional de un virus vivo atenuado eficaz contra el ASFV.

Dado que no existen vacunas contra el ASFV actualmente disponibles, el desarrollo de cualquier vacuna experimental que pueda inducir cualquier tipo de protección contra la presentación letal de la enfermedad resulta de gran interés.

Sumario de la invención

La invención se expone en el juego de reivindicaciones adjunto. Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la presente invención. Las referencias a procedimientos de tratamiento en los siguientes párrafos de la presente descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para el diagnóstico).

Los presentes inventores han desarrollado el nuevo virus mutante recombinante Δ9GL/ΔUK ASFV-G, una modificación del ASFV-G (aislado del virus de la peste porcina africana-Georgia 2007).

De acuerdo con este descubrimiento, un objeto de la invención es proporcionar el nuevo virus mutante Δ9GL/ΔUK ASFV-G, resultante de la deleción de una gran parte tanto del gen *9GL (B119L)* como del gen *UK (OP96R)* del ASFV-G parental. La secuencia de nucleótidos de Δ9GL/ΔUK ASFV-G (SEQ ID NO: 3) difiere de la secuencia de nucleótidos que codifica el ASFV-G de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1). La proteína codificada por 9GL del ASFV-G (tipo salvaje) de 119 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) y la proteína codificada por UK del ASFV-G (tipo salvaje) de 95 aminoácidos (SEQ ID NO: 25) difieren de las proteínas mutantes 9GL y UK codificadas por la secuencia de nucleótidos mutante de Δ9GL/ΔUK ASFV-G (SEQ ID NO: 3). Un polipéptido 9GL mutante de 61 aminoácidos (SEQ ID NO: 4) es el resultado de la deleción del aminoácido n.º 11 al aminoácido n.º 68 del polipéptido 9GL de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2), y un polipéptido UK mutante de 10 aminoácidos (SEQ ID NO: 26) es el resultado de la deleción del aminoácido n.º 1 al aminoácido n.º 85 del polipéptido UK de tipo salvaje (SEQ ID NO:25).

Un objeto adicional de la invención es proporcionar composiciones inmunogénicas que comprenden un virus Δ9GL/ΔUK ASFV-G viable.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una vacuna viva atenuada de Δ9GL/ΔUK ASFV-G diseñada racionalmente y eficaz para proteger a un animal de la enfermedad PPA clínica cuando se expone al ASFV-G patógeno.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una vacuna con marcador genético que pueda distinguir potencialmente entre animales vacunados y animales infectados con ASFV-G.

Otro objeto de la invención es proporcionar una vacuna viva atenuada de Δ9GL/ΔUK ASFV-G para su uso en la protección de cerdos contra el ASFV-G, en la que la vacuna comprende un virus mutante Δ9GL/ΔUK ASFV-G.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un procedimiento para distinguir animales infectados con ASFV-G de animales vacunados con dicha vacuna viva atenuada de Δ9GL/ΔUK ASFV-G diseñada racionalmente, que comprende una estrategia genética DIVA para diferenciar animales vacunados de animales infectados tipo salvaje.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B muestran la alineación de secuencias de los polipéptidos codificados por el gen *9GL (B119L)* ASFV-G (Fig. 1A) y los polipéptidos codificados por el gen *UK (DP96R)* ASFV-G (Fig. 1B). Se compararon aislados de diversos orígenes temporales y geográficos, incluyendo los obtenidos de garrapatas y cerdos. La deleción parcial introducida en ASFV-G que produjo el virus Δ9GL/ΔUK ASFV-G se muestra entre paréntesis.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han desarrollado un virus atenuado que puede utilizarse como candidato a vacuna mediante el enfoque de dirigir los genes *9GL (B119L) ASFV-G* y *UK (OP96R) ASFV-G* para las modificaciones genéticas. En el presente documento, se presenta la construcción de un virus recombinante Δ9GL/ΔUK del aislado altamente virulento ASFV Georgia 2007 (ASFV-G). El Δ9GL/ΔUK ASFV-G administrado por vía intramuscular (IM) a cerdos en dosis relativamente altas (10^4 o 10^6 HAD_{50}) no induce la enfermedad. Los animales infectados con 10^4 o 10^6 HAD_{50} están protegidos contra la presentación de la enfermedad clínica cuando se exponen a los 28 días después de la infección con la cepa parental virulenta Georgia 2007.

Aunque se ha demostrado que la deleción independiente de cuatro genes diferentes del ASFV atenúa los virus virulentos y aunque las deleciones independientes de los genes NL (DP71L) (Zsak *et al.* 1996, *supra*) o UK (DP69R) (Zsak *et al.* 1998, *supra*) del ASFV E75, la deleción del gen TK (A240L) (Moore *et al.*, *supra*) del ASFV adaptado a células Vero, Malawi Lil-20/1 y Haití, y deleción del gen 9GL (B119L) también de los aislados Malawi Lil-20/1 (Lewis *et al.*, *supra*) y Pretoriuskop/96/4 (Neilan *et al.*, *supra*) dieron lugar a virus mutantes recombinantes por deleción con

una virulencia significativamente reducida en cerdos; en todos estos casos, los animales inoculados con cada uno de estos virus genéticamente modificados sobrevivieron a la infección y quedaron protegidos contra el ASFV cuando fueron expuestos al correspondiente virus parental virulento, es decir, a una exposición homóloga (Lewis *et al.*, *supra*; Moore *et al.*, *supra*; Neilan *et al.*, *supra*; Zsak *et al.* 1996, *supra*; Zsak *et al.* 1998, *supra*). Esos hallazgos sugieren que el desarrollo de virus recombinantes atenuados del ASFV mediante manipulaciones genéticas de genes diana constituye un enfoque eficaz para el desarrollo de vacunas.

Sin embargo, su nivel de eficacia en otros aislados del ASFV no es predecible. Por ejemplo, el producto del gen NL (DP71L) existe en dos formas diferentes, una forma larga (184 aminoácidos como en 23-NL) o una forma corta (de 70 a 72 aminoácidos), dependiendo del aislado del ASFV (Zsak *et al.* 1996, *supra*). Aunque la deleción de este gen en el aislado E70 ASFV (forma corta) produjo un virus atenuado, la deleción del gen NL (DP71L) del ASFV Malawi Lil-20/1 (forma larga) o Pretoriuskop/96/4 (forma corta) no dio lugar a la atenuación del virus (Afonso *et al.* 1998. J. Gen. Virol. 79 (Pt. 10):2543-2547). La deleción del gen TK (A240L), un gen altamente conservado entre todos los aislados del ASFV que intervienen en la síntesis del ADN, se ha introducido en los virus patógenos Malawi Lil-20/1 y Haití H811 adaptados a células Vero. El virus mutante Malawi Lil-20/1 era menos virulento *in vivo* que el virus revertiente (virus de tipo salvaje), pero no estaba completamente atenuado (Moore *et al.*, *supra*). El gen UK (DP69R) está situado en la región variable derecha de ciertos aislados del ASFV. La deleción de este gen de los aislados E70 ASFV produjo un virus que exhibía una virulencia reducida (Zsak *et al.* 1998, *supra*). Aunque el gen UK (DP69R) está conservado, no está presente en todos los aislados del ASFV (por ejemplo, Malawi Lil-20/1), lo que limita su uso como gen diana candidato para producir virus atenuados.

El gen 9GL *(B119L)* está altamente conservado entre los ASFV aislados y secuenciados hasta la fecha, incluidos aquellos procedentes tanto de garrapatas como de cerdos. El hecho de que la deleción del gen de los virulentos Malawi Lil-20/1 (Lewis *et al.*, *supra*) y Pretoriuskop/96/4 (Neilan *et al.*, *supra*) redujera eficazmente la virulencia en cerdos e indujera protección hizo del 9GL (B119L) un potente gen diana candidato para la modificación y producción de virus atenuados que pueden otorgar una protección eficaz contra el ASFV. De hecho, los inventores han constatado que la deleción de 9GL (B119L) del aislado ASFV-G no tenía el mismo efecto en términos de atenuación y protección que los notificados para Malawi Lil-20/1 y Pretoriuskop/96/4. Solo cuando se administró Δ9GL ASFV-G en dosis bajas a cerdos fue posible observar una disminución en la virulencia del virus (O'Donnell *et al.*, *supra*). Los inventores también habían demostrado que una dosis subletal de Δ9GL ASFV-G era capaz de inducir una protección eficaz contra la presentación de la enfermedad clínica tras la exposición al virus parental homólogo. Las proteínas NL codificadas por E70 (forma corta) y Malawi Lil-20/1 (forma larga) difieren significativamente y eso puede explicar las diferencias fenotípicas observadas en cerdos inoculados con los respectivos virus mutantes por deleción. Sin embargo, las matrices de identidad de proteínas indican que la proteína 9GL es muy similar entre los aislados del ASFV, donde ASFV-G, Malawi Lil-20/1 y Pretoriuskop/96/4 comparten más del 93 % de identidad de aminoácidos, lo que hace poco probable que la atenuación del ASFV se base únicamente en la divergencia de proteínas. Puesto que los fenotipos bien observados probablemente estén mediados por el efecto de múltiples genes (Lewis *et al.*, *supra*; Moore *et al.*, *supra*; Neilan *et al.*, *supra*; Zsak *et al.* 1996, *supra*; Zsak *et al.* 1998, *supra*), las pruebas acumuladas hasta ahora dificultan la formulación de conjeturas sobre cuál es realmente el espectro de los genes que median la virulencia en el aislado del ASFV Georgia 2007.

En resumen, en el presente documento se presentan pruebas de que la deleción tanto del gen 9GL (B119L) como del gen UK (DP69R) da lugar al virus recombinante Δ9GL/ΔUK ASFV-G atenuado. La administración intramuscular de Δ9GL/ΔUK ASFV-G a cerdos a dosis relativamente altas (10^4 o 10^6 HAD_{50}) no induce la enfermedad. Los animales infectados con 10^4 o 10^6 HAD_{50} están protegidos contra la presentación de la enfermedad clínica cuando se exponen a los 28 días después de la infección con la cepa parental virulenta Georgia 2007.

Una vacuna se define en el presente documento como un agente biológico capaz de proporcionar una respuesta protectora en un animal al que se le ha administrado y que no puede causar una enfermedad grave. La administración de la vacuna produce inmunidad contra una enfermedad; la vacuna estimula la producción de anticuerpos o la inmunidad celular contra el patógeno causante de la enfermedad. La inmunidad se define en el presente documento como la inducción de un nivel significativamente mayor de protección en una población de cerdos contra la mortalidad y los síntomas clínicos tras la vacunación en comparación con un grupo no vacunado. En particular, la vacuna según la invención protege a una gran proporción de animales vacunados contra la aparición de síntomas clínicos de la enfermedad y la mortalidad. La vacuna de la presente invención es una vacuna de virus mutante modificada genéticamente. Una vacuna con marcador genético se define como una vacuna que, junto con una prueba de diagnóstico, permite la diferenciación genética de animales vacunados de animales infectados. Puede utilizarse una mutación por deleción para diferenciar los animales infectados de los vacunados. Se entiende por mutación un cambio en la información genética de los genes 9GL (B119L) y UK (OP96R) "de tipo salvaje" o no modificados de una cepa parental del ASFV-G capaz de expresar proteínas 9GL y UK nativas. Por lo tanto, los polipéptidos 9GL y UK expresados por el virus mutante Δ9GL/ΔUK ASFV-G están modificados: la proteína 9GL de Δ9GL/ΔUK ASFV-G tiene menos aminoácidos que tanto el 9GL de tipo salvaje como el UK de tipo salvaje, ya que los aminoácidos n.º 11 a n.º 68 están suprimidos en el polipéptido 9GL de Δ9GL ASFV-G y los aminoácidos n.º 1 a n.º 85 están suprimidos en el polipéptido UK. El mutante Δ9GL/ΔUK ASFV-G recombinante de ASFV-G comprende nucleótidos que codifican mutaciones en los polipéptidos 9GL y UK ASFV-G. La mutación comprende una deleción de 58 aminoácidos de la proteína 9GL y una deleción de 85 aminoácidos de la proteína UK. El mutante

recombinante Δ9GL/ΔUK ASFV-G de ASFV-G es una vacuna viva atenuada contra el ASFV-G cuando se utiliza en dosis de inoculación IM de 10^4 HAD_{50} a 10^6 HAD_{50}.

Se proporciona una vacuna contra el ASFV-G que comprende un mutante Δ9GL/ΔUK ASFV-G como se define anteriormente en una forma viva, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La vacuna según la invención que contiene el virus vivo puede prepararse y comercializarse en forma de suspensión o en forma liofilizada y contiene, además, un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable utilizado habitualmente para tales composiciones. Los vehículos incluyen estabilizadores, conservantes y tampones. Estabilizadores adecuados son, por ejemplo, SPGA (sacarosa, fosfato, glutamato y albúmina humana), carbohidratos (como sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrano, glutamato o glucosa), proteínas (como suero lácteo desecado, albúmina o caseína) o productos de degradación de los mismos. Los tampones adecuados son, por ejemplo, fosfatos de metales alcalinos. Los conservantes adecuados son timerosal, mertiolato y gentamicina. Los diluyentes incluyen agua, tampón acuoso (como solución salina tamponada), alcoholes y polioles (como glicerol).

Si se desea, las vacunas vivas según la invención pueden contener un adyuvante. Los ejemplos de compuestos y composiciones adecuados con actividad adyuvante son bien conocidos en la técnica. Además, pueden incorporarse a la vacuna secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos para aplicaciones farmacéuticas o de diagnóstico, en particular inmunomoduladores tales como linfocinas, interferones o citocinas.

Una vacuna según la invención puede prepararse mediante procedimientos convencionales tales como los utilizados habitualmente para las vacunas vivas atenuadas contra el ASFV disponibles comercialmente. Brevemente, se inocula un sustrato susceptible con el mutante Δ9GL/ΔUK ASFV-G y se propaga hasta que el virus se ha replicado hasta un título deseado, tras lo cual se recolecta el material que contiene Δ9GL/ΔUK ASFV-G. Posteriormente, el material cosechado se formula en una preparación farmacéutica con propiedades inmunizantes.

En la presente invención puede utilizarse cualquier sustrato capaz de soportar la replicación de los virus Δ9GL/ΔUK ASFV-G, incluyendo los cultivos primarios de macrófagos de sangre periférica porcina.

La vacuna puede administrarse mediante inoculación o inyección intramuscular, subcutánea o intranasal en una cantidad que sea eficaz para proteger al animal contra la exposición a una cepa virulenta de ASFV-G. Esta cantidad puede variar según el animal inoculado, teniendo en cuenta el tamaño y peso del animal. La vacuna según la invención comprende una dosis eficaz del mutante Δ9GL/ΔUK ASFV-G como componente activo, es decir, una cantidad de material inmunizante Δ9GL/ΔUK ASFV-G que inducirá inmunidad en los animales vacunados, cerdos, contra la exposición a un ASFV-G virulento. La inmunidad se define en el presente documento como la inducción de un nivel significativamente mayor de protección en una población de cerdos contra la mortalidad y los síntomas clínicos tras la vacunación en comparación con un grupo no vacunado. En particular, la vacuna según la invención previene a una gran proporción de animales vacunados contra la aparición de síntomas clínicos de la enfermedad y la mortalidad. Normalmente, la vacuna viva puede administrarse en una dosis de 10^4 HAD_{50} a 10^6 HAD_{50}. Las cantidades eficaces pueden ser determinadas experimentalmente según sea necesario por los expertos en la materia siguiendo la guía proporcionada, por ejemplo, por el Ejemplo 6.

Además del mutante Δ9GL/ΔUK ASFV-G, la invención también puede incluir vacunas combinadas que comprenden una cepa de vacuna capaz de inducir protección contra otro patógeno porcino.

La vacuna Δ9GL/ΔUK ASFV-G descrita anteriormente, junto con un procedimiento de diagnóstico, tiene el potencial de distinguir entre animales que están vacunados con ella y animales que están infectados con cepas de ASFV-G de origen natural o vacunados con vacunas convencionales contra el ASFV-G.

La presente invención también proporciona una herramienta inestimable para supervisar las medidas de control del ASFV-G que pueden conducir a la erradicación del ASFV-G si se aplican en programas de erradicación a gran escala. Esta herramienta se refiere a un procedimiento para determinar la infección por ASFV-G en cerdos que comprende el paso de examinar una muestra del animal para detectar la presencia de nucleótidos que codifican las proteínas 9GL y UK ASFV-G de tipo salvaje frente al polinucleótido que codifica los polipéptidos Δ9GL y ΔUK ASFV-G más cortos debidos a deleciones en el gen 9GL (B119L) y los genes UK (DP96R) de Δ9GL/ΔUK ASFV-G. La muestra del animal utilizada en este procedimiento puede ser cualquier muestra en la que puedan detectarse mediante DIVA genético diferencias genéticas entre ASFV-G y Δ9GL/ΔUK ASFV-G que permitan diferenciar la infección natural de la vacunación.

EJEMPLOS

Una vez descrita de forma general la presente invención, la misma se entenderá mejor haciendo referencia a determinados ejemplos específicos, que se incluyen en el presente documento solo para ilustrar mejor la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

EJEMPLO 1

Cultivos celulares y virus

Se prepararon cultivos celulares primarios de macrófagos porcinos a partir de sangre porcina desfibrinada como se describió previamente por Zsak *et al.* (1996, *supra*). Brevemente, la sangre porcina 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 por flotación sobre un gradiente de densidad de Ficoll-Paque (Pharmacia, Piscataway, N.J.) (gravedad específica, 1,079). La fracción celular de monocitos/macrófagos se cultivó en matraces de cultivo de tejidos Primaria (Falcon; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, N.J.) de plástico que contenían medios de macrófagos, compuestos por medio RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) con un 30 % de sobrenadante de L929 y un 20 % de suero bovino fetal (HI-FBS, Thermo Scientific, Waltham, MA) durante 48 horas a 37 °C bajo un 5 % de CO_2. Las células adherentes se separaron del plástico utilizando EDTA 10 mM en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se volvieron a sembrar en placas Primaria T25 de 6 o 96 pocillos a una densidad de 5 x 10^6 células por ml para su uso en ensayos 24 horas después.

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

El ASFV Georgia (ASFV-G) fue un aislado de campo amablemente proporcionado por el Dr. Nino Vepkhvadze, del Laboratorio del Ministerio de Agricultura (LMA) en Tbilisi, República de Georgia.

EJEMPLO 2

Construcción del Δ9GL/ΔUK ASFV-G recombinante

Se generaron ASFV recombinantes por recombinación homóloga secuencial entre el genoma parental de ASFV y vectores de transferencia de recombinación en procedimientos de infección y transfección utilizando cultivos de células de macrófagos porcinos (Neilan *et al.*, *supra*; Zsak *et al.* 1996, *supra*). En primer lugar, se utilizó un vector de transferencia recombinante (p72GUSΔ9GL) que contenía regiones genómicas flanqueantes que incluían porciones de 9GL mapeadas a la izquierda (1,2 kpb) y a la derecha (1,15 kpb) del gen y un casete de gen marcador que contenía el gen de la β-glucuronidasa (GUS) con el promotor del gen tardío p72 del ASFV, p72GUS. Esta construcción creó una deleción de 173 nucleótidos en el ORF 9GL (residuos de aminoácidos 11 a 68) (véase la Fig. 1). El vector de transferencia recombinante p72GUSΔ9GL se obtuvo mediante síntesis de ADN (GenScript, Piscataway, NJ, EE. UU.). Se infectaron cultivos celulares de macrófagos con ASFV-G y se transfectaron con p72GUSΔ9GL. Los virus recombinantes que representan placas primarias independientes se purificaron hasta la homogeneidad mediante rondas sucesivas de purificación por ensayo de placas. El virus recombinante se obtuvo después de 11 eventos sucesivos de purificación de placas en monocapas de cultivos ceulares primarios de macrófagos porcinos. El virus recombinante intermedio producido, Δ9GL ASFV-G, se utilizó entonces como virus parental en procedimientos infecciosos/transfección utilizando un vector de transferencia recombinante que produciría la deleción del gen UK del genoma del virus. Se utilizó un vector de transferencia recombinante (p72mCherryΔUK) que contenía regiones genómicas flanqueantes de UK mapeadas a la izquierda (1,156 kpb) y a la derecha (1,190 kpb) del gen y un casete de gen marcador que contenía el gen mCherry con el promotor del gen tardío p72 del ASFV, p72mCherry. El vector de transferencia recombinante p72mCheryΔUK se obtuvo mediante síntesis de ADN (GenScript, Piscataway, NJ, EE. UU.). Esta construcción creó una deleción de 255 nucleótidos en el ORF UK (residuos de aminoácidos 1 a 85) (véase la Fig. 1). El segundo evento de recombinación reemplazó el gen UK por el casete que contenía el gen fluorescente mCherry bajo el promotor p72 del ASFV. El virus recombinante se seleccionó después de 10 rondas de purificación por dilución limitante basada en la actividad fluorescente. La población de virus obtenida de la última ronda de purificación se amplificó en cultivos celulares primarios de macrófagos porcinos para obtener una reserva de virus.

EJEMPLO 3

Análisis completo de la secuencia del genoma: Δ9GL/ΔUK ASFV-G relativo al ASFV-G parental

Para evaluar la precisión de la modificación genética y la integridad del genoma del virus recombinante, se obtuvieron secuencias genómicas completas de Δ9GL/ΔUK ASFV-G y ASFV-G parental utilizando secuenciación de próxima generación (NGS) y se compararon (Tabla 1). En primer lugar, se realizó una comparación del genoma completo entre ASFV-G parental y ASFV Georgia 2007/1 (Chapman *et al.*, *supra*). El ADN del ASFV se obtuvo del citoplasma de células infectadas mediante el procedimiento Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU.). La concentración de ADN se determinó utilizando el kit de ensayo Qubit® dsDNA HS (Life Technologies) y se leyó en un fluorómetro Qubit® 2 (Life Technologies). Un microgramo de ADN del virus se fragmentó enzimáticamente para obtener fragmentos de extremos romos en un rango de longitud de 200-300 pb utilizando el kit de reactivos Ion Shear™ Plus (Life Technologies) y se incubó a 37 °C en un ciclador térmico Peltier DNA Engine Tetrad 2. Tras el cizallamiento, la biblioteca de ADN fragmentado se cargó en un chip de ADN (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) y se analizó con un bioanalizador 2100 (Agilent) para evaluar la distribución y el rango de tamaño del ADN. El ADN

fragmentado se ligó a adaptadores compatibles con Ion y códigos de barras de biblioteca, tras lo cual se procedió a la reparación de mellas para completar la unión entre adaptadores e insertos de ADN utilizando el kit Ion Plus Fragment Library (Life Technologies). La biblioteca ligada al adaptador se seleccionó por tamaño para obtener una longitud óptima en casetes de gel de agarosa al 2 % (Sage Science, Beverly, MA, EE. UU.) utilizando el instrumento Pippin Prep™ (Sage Science). La concentración de la biblioteca se normalizó utilizando el kit Ion Library Equalizer™ (Life Technologies). A continuación, la biblioteca de ADN se amplificó clonalmente en partículas esféricas Ion Sphere™ Particles (ISP) generando ISP con plantilla positiva utilizando el kit Ion PGM™ Template OneTouch™ 2 200 (Life Technologies) con el instrumento Ion OneTouch™ 2 (Life Technologies). Antes de proceder al enriquecimiento, se realizó una evaluación de la calidad de los ISP con plantilla positiva no enriquecida utilizando el kit de ensayo de control de calidad Ion Sphere™ (Life Technologies) y un instrumento Qubit® 2 Fluorometer. A continuación, las ISP con plantilla positiva se enriquecieron utilizando el kit Ion PGM™ Template OneTouch™ 2 200 (Life Technologies) y el instrumento Ion OneTouch™ ES (Life Technologies) para eliminar las ISP con plantilla negativa y desnaturalizar el ADN en ISP con plantilla positiva. Utilizando el kit Ion PGM™ 200 Sequencing v2 (Life Technologies), se prepararon ISP de plantilla enriquecida para la secuenciación y se cargaron en Ion 314™ o Ion 316™ Chip v2 (Life Technologies) y se ejecutaron en el secuenciador Ion PGM™ (Life Technologies). A continuación, las secuencias obtenidas se recortaron utilizando las herramientas de manipulación y control de calidad NGS Galaxy (obtenido de Internet: usegalaxy.org/). Las secuencias se alinearon y analizaron utilizando el software Sequencher 5.2.2 (Genecodes) y CLC Genomics Workbench (CLCBio).

Se observaron las siguientes diferencias entre estos dos virus (las posiciones de nucleótidos se proporcionan en base a ASFV Georgia 2007/1, acceso a GenBank FR682468): (i) dos inserciones de nucleótidos, T en la posición 433 y A en la posición 441 en un segmento no codificante del genoma; (ii) dos deleciones de nucleótidos, T en la posición 1602 y T en la posición 1603 en el ORF del gen MGF 360-1L, que resulta en un desplazamiento del marco; (iii) una deleción del nucleótido T en la posición 1620 en el ORF del gen MGF 360-1L que resulta en un desplazamiento del marco; (iv) una mutación de nucleótidos, de A a G, en la posición 97391 que resulta en una mutación silenciosa en el ORF B438L; (v) una mutación de nucleótidos, de C a G, en la posición 166192 que resulta en una sustitución de residuos (Ala a Pro) en la posición de residuo 85 en el ORF E199L; y (vi) una inserción de nucleótidos, T en la posición 183303, un segmento no codificante del genoma (Tabla 1). En segundo lugar, se realizó una comparación del genoma completo entre el Δ9GL/ΔUK ASFV y el ASFV-G parental. Los conjuntos de secuencias de ADN de Δ9GL/ΔUK ASFV y ASFV-G revelaron una deleción de 173 nucleótidos en el gen 9GL correspondiente a la modificación introducida. La secuencia consenso del genoma del Δ9GL/ΔUK ASFV mostró una inserción de 2324 nucleótidos en el gen 9GL correspondiente a la secuencia del casete p72-βGUS introducida para generar una deleción de 173 nucleótidos en el gen objetivo. Además, los conjuntos de secuencias de ADN de Δ9GL/ΔUK ASFV-G y ASFV-G revelaron una deleción de 255 nucleótidos en el gen UK correspondiente a la modificación introducida. La secuencia consenso del genoma del Δ9GL/ΔUK ASFV-G mostró una inserción de 937 nucleótidos en el gen UK correspondiente a la secuencia del casete p72-mCherry introducida para generar una deleción de 255 nucleótidos en el gen objetivo. Aparte de la inserción del casete, solo se observó una diferencia adicional entre los genomas de Δ9GL/ΔUK ASFV-G y ASFV-G, una mutación del nucleótido G a C en la posición 36.465 que resultó en una sustitución del residuo (Glu a Gln) en la posición de residuo 224 en el ORF MGF 505-4R. En resumen, el virus Δ9GL/ΔUK ASFV-G no acumuló ninguna mutación significativa durante el proceso de recombinación homóloga y purificación de placas (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las diferencias entre la secuencia del genoma completo del Δ9GL/ΔUK ASFV-G y el ASFV-G parental en comparación con el ASFV Georgia07/1*

			Virus	
NPN*		**Tipo de modificación**	**ASFV-G**	**Δ9GL/ΔUK ASFV-G**
	433	Inserción T	+	+
	411	Inserción A	+	+
	1602	Deleción TT en MGF 360-1L FS@	+	+
	1620	Inserción T en MGF 360-1L FS	+	+
	36465	MGF 505-4R G a C Glu224Gln	-	+
	97391	B438L A a G SM#	+	+
	166192	E199L C a G Ala85Pro	+	+
	183303	Inserción T en un NCR+	+	+

* Número de posición nucleotídica (basado en la secuencia del aislado ASFV Georgia 2007/1 publicada por Chapman *et al.* 2011)
@ La modificación nucleotídica causa un desplazamiento de marco en el ORF correspondiente.
# La modificación nucleotídica causa una mutación silenciosa
+ Región no codificante

EJEMPLO 4

Evaluación de la virulencia del Δ9GL/ΔUK ASFV-G en cerdos

Se realizaron experimentos con animales en condiciones de nivel de bioseguridad 3 en las instalaciones para animales en el PIADC siguiendo un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal.

Se evaluó el fenotipo de virulencia de Δ9GL/ΔUK ASFV-G en relación con el virus parental virulento ASFV-G utilizando cerdos de raza comercial de 80-90 libras. Se inocularon cinco cerdos por vía intramuscular (IM) con 10^4 o 10^6 HAD_{50} de Δ9GL/ΔUK ASFV-G o con 10^4 HAD_{50} de ASFV-G. Los signos clínicos (anorexia, depresión, fiebre, decoloración morada de la piel, marcha tambaleante, diarrea y tos) y los cambios en la temperatura corporal se registraron diariamente durante todo el experimento. En experimentos de protección, los animales fueron inoculados IM con 10^4 HAD_{50} o 10^6 HAD_{50} y 28 días después se les administró por vía IM 10^3 HAD_{50} de la cepa virulenta parental ASFV Georgia 2007. La presencia de signos clínicos asociados con la enfermedad se realizó como se ha descrito anteriormente.

Todos los cerdos de 80 a 90 libras inoculados por vía IM con 10^4 HAD_{50} de ASFV-G exhibieron un aumento de la temperatura corporal (>104 °F) a los 3 o 4 días después de la infección. Los cerdos presentaron signos clínicos asociados con la enfermedad, incluyendo anorexia, depresión, decoloración morada de la piel, marcha tambaleante y diarrea (Tabla 2). Los signos de la enfermedad se agravaron progresivamente con el tiempo y los animales murieron o fueron sacrificados *in extremis* a los 7 o 9 días después de la infección. Por el contrario, los animales inoculados por vía IM con 10^4 o 10^6 HAD_{50} de Δ9GL/ΔUK ASFV-G no presentaron ningún signo de enfermedad clínica durante todo el periodo de observación (21 días). Por lo tanto, la deleción de los genes 9GL y UK produjo una atenuación completa del ASFV-G virulento parental. La deleción del gen UK aumenta la atenuación del Δ9GL ASFV-G hasta el punto de que 10^6 HAD_{50} de Δ9GL/ΔUK ASFV-G se atenuó completamente mientras que los animales inoculados con 10^4 HAD_{50} de Δ9GL ASFV-G presentaron un nivel variable de enfermedad (O'Donnell *et al.*, *supra*).

Tabla 2. Supervivencia porcina y respuesta a la fiebre después de la infección con virus Δ9GL/ΔUK ASFV-G y virus ASFV-G parentales.

			Fiebre		
Virus	n.º de supervivientes /Total	Tiempo medio total hasta la muerte (días ± DE)	n.º de días hasta la aparición (días ± DE)	Duración n.º de días (días ± DE)	Temperatura máxima diaria (°F ± DE)
ASFV-G 10^2 HAD_{50}	0/5	7,6 (0,55)	3,6 (0,55)	4 (0,5)	105,6 (0,7)
Δ9GL/ΔUK ASFV-G 10^4 HAD_{50}	5/5	-	-	-	103,2 (0,32)
Δ9GL/ΔUK ASFV-G 10^6 HAD_{50}	5/5	-	-	-	103,4 (0,59)

EJEMPLO 6

Eficacia protectora de Δ9GL/ΔUK ASFV-G contra la exposición al ASFV-G parental

Dado que los cerdos inoculados vía IM con 10^4 HAD_{50}-10^6 HAD_{50} de Δ9GL/ΔUK ASFV-G sobrevivieron a la infección sin signos de la enfermedad, grupos de animales (n=5) infectados con 10^4 o 10^6 HAD_{50} de Δ9GL/ΔUK ASFV-G fueron expuesto por vía IM a 10^3 HAD_{50} de ASFV-G parental el día 28 después de la inoculación (desafío homólogo). Cinco animales no inoculados que fueron expuestos por la misma vía y dosis sirvieron como grupo de control no inoculado/expuesto. Los cinco animales inoculados y expuestos al Δ9GL/ΔUK ASFV-G permanecieron completamente asintomáticos durante todo el periodo de observación (21 días), con la excepción de dos animales inmunizados con 10^6 HAD_{50} de Δ9GL/ΔUK ASFV-G que mostraron un leve y transitorio aumento de la temperatura corporal (Tabla 3). Todos los animales en el grupo de control simulado inoculado/expuesto desarrollaron la enfermedad con un curso clínico similar al observado en animales inoculados con 10^4 HAD_{50} de ASFV-G (véase más arriba). Por lo tanto, Δ9GL/ΔUK ASFV-G es capaz de inducir protección contra la presentación de enfermedad clínica cuando se expone al virus parental altamente virulento.

Tabla 3. Supervivencia porcina y respuesta a la fiebre en animales infectados con Δ9GL/ΔUK ASFV-G expuestos a virus ASFV-G parentales.

			Fiebre		
Virus	n.º de supervivientes /Total	Tiempo medio total hasta la muerte (días ± DE)	n.º de días hasta la aparición (días ± DE)	Duración n.º de días (días ± DE)	Temperatura máxima diaria (°F ± DE)
Simulado	0/5	7,6 (0,55)	3,6 (0,55)	5 (0,50)	105,6 (0,7)
Δ9GL/ΔUK ASFV-G 10^4 HAD_{50}	5/5	-	-	-	102,7 (0,63)
Δ9GL/ΔUK ASFV-G 10^6 HAD_{50}	5/5	-	10,5 (9,45)*	4 (2,84)*	103,6 (1,21)

*Los datos se basan en 2 de cada 5 animales que presentaron un aumento transitorio de la temperatura corporal.
#Los animales infectados IM con 10^4 o 10^6 HAD_{50} del virus Δ9GL/ΔUK ASFV-G fueron expuestos IM 28 días después con 10^3 HAD_{50} del virus ASFV-G.

En resumen, en el presente documento se presentan pruebas de que la deleción de los genes 9GL y UK altera drásticamente la virulencia del ASFV-G produciendo un virus completamente atenuado denominado Δ9GL/ΔUK ASFV-G. Los animales inmunizados con Δ9GL/ΔUK ASFV-G fueron protegidos contra la exposición al ASFV-G parental virulento.

La anterior descripción y determinadas realizaciones y detalles representativos de la invención han sido expuestos con fines ilustrativos y descriptivos de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Virus mutante recombinante Δ9GL/ΔUK del aislado de la peste porcina africana de Georgia 2007 (ASFV-G).

2. Virus mutante recombinante Δ9GL/ΔUK ASFV-G que tiene la SEQ ID NO: 3.

3. Composición de vacuna que comprende el virus mutante recombinante Δ9GL/ΔUK ASFV-G según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

4. Vacuna viva atenuada de Δ9GL/ΔUK ASFV-G para su uso en la protección de cerdos contra el ASFV-G, en la que la vacuna comprende el virus mutante recombinante Δ9GL/ΔUK ASFV-G según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en una cantidad eficaz para proteger a dichos cerdos de la ASFV-G clínica.

5. Vacuna para su uso según la reivindicación 4, en la que la cantidad eficaz para proteger a dichos cerdos de la ASFV-G clínica es de 10^4 HAD_{50} a 10^6 HAD_{50} del virus Δ9GL/ΔUK ASFV-G.

6. Procedimiento para diferenciar un mamífero vacunado con una vacuna viva atenuada de Δ9GL/ΔUK ASFV-G que comprende el virus mutante recombinante Δ9GL/ΔUK ASFV-G según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 de un mamífero no vacunado infectado con ASFV-G, comprendiendo dicho procedimiento: analizar una muestra de un mamífero de prueba que necesita ser evaluado, para determinar la presencia de un gen normalmente presente en el ASFV-G de tipo salvaje pero no en el virus Δ9GL/ΔUK ASFV-G utilizado para vacunar a dicho mamífero de prueba.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el paso de analizar dicha muestra se realiza con un ensayo basado en PCR.

8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el paso de análisis se realiza con un ensayo de detección de anticuerpos o un ELISA.

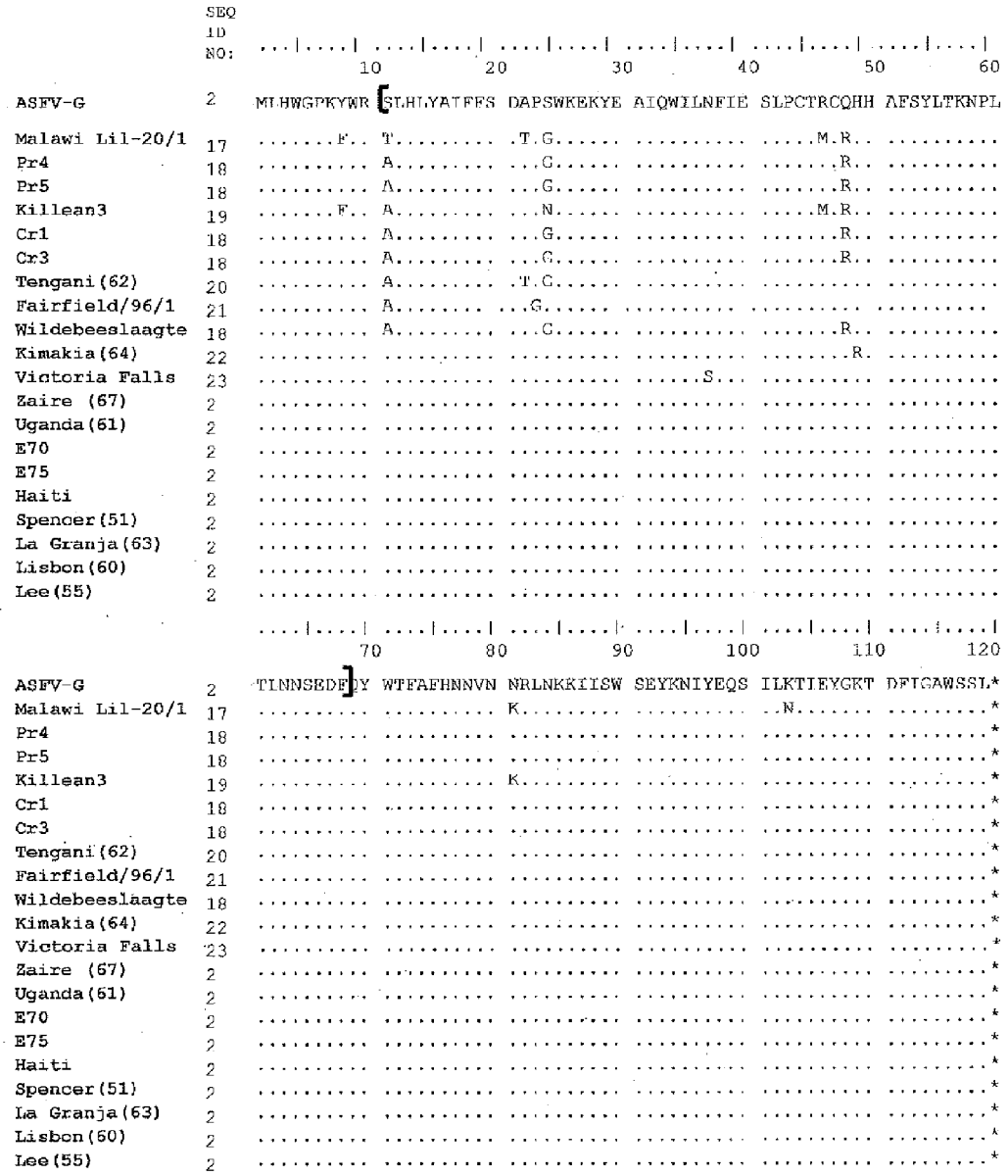
SEQ ID NO:
10 20 30 40 50 60
ASFV-G 2 MLHWGPKYWR GLHLYATFFS DAPSWKEKYE AIQWILNFIE SLPCTRCQHH AFSYLTKNPL
Malawi Lil-20/1 17 .....F.. T..... .T.G..... ....M.R.. .....
Pr4 18 ..... A..... ...G..... ....R.. .....
Pr5 18 ..... A..... ...G..... ....R.. .....
Killean3 19 .....F.. A..... ...N..... ....M.R.. .....
Cr1 18 ..... A..... ...G..... ....R.. .....
Cr3 18 ..... A..... ...G..... ....R.. .....
Tengani(62) 20 ..... A..... .T.G..... ....
Fairfield/96/1 21 ..... A..... ...G..... ....
Wildebeeslaagte 18 ..... A..... ...C..... ....R.. .....
Kimakia(64) 22 ....R. .....
Victoria Falls 23 ....S... ....
Zaire (67) 2 ....
Uganda(61) 2 ....
E70 2 ....
E75 2 ....
Haiti 2 ....
Spencer(51) 2 ....
La Granja(63) 2 ....
Lisbon(60) 2 ....
Lee(55) 2 ....
70 80 90 100 110 120
ASFV-G 2 TINNSEDEY WTFAFHNNVN NRLNKKIISW SEYKNIYEQS ILKTIEYGKT DFICAWSSL*
Malawi Lil-20/1 17 .... K..... ....N..... .....*
Pr4 18 ....*
Pr5 18 ....*
Killean3 19 .... K..... ....*
Cr1 18 ....*
Cr3 18 ....*
Tengani(62) 20 ....*
Fairfield/96/1 21 ....*
Wildebeeslaagte 18 ....*
Kimakia(64) 22 ....*
Victoria Falls 23 ....*
Zaire (67) 2 ....*
Uganda(61) 2 ....*
E70 2 ....*
E75 2 ....*
Haiti 2 ....*
Spencer(51) 2 ....*
La Granja(63) 2 ....*
Lisbon(60) 2 ....*
Lee(55) 2 ....*

Fig. 1A

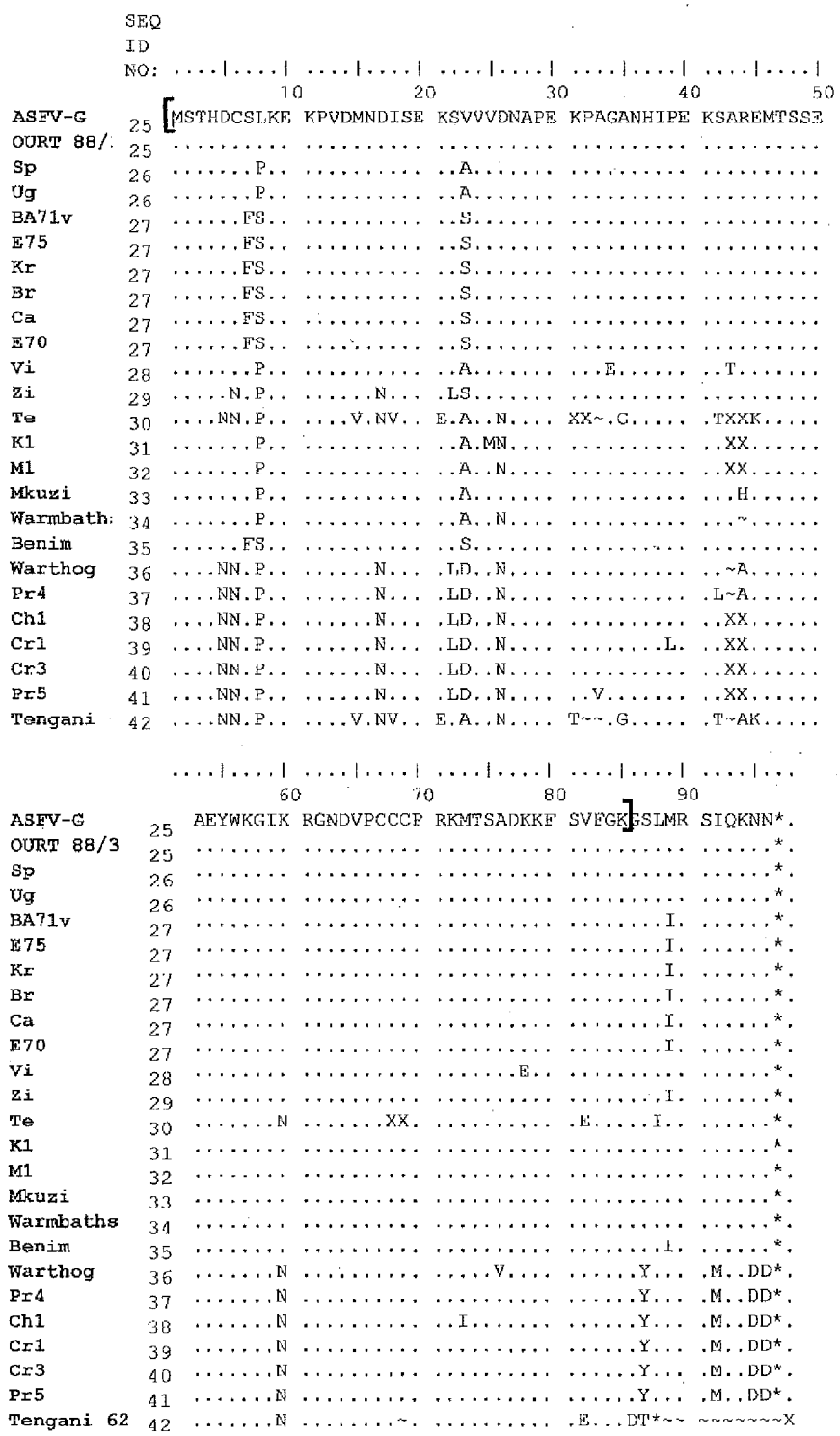
SEQ ID NO:
10 20 30 40 50
ASFV-G 25 MSTHDCSLKE KPVDMNDISE KSVVVDNAPE KPAGANHIPE KSAREMTSSE
OURT 88/3 25
Sp 26
Ug 26
BA71v 27
E75 27
Kr 27
Br 27
Ca 27
E70 27
Vi 28
Zi 29
Te 30
K1 31
M1 32
Mkuzi 33
Warmbaths 34
Benim 35
Warthog 36
Pr4 37
Ch1 38
Cr1 39
Cr3 40
Pr5 41
Tengani 42
60 70 80 90
ASFV-G 25 AEYWKGIK RGNDVPCCCP RKMTSADKKF SVFGKGSLMR SIQKNN*.
OURT 88/3 25
Sp 26
Ug 26
BA71v 27
E75 27
Kr 27
Br 27
Ca 27
E70 27
Vi 28
Zi 29
Te 30
K1 31
M1 32
Mkuzi 33
Warmbaths 34
Benim 35
Warthog 36
Pr4 37
Ch1 38
Cr1 39
Cr3 40
Pr5 41
Tengani 62 42

Fig. 1B