(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 337 113**

(21) Número de solicitud: 200701023

(51) Int. Cl.:
C07K 14/01 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **17.04.2007**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **20.04.2010**

Fecha de la concesión: **12.01.2011**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **24.01.2011**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **24.01.2011**

(73) Titular/es:
Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA)
Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona
Edifici CReSA
08193 Bellaterra, Barcelona, ES

(72) Inventor/es: **Marqués Arguilaget, Jordi;**
Fernández-Borges, Natalia;
Rodríguez González, Fernando y
Pérez Martín, Eva

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

(54) Título: **Empleo de la hemaglutinina del virus de la peste porcina africana como adyuvante.**

(57) Resumen:
Empleo de la hemaglutinina del virus de la peste porcina africana como adyuvante.
La invención se relaciona, en general, con el empleo de la hemaglutinina (HA) del virus de la peste porcina africana (VPPA) como adyuvante para potenciar la respuesta inmune frente a un antígeno en un sujeto. La invención proporciona una construcción génica que comprende la totalidad o parte de la secuencia codificante de dicha HA fusionada a la secuencia codificante de un antígeno. De aplicación en sanidad humana y animal.

ES 2 337 113 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Empleo de la hemaglutinina del virus de la peste porcina africana como adyuvante.

Campo de la invención

La invención se relaciona, en general, con el empleo de la hemaglutinina (HA) del virus de la peste porcina africana (VPPA) como adyuvante para potenciar la respuesta inmune frente a un antígeno en un sujeto. La invención también se relaciona con construcciones génicas que comprenden, completa o parcialmente, la secuencia codificante de dicha hemaglutinina viral fusionada a la secuencia codificante de un antígeno y con sus aplicaciones.

Antecedentes de la invención

Las vacunas constituyen un método exitoso y ampliamente aceptado en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas. Son efectivas y no inducen resistencia frente a antibióticos del patógeno diana o afectan a la flora habitual del hospedador. En muchos casos, tales como cuando se induce una inmunidad antiviral, las vacunas pueden prevenir una enfermedad para la que no existe un tratamiento curativo paliativo viable.

Las vacunas funcionan de manera que hacen que el sistema inmune desencadene una respuesta frente a un agente, o antígeno, típicamente un organismo infectivo o una porción del mismo que se introduce en el cuerpo en forma no infecciosa o patogénica. Una vez que se ha sensibilizado al sistema inmune con dicho agente, una exposición posterior en el tiempo a dicho organismo resulta en una respuesta inmune rápida y robusta que destruye al patógeno antes de que éste se pueda multiplicar e infectar suficientes células en el organismo hospedador como para causar síntomas de la enfermedad.

El agente, o antígeno, empleado para desarrollar la respuesta inmune puede ser el microorganismo que provoca la enfermedad en su forma completa en un estado menos infectivo, conocido como microorganismo atenuado, o, en algunos casos, componentes del organismo (en forma de subunidades), tales como hidratos de carbono, proteínas o péptidos que representan varios componentes estructurales del organismo. Asimismo, entre las nuevas tecnologías, merece la pena destacar la inmunización con plásmidos recombinantes de expresión transitoria o vacunas ADN.

Las vacunas ADN se basan en la inmunización con un plásmido que contiene la información genética de uno o varios genes que codifican proteínas inmunogénicas de uno o más patógenos determinados, frente al que (o a los que) se desea inducir una respuesta inmune protectora en el sujeto vacunado. Dicho plásmido actúa como un vector que vehiculiza la introducción de la información genética de interés al interior de las células del hospedador para su expresión, procesamiento y presentación al sistema inmune, en lo que sería una imitación de lo que ocurre durante la infección con el patógeno completo. La respuesta inmune generada, humoral o celular, prepara al sujeto vacunado para contrarrestar una infección con el patógeno, de manera que su utilización de forma profiláctica constituye una potencial herramienta a aplicar, sobre todo en aquellas enfermedades que requieren ambas ramas de la respuesta inmune, tales como las causadas por virus.

Es conocido el empleo de monofosforil lípido A o saponina QS-21 como adyuvantes químicos en vacunación con ADN. Asimismo, se ha descrito el uso de una formulación de liposomas catiónicos (DOTAP) en vacunación con ADN (Etchart *et al*. J. Gen. Virol. 1997, 78:1577-1580), observándose un efecto adyuvante cuando se administraba por vía oral, pero no cuando se administraba por vía intranasal. El DOTAP también se ha empleado en vacunas ADN que codifican la hemaglutinina del virus de la influenza, sin embargo, su administración inhibe la respuesta inmune.

La utilización de moléculas transportadoras o "carriers" capaces de dirigir específicamente el antígeno vacunal a las células presentadoras de antígeno (CPA), es decir, al "sitio" de inducción de una respuesta inmune en el organismo, presenta varias ventajas respecto a los adyuvantes clásicos utilizados hasta ahora. Por un lado, reducen la toxicidad al activar de una manera muy específica, local y controlada, únicamente a las células que expresan el receptor específico que reconoce el transportador, siendo por otro lado esas CPA las encargadas de presentar el antígeno vacunal al sistema inmune (Lew AM, Brady BJ, Boyle BJ. Site-directed immune responses in DNA vaccines encoding ligand-antigen fusions. Vaccine. 2000 Feb 25; 18(16): 1681-5.). Un buen ejemplo del éxito de este tipo de estrategias proviene de la utilización de la molécula CTLA4 como adyuvante en protocolos de vacunación con ADN, descrito inicialmente a final de los 90's (Boyle JS, Brady JL, Lew AM. Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusión antigen that is directed to sites of immune induction. Nature. 1998 Mar 26; 392(6674):408-11). A pesar de que ha sido demostrada la eficacia de la molécula de CTLA4 para dirigir los antígenos vacunales a las CPA que expresan sus receptores (B7.1 y B7.2), la utilización de este antígeno de superficie de linfocitos T como transportador podría tener efectos secundarios no deseados, tales como el bloqueo inespecífico de la respuesta T. De hecho, la misma molécula que se utiliza en protocolos de vacunación con ADN como adyuvante y transportador de antígenos, se ha propuesto recientemente como inmunosupresor en protocolos de transplante (Li S, Salgar SK, Thanikachalam M, Murdock AD, Gammie JS, Demetris AJ, Zeevi A, Pham SM. CTLA4-Ig-based conditioning regimen to induce tolerance to cardiac allografts. J Surg Res. 2006 Dec; 136(2):238-46. Epub 2006 Oct 13.), o para tratar procesos autoinmunes (Pollard LC. Inhibiting costimulatory activation of T cells: a viable treatment option for rheumatoid arthritis? Drugs. 2007; 67(1): 1-9.).

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de identificar nuevas moléculas transportadoras o "carriers" capaces de dirigir específicamente el antígeno vacunal a las CPA con el fin de potenciar la respuesta inmune frente a un antígeno en un sujeto.

Compendio de la invención

La invención se relaciona con una nueva estrategia vacunal que permite potenciar tanto la respuesta humoral (anticuerpos) como la respuesta celular inducida tras la vacunación.

Los inventores han encontrado que la hemaglutinina (HA) del virus de la peste porcina africana (VPPA) potencia la respuesta inmune frente a un antígeno en un sujeto, tanto la respuesta humoral como la respuesta celular inducida tras la vacunación con un antígeno, ejerciendo, por tanto, un efecto adyuvante cuando se utiliza en vacunación con ADN. Dicha HA del VPPA parece tener la capacidad de dirigir un antígeno específicamente a las CPA profesionales (macrófagos y células dendríticas, principalmente), lo que potencia la respuesta inmune frente a un antígeno en un sujeto. Aunque los inventores no desean estar vinculados por ninguna teoría, se cree que la capacidad de dicha HA del VPPA de dirigir antígenos específicamente a las CPA profesionales es debida a que dicha proteína presenta una elevada homología con el antígeno de superficie leucocitario CD2, el cual, como es conocido, tiene receptores en CPA.

En los ensayos realizados por los inventores se han desarrollado unas vacunas ADN fusionando un polinucleótido que codifica un antígeno determinado y un polinucleótido que codifica la fracción soluble de la HA (sHA) del VPPA, y se ha evaluado la respuesta inmune en cerdos inmunizados con dichas vacunas ADN (Ejemplo 1), observándose que, tras la inmunización de cerdos con dichas vacunas ADN, se produce una elevada respuesta inmune frente a dicho antígeno, mucho mayor que la observada en animales control, lo que pone de manifiesto que la respuesta de anticuerpos y la respuesta celular específicamente dirigida contra un antígeno tras la vacunación con ADN se potencia si dicho antígeno se fusiona a dicha HA de VPPA o a una variante funcionalmente equivalente de la misma.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica que comprende (a) un polinucleótido (A) seleccionado entre (i) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la hemaglutinina (HA) del virus de la peste porcina africana (VPPA); (ii) un fragmento funcionalmente equivalente de dicho polinucleótido definido en (i); y (iii) una variante funcionalmente equivalente de dicho polinucleótido definido en (i) que muestra una identidad mínima del 80% con respecto a la secuencia codificante de la HA del VPPA; y (b) un polinucleótido (B) que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende dicha construcción génica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión obtenible por expresión de dicha construcción génica o de la secuencia codificante contenida en dicho vector. El procedimiento para la producción de dicha proteína de fusión constituye un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora que contiene dicha construcción génica, dicho vector o dicha proteína de fusión.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dicha construcción génica, o de dicho vector, o de dicha proteína de fusión, o de dicha célula huésped junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de dicha construcción génica, o de dicho vector, o de dicha proteína de fusión, o de dicha célula hospedadora en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un organismo que expresa o contiene dicho antígeno.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para potenciar la respuesta inmune frente a un antígeno que comprende administrar a un sujeto dicha construcción génica en la que dicho polinucleótido (B) comprende la secuencia de nucleótidos que codifica dicho antígeno, o un vector que comprende dicha construcción génica, o una proteína de fusión tal como la mencionada previamente que comprende dicho antígeno.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la HA del VPPA, o de un fragmento funcionalmente equivalente de la misma, o de una variante funcionalmente equivalente de la misma que muestra una identidad mínima del 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la HA del VPPA, como adyuvante en la elaboración de una composición farmacéutica, tal como una vacuna o composición inmunoterapéutica que comprende un antígeno.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la HA del VPPA, o de un fragmento funcionalmente equivalente de la misma, o de una variante funcionalmente equivalente de la misma que muestra una identidad mínima del 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la HA del VPPA, como adyuvante en la elaboración de una composición para potenciar la respuesta inmune frente a un antígeno administrado conjuntamente con dicha composición potenciadora de la respuesta inmune.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce dicha proteína de fusión, con composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce

dicha proteína de fusión, y con el uso de dicho anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce dicha proteína de fusión en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un organismo que contiene el antígeno presente en dicha proteína de fusión.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula del sistema inmune aislada con capacidad para reconocer dicha proteína de fusión, con composiciones farmacéuticas que comprenden dicha célula del sistema inmune, y con el uso de dicha célula del sistema inmune en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un organismo que contiene el antígeno presente en dicha proteína de fusión.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra cómo las células que expresan la HA del VPPA son capaces de unir eritrocitos formando una típica imagen de roseta; además, muestra de forma esquemática la estrategia de fusión de la fracción soluble de la HA (sHA) del VPPA a un antígeno, prestando especial atención a los dominios de homología con el antígeno de superficie leucocitario CD2.

La Figura 2 ilustra esquemáticamente el fundamento de esta invención, basado en potenciar la respuesta inmune inducida contra un antígeno mediante su fusión a la fracción sHA del VPPA, aprovechando su posible capacidad "direccionadora" a las CPA.

La Figura 3 muestra esquemáticamente la proteína de fusión resultante de la fusión de (i) las proteínas p54 y p30 del VPPA que forman la proteína de fusión identificada como Proteína Quimera o PQ en esta descripción, y (ii) la fracción sHA del VPPA; dichas proteínas p54 y p30 son dos antígenos inmunorelevantes del VPPA lo que justifica la elección de dicha PQ como antígeno vacunal.

La Figura 4 es una representación esquemática del plásmido pCMV-PQ y el producto expresado (PQ), es decir, la proteína de fusión formada por las proteínas p54 y p30 del VPPA.

La Figura 5 es una representación esquemática del plásmido pCMV-sHAPQ y el producto expresado (sHAPQ), es decir, la proteína de fusión resultante de la fusión de (i) las proteínas p54 y p30 del VPPA (PQ) y (ii) la fracción sHA del VPPA.

La Figura 6 es una gráfica que muestra los resultados obtenidos al vacunar cerdos con distintas vacunas de ADN (pCMV-PQ, pCMV-sHAPQ y pCMV), observándose una elevada respuesta de anticuerpos inducida contra la proteína p30 del VPPA cuando se utiliza el plásmido pCMV-sHAPQ. Se representan las desviaciones estándar dentro de cada grupo (8 cerdos).

La Figura 7 es una gráfica que muestra los resultados obtenidos al vacunar cerdos con distintas vacunas de ADN (pCMV-PQ y pCMV-sHAPQ), observándose una mejor respuesta celular inducida contra la proteína p30 del VPPA cuando se utiliza el plásmido pCMV-sHAPQ. Se representan las desviaciones estándar dentro de cada grupo (8 cerdos).

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica, en adelante "construcción génica de la invención", que comprende:

a) un polinucleótido (A) seleccionado entre:

   (i) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la hemaglutinina (HA) del virus de la peste porcina africana (VPPA);

   (ii) un fragmento funcionalmente equivalente de dicho polinucleótido definido en (i); y

   (iii) una variante funcionalmente equivalente de dicho polinucleótido definido en (i) que muestra una identidad mínima del 80% con respecto a la secuencia codificante de la HA del VPPA; y

b) un polinucleótido (B) que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno.

El polinucleótido (A) comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la HA del VPPA, o un fragmento funcionalmente equivalente de dicha secuencia de nucleótidos que codifica la HA del VPPA, o una variante funcionalmente equivalente de dicha secuencia de nucleótidos que codifica la HA del VPPA que muestra una identidad mínima del 80% con respecto a la secuencia codificante de la HA del VPPA.

En una realización particular, el polinucleótido (A) comprende, o está constituido por, la secuencia de nucleótidos que codifica la HA del VPPA, longitud completa.

El término "HA del VPPA" se refiere, en general, a una proteína cuya secuencia de aminoácidos comprende o está constituida por la secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina (HA) del VPPA e incluye cualquier HA de cualquier cepa o aislado de VPPA, independientemente de su procedencia; dicha proteína (HA) es la responsable de la adhesión de eritrocitos a células infectadas (Ruiz-Gonzalvo F & Coll JM. Characterization of a soluble hemagglutinin induced in African swine fever virus-infected cells. Virology. 1993, 196(2):769-77; Ruiz-Gonzalvo F *et al*. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. Virology, 1996, 218:285-289).

Las dos primeras secuencias de la HA del VPPA fueron publicadas casi simultáneamente en 1994, correspondiendo con las secuencias procedentes de (i) un aislado español del VPPA aislado en Badajoz en 1971, adaptado a células Vero (Rodríguez JM *et al*. African swine fever viras encodes a CD2 homolog responsible for the adhesión of erythrocytes to infected cells. J Virol. 1993 Sep; 67(9):5312-20) y de (ii) un aislado africano virulento (Borca MV *et al*. An African swine fever virus gene with similarity to the T-lymphocyte surface antigen CD2 mediates hemadsorption. Virology. 1994; 199(2):463-8). A partir de ese momento, se ha secuenciado la HA de varios aislados hemadsorbentes (capaces de unirse a eritrocitos) cuyas secuencias mantienen un alto grado de similitud, caracterizadas todas por poseer una serie de dominios extracelulares con gran homología al antígeno de superficie linfocitaria CD2 (Borca *et al*., 1994, citado *supra*; Rodríguez *et al*., 2004, citado *supra*.). Así pues, la presente invención incluye la utilización de cualquier HA o fragmento funcionalmente equivalente de la HA del VPPA independientemente de su procedencia. En una realización particular, dicha HA del VPPA es la HA del aislado BA71 del VPPA, cuya secuencia de aminoácidos, longitud completa (SEQ ID NO: 1), puede encontrarse en NCBI, número de acceso L16864, junto con la secuencia de nucleótidos codificante de dicha HA del VPPA.

El término "VPPA", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere al virus de la peste porcina africana (VPPA) e incluye cualquier cepa de VPPA, independientemente de su procedencia, por ejemplo, la cepa española España 75 (E75), una cepa altamente virulenta, la cepa española BA71, que corresponde a una cepa de VPPA aislada en Badajoz en 1971 y adaptada a la línea celular estable Vero (V) de riñón de mono; dicha cepa (BA71) es apatógena y está secuenciada completamente (número de acceso U18466) (Yanez RJ *et al*. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. Virology. 1995 Apr 1; 208(1):249-78), etc.

En otra realización particular, el polinucleótido (A) comprende, o está constituido por un fragmento funcionalmente equivalente de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la HA del VPPA. Tal como aquí se utiliza, la expresión "fragmento funcionalmente equivalente de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la HA del VPPA" [o "fragmento funcionalmente equivalente de dicho polinucleótido definido en (i)", tal como se indica en la definición de la construcción génica de la invención] se refiere a un fragmento de un polinucleótido que comprende, o está constituido, por una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento funcionalmente equivalente de la HA del VPPA.

Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "fragmento funcionalmente equivalente de la HA del VPPA" se refiere a una parte o porción de la HA del VPPA que conserva la capacidad de dirigir o transportar un antígeno al que está unido a una CPA o a una secuencia que se obtiene a partir de dicha HA del VPPA mediante modificación de un número variable de residuos pero que también conserva la capacidad de dirigir o transportar un antígeno al que está unido a una CPA. Dicha capacidad para transportar el antígeno al que está unido a una CPA parece ser debida a la existencia en la HA del VPPA de unas regiones que presentan un alto grado de homología a los dominios de unión del antígeno leucocitario de superficie CD2 a sus receptores en CPA. Por tanto, en una realización particular, dicho fragmento funcionalmente equivalente contiene la secuencia comprendida entre los aminoácidos 21 y 204 de la HA del VPPA, región de la HA del VPPA sustancialmente homologa (es decir, que presenta un elevado grado de identidad) al dominio de unión de CD2 a sus receptores en las CPAs (Borca *et al*., 2004, citado *supra*, Rodríguez *et al*., 2004, citado *supra*). La capacidad para transportar el antígeno al que está unido dicho fragmento a una CPA y así inducir una respuesta inmune en animales se puede determinar mediante métodos convencionales tales como los ensayos descritos en el Ejemplo 1. En una realización particular, el fragmento funcionalmente equivalente de la HA de VPPA que mantiene la capacidad para transportar dicho antígeno a una CPA es un péptido que comprende, o está constituido por la secuencia comprendida entre los aminoácidos 21 y 204 de la HA del VPPA, denominado en esta descripción "fracción soluble de la hemaglutinina" (sHA) del VPPA (SEQ ID NO: 2).

En otra realización particular, el polinucleótido (A) comprende o está constituido por una variante funcionalmente equivalente de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la HA del VPPA que muestra una identidad mínima del 80% con respecto a la secuencia codificante de la HA del VPPA. En general, dicha variante funcionalmente equivalente de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la HA del VPPA que muestra una identidad mínima del 80% con respecto a la secuencia codificante de la HA del VPPA codifica una variante de la HA del VPPA que es funcionalmente equivalente a la HA del VPPA.

En otra realización particular, el polinucleótido (A) comprende o está constituido por una variante funcionalmente equivalente de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la HA del VPPA que muestra, al menos, un 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 92%, 94%, 96% ó 98% de identidad a nivel de la secuencia de nucleótidos que codifica la HA del VPPA.

El polinucleótido (B) comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno. El término "antígeno", tal como aquí se utiliza, se refiere a una molécula, de naturaleza peptídica o proteica, capaz de unirse a un anticuerpo o

a un receptor de células T cuando es presentado por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Por tanto, dicho término incluye cualquier sustancia, de naturaleza peptídica o proteica, capaz de ser reconocida por el sistema inmune de un sujeto y/o capaz de inducir en un sujeto una respuesta inmune humoral o una respuesta inmune celular que conduce a la activación de linfocitos B y/o T cuando se introduce en un sujeto, lo que puede requerir que, en ocasiones, el antígeno contenga o esté unido a un epítopo de células Th. Un antígeno puede tener uno o más epítopos (epítopos B y T).

A modo ilustrativo, no limitativo, dicho antígeno puede ser:

(a) un péptido o proteína capaz de (apropiado o diseñado para) inducir una respuesta inmune frente a una enfermedad infecciosa;

(b) un péptido o proteína capaz de (apropiado o diseñado para) inducir una respuesta inmune en animales, por ejemplo, seres humanos y animales domésticos, incluyendo animales de granjas y mascotas;

(c) un péptido o proteína capaz de (apropiado o diseñado para) inducir una respuesta inmune frente a una célula cancerosa;

(d) un péptido o proteína capaz de (apropiado o diseñado para) inducir una respuesta inmune frente a un alergeno;

(e) un péptido o proteína capaz de (apropiado o diseñado para) inducir una respuesta mejorada frente a un autoantígeno; o

(f) un fragmento (p ej., un dominio) de cualquiera de dichos péptidos o proteínas (a)-(e).

El término "péptido" o "proteína", tal como se utiliza en esta descripción, incluye modificaciones post-traduccionales del péptido o proteína, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares.

En una realización particular, dicho antígeno es un péptido o proteína capaz de (apropiado o diseñado para) inducir una respuesta inmune frente a una enfermedad infecciosa, tal como una enfermedad infecciosa en animales causada por microorganismos patógenos de animales, incluyendo el ser humano, por ejemplo, virus, bacterias, hongos, parásitos infecciosos, priones, etc., relevantes en sanidad humana o animal. Los antígenos expresados por la construcción génica de la invención son productos recombinantes, idénticos o similares a los antígenos naturales de un microorganismo, y capaces de inducir una respuesta inmune específica para ese microorganismo.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de virus infecciosos encontrados en animales incluyen virus de las familias:Arteriviridae, Retroviridae, Picornaviridae, Calciviridae, Togaviridae, Flaviridae, Coronoviridae, Rhabdoviradae, Filoviridae, Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae, Bungaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Hepadnaviridae, Parvoviridae (parvovirus), Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Iridoviridae, etc. Entre dichos virus infecciosos se encuentran patógenos de ganado porcino, por ejemplo, el virus de la peste porcina africana (VPPA), el virus de la peste porcina clásica (VPPC), el parvovirus porcino (PPV), el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), el virus de la enfermedad de Aujesky (ADV), el virus de la fiebre añosa (FDMV), el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV), el circovirus porcino, etc., patógenos de ganado bovino, tales como el virus de la diarrea viral bovina (BVDV), el virus de la rinotrqueitis bovina (IBRV), el virus de la lengua azul (BTV), etc., patógenos de conejos, tales como el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV), etc., patógenos de aves, por ejemplo, el virus de la bursitis infecciosa aviar (IBDV) o enfermedad de Gumboro, el pneumovirus aviar, etc.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de bacterias incluyen tanto bacterias Gram positivas, e.g., *Pasteurella sp*., *Staphylococcus sp*., *Streptococcus sp*., etc., como bacterias Gram negativas, e.g., *Escherichia coli, Pseudomonas sp*., *Salmonella sp*., etc. Ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi, Legionella pneumoplailia, Mycobacteria* sp. (e.g., *M. tuberculosis, M. avium, M. intracellulare, M. kansaii, M. gordonae*), *Staphylococcus aureus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogefaes* (Grupo A de Streptococcus), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B de Streptococcus), Streptococcus (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, Streptococcus (sp. anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae, Campylobacter sp*., *Enterococcus sp*., *Haemophilus influenzae, Bacillus aratracis*, *Corynebacteriumdiphtlzeriae, Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae, Clostridium perfringers, Clostridium tetani, Enterobacter aerogenes, Klebsiella pyzeunaoniae, Pasturella multocida, Bacteroides sp*., *Fusobacterium nucleatum, Streptobacillus moniliformis, Treponemapallidium, Treponema pertenue, Leptospira, Rickettsia, Actinornyces israelli, Chlamydia*, etc.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de hongos infecciosos incluyen *Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis, Chlamydia trachomatis* y *Candida albicans*.

Entre los parásitos infecciosos se incluyen, a modo ilustrativo, no limitativo, protozoos, tales como *Plasmodium sp*., causantes de la malaria, e.g. *P. falciparum, P. malariae, P. ovale, P. vivax*, etc., *Leishmania sp*., causantes de *lesihmaniasis*, e.g., *L. major, L. donovani, L. infantum, L. braziliensis, L. panamensis, L. mexicana*, etc., *Toxoplasma gondii, Schistosoma* sp., etc., así como nematodos parásitos, tales como *Dirojilaria immitis*, etc.

Los priones, o proteínas priónicas, son partículas acelulares, patógenas y transmisibles, que producen enfermedades que afectan al sistema nervioso central (SNC), entre las que se encuentran las encefalopatías espongiformes transmisibles. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades priónicas en seres humanos incluyen la enfermedad de Creutzeldt-Jakob (ECJ) clásica, la variante de la enfermedad de Creutzeldt-Jakob (ECJ), la enfermedad de Gertsmann-Straüssler-Scheinker, el insomnio familiar fatal, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades priónicas en otros animales la encefalopatía espongiforme bovina, la tembladera (scrapie) ovina, la encefalopatía transmisible de los visiones, la encefalopatía espongiforme felina, la encefalopatía espongiforme de ungulados, las enfermedades crónicas de desgaste (muías, ciervos, alces, etc.), etc.

En otra realización particular, dicho antígeno es un péptido o proteína capaz de (apropiado o diseñado para) inducir una respuesta inmune en animales, por ejemplo, seres humanos y animales domésticos, incluyendo animales de granjas y mascotas.

En otra realización particular, dicho antígeno es un péptido o proteína asociado a un tumor o a un cáncer ("marcador tumoral") capaz de (apropiado o diseñado para) inducir una respuesta inmune frente a una célula tumoral o cancerosa, por lo que la construcción génica de la invención puede ser utilizada en el tratamiento de cánceres mediante la estimulación de una respuesta inmune específica de antígeno frente a un antígeno tumoral. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de cánceres que podrían ser potencialmente tratados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen cáncer del tracto biliar, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de estómago, neoplasmas intraepiteliales, linfomas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (e. g., cáncer de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas), melanoma, neuroblastomas, cáncer de boca, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de recto, sarcomas, cáncer de piel, cáncer de testículos, cáncer de tiroides, y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas.

La selección de antígenos tumorales o determinantes antigénicos para el tratamiento de cánceres puede ser realizada por un experto en la materia a la vista del estado de la técnica [Renkvist *et al*., Cáncer Immunol. Immunother. 50:3-15 (2001)], estando dichos antígenos y determinantes antigénicos incluidos dentro del ámbito de la presente invención. Ejemplos representativos de dichos antígenos o determinantes antigénicos incluyen: Her2 (cáncer de mama); GD2 (neuroblastoma); EGF-R. (glioblastoma maligno); CEA (cáncer de tiroide medular); CD52 (leucemia); proteína gp100 de melanoma humano; proteína melan-A/MART-1 de melanoma humano; tirosinasa; proteína NA17-A; proteína MAGE-3; proteína p53; proteína HPV16E7; y fragmentos antigénicos de dichos péptidos o proteínas.

En otra realización particular, dicho antígeno es un péptido o proteína capaz de (apropiado o diseñado para) inducir una respuesta inmune frente a un alergeno.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "alérgeno" se refiere a un péptido o proteína a la que un sujeto es sensible y provoca una reacción inmunitaria, por ejemplo, extractos alergénicos de pólenes, extractos alergénicos de insectos, extractos alergénicos de alimentos o productos alimenticios, componentes presentes en saliva, pinzas o aguijones de insectos que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, componentes presentes en plantas que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de alergenos incluyen extractos proteicos de pólenes, e.g., de *Lolium perenne, Poa pratense, Phleum pratense, Cynodon dactylon, Festuca pratensis, Dactylis glomerata, Secale cereale, Hordeum vulgare, Avena sativa, Triticum sativa, Artemisia vulgaris, Chenopodium álbum, Plantago lanceolata, Taraxacum vulgare, Parietaria judaica, Salsola kali, Urtica dioica, Olea europea, Platanus sp*., *Cupressus sp*., etc.; extractos proteicos de insectos, e.g., de *Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, Acarus siro, Blomia tropicalis, Euroglyphus maynei, Glyciphagus domesticus, Lepidoglyphus destructor, Tyrophagus putrescentiae*, etc.; extractos proteicos de hongos o de epitelios animales, e.g., *Penicillium sp*., *Alternaria alternata, Cladosporium herbarum*, epitelio de perro, epitelio de gato, epitelio de caballo, etc.; extractos proteicos de alimentos o productos alimenticios, etc.

En otra realización particular, dicho antígeno es un péptido o proteína capaz de (apropiado o diseñado para) inducir una respuesta mejorada frente a un auto-antígeno. El término "auto-antígeno", tal como aquí se utiliza, se refiere a péptidos o proteínas codificados por el ADN del sujeto y productos generados por proteínas o RNA codificado por el ADN del sujeto. Ejemplos de auto-antígenos se describen en WO 02/56905.

En otra realización particular, dicho antígeno es un fragmento de cualquiera de dichos péptidos o proteínas (a)-(e) previamente definidos; en general, dicho fragmento incluirá un dominio antigénico de dichos péptidos o proteínas.

En otra realización particular, dicho antígeno es una proteína de fusión que comprende las proteínas p54 y p30 del VPPA.

La construcción génica de la invención comprende un polinucleótido (A) y un polinucleótido (B). Dichos polinucleótidos (A) y (B) pueden estar unidos en cualquier orden. Así, en una realización particular, el extremo 3' de dicho polinucleótido (A) está unido al extremo 5' de dicho polinucleótido (B), mientras que, en otra realización particular, el extremo 5' de dicho polinucleótido (A) está unido al extremo 3' de dicho polinucleótido (B). Ambos polinucleótidos (A) y (B) pueden estar unidos directamente o a través de un polinucleótido (C), que codifica para un péptido espaciador, entre dichos polinucleótidos (A) y (B). Ejemplos de péptidos espaciadores podrían ser desde péptidos marcadores frente a los cuales exista un anticuerpo específico que facilita el seguimiento de la expresión de la fusión (ej: c-myc),

hasta cualquier péptido que se genere artificialmente como consecuencia de la fusión de las secuencias específicas de la HA y del antígeno concreto.

En una realización particular, sería posible que el polinucleótido (B) comprendiera las secuencias de nucleótidos codificantes de dos o más antígenos (e.g., dispuestas en tándem), con el fin de inmunizar al animal frente a diferentes patógenos en una misma inmunización; y si, en teoría, e incluso que el polinucleótido (A) estuviera unido, por el extremo 5' a un polinucleótido (B) y por el extremo 3' a otro polinucleótido (B).

En una realización particular, la construcción génica de la invención comprende la secuencia de nucleótidos definida en SEQ ID NO: 5.

La construcción génica de la invención puede obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica [Sambrook *et al*., "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989] y, si se desea, puede ser insertada en un vector apropiado.

Por tanto, en otra realización particular, la invención se relaciona con un vector, en adelante "vector de la invención", que comprende una construcción génica de la invención. Dicho vector puede ser un vector de almacenamiento, multiplicación o expresión, típicamente, un vector de expresión, y, si se desea, puede ser utilizado para transformar células u organismos susceptibles de ser transformados por dicho vector. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas. En una realización particular, el vector de la invención es un vector útil para transformar células eucariotas, e.g., células animales, ventajosamente, células de mamíferos.

En una realización particular, el vector de la invención comprende una construcción génica de la invención operativamente unida a una secuencia reguladora, de la expresión de dichos polinucleótidos (A) y (B) [y, en su caso, (C)] constituyendo de este modo un "cassette" de expresión. Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión "operativamente unida" significa que la proteína codificada por dichos polinucleótidos (A) y (B) [y, en su caso, (C)], es expresada en el marco de lectura correcto bajo el control de las secuencias de control o reguladoras de expresión. Las secuencias de control o reguladoras de expresión son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción de una proteína, e incluyen secuencias promotoras, secuencias codificantes para reguladores transcripcionales, secuencias de unión a ribosomas (RBS) y/o secuencias terminadoras de transcripción. Aunque, en una realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos procariotas, por ejemplo, bacterias, etc., ventajosamente, en otra realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos eucariotas, por ejemplo, células de mamífero, líneas celulares de mamífero, etc.

Adicionalmente, si se desea, el vector de la invención comprende, además, un marcador o gen que codifica un motivo o un fenotipo que permita la selección y/o localización de las células u organismos transformados con dicho vector.

En una realización particular, el vector de la invención es un plásmido que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra (o no) en el genoma de dicha célula. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de vectores de la en los que puede insertarse la construcción génica de la invención incluyen el vector pCMV comercializado por Clontech.

La obtención del vector de la invención puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook *et al*., "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3].

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula, eucariota o procariota, que comprende la construcción génica de la invención o el vector de la invención. En una realización particular, dicha célula es una célula procariota, e.g., una célula bacteriana; en otra realización particular, dicha célula es una célula eucariota, tal como una célula animal, e.g., una célula de mamífero.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión, en adelante "proteína de fusión de la invención", codificada por la secuencia codificante presente en la construcción génica de la invención. Por tanto, dicha proteína de fusión de la invención comprende:

a) un polipéptido (A') seleccionado entre:

   (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina (HA) del virus de la peste porcina africana (VPPA);

   (ii) un fragmento funcionalmente equivalente de dicho polipéptido definido en (i); y

   (iii) una variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido definido en (i) que muestra una identidad mínima del 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la HA del VPPA; y

b) un polipéptido (B') que comprende la secuencia de aminoácidos de un antígeno.

En una realización particular, dicho polipéptido (A') comprende, o está constituido por, la secuencia de aminoácidos de la HA completa del VPPA; en una realización concreta, dicho polipéptido (A') comprende, o está constituido, por la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 que corresponde a la secuencia de aminoácidos de la HA del aislado BA71 del VPPA.

En otra realización particular, dicho polipéptido (A') comprende, o está constituido por, un fragmento funcionalmente equivalente de la HA del VPPA, tal como una región de la HA del VPPA que comprende la región homologa a los dominios de unión de CD2 a CPA; en una realización concreta, dicho polipéptido (A') comprende, o está constituido por, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 que corresponde a la secuencia de aminoácidos de la fracción sHA del VPPA.

En otra realización particular, dicho polipéptido (A') comprende, o está constituido por, una variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la HA del VPPA que muestra una identidad mínima del 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la HA del VPPA; en una realización concreta, dicho polipéptido (A') comprende una variante funcionalmente equivalente de la HA del VPPA que muestra, al menos, un 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 92%, 94%, 96% ó 98% de identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos de la HA del VPPA.

El polipéptido (B') comprende, o está constituido por, la secuencia de aminoácidos de un antígeno; en concreto, por el antígeno codificado por el polinucleótido (B) presente en la construcción génica de la invención. Por tanto, en una realización particular, dicho polipéptido (B') comprende, o está constituido, por la secuencia de aminoácidos de un antígeno tal como cualquiera de los definidos previamente en relación con el polinucleótido (B).

En una realización particular, el polipéptido (B') es una proteína de fusión que comprende las proteínas p54 y p30 del VPPA. En otra realización particular, el polipéptido de la invención tiene la secuencia SEQ ID NO: 4.

Dichos polipéptidos (A') y (B') pueden estar unidos en cualquier orden. Así, en una realización particular, el extremo carboxilo terminal de dicho polipéptido (A') está unido al extremo amino terminal de dicho polipéptido (B'), mientras que, en otra realización particular, el extremo amino terminal de dicho polipéptido (A') está unido al extremo carboxilo terminal de dicho polipéptido (B'). Ambos polipéptidos (A') y (B') pueden estar unidos directamente o a través de un polipéptido (C'), un péptido espaciador, entre dichos polipéptidos (A') y (B').

La proteína de fusión de la invención puede ser utilizada con fines terapéuticos, e.g., en la elaboración de vacunas y composiciones inmunoterapéuticas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedador, en adelante "célula hospedadora de la invención" que contiene la construcción génica de la invención, o el vector de la invención, o la proteína de fusión de la invención. Dicha célula hospedadora de la invención es capaz de expresar la proteína de la invención y puede ser obtenida mediante transformación, transfección o infección con un vector de la invención, tal como se ha mencionado previamente, por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrok *et al*., 1989]. Células hospedadoras adecuadas incluyen células procariotas, levaduras o células eucariotas, más preferentemente, una célula presentadora de antígenos (CPA). Para expresar la proteína de fusión de la invención pueden utilizarse diversos sistemas de expresión, por ejemplo, sistemas de expresión basados en el cultivo de células de insecto, células de mamíferos, etc. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas en células de insectos son bien conocidos en el estado de la técnica. Asimismo, algunos ejemplos de líneas celulares de mamíferos hospedadoras adecuadas incluyen pero no se limitan a células NS/0, células L, C127, 3T3, células de ovario de hámster chino (CHO), células embrionarias humanas de riñón (HEK-293), HeLa y BHK; células CV-1 (ATCC CCL70) y células COS-7, ambas derivadas de riñón de mono, etc. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula presentadora de antígenos (CPA), en particular, una célula dendrítica, un macrófago o una célula B, y, entre las células dendríticas, preferentemente, las células de Langerhans o células dendríticas foliculares, de la médula ósea o sanguíneas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir la proteína de fusión de la invención. En una realización particular, la proteína de fusión de la invención puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la expresión de la secuencia de nucleótidos de la construcción génica de la invención que codifica dicha proteína de fusión en células hospedadoras apropiadas. Así, la proteína de fusión de la invención se puede obtener mediante un procedimiento que comprende cultivar una célula hospedadora de la invención, que comprende la construcción génica de la invención o el vector de la invención, bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicha proteína. Si se desea, la proteína de fusión de la invención así obtenida puede ser aislada, y, opcionalmente, purificada, por métodos convencionales.

Alternativamente, la proteína de fusión de la invención puede ser obtenida por métodos convencionales de síntesis química de proteínas conocidos por los expertos en la materia. En una realización particular, podría ser conveniente o deseable que dicha proteína de fusión incluyera alguna secuencia peptídica que ayudara a su aislamiento o purificación (e.g., una cola de histidinas, un epítopo frente al que existan anticuerpos (p.ej., c-myc), etc.

En otro aspecto, la invención de relaciona con una composición farmacéutica, en adelante "composición farmacéutica de la invención", que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una construcción génica de la

invención, o de un vector de la invención, o de una proteína de fusión de la invención, o de una célula hospedadora de la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Para su administración a un sujeto, la composición farmacéutica de la invención se presentará en una forma farmacéutica de administración apropiada. Para ello, la, composición farmacéutica de la invención incluirá los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la elaboración de la forma farmacéutica de administración elegida. La forma farmacéutica de administración del componente activo (construcción génica de la invención, vector de la invención, proteína de fusión de la invención o célula hospedadora de la invención) presente en la composición farmacéutica de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo de posibilidades conocidas por los expertos en la materia, dependiendo, entre otros factores, de la naturaleza de dicho componente activo (ácido nucleico, proteína o célula) y de la vía de administración elegida. En este sentido, la composición farmacéutica de la invención puede ser administrada a un sujeto por cualquier vía de administración apropiada, e.g., oral, parenteral, etc.

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende una construcción génica de la invención o un vector de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En este caso, dicha construcción génica o vector de la invención puede ser administrada en forma de un ADN desnudo (es decir, simplemente diluido en una solución fisiológica), administrado en cualquiera de sus posibles formas y utilizando las más diversas vías de inoculación (revisadas en la página web: www.dnavaccine.com). En general, para su administración a un sujeto, la construcción génica de la invención estará incluida en un vector de la invención apropiado para su administración a un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, dicho vector de la invención puede ser un vector viral, por ejemplo, un vector basado en un retrovirus, o en un adenovirus, etc., o un vector no viral, e.g., un complejo ADN-liposoma, un complejo ADN-polímero, un complejo ADN-polímero-liposoma, etc. [véase "Nonviral Vectors for Gene Therapy", editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)]. Dichos vectores pueden ser administrados directamente al sujeto por métodos convencionales. Alternativamente, dichos vectores pueden ser utilizados para transformar, transfectar o infectar células, por ejemplo, células de mamíferos, *ex vivo*, y, posteriormente implantarlas en el cuerpo animal para obtener el efecto terapéutico deseado. Para su administración al sujeto receptor dichas células se formularán en un medio adecuado que no afecte adversamente a la viabilidad de dichas células.

En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende una proteína de fusión de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En este caso, la composición farmacéutica de la invención puede ser formulada, a modo ilustrativo no limitativo, en una forma farmacéutica de administración sólida (e.g., comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, etc.) o líquida (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.) para su administración por vía oral, parenteral (e.g., intramuscular, subcutánea, intravenosa, etc.), etc. En cada caso se elegirán los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para la forma farmacéutica de administración y vía de administración elegida. Información sobre dichos vehículos y excipientes, así como sobre dichas formas farmacéuticas de administración de la proteína de fusión de la invención puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos, en general, y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende una célula hospedadora de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las células hospedadoras de la invención pueden ser administradas al sujeto para que expresen la proteína de fusión directamente sobre el propio sujeto.

La composición farmacéutica de la invención comprende, al menos, un componente activo, tal como una construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula hospedadora de la invención o una proteína de fusión de la invención, en una cantidad terapéuticamente efectiva. Tal como aquí se utiliza, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de componente activo calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias del componente activo y el efecto terapéutico a conseguir. Por tanto, la dosis de componente activo a administrar a un sujeto será una cantidad terapéuticamente efectiva y puede variar dentro de un amplio intervalo. La composición farmacéutica de la invención se puede administrar una o más veces al día con fines preventivos o terapéuticos. La dosis de componente activo a administrar dependerá de numerosos factores, entre los que se incluyen las características del producto a administrar, tales como, por ejemplo, su actividad y vida media biológica, la concentración del producto en la composición farmacéutica, la forma farmacéutica de administración elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben ser consideradas tan solo como guías para el experto en la materia, y éste debe ajustar las dosis en función de las variables citadas anteriormente. A modo simplemente ilustrativo, no limitativo, en una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar una o más veces al día, en una cantidad típica comprendida entre 100 μg y 1.000 μg de vector/sujeto, preferentemente, entre 200 μg y 800 μg vector/sujeto aunque pueden surgir variaciones dependiendo de la respuesta del sujeto individual a dicha composición farmacéutica, así como del tipo de la formulación farmacéutica elegida y del periodo de tiempo e intervalo en el cual se efectúa tal administración. La dosis de composición farmacéutica de la invención puede ser repetida, dependiendo del estado del sujeto y su evolución, a intervalos de tiempo (días, semanas o meses) que tendrán que ser establecidos en cada caso por el especialista. A modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo, la composición farmacéutica de esta invención se administrará, en general, de una a hasta cuatro dosis de vacuna cada día.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "sujeto" incluye a cualquier animal que posee sistema inmunitario, preferentemente, mamíferos, por ejemplo, suidos (p. ej., cerdos, etc.).

Aunque, en principio, la composición farmacéutica de la invención puede ser utilizado para tratar cualquier sujeto, en una realización particular, la composición farmacéutica de la invención es especialmente útil para tratar suidos (e.g., cerdos, etc.).

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una construcción génica de la invención, o de un vector de la invención, o de una proteína de fusión de la invención o de una célula hospedadora de la invención, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de una enfermedad causada por un organismo que expresa o contiene dicho antígeno. En una realización particular, dicha construcción génica de la invención, vector de la invención, célula hospedadora de la invención o proteína de fusión de la invención, pueden ser utilizados en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención en suidos de una enfermedad causada por un patógeno porcino que expresa o contiene dicho antígeno. Ejemplos ilustrativos de patógenos porcinos han sido incluidos previamente.

La proteína de fusión de la invención puede ser utilizada para producir, mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, anticuerpos que reconocen dicha proteína de fusión de la invención. Dichos anticuerpos, o fragmentos de los mismos con capacidad para unirse a dicha proteína de fusión de la invención, pueden ser útiles para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un organismo, p.ej., un organismo patógeno, que contiene el antígeno presente en la proteína de fusión de la invención. Dichos anticuerpos, o fragmentos de los mismos con capacidad para unirse a dicha proteína de fusión de la invención, en adelante anticuerpo de la invención, constituyen un aspecto adicional de esta invención. En una realización particular, dicho anticuerpo reconoce un epítopo específico de un antígeno según se ha mencionado previamente.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "anticuerpo" pretende incluir tanto anticuerpos quiméricos o recombinantes como anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales o fragmentos proteolíticos de los mismos, tales como fragmentos, Fab o F(ab')2, etc. Además, el ADN que codifica para la región variable del anticuerpo puede insertarse en otros anticuerpos para producir de este modo anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos de cadena sencilla (scFv) pueden ser polipéptidos compuestos por cadenas sencillas que poseen la capacidad propia de un anticuerpo de unión a un antígeno y que comprenden un par de secuencias de aminoácidos homologas o análogas a las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulinas (unión VH-VL o scFv). Los polipéptidos análogos a las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo pueden unirse, si se desea, a través de un polipéptido de unión. Métodos para la producción de anticuerpos son ampliamente conocidos por el experto en la materia y están recogidos en el estado de la técnica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención. Asimismo, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un anticuerpo de la invención, que reconoce una proteína de fusión de la invención, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un organismo que contiene dicho antígeno presente en dicha proteína de fusión.

Además, la proteína de fusión de la invención puede ser utilizada para producir células del sistema inmune, tales como células B, células T, células dendríticas, etc., que reconocen dicha proteína. Dichas células con capacidad para reconocer a dicha proteína de fusión de la invención, aisladas, en adelante células del sistema inmune de la invención, pueden ser útiles para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un organismo patógeno que contiene el antígeno presente en la proteína de fusión de la invención y constituyen un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una célula del sistema inmune de la invención. Asimismo, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una célula del sistema inmune de la invención, tal como una célula B, una célula T, una célula dendrítica, etc., que reconoce una proteína de fusión de la invención, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un organismo que contiene dicho antígeno presente en dicha proteína de fusión.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para potenciar la respuesta inmune frente a un antígeno que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una construcción génica de la invención en la que dicho polinucleótido (B) comprende la secuencia de nucleótidos que codifica dicho antígeno, o de un vector de la invención que comprende dicha construcción génica, o de una proteína de fusión de la invención que comprende dicho antígeno o de una célula hospedadora que expresa el antígeno. La administración de dicha construcción génica de la invención, o de dicho vector de la invención o de dicha proteína de fusión de la invención se llevará a cabo en forma de una composición farmacéutica, cuyas características ya se han mencionado (composición farmacéutica de la invención).

Tal como se muestra en el Ejemplo 1 que acompaña la presente descripción, los experimentos llevados a cabo por los inventores ponen de manifiesto que, tras la inmunización de cerdos con una construcción génica que codifica una proteína de fusión que comprende la fracción sHA del VPPA y un antígeno específico, se produce una elevada respuesta inmune frente a dicho antígeno, que es mucho mayor que la observada en animales control. Así, la HA del VPPA, o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma, tal como la fracción sHA del VPPA, con capacidad para transportar el antígeno al que está unido a una CP A, ejerce un efecto adyuvante en vacunación con ADN cuando se administra junto con un antígeno produciéndose un efecto potenciador o estimulador de la respuesta inmune en el sujeto tras su administración a dicho sujeto.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la HA del VPPA o de ion fragmento funcionalmente equivalente de la misma o de una variante funcionalmente equivalente de la misma que muestra una identidad mínima del 80% con la HA del VPPA como adyuvante en la elaboración de una composición farmacéutica, tal como una vacuna o composición inmunoterapéutica, que comprende un antígeno.

Asimismo, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la HA del VPPA o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma o de una variante funcionalmente equivalente de la misma que muestra una identidad mínima del 80% con la HA del VPPA en la elaboración de una composición para potenciar la respuesta inmune frente a un antígeno administrado conjuntamente con dicha composición potenciadora de la respuesta inmune.

El siguiente ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Construcción de los plásmidos pCMV-PQ y pCMV-sHAPQ e inmunización de cerdos con dichos plásmidos

Construcción de los plásmidos pCMV-PQ y pCMV-sHAPQ

Se describe la obtención de una proteína de fusión, identificada genéricamente como Proteína Quimérica (PQ), que comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína p30 y de la proteína p54 del virus de la peste porcina africana (VPPA) (SEQ ID NO: 3). La secuencia correspondiente a la proteína p30 del VPPA se incluye entre los aminoácidos 138 y 139 de la proteína p54 y comprende desde el residuo 139 al 341 de la proteína quimérica, manteniendo PQ tanto las propiedades antigénicas como inmunogénicas de ambas proteínas del VPPA (Barderas MG, Rodríguez F, Gomez-Puertas P, Aviles M, Beitia F, Alonso C, Escribano JM. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. Arch Virol. 2001; 146(9): 1681-91). Como consecuencia de la fusión de la sHA con PQ se produce la sustitución del aminoácido 138 de la p54 del VPPA, reemplazando la prolina por una treonina (Thr 138 en SEQ ID NO: 3).

Brevemente, la secuencia de ADN que codifica dicha proteína de fusión PQ (Barderas *et al*., 2001, citado *supra*) se clonó en el plásmido pCMV (Clontech), bajo el control del promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus (CMV) humano para generar el plásmido pCMV-PQ, tal como se muestra en la Figura 4. Dicho plásmido pCMV-PQ es capaz de expresar dicha proteína de fusión PQ, resultante de la fusión de las proteínas p30 y p54 de VPPA.

Tras la digestión del plásmido de transferencia a báculo virus pBacpakp54/p30 (Barderas *et al*., 2001, citado *supra*) con la enzima de restricción BamHI, se obtuvo el fragmento de ADN correspondiente a la fase de lectura abierta que codifica la proteína de fusión PQ, flanqueada por extremos cohesivos compatibles para su ligación en el plásmido pCMVLII (modificado por Rodríguez *et al*. Journal of Virology, 2001, 75:10421-10430), así como en el plásmido pCMV-sHA (descrito a continuación).

Por otro lado, el fragmento de ADN que codifica dicha PQ se clonó en dicho vector (pCMV) como una molécula de fusión con la secuencia de ADN que codifica la fracción soluble de la hemaglutinina (sHA) de VPPA. Como consecuencia de la fusión de la sHA con PQ se introducen dos aminoácidos adicionales: arginina 185 y serina 186 (Arg 185 y Ser 136 en SEQ ID NO: 4). generando el plásmido pCMV-sHAPQ (Figura 5). Dicho plásmido es capaz de expresar dicha proteína PQ (formada por las proteínas p30 y p54 del VPPA) como proteína de fusión con la fracción sHA (identificada como sHA-PQ en la Figura 5) (SEQ ID NO: 4).

Brevemente, el fragmento de ADN que codifica la fracción sHA del VPPA se obtuvo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando los cebadores:

Up HA Not I 5' -GCGGCCGCCATGTGGAGTACTTTAAATCAAAC-3'

Down HA EagI 5'-CGGCCGAGATCTTGTGGATAAATAATTTTG-3',

y el ADN del aislado VPPA BA71 como molde de la reacción. La reacción de PCR consistió en 30 ciclos de reacción consistentes cada uno en 30 segundos de desnaturalización a 95ºC, seguidos de 1 minuto de anillamiento a 55ºC y 2 minutos de extensión a 72ºC.

El producto de amplificación correspondiente a la ORF de la fracción sHA de VPPA fue subclonado en el vector pGEMT-easy (Promega) y, tras su digestión con las enzimas de restricción EagI y NotI, permitió su purificación y clonaje en el sitio único NotI del pCMV (Clontech) para obtener el vector pCMV-sHA.

Finalmente, el ADN que codifica la PQ, producto de la digestión del pBacpackp5/p30 (ver arriba), se clonó como molécula de fusión al ADN que codifica el fragmento fusionado a la fracción sHA tras la digestión del plásmido pCMV-sHA con BglII, para obtener el plásmido final pCMV-sHAPQ (Figura 5), que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 5, el cual es capaz de expresar la proteína de fusión sHA-PQ.

Inoculación de animales con las construcciones pCMV-PQ y pCMV-sHAPQ

Se inocularon intramuscularmente 3 grupos de cerdos Large white/landrace (8 cerdos por grupo) con cada uno de los plásmidos siguientes: pCMV (plásmido control), pCMV-PQ y pCMV-sHAPQ. Se suministraron hasta 4 dosis de vacuna espaciadas en 15 días inoculando 600 μg (1,5 ml de solución salina fisiológica) de plásmido por cerdo (repartidos entre los músculos del cuello y de los cuartos traseros y subcutáneamente en la oreja).

Los animales se sangraron antes de cada dosis de vacuna y 6 semanas después de la última dosis administrada (tiempo en el que la respuesta de memoria ya se ha establecido), para poder medir, a partir del suero obtenido, los anticuerpos específicamente dirigidos contra los antígenos de VPPA. Dicha medida se puede realizar por técnicas convencionales, tales como mediante un ELISA o mediante un Western Blot. Los resultados mostrados corresponden a un ensayo en el que se utilizó la proteína p30 recombinante de VPPA expresada en báculo virus como antígeno para cubrir las placas de ELISA (Figura 6) según se ha descrito con anterioridad (Oviedo *et al*. 1997, J Virol Methods 64:27-35). Como se puede observar, la respuesta inmune cuando se inyecta la construcción (pCMV-sHAPQ), que codifica la proteína de fusión sHA-PQ, es muy superior a la producida cuando se inyecta un plásmido que codifica la proteína de fusión PQ sin la fracción sHA (pCMV-PQ) o con el plásmido control (pCMV).

Para estudiar la inducción de la respuesta celular (células T-CD4$^+$ y células T-CD8$^+$), se midió la respuesta celular en todos los cerdos inmunizados con el plásmido control (pCMV) y con los plásmidos pCMV-PQ y pCMV-sHAPQ, 6 semanas después de haber sido suministrada la última dosis de vacuna (para medir la respuesta T de memoria), usando para ello la técnica de ELISPOT específico para interferón gamma (IFN-γ). Esta metodología permite cuantificar el número de células T que específicamente secretan IFN-γ al reconocer un antígeno concreto (un péptido, una proteína, virus completo...), tras la vacunación con los distintos plásmidos. Así, a partir de una muestra de sangre completa se obtuvieron las células blancas (PBLs) independientemente de los eritrocitos, para, a continuación, ser cultivadas *in vitro* en placas de cultivo (Millipore) pre-tapizadas con un anticuerpo anti-IFN-γ, (Pharmingen), siguiendo protocolos convencionales (Immunological Methods 2006). Las células se crecieron durante 18 horas en presencia de la proteína p30 recombinante de VPPA (Figura 7) o en presencia de una proteína irrelevante (albúmina), control negativo. Finalmente, las células se retiraron y las placas se revelaron como si de un ELISA normal se tratara utilizando reactivos específicos de la casa comercial Pharmingen. Cada uno de los puntos observados tras el revelado (véase el inserto en la Figura 7) corresponde a una célula específica para el estímulo concreto.

Mejora de la respuesta inmune inducida tras la vacunación con ADN

En ninguno de los cerdos inmunizados con pCMV-PQ (plásmido que expresa las proteínas p30 y p54 fusionadas, es decir, PQ), se detecta una respuesta específica de anticuerpos frente a la proteína p30 de VPPA detectables por ELISA (Figura 6). Al igual que sucede para la respuesta de anticuerpos, ningún animal inmunizado con pCMV-PQ induce respuesta celular (Figura 7). A pesar de que esta misma construcción es inmunogénica en ratones (datos del laboratorio no publicados), no resulta funcional en el cerdo.

A modo de resumen, los resultados obtenidos permiten efectuar los siguientes comentarios:

A) todos los animales inmunizados con pCMV-sHAPQ desarrollaron una elevada respuesta de anticuerpos específicos frente a la proteína antigénica p30 de VPPA (Figura 6); así pues, la respuesta de anticuerpos inducida tras la vacunación se potencia dirigiendo los antígenos del VPPA a las células presentadoras de antígeno (CPA) mediante su fusión a la sHA;

B) la respuesta de anticuerpos inducida por pCMV-sHAPQ llega a un plato tras la 3ª dosis de vacunación, con lo que dosis adicionales de vacuna parecen no tener ningún efecto adicional (Figura 6); y

C) todos los cerdos vacunados con pCMV-sHAPQ desarrollaron una respuesta celular; todos los animales inmunizados con pCMV-sHAPQ desarrollaron una elevada respuesta de IFN-γ tras la estimulación con p30 de VPPA (Figura 7); así pues, la respuesta celular inducida tras la vacunación se potencia dirigiendo los antígenos del VPPA a las células presentadoras de antígeno mediante su fusión a la fracción sHA.

Tales resultados permiten concluir que la respuesta de anticuerpos y celular específicamente dirigida contra los antígenos del VPPA tras la vacunación con ADN se puede mejorar si éstos se fusionan a la fracción sHA del VPPA.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción génica que comprende:

a) un polinucleótido (A) seleccionado entre:

(i) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la hemaglutinina (HA) del virus de la peste porcina africana (VPPA);

(ii) un fragmento funcionalmente equivalente de dicho polinucleótido definido en (i); y

(iii) una variante funcionalmente equivalente de dicho polinucleótido definido en (i) que muestra una identidad mínima del 80% con respecto a la secuencia codificante de la HA del VPPA; y

b) un polinucleótido (B) que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno.

2. Construcción génica según la reivindicación 1, en la que el extremo 3' de dicho polinucleótido (A) está unido al extremo 5' de dicho polinucleótido (B).

3. Construcción génica según la reivindicación 1, en la que el extremo 5' de dicho polinucleótido (A) está unido al extremo 3' de dicho polinucleótido (B).

4. Construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en la que dicho polinucleótido (A) comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la fracción soluble de la hemaglutinina (sHA) del virus de la peste porcina africana (VPPA).

5. Construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho polinucleótido (A) comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 1 o la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2.

6. Construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el polinucleótido (B) codifica una proteína de fusión que comprende las proteínas p54 y p30 del VPPA.

7. Construcción génica según la reivindicación 6, en la que el polinucleótido (B) codifica una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3.

8. Construcción génica según la reivindicación 1, 4, 5, 6 ó 7, que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

9. Un vector que comprende una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Una proteína de fusión obtenible por expresión de la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o de un vector según la reivindicación 9.

11. Una proteína de fusión que comprende:

a) un polipéptido (A') seleccionado entre:

(i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina (HA) del virus de la peste porcina africana (VPPA);

(ii) un fragmento funcionalmente equivalente de dicho polipéptido definido en (i); y

(iii) una variante funcionalmente equivalente de dicho polipéptido definido en (i) que muestra una identidad mínima del 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la HA del VPPA; y

b) un polipéptido (B') que comprende la secuencia de aminoácidos de un antígeno.

12. Proteína según la reivindicación 11, en la que el extremo carboxilo de dicho polipéptido (A) está unido al extremo amino de dicho polipéptido (B).

13. Proteína según la reivindicación 11, en la que el extremo amino de dicho polipéptido (A') está unido al extremo carboxilo de dicho polipéptido (B').

14. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que dicho polipéptido (A') comprende la fracción soluble de la hemaglutinina (sHA) del virus de la peste porcina africana (VPPA).

15. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en la que dicho polipéptido (A') comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

16. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en la que el polipéptido (B') es una proteína de fusión que comprende las proteínas p54 y p30 del VPPA.

17. Proteína según la reivindicación 16, en la que dicha proteína tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4.

18. Una célula hospedadora que contiene una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, un vector según la reivindicación 9, o una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17.

19. Una célula hospedadora según la reivindicación 18, en la que dicha célula es una célula presentadora de antígenos (CPA).

20. Método para producir una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, que comprende introducir en una célula hospedadora una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o un vector según la reivindicación 9, y recuperar la proteína de fusión del medio de cultivo o del interior de la célula hospedadora.

21. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o de un vector según la reivindicación 9, o de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, o de una célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

22. Uso de una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o de un vector según la reivindicación 9, o de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, o de una célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de una enfermedad causada por un organismo que expresa o contiene dicho antígeno.

23. Uso de la hemaglutinina (HA) del virus de la peste porcina africana (VPPA), o de un fragmento funcionalmente equivalente de la misma, o de una variante funcionalmente equivalente de la misma que muestra una identidad mínima del 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la HA del VPPA, como adyuvante en la elaboración de una composición farmacéutica.

24. Uso según la reivindicación 23, en donde la composición farmacéutica es utilizada para potenciar la respuesta inmune frente a un antígeno administrado conjuntamente con dicha composición potenciadora de la respuesta inmune.

25. Un anticuerpo con capacidad para unirse a una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17.

26. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la reivindicación 25.

27. Uso de un anticuerpo según la reivindicación 25, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un organismo que contiene el antígeno presente en dicha proteína de fusión.

28. Una célula del sistema inmune, aislada, con capacidad para reconocer a una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17.

29. Una composición farmacéutica que comprende una célula del sistema inmune según la reivindicación 28.

30. Uso de una célula del sistema inmune según la reivindicación 28, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un organismo que contiene el antígeno presente en dicha proteína de fusión.

Utilización de la HA del VPPA como transportador de antígenos a las CPAs

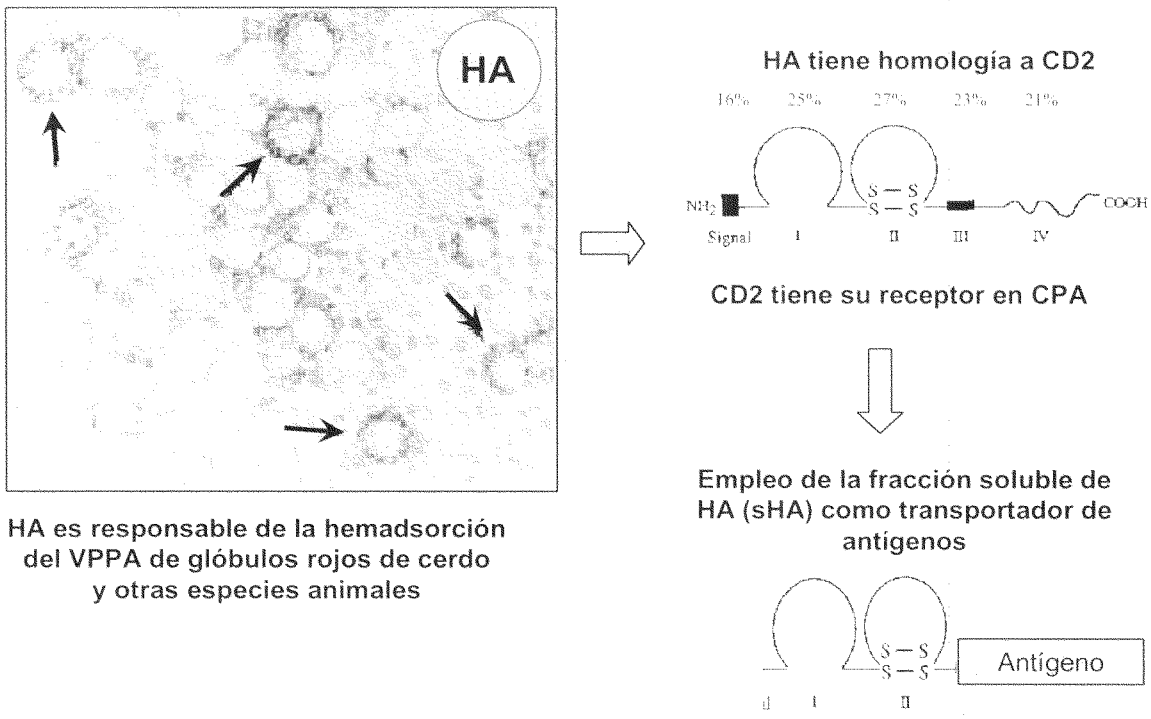
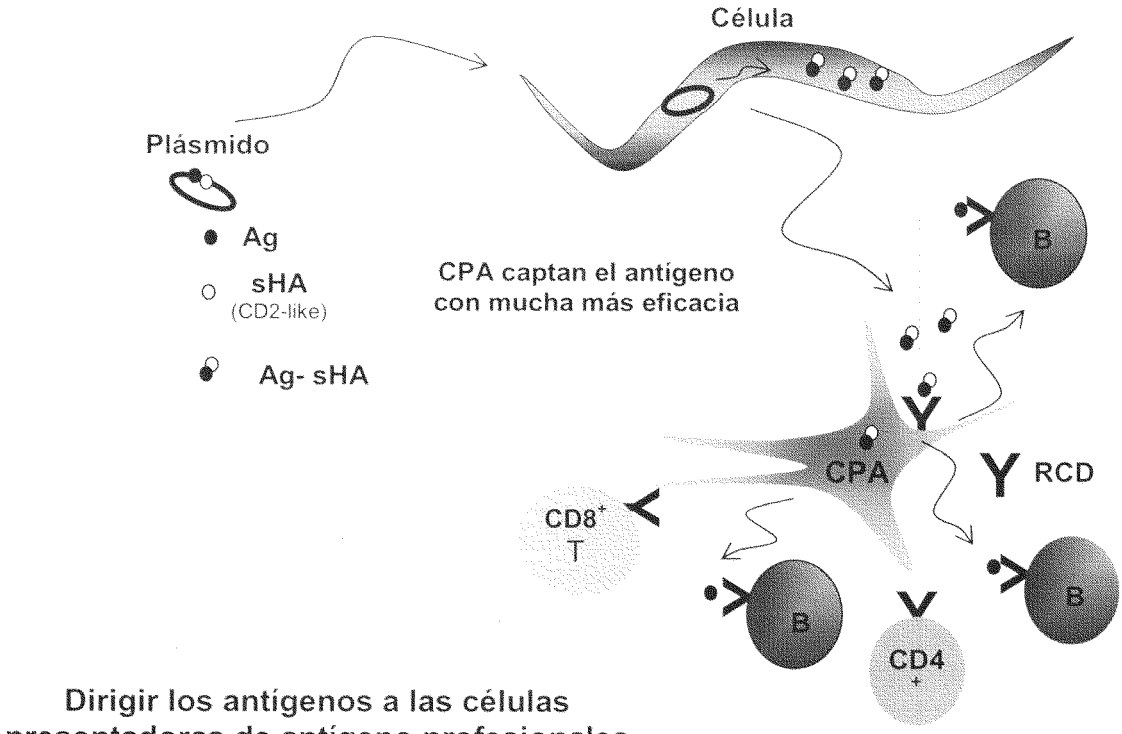


FIGURA 1



Dirigir los antígenos a las células presentadoras de antígeno profesionales (CPA) mejora la respuesta inmune

FIGURA 2

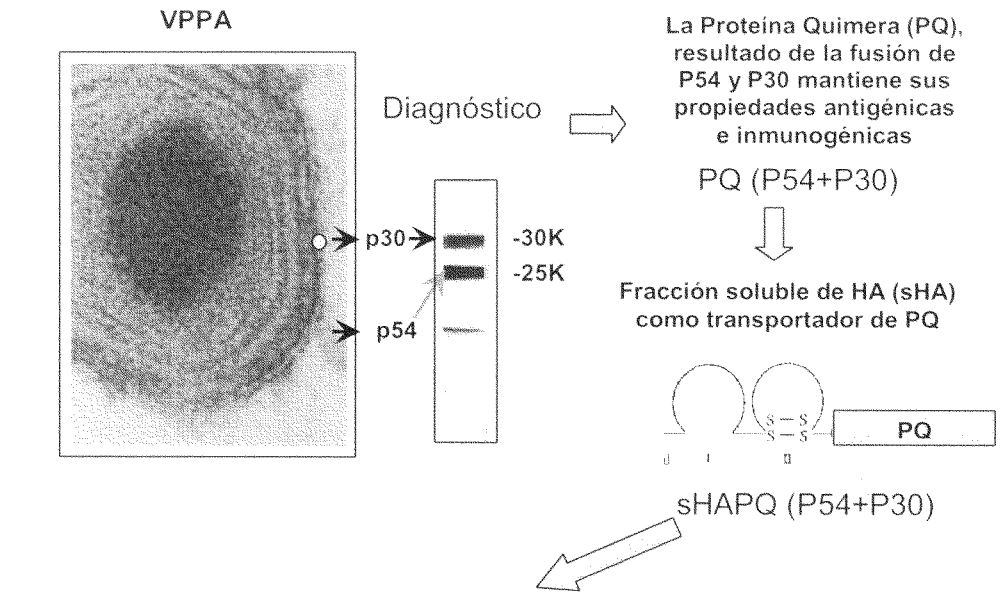

LA P30 y P54 DE VPPA SON MUY ANTIGENICAS E INMUNOGENICAS:
VPPA
Diagnóstico
La Proteína Quimera (PQ), resultado de la fusión de P54 y P30 mantiene sus propiedades antigénicas e inmunogénicas
PQ (P54+P30)
p30
p54
-30K
-25K
Fracción soluble de HA (sHA) como transportador de PQ
PQ
sHAPQ (P54+P30)
INMUNIZACION CON ADN COMO ESTRATEGIA DE VACUNACION

FIGURA 3

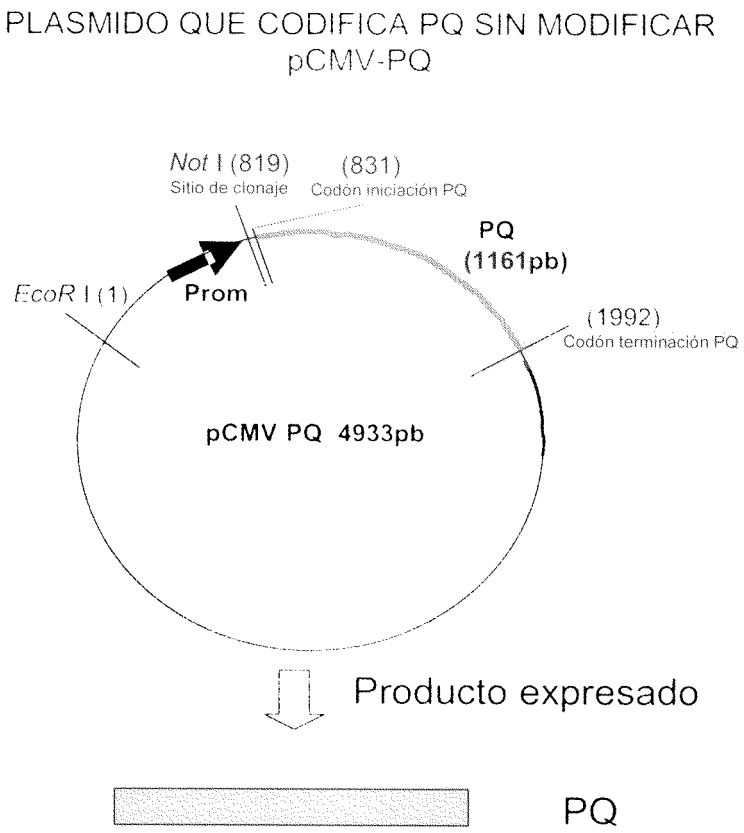

PLASMIDO QUE CODIFICA PQ SIN MODIFICAR
pCMV-PQ
Not I (819)
Sitio de clonaje
(831)
Codón iniciación PQ
PQ
(1161pb)
EcoR I (1)
Prom
(1992)
Codón terminación PQ
pCMV PQ 4933pb
Producto expresado
PQ

FIGURA 4

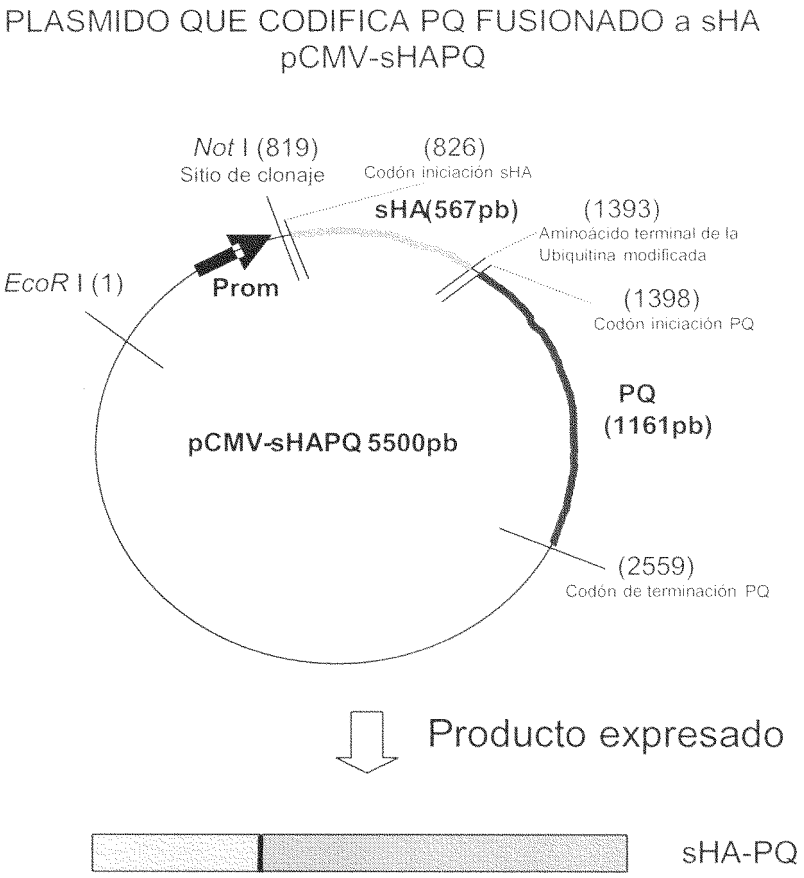

PLASMIDO QUE CODIFICA PQ FUSIONADO a sHA
pCMV-sHAPQ
Not I (819)
Sitio de clonaje
(826)
Codón iniciación sHA
sHA(567pb)
(1393)
Aminoácido terminal de la
Ubiquitina modificada
EcoR I (1)
Prom
(1398)
Codón iniciación PQ
PQ
(1161pb)
pCMV-sHAPQ 5500pb
(2559)
Codón de terminación PQ
Producto expresado
sHA-PQ

FIGURA 5

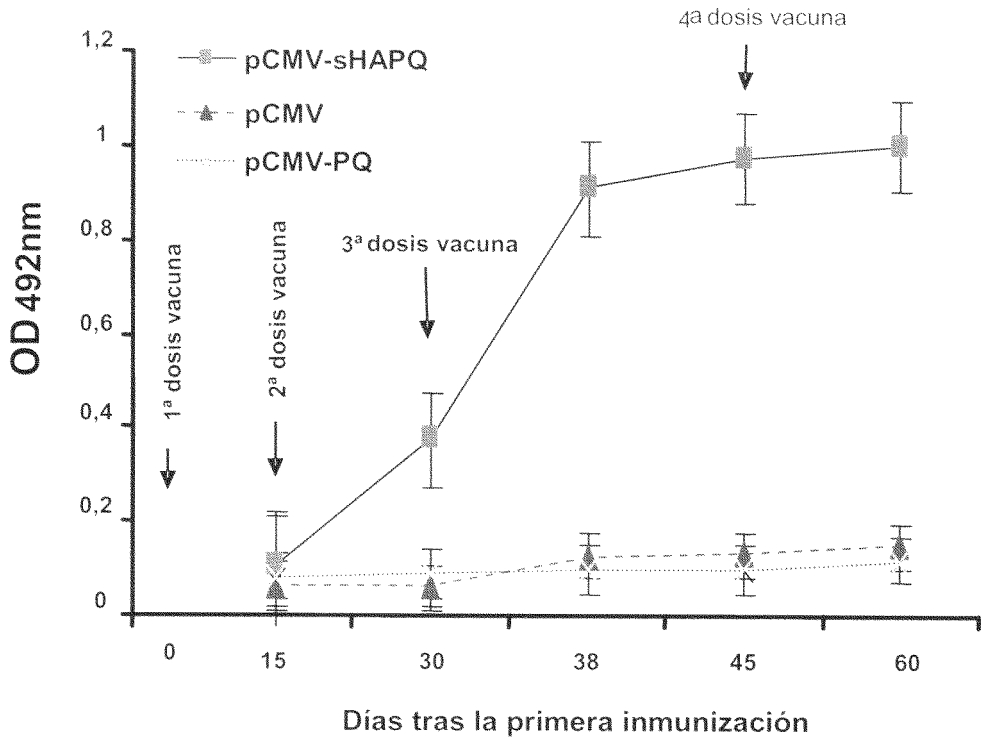

pCMV-sHAPQ INDUCE UNA GRAN RESPUESTA CELULAR
4ª dosis vacuna
pCMV-sHAPQ
pCMV
pCMV-PQ
OD 492nm
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
1ª dosis vacuna
2ª dosis vacuna
3ª dosis vacuna
0
15
30
38
45
60
Días tras la primera inmunización

FIGURA 6

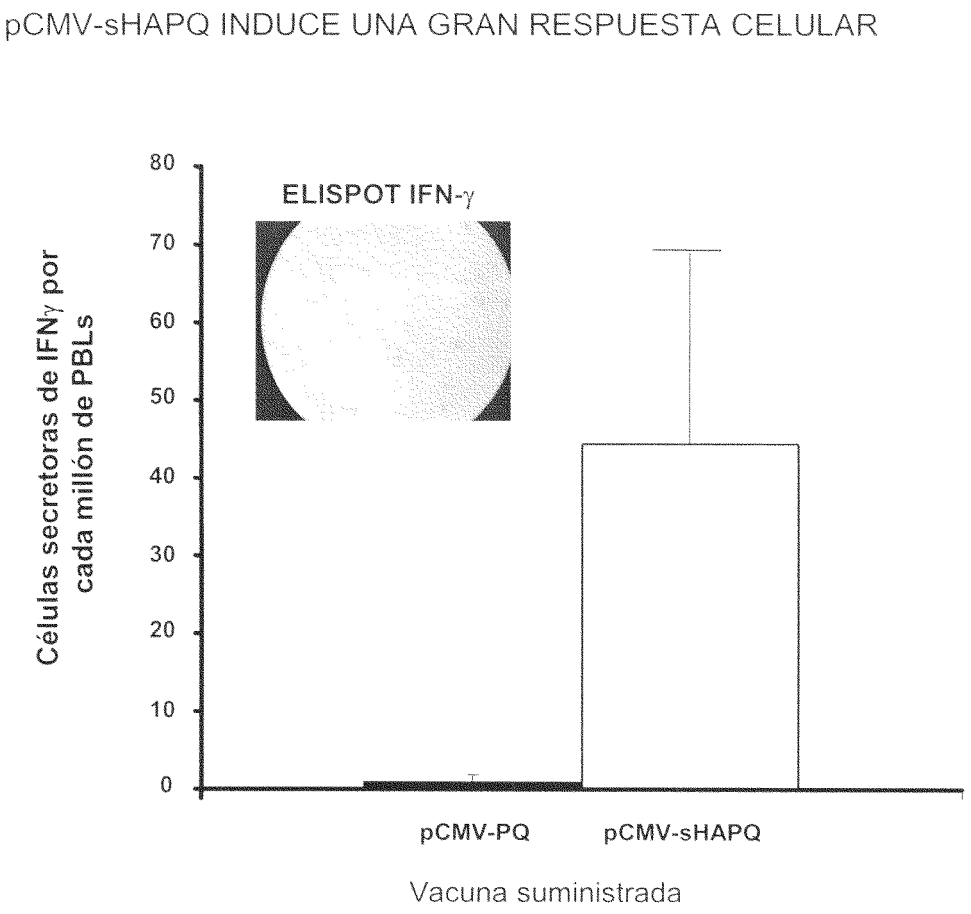

pCMV-sHAPQ INDUCE UNA GRAN RESPUESTA CELULAR
ELISPOT IFN-γ
Células secretoras de IFNγ por cada millón de PBLs
80
70
60
50
40
30
20
10
0
pCMV-PQ
pCMV-sHAPQ
Vacuna suministrada

FIGURA 7

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA)

<120> EMPLEO DE LA HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA COMO ADYUVANTE

<130> P2251ES00

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 402
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Hemaglutinina (HA) del virus de la peste porcina africana (VPPA) cepa BA71

<400> 1

```
Met Ile Ile Ile Val Ile Phe Leu Met Cys Leu Lys Ile Val Leu Asn
1               5                   10                  15

Asn Ile Ile Ile Trp Ser Thr Leu Asn Gln Thr Val Phe Leu Asn Asn
            20                  25                  30

Ile Phe Thr Ile Asn Asp Thr Tyr Gly Gly Leu Phe Trp Asn Thr Tyr
        35                  40                  45

Tyr Asp Asn Asn Arg Ser Asn Phe Thr Tyr Cys Gly Ile Ala Gly Asn
    50                  55                  60

Tyr Cys Ser Cys Cys Gly His Asn Ile Ser Leu Tyr Asn Thr Thr Asn
65                  70                  75                  80

Asn Cys Ser Leu Ile Ile Phe Pro Asn Asn Thr Glu Ile Phe Asn Arg
                85                  90                  95

Thr Tyr Glu Leu Val Tyr Leu Asp Lys Lys Ile Asn Tyr Thr Val Lys
            100                 105                 110

Leu Leu Lys Ser Val Asp Ser Pro Thr Ile Thr Tyr Asn Cys Thr Asn
        115                 120                 125

Ser Leu Ile Thr Cys Lys Asn Asn Asn Gly Thr Asn Val Asn Ile Tyr
    130                 135                 140
```

```
Leu Ile Ile Asn Asn Thr Ile Val Asn Asp Thr Asn Gly Asp Ile Leu
145                 150                 155                 160

Asn Tyr Tyr Trp Asn Gly Asn Asn Asn Phe Thr Ala Thr Cys Met Ile
                165                 170                 175

Asn Asn Thr Ile Ser Ser Leu Asn Glu Thr Glu Asn Ile Asn Cys Thr
            180                 185                 190

Asn Pro Ile Leu Lys Tyr Gln Asn Tyr Leu Ser Thr Leu Phe Tyr Ile
        195                 200                 205

Ile Ile Phe Ile Val Ser Gly Leu Ile Ile Gly Ile Phe Ile Ser Ile
    210                 215                 220

Ile Ser Val Leu Ser Ile Arg Arg Lys Arg Lys Lys His Val Glu Glu
225                 230                 235                 240

Ile Glu Ser Pro Pro Pro Ser Glu Ser Asn Glu Glu Asp Ile Ser His
                245                 250                 255

Asp Asp Thr Thr Ser Ile His Glu Pro Ser Pro Arg Glu Pro Leu Leu
            260                 265                 270

Pro Lys Pro Tyr Ser Arg Tyr Gln Tyr Asn Thr Pro Ile Tyr Tyr Met
        275                 280                 285

Arg Pro Ser Thr Gln Pro Leu Asn Pro Phe Pro Leu Pro Lys Pro Cys
    290                 295                 300

Pro Pro Pro Lys Pro Cys Pro Pro Pro Lys Pro Cys Pro Pro Pro Lys
305                 310                 315                 320

Pro Cys Pro Pro Pro Lys Pro Cys Ser Pro Pro Lys Pro Cys Arg Pro
                325                 330                 335

Pro Lys Pro Cys Pro Pro Pro Lys Pro Cys Pro Pro Pro Lys Pro Cys
            340                 345                 350

Pro Pro Pro Lys Pro Cys Pro Pro Ser Lys Pro Cys Pro Ser Pro Glu
        355                 360                 365

Ser Tyr Ser Pro Pro Lys Pro Leu Pro Ser Ile Pro Leu Leu Pro Asn
    370                 375                 380
```

```
Ile Pro Pro Leu Ser Thr Gln Asn Ile Ser Leu Ile His Val Asp Arg
385                 390                 395                 400

Ile Ile
```

<210> 2
<211> 185
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fracción soluble de la hemaglutinina (sHA) del virus de la peste porcina africana (VPPA) cepa BA71

<400> 2

```
Met Trp Ser Thr Leu Asn Gln Thr Val Phe Leu Asn Asn Ile Phe Thr
1               5                   10                  15

Ile Asn Asp Thr Tyr Gly Gly Leu Phe Trp Asn Thr Tyr Tyr Asp Asn
            20                  25                  30

Asn Arg Ser Asn Phe Thr Tyr Cys Gly Ile Ala Gly Asn Tyr Cys Ser
        35                  40                  45

Cys Cys Gly His Asn Ile Ser Leu Tyr Asn Thr Thr Asn Asn Cys Ser
    50                  55                  60

Leu Ile Ile Phe Pro Asn Asn Thr Glu Ile Phe Asn Arg Thr Tyr Glu
65                  70                  75                  80

Leu Val Tyr Leu Asp Lys Lys Ile Asn Tyr Thr Val Lys Leu Leu Lys
                85                  90                  95

Ser Val Asp Ser Pro Thr Ile Thr Tyr Asn Cys Thr Asn Ser Leu Ile
            100                 105                 110

Thr Cys Lys Asn Asn Asn Gly Thr Asn Val Asn Ile Tyr Leu Ile Ile
        115                 120                 125

Asn Asn Thr Ile Val Asn Asp Thr Asn Gly Asp Ile Leu Asn Tyr Tyr
    130                 135                 140

Trp Asn Gly Asn Asn Asn Phe Thr Ala Thr Cys Met Ile Asn Asn Thr
145                 150                 155                 160
```

Ile Ser Ser Leu Asn Glu Thr Glu Asn Ile Asn Cys Thr Asn Pro Ile
165 170 175

Leu Lys Tyr Gln Asn Tyr Leu Ser Thr
180 185

<210> 3
<211> 386
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión p30-p54 del virus de la peste porcina africana (VPPA)

<400> 3

Met Asp Ser Glu Phe Phe Gln Pro Val Tyr Pro Arg His Tyr Gly Glu
1 5 10 15

Cys Leu Ser Pro Val Thr Pro Pro Ser Phe Phe Ser Thr His Met Tyr
20 25 30

Thr Ile Leu Ile Ala Ile Val Val Leu Val Ile Ile Ile Ile Val Leu
35 40 45

Ile Tyr Leu Phe Ser Ser Arg Lys Lys Lys Ala Ala Ala Ala Ile Glu
50 55 60

Glu Glu Asp Ile Gln Phe Ile Asn Pro Tyr Gln Asp Gln Gln Trp Ala
65 70 75 80

Glu Val Thr Pro Gln Pro Gly Thr Ser Lys Pro Ala Gly Ala Thr Thr
85 90 95

Ala Ser Ala Gly Lys Pro Val Thr Gly Arg Pro Ala Thr Asn Arg Pro
100 105 110

Ala Thr Asn Lys Pro Val Thr Asp Asn Pro Val Thr Asp Arg Leu Val
115 120 125

Met Ala Thr Gly Gly Pro Ala Ala Ala Thr Asp Phe Ile Leu Asn Ile
130 135 140

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

Gln Val Val Phe His Ala Gly Ser Leu Tyr Asn Trp Phe Ser Val Glu
165 170 175

Ile Ile Asn Ser Gly Arg Ile Val Thr Thr Ala Ile Lys Thr Leu Leu
180 185 190

Ser Thr Val Lys Tyr Asp Ile Val Lys Ser Ala His Ile Tyr Ala Gly
195 200 205

Gln Gly Tyr Thr Glu His Gln Ala Gln Glu Glu Trp Asn Met Thr Leu
210 215 220

His Val Leu Phe Glu Glu Glu Thr Glu Ser Ser Ala Ser Ser Glu Ser
225 230 235 240

Ile His Glu Lys Asn Asp Asn Glu Thr Asn Glu Cys Thr Ser Ser Phe
245 250 255

Glu Thr Leu Phe Glu Gln Glu Pro Ser Ser Glu Glu Pro Lys Asp Ser
260 265 270

Lys Leu Tyr Met Leu Ala Gln Lys Thr Val Gln His Ile Glu Gln Tyr
275 280 285

Gly Lys Ala Pro Asp Phe Asn Lys Val Ile Arg Ala His Asn Phe Ile
290 295 300

Gln Thr Ile His Gly Thr Pro Leu Lys Glu Glu Glu Lys Glu Val Val
305 310 315 320

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

Leu His Leu Met Phe Ala Ala Ala Ser Ala His Pro Thr Glu Pro Tyr
340 345 350

Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser Ala Ile
355 360 365

Glu Asn Leu Arg Gln Arg Asn Thr Tyr Thr His Lys Asp Leu Glu Asn
370 375 380

Ser Leu
385

<210> 4

<211> 573

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión (sHAPQ) sHA-p30-p54

<400> 4

```
Met Trp Ser Thr Leu Asn Gln Thr Val Phe Leu Asn Asn Ile Phe Thr
1               5                  10                  15

Ile Asn Asp Thr Tyr Gly Gly Leu Phe Trp Asn Thr Tyr Tyr Asp Asn
            20                  25                  30

Asn Arg Ser Asn Phe Thr Tyr Cys Gly Ile Ala Gly Asn Tyr Cys Ser
        35                  40                  45

Cys Cys Gly His Asn Ile Ser Leu Tyr Asn Thr Thr Asn Asn Cys Ser
    50                  55                  60

Leu Ile Ile Phe Pro Asn Asn Thr Glu Ile Phe Asn Arg Thr Tyr Glu
65                  70                  75                  80

Leu Val Tyr Leu Asp Lys Lys Ile Asn Tyr Thr Val Lys Leu Leu Lys
                85                  90                  95

Ser Val Asp Ser Pro Thr Ile Thr Tyr Asn Cys Thr Asn Ser Leu Ile
            100                 105                 110

Thr Cys Lys Asn Asn Asn Gly Thr Asn Val Asn Ile Tyr Leu Ile Ile
        115                 120                 125

Asn Asn Thr Ile Val Asn Asp Thr Asn Gly Asp Ile Leu Asn Tyr Tyr
    130                 135                 140

Trp Asn Gly Asn Asn Asn Phe Thr Ala Thr Cys Met Ile Asn Asn Thr
145                 150                 155                 160

Ile Ser Ser Leu Asn Glu Thr Glu Asn Ile Asn Cys Thr Asn Pro Ile
                165                 170                 175

Leu Lys Tyr Gln Asn Tyr Leu Ser Thr Arg Ser Met Asp Ser Glu Phe
            180                 185                 190

Phe Gln Pro Val Tyr Pro Arg His Tyr Gly Glu Cys Leu Ser Pro Val
        195                 200                 205
```

```
Thr Pro Pro Ser Phe Phe Ser Thr His Met Tyr Thr Ile Leu Ile Ala
    210                 215                 220

Ile Val Val Leu Val Ile Ile Ile Ile Val Leu Ile Tyr Leu Phe Ser
225                 230                 235                 240

Ser Arg Lys Lys Lys Ala Ala Ala Ala Ile Glu Glu Glu Asp Ile Gln
                245                 250                 255

Phe Ile Asn Pro Tyr Gln Asp Gln Gln Trp Ala Glu Val Thr Pro Gln
            260                 265                 270

Pro Gly Thr Ser Lys Pro Ala Gly Ala Thr Thr Ala Ser Ala Gly Lys
        275                 280                 285

Pro Val Thr Gly Arg Pro Ala Thr Asn Arg Pro Ala Thr Asn Lys Pro
    290                 295                 300

Val Thr Asp Asn Pro Val Thr Asp Arg Leu Val Met Ala Thr Gly Gly
305                 310                 315                 320

Pro Ala Ala Ala Thr Asp Phe Ile Leu Asn Ile Ser Met Lys Met Glu
                325                 330                 335

Val Ile Phe Lys Thr Asp Leu Arg Ser Ser Ser Gln Val Val Phe His
            340                 345                 350

Ala Gly Ser Leu Tyr Asn Trp Phe Ser Val Glu Ile Ile Asn Ser Gly
        355                 360                 365

Arg Ile Val Thr Thr Ala Ile Lys Thr Leu Leu Ser Thr Val Lys Tyr
    370                 375                 380

Asp Ile Val Lys Ser Ala His Ile Tyr Ala Gly Gln Gly Tyr Thr Glu
385                 390                 395                 400

His Gln Ala Gln Glu Glu Trp Asn Met Thr Leu His Val Leu Phe Glu
                405                 410                 415

Glu Glu Thr Glu Ser Ser Ala Ser Ser Glu Ser Ile His Glu Lys Asn
            420                 425                 430

Asp Asn Glu Thr Asn Glu Cys Thr Ser Ser Phe Glu Thr Leu Phe Glu
        435                 440                 445
```

```
Gln Glu Pro Ser Ser Glu Glu Pro Lys Asp Ser Lys Leu Tyr Met Leu
    450                 455                 460

Ala Gln Lys Thr Val Gln His Ile Glu Gln Tyr Gly Lys Ala Pro Asp
465                 470                 475                 480

Phe Asn Lys Val Ile Arg Ala His Asn Phe Ile Gln Thr Ile His Gly
                485                 490                 495

Thr Pro Leu Lys Glu Glu Glu Lys Glu Val Val Arg Leu Met Val Ile
            500                 505                 510

Lys Leu Leu Lys Lys Asn Lys Leu Leu Ser His Leu His Leu Met Phe
        515                 520                 525

Ala Ala Ala Ser Ala His Pro Thr Glu Pro Tyr Thr Thr Val Thr Thr
    530                 535                 540

Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr Met Ser Ala Ile Glu Asn Leu Arg Gln
545                 550                 555                 560

Arg Asn Thr Tyr Thr His Lys Asp Leu Glu Asn Ser Leu
                565                 570
```

<210> 5

<211> 1.722

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica la proteína de fusión (sHAPQ) sHA-p30-p54

<400> 5

```
atgtggagta ctttaaatca aactgtattt ttaaataata tttttacaat taatgataca     60

tatggtggtc tattttggaa tacatattat gataataatc gtagtaattt tacttattgt    120

ggaatagcag gaaattattg ttcatgttgt ggtcataaca tatcattgta taatacaaca    180

aataattgta gtttaattat ttttcctaac aatacagaaa tatttaatag aacatatgaa    240

ttagtatatt tggacaaaaa aattaattat acagtaaaac tattaaaatc tgttgattcc    300

ccaactatta catataattg tactaattct ttaataacat gtaaaaataa taatgggaca    360

aatgttaata tatatttaat tattaacaat acaattgtta atgatactaa tggagatatc    420

cttaattatt attggaatgg taataataat tttacagcta catgtatgat taataataca    480
```

attagttcat tgaatgaaac agaaaatata aattgtacta atccaatatt aaaatatcaa 540

aattatttat ccacaagatc tatggattct gaatttttc aaccggttta tccgcggcat 600

tatggtgagt gtttgtcacc agtcacccca ccaagcttct tctccacaca tatgtatact 660

attctcattg ctatcgtggt cttagtcatt attatcatcg ttctaatcta tctattctct 720

tcaagaaaga aaaaagctgc tgccgctatt gaggaggaag atatacagtt tataaatcct 780

tatcaagatc agcaatgggc agaagtcact ccacaaccag gtacctctaa accggctgga 840

gcgactacag caagtgcagg caaaccagtc acgggcagac cggcaacaaa cagaccagca 900

acaaacaaac cagtcacgga caacccagtt acggacagac tagtcatggc aactggcggg 960

ccagcggccg cgacggattt tattttaaat atatccatga aaatggaggt catcttcaaa 1020

acggatttaa gatcatcttc acaagttgtg tttcatgcgg gtagcttgta taattggttt 1080

tctgttgaga ttatcaatag cggtagaatt gttacgaccg ctataaaaac attgctcagt 1140

actgttaagt atgatattgt gaaatctgct catatatatg cagggcaagg gtataccgaa 1200

catcaggctc aagaagaatg gaatatgact ctgcatgtgc tgtttgaaga ggagacagaa 1260

tcctcagcat catcggaaag cattcatgaa aaaaatgata atgaaaccaa tgaatgcaca 1320

tcctcctttg aaacattgtt tgagcaagag ccctcatcag aggaacctaa agactccaag 1380

ctgtatatgc ttgcacaaaa gactgtgcaa catattgaac aatatggaaa ggcacctgat 1440

tttaacaagg ttattagagc acataacttt attcaaacca ttcatggaac ccctctaaag 1500

gaagaagaaa aagaggtggt aagactcatg gtcattaaac ttttaaaaaa aaataagctt 1560

ttatctcacc tacatttaat gtttgcggcc gcgagtgctc atccgactga gccttacacg 1620

acagtcacta ctcagaacac tgcttcacaa acaatgtcgg ctattgaaaa tttacgacaa 1680

agaaacacct atacgcataa agacctagaa aactccttgt aa 1722

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 337 113

(21) Nº de solicitud: 200701023

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **17.04.2007**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	2004, YAO Q. et al. Th cell-independent immune responses to chimeric hemagglutinin/ simian human immunodeficiency virus-like particles vaccine. The Journal of Immunology. Vol. 173, páginas 1951-1958. ISSN 0022-1767, todo el documento.	1-30
A	WO 02081655 A2 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 17.10.2002, todo el documento.	1-30
A	12-1992, GLÜCK R. et al. Immunopotentiating reconstituted influenza virus virosome vaccine delivery system for immunization against hepatitis A. The Journal of Clinical Investigation. Vol. 90, páginas 2491-2495. ISSN 0021-9738, todo el documento.	1-30
A	WO 9219267 A1 (SCHWEIZ SERUM & IMPFINSTITUT BERN) 12.11.1992, páginas 6-22,28-30.	1-30
A	2003, POULAIN-GODEFROY O. et al. Adjuvant activity of free Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin delivered by mucosal routes. Scandinavian Journal of Immunology. Vol. 58, páginas 503-510, todo el documento.	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
06.04.2010	M. Cumbreño Galindo	1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/01 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)