

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/107614 A1

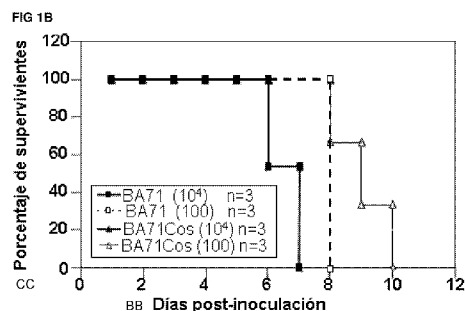
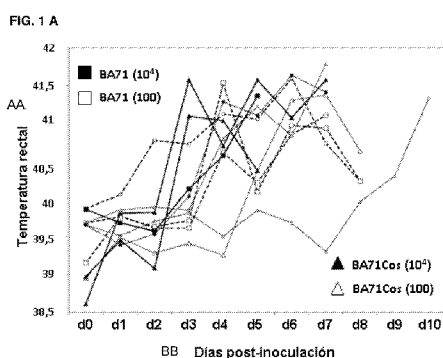
(43) Fecha de publicación internacional
16 de agosto de 2012 (16.08.2012) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 7/04 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)
A61K 39/187 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2012/070058
- (22) Fecha de presentación internacional:
31 de enero de 2012 (31.01.2012)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201130163 8 de febrero de 2011 (08.02.2011) ES
- (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH** [GB/GB]; Ash Road, Pirbright Surrey GU24 0NF (GB).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **SALAS FALGUERAS, María Luisa** [ES/ES]; Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Nicolás Cabrera, 1, E-28049 Madrid (ES). **RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, Javier María** [ES/ES]; Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Nicolás Cabrera, 1, E-28049 Madrid (ES). **DIXON, Linda Kathleen** [GB/GB]; Institute for Animal Health, Ash Road, Pirbright Surrey GU24 0NF (GB).
- (74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: VACCINE AGAINST AFRICAN SWINE FEVER VIRUS, BASED ON REPLICATION DEFICIENT RECOMBINANT VIRUSES

(54) Título : VACUNA CONTRA EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA BASADA EN VIRUS RECOMBINANTES DEFICIENTES EN REPLICACIÓN



AA... Rectal temperature
BB... Days post inoculation
CC... Percentage of survivors

(57) Abstract: The invention relates to a series of recombinant African swine fever viruses (ASFV) characterised in that they are obtained from virulent strain BA71, in which the expression of gene pp220, pp62 or pB438L is repressed. When pp220 is repressed, gene TK is also deleted or gene CD2 optionally together with that of pol X. In the strains in which pp62 or pB438L is repressed, TK is deleted. The invention also relates to empty viral particles that are generated naturally following infection with replication deficient recombinant viruses and to the use thereof in a vaccine against African swine fever.

(57) Resumen: La presente invención, se refiere una serie de virus de la peste porcina africana (ASFV) recombinantes, caracterizados por que se obtienen a partir de la cepa virulenta BA71 que presentan reprimida la expresión del gen pp220, pp62 o pB438L. En el caso de estar reprimido pp220, tienen suprimido también el gen TK, o el gen CD2 opcionalmente junto con el de la pol X, mientras que las cepas que tienen reprimido pp62 o pB438L presentan suprimida la TK. Además, se refiere a las partículas virales vacías que se generan naturalmente tras la infección con los virus recombinantes deficientes en replicación y a su uso en una vacuna frente a la peste porcina africana.

WO 2012/107614 A1



TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):*

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*
- *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

VACUNA CONTRA EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA
BASADA EN VIRUS RECOMBINANTES DEFICIENTES EN REPLICACIÓN.

La presente invención se refiere a un virus recombinante de la cepa virulenta
5 BA71 del virus de la peste porcina africana, deficiente en replicación, a las
partículas virales vacías que se producen en células aisladas tras la infección
con dicho virus y al uso de dicho material para la elaboración de una vacuna
contra el virus de la peste porcina africana.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

El virus de la peste porcina africana (VPPA) es un virus de DNA de doble
cadena de la familia *Asfarviridae* que provoca una enfermedad hemorrágica
muy grave en el cerdo doméstico. Dicha enfermedad produce grandes pérdidas
15 económicas en el continente africano, donde es endémica, y desde donde se
ha extendido desde 2007 a países de la región del Cáucaso y a Rusia, lo que
supone un peligro de reentrada en Europa occidental y, asimismo, una
amenaza para China y otros países asiáticos (Rowlands et al. 2008. *Emerg
Infect Dis* 14:1870-1874). El desarrollo de una vacuna eficaz es, por lo tanto,
20 fundamental para controlar la propagación de esta enfermedad.

A pesar del conocimiento que se tiene actualmente sobre la biología del VPPA,
los esfuerzos realizados hasta ahora para conseguir una vacuna eficaz han
sido escasos e infructuosos. Se han utilizado preparados inactivados del VPPA
25 que aunque son capaces de inducir una respuesta humoral no protegen frente
al virus (Stone y Hess. 1967. *Am J Vet Res* 28:475-481). También se han
usado sin éxito cepas atenuadas del VPPA, ya que la inmunización de cerdos
con cepas atenuadas del virus induce protección solamente frente al virus
virulento homólogo pero no frente al heterólogo (Mebus. 1988. *Ad Virus Res*
30 35:251-269). Por otra parte, también se han utilizado vacunas basadas en
proteínas virales, pero la gran complejidad del VPPA, que codifica por más de
150 proteínas, dificulta la selección de los antígenos virales candidatos para el

desarrollo de este tipo de vacunas. No obstante, se ha descrito el potencial de protección de tres proteínas estructurales del virus, p54, p30 y pEP402R (también conocida como CD2 o hemaglutinina), expresadas en un sistema de baculovirus y administradas con adyuvante de Freund's, que inducen anticuerpos neutralizantes y una protección parcial (Ruiz-Gonzalvo et al. 1996. *Virol* 218:285-289; Gómez-Puertas et al. 1998. *Virol* 243:461-471).

En relación a la producción de virus recombinantes deficientes en replicación, se han producido virus derivados de la cepa atenuada BA71V (adaptada a crecer en células Vero) pero no se ha podido realizar ningún estudio inmunológico con dichos virus ni con las partículas vacías derivadas de estos, porque no son patogénicos (Zsak et al. 2001. *J Virol* 75:3066-3076). Por lo tanto, es imposible la utilización de virus derivados de la cepa BA71V como componentes de una vacuna frente al VPPA que produzca una respuesta inmune efectiva *in vivo*. Por otra parte, para la producción de dichos virus derivados de la cepa atenuada BA71V, se han producido estirpes del VPPA deficientes en replicación mediante la expresión condicional de ciertos genes virales requeridos para la morfogénesis y encapsidación del genoma. Para ello, los genes virales se situaron bajo el control de un promotor inducible por IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), mediante la introducción en el genoma viral del sistema represor/operador del operón lac de *Escherichia coli* (García-Escudero et al. 1998. *J Virol* 72:3185-3195). De esta manera, se han construido virus atenuados BA71V con represión de las poliproteínas pp220 (Andrés et al. 2002. *J Virol* 76:2654-2666), pp62 (Suárez et al. 2010. *J Virol* 84:176-187) y de la proteína pB438L (Epifano et al. 2006. *J Virol* 80:11456-11466). En estos estudios se ha observado que, cuando no se añade IPTG durante el proceso de producción viral, no se expresan las proteínas reguladas por el promotor inducible y se generan partículas virales vacías, en el caso de la represión de pp220 o pp62, de estructura icosaédrica y carentes de los dominios internos del virus y del DNA y, en el caso de la represión de pB438L, estructuras tubulares carentes de DNA. En todos estos casos, las partículas virales aberrantes no

son infecciosas al carecer de DNA, pero contienen los dominios externos (envuelta interna y cápsida) y pueden salir eficazmente de la célula infectada.

Otros virus recombinantes contruidos utilizando la cepa atenuada y no patogénica BA71V son virus que no expresan genes dispensables para la replicación pero importantes para la virulencia y para la inhibición de la respuesta inmune del hospedador. Es el caso de los virus que no expresan el gen de la timidina quinasa (TK) generados mediante la introducción de un *cassette* de represor+selección en el locus de este gen (Andrés et al. 2002. J Virol 76:2654-2666). Mediante la introducción del *cassette* se elimina la expresión de la TK y se seleccionan los recombinantes. Este sistema se ha utilizado para generar virus TK- mediante la introducción en el locus de TK del gen *lac I* del represor Lac, bajo el control del promotor viral *pU104* y, como marcador de selección, el gen *gusA* (gen de la β -glucuronidasa) bajo el control del promotor viral *p72*. También se han creado virus que no expresan la proteína homóloga del receptor de adhesión CD2, una proteína estructural presente en los dominios externos del virus y que actúa como inmunosupresor (dificulta la respuesta inmune del organismo infectado), introduciendo el gen LacZ mediante recombinación homóloga bajo el control de *p72*, rompiendo así el marco de lectura del gen *EP402R* que codifica por la CD2 (Rodríguez et al. 1993. J Virol 67:5312-5320; Ruiz-Gonzalvo et al. 1996. Virology 218:285-298). Nuevamente, en ninguno de estos casos se pudieron realizar estudios inmunológicos *in vivo* ya que estos virus deficientes en genes dispensables para la replicación derivaban de la cepa no patogénica BA71V.

La producción de virus recombinantes deficientes en replicación que además no expresan alguno de los genes dispensables para la replicación, como el gen de la TK, se ha realizado hasta la fecha también en virus de la cepa atenuada BA71V, haciendo imposible su uso en vacunación (Andrés et al. 2002. J Virol 76:2654-2666, Suárez et al. 2010. J Virol 84:176-187 y Epifano et al. 2006. J Virol 80:11456-11466, respectivamente). Es el caso de virus TK- e inducibles en el gen de la pp220 (virus BA71V.v220i.TK-) (Andrés et al. 2002. J Virol

76:2654-2666), en el de la pp62 (virus BA71V.v62i.TK-) (Suárez et al. 2010. J Virol 84:176-187) y en el de la pB438L (virus BA71V.vB438Li.TK-) (Epifano et al. 2006. J Virol 80:11456-11466). Las herramientas para la generación de los mismos fueron las siguientes: la represión de la expresión de TK mediante la introducción del *cassette* de represor+selección compuesto por el gen *lacI* bajo el control del promotor viral *pU104* y el gen marcador *gusA* bajo el control del promotor viral *p72*; y la sustitución de los promotores originales de los genes de pp220, pp62 y pB438L por el promotor inducible por IPTG *p72.I* compuesto por el promotor tardío *p72.4* y la secuencia del operador O_1 del operón *lac* de *E. coli*; y además del gen marcador *lacZ* para la selección de los recombinantes. En ninguno de los casos se han utilizado los virus o las partículas virales aberrantes que se generan en ausencia de inductor en inmunización para el VPPA.

15 La cepa atenuada BA71V derivada de la cepa patogénica BA71 (la cepa utilizada en la invención y que es de libre acceso al público), se generó tras su adaptación a células Vero, y su genoma está secuenciado (Yáñez et al. 1995. Virology 208:249-278). Las dos cepas difieren en los extremos del DNA, ya que BA71V contiene dos deleciones de 2.5 y 7 kb de longitud en dichas regiones terminales (Blasco et al. 1989. Virology 168:330-338). Además, en la cepa BA71V se han descrito deleciones significativas en la región terminal izquierda (LVR) que contiene genes de los miembros de las familias multigénicas MGF360 y de la MGF530. Estos genes son esenciales en la supervivencia de las células infectadas e importantes en la patogénesis y virulencia (Zsak et al. 2001. J Virol 75:3066-3076). La comparación de mapas de restricción entre 23 aislados virales de VPPA reveló que el genoma viral se mantiene constante en la zona central (de 125 kb de longitud) mientras que existen dos regiones variables en los extremos, de 38-47 kb en el extremo izquierdo y de 13-16 kb en el extremo derecho (Blasco et al. 1989. Virology 68:330-338). Como se ha señalado anteriormente, los virus recombinantes deficientes en replicación derivados de la cepa atenuada BA71V no han sido utilizados en vacunación *in vivo* al no ser virus infectivos.

Dado que ninguno de los abordajes que se han utilizado hasta el momento han conseguido generar una vacuna eficaz contra el VPPA, se hace necesario un nuevo enfoque para el desarrollo de una nueva vacuna efectiva.

5 EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a virus recombinantes deficientes en replicación derivados de la cepa virulenta o patogénica BA71, a las partículas vacías que se generan en cultivos de células aisladas infectadas por estos virus recombinantes en condiciones de represión y al uso de ambas para la elaboración de un medicamento, preferiblemente una vacuna frente al virus de la peste porcina africana. Esta invención ofrece una alternativa novedosa a los tratamientos actuales frente a la peste porcina africana al ser capaz de generar una respuesta inmunológica en el animal capaz de inducir una protección eficaz frente al virus.

Los virus recombinantes de la presente invención deficientes en replicación derivados de la cepa patogénica BA71 poseen ciertos genes virales situados bajo el control de un promotor inducible que permite su expresión condicional. De este modo, en condiciones de represión, se generan virus defectivos sin DNA, pero con todos los dominios externos de la partícula viral y que pueden salir eficazmente de la célula infectada. Así, la infección con estos virus inducibles mimetiza una infección normal, sintetizándose todas las proteínas virales, excepto aquellas cuya expresión está reprimida en el virus recombinante, y se puede por tanto inducir una fuerte respuesta inmune. En este sentido, presentan una clara ventaja frente a la utilización como antígenos de proteínas virales individuales o en determinadas combinaciones. Respecto a la utilización de virus atenuados, estos virus recombinantes inducibles presentan mayor seguridad, dado que las partículas virales producidas no son infectivas, y hay un solo ciclo de replicación. Además, el sistema de la invención es compatible con la delección de otros genes virales, como aquellos implicados en el control de la respuesta inmune por parte del virus, en la

virulencia o en la reparación del DNA, lo que aumentaría la eficiencia y seguridad de la vacuna.

Dado que la cepa virulenta BA71 presenta con respecto a la no patogénica BA71V diferencias en los extremos del DNA, pero no hay diferencias en las zonas necesarias para la generación de los virus recombinantes, se han podido utilizar las mismas herramientas descritas en la generación de virus deficientes en replicación derivados de BA71V descritas anteriormente. Así, se han podido construir virus patogénicos que pueden crecerse en células aisladas en presencia del inductor (IPTG), pero que, una vez han infectado al hospedador, al no haber inductor son defectivos en su replicación, únicamente generan partículas virales vacías, siendo por lo tanto muy seguros como vacunas potenciales. Una ventaja adicional de la cepa BA71 es que puede crecer y formar placas de lisis en células COS (ATCC, CRL-1650TM), una línea celular que puede ser transfectada muy eficazmente, lo que es muy útil para la construcción de los virus recombinantes por recombinación homóloga. Además, el virus producido en estas células conserva su virulencia, incluso después del alto número de pases que se requieren para la construcción y purificación del virus recombinante. De este modo, se ha conseguido generar con éxito una vacuna que comprende virus recombinantes deficientes en replicación derivados de la cepa patogénica BA71 capaces de infectar *in vivo* y de generar una respuesta inmune efectiva, lo que es imposible en los virus derivados de la cepa atenuada BA71V. Además, se han generado partículas virales vacías de dichos virus para su uso en vacunación frente a aislados virulentos del VPPA que, al ser derivadas del virus patogénico, mimetizan los antígenos virales de éste y serían más efectivas que las vacunas de proteínas recombinantes desarrolladas previamente, al incluir muchas de las proteínas estructurales del virus.

Los virus recombinantes de la presente invención expresan de modo inducible uno o varios de los genes pp220, pp62 y pB438L y además tienen reprimida la expresión de genes implicados en el control de la respuesta inmune por parte

del virus o en la virulencia, tales como el gen de la timidina quinasa (TK), y/o el homólogo del receptor de adhesión CD2 (CD2); y/o el gen de reparación de la DNA polimerasa X (pol X) para conferirles mayor seguridad.

- 5 Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un virus recombinante caracterizado porque se obtiene a partir de la cepa virulenta BA71 del virus de la peste porcina africana y porque es deficiente en la replicación del virus (en adelante, "virus de la invención").
- 10 El término "Virus de la Peste Porcina Africana", también llamado en la literatura "VPPA", "ASFV", "African Swine Fever Virus", se refiere a un virus de DNA de cadena doble con envoltura de la familia *Asfarviridae* que infecta, entre otros, a animales de la familia *Suidae*.
- 15 La cepa BA71 se refiere al virus de la peste porcina africana aislada en Badajoz en 1971 que es altamente virulenta y cuyo DNA contiene 178 kpb (Enjuanes et al. 1976. J Gen Virol 32: 471-477). Actualmente, la secuencia del genoma de la cepa BA71 no está publicada. La cepa BA71 es de acceso libre al público.
- 20 Los virus de la invención se han generado mediante la modificación del genoma viral para permitir la expresión inducible de uno o varios de los genes que codifican las proteínas pp220, pp62 o pB438L, respectivamente. Por lo que una realización preferida de la invención se refiere al virus de la invención que
- 25 tiene reprimida la expresión de al menos un gen que codifica para la proteína seleccionada de la lista que comprende la poliproteína pp220, la poliproteína pp62 y la proteína pB438L.
- 30 La poliproteína pp220 en la presente invención se refiere a la poliproteína codificada por la cepa BA71 que es homóloga a la pp220 codificada por la cepa BA71V o a variaciones funcionales de la misma. La pp220 de la cepa BA71V se refiere a la SEQ ID NO: 1 (número de acceso NP_042785.1)

El término "proteína homóloga" se refiere a aquella proteína que tiene una secuencia similar y que ejerce igual función en el virus de la peste porcina africana, independientemente de la cepa del virus. En la presente invención, se refiere a las proteínas de la cepa BA71 que tienen una secuencia de aminoácidos similar a las de la cepa BA71V, donde secuencia similar se refiere a una secuencia con una similitud superior al 95%, que realizan la misma función en el virus.

Así, una realización más preferida se refiere a los virus de la invención donde el gen reprimido es el que codifica para la poliproteína pp220.

La poliproteína pp62 en la presente invención se refiere a la poliproteína codificada por la cepa BA71 que es homóloga a la pp62 codificada por la cepa BA71V o a variaciones funcionales de la misma. La pp62 de la cepa BA71V se refiere a la SEQ ID NO: 2 (número de acceso NP_042787).

Así, otra realización más preferida de la invención se refiere a los virus de la invención donde el gen reprimido es el que codifica para la poliproteína pp62.

La proteína pB438L en la presente invención se refiere a la proteína codificada por la cepa BA71 que es homóloga a la pB438L codificada por la cepa BA71V o a variaciones funcionales de la misma. La pB438L de la cepa BA71V se refiere a la SEQ ID NO: 3 (número de acceso NP_042769.1).

Así, otra realización más preferida se refiere a los virus de la invención donde el gen reprimido es el que codifica para la proteína pB438L.

La expresión inducible de los genes que codifican las poliproteínas pp220 o pp62 o la proteína pB438L se ha realizado mediante la sustitución del promotor original de estos genes por el promotor inducible *p72.1* formado por el promotor viral tardío *p72.4* y la secuencia del operador O_1 del operón Lac de *E. coli*. En esta invención también se puede utilizar el promotor inducible *p74.1** que se

diferencia del *p74.l* en la distancia desde la secuencia operadora hasta el inicio de la transcripción del gen inducible (2 y 8 bases, respectivamente). Ambos promotores son inducibles por IPTG. La presente invención también se refiere a virus de la invención donde los genes son inducidos por otros inductores, por ejemplo tetraciclina, y que contienen promotores inducibles por los mismos.

Por lo que una realización aún más preferida de la invención se refiere al virus de la invención donde dicho virus comprende una construcción genética que comprende un promotor inducible capaz de dirigir dicha represión.

10

Una construcción genética se entiende como una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia codificante del virus de la invención operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para regular su transcripción, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc.

Un promotor es una secuencia de nucleótidos que controla la transcripción de un gen dado. El término "inducible", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la posibilidad de que el promotor tenga un elemento de control que permita activar o desactivar (reprimir) la transcripción del gen que regula, en presencia de un factor externo al promotor, como por ejemplo, la adición de una sustancia al medio de cultivo en el que crece el organismo que contiene el virus de la invención. Un promotor inducible por IPTG es aquel que presenta los elementos necesarios para que la transcripción se produzca únicamente en presencia de esta sustancia.

Los virus recombinantes contienen asimismo al menos un gen de selección (*lacZ* que codifica para la β -Galactosidasa u otro gen de selección) bajo el control del promotor viral *p72*. Así, en otra realización aún más preferida los virus de la invención además comprenden al menos un gen de selección.

30

El término "gen de selección", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un gen que codifica para una proteína que confiere una característica al organismo en el que se expresa dicho gen y que no se encuentra en dicho organismo de forma natural, como puede ser que sobreviva a la presencia de un antibiótico, que produzca una sustancia coloreada en presencia de un reactivo determinado o que emita luz. Un gen de resistencia a un antibiótico codifica para una proteína que confiere a la célula que la expresa, que normalmente sería sensible al antibiótico, la capacidad de superar el efecto del antibiótico. Dicha proteína suele ser un enzima que inactiva el antibiótico en cuestión.

Por lo que otra realización aún más preferida de la invención se refiere al virus de la invención donde dicho virus comprende una construcción genética que comprende al menos un gen de selección.

Otra realización aún más preferida se refiere a los virus de la invención donde dicho virus comprende una construcción genética que comprende un promotor inducible capaz de dirigir dicha expresión donde el promotor es inducible por IPTG.

Para aumentar la seguridad de los virus de la invención, se ha dispuesto de mecanismos de protección frente a una posible modificación genética (reversión) que los pudiera convertir en virus capaces de replicar. El mecanismo para lograrlo se basa en la represión constitutiva bien de genes implicados en la virulencia (particularmente, el gen de la timidina quinasa), bien de genes que participan en inmunosupresión (particularmente, el gen *EP402R* que codifica para la CD2) o de genes que participan en la reparación del DNA (como el gen *O174L* que codifica para la DNA polimerasa X). En todos ellos ha sido posible utilizar las herramientas descritas anteriormente para la generación de los virus deficientes en replicación derivados de BA71V ya que no está descrito que existan diferencias significativas entre esta cepa y la cepa de la invención en estos genes dispensables para la replicación. Por recombinación

homóloga se ha introducido en los genes cuya expresión se quiere reprimir constitutivamente el *cassette* represor+selección que contiene (i) el gen del represor *Lac I* del operón *Lac* de *E. coli* bajo el control del promotor temprano/tardío del gen *U104L* (*pU104*) del VPPA y (ii) el marcador *p72GUS*,
5 que consiste en el gen de la β -glucuronidasa (β -Gus o *gusA*) bajo el control del promotor *p72* del gen de la proteína *p72*. Además, la presente invención también admite la delección de la expresión de genes dispensables para la replicación mediante inserción de un gen de selección (por ejemplo GFP o EGFP, que codifican por la proteína fluorescente verde y la proteína
10 fluorescente verde mejorada ("green fluorescent protein" o "enhanced green fluorescent protein", respectivamente) que interrumpa el marco de lectura del gen dispensable para la replicación. De este modo se han generado virus atenuados (los virus TK-), virus sin inmunosupresores, y que por tanto favorecen la respuesta inmune del hospedador (los virus CD2-) y virus que
15 tienen alterado el sistema de reparación del DNA (los virus pol X-).

La timidina quinasa (TK) en la presente invención se refiere a la proteína codificada por la cepa BA71 que es homóloga a la timidina quinasa codificada por la cepa BA71V o a variaciones funcionales de la misma. La timidina
20 quinasa de la cepa BA71V se refiere a la SEQ ID NO: 4 (número de acceso NP_042744.1).

La CD2 (también llamado "homólogo del receptor de adhesión CD2" o "hemaglutinina") en la presente invención se refiere a la proteína codificada por
25 el gen *EP402R* por la cepa BA71 que es homóloga a la CD2 codificada por la cepa BA71V o a variaciones funcionales de la misma. La CD2 de la cepa BA71V se refiere a la SEQ ID NO: 5 (número de acceso NP_042752.1).

La polimerasa X (pol X, "DNA polimerase beta-like protein") en la presente invención se refiere a la proteína codificada por el gen *O174L* por la cepa BA71
30 que es homóloga a la pol X codificada por la cepa BA71V o a variaciones funcionales de la misma. La pol X de la cepa BA71V se refiere a la SEQ ID NO: 6 (número de acceso NP_042790.1).

Por todo esto, un aspecto de la invención se refiere a un virus de la invención que además no expresa al menos un gen dispensable para la replicación. Preferentemente, los genes dispensables para la replicación comprenden al menos un gen que se selecciona de la lista que comprende: gen que participa

5 en la virulencia del virus, gen que participa en inmunosupresión, y gen que participa en la reparación del DNA. Más preferentemente el gen dispensable para la replicación se selecciona de la lista que comprende: el gen de la timidina quinasa, el gen *EP402R* y el gen *O174L*, o cualquiera de sus combinaciones. Una realización más preferida se refiere al virus de la invención

10 donde los genes dispensables para la replicación están reprimidos porque tienen variado su marco de lectura y no expresan una proteína viable.

También forman parte de la invención las construcciones genéticas de DNA que codifican secuencias del virus recombinante de la invención. Dicha

15 construcción genética de DNA dirigiría la transcripción intracelular de la secuencia del virus o fragmento del mismo, y comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias: a) secuencia de DNA que comprende, al menos, la secuencia codificante del virus de la invención para su transcripción intracelular, b) un *cassette* de expresión que comprende la secuencia de DNA

20 definida en a) unido operativamente a elementos de control de la transcripción y opcionalmente de traducción; c) secuencia de DNA correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante del virus de la invención, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia, y con otras secuencias para

25 regular su transcripción tales como, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, o señal de poliadenilación, donde preferentemente el vector es un plásmido.

Otro aspecto de la invención se refiere a la célula hospedadora que comprende

30 el ácido nucleico, el *cassette* de expresión o el vector que codifican secuencias del virus de la invención, donde la célula preferentemente es una célula de mamífero (no perteneciente al grupo de las células embrionarias o germinales

humanas), de insecto, de levadura o bacteria. La introducción de dichas construcciones génicas se puede realizar con los métodos conocidos en el estado de la técnica. También se refiere al método de producción del virus de la invención que comprende cultivar dichas células hospedadoras.

5

Otra realización preferida se refiere al uso de los virus de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica.

El término "composición farmacéutica" en esta memoria hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades. En el contexto de la presente invención se refiere a una composición que comprenda al menos los virus de la invención.

Una realización más preferida se refiere al uso del virus de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de la peste porcina africana, preferiblemente para la profilaxis de la peste porcina africana.

La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse tanto sola como en combinación con otras composiciones para el tratamiento o prevención de la peste porcina africana.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como al profiláctico o medidas preventivas. Aquellas necesarias de tratamiento incluyen las ya asociadas con alteraciones así como en aquellas en las que se previene la alteración. Una "alteración" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con la composición de la invención, tal y como se describe en el presente documento.

Una realización aún más preferida de la invención se refiere al uso del virus de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica para la profilaxis de la peste porcina africana donde dicha composición farmacéutica es una vacuna.

En el contexto de la presente invención el término "vacuna" se refiere a una preparación antigénica empleada para provocar una respuesta del sistema inmune a la enfermedad causada por un virus de la peste porcina africana. Es un preparado de antígenos que, una vez dentro del organismo, provoca la
5 respuesta del sistema inmunitario mediante la producción de anticuerpos, y genera memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria.

Otro aspecto de la invención se refiere a una vacuna frente al virus de la peste
10 porcina africana que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del virus de la invención.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de agentes moduladores
15 calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos agentes (y construcciones) y el efecto terapéutico a conseguir. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

20

En una realización aún más preferida, la vacuna que comprende el virus de la invención además comprende, al menos, un excipiente y/o al menos, un vehículo farmacológicamente aceptables.

25 El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la vacuna que contiene el virus de la invención, estabiliza dicha vacuna o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle una consistencia, forma, sabor o cualquier otra característica funcional específica. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los
30 ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de

una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

5

Un "vehículo farmacológicamente aceptable" se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención y cuya función es facilitar la incorporación del fármaco así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. El término "farmacológicamente aceptable" se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

Así, la composición farmacéutica o vacuna proporcionada por esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

En una realización más preferida de la invención, la vacuna que contiene los virus de la invención comprende al menos otro principio activo.

La presente invención también se refiere al uso de la vacuna que contiene el virus de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para la profilaxis de animales mamíferos, preferentemente de la familia *Suidae*, por ejemplo cerdos.

30

Como se ha explicado anteriormente, en condiciones de represión (es decir, en ausencia del inductor del promotor bajo cuyo control se han colocado ciertos genes virales) los virus de la invención son capaces de infectar la célula huésped pero no de producir virus completos, y las partículas virales que salen de la célula están vacías, ya que carecen del DNA. Por lo tanto en una infección *in vivo* con los virus de la invención se producen de forma natural dichas partículas virales vacías en el interior del animal infectado al tratarse éste de un sistema que carece del inductor. Como estas partículas virales vacías poseen todos los dominios externos (envuelta interna, cápsida y envuelta externa) podrían participar en la generación de la respuesta inmune observada frente al VPPA en el animal infectado por los virus de la invención. De esta manera podrían constituir una herramienta alternativa y/o complementaria para el tratamiento de la peste porcina africana.

Así, una realización preferida es el procedimiento para la obtención de partículas virales vacías (de ahora en adelante, "partículas virales de la invención") que comprende la infección de células aisladas con el virus recombinante de la invención en ausencia del agente inductor del promotor que controla los genes virales cuya transcripción se desea reprimir.

20

Se entiende por "infección" en la presente invención aquella patología generada por la invasión o colonización de cualquier tejido de un hospedador por parte del virus de la peste porcina africana. La "infección de células aisladas" se entiende que es una infección *in vitro* en la que la células aisladas infectadas por el virus de la invención son privadas del inductor para la correcta generación de las partículas virales vacías.

Se entiende en esta memoria el término "célula aislada" aquella célula cultivada *in vitro* para la producción de las partículas virales vacías cuando no son cultivadas con el agente inductor o para la producción de los virus recombinantes de la invención cuando son cultivadas con el inductor. Las células aisladas son preferentemente líneas celulares.

30

Una realización aún más preferida de la invención, se refiere a la partícula viral vacía generada por infección de las células aisladas con los virus de la invención, en adelante "partícula viral de la invención".

- 5 Otra realización preferida de la invención se refiere al uso de la partícula viral de la invención que se genera por infección por el virus de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica, preferiblemente para el tratamiento de la peste porcina africana, más preferiblemente para la profilaxis de la peste porcina africana. Más preferiblemente dicha composición
- 10 farmacéutica es una vacuna. Dicha vacuna comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de las partículas virales de la invención, y preferiblemente comprende también al menos un adyuvante, un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptables, donde en otra realización aún más preferida el adyuvante es el adyuvante de Freund's, y que además puede
- 15 comprender al menos otro principio activo.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la vacuna que contiene las partículas virales de la invención frente al virus de la peste porcina africana para la elaboración de una composición farmacéutica para la profilaxis de

20 animales mamíferos, preferiblemente de la familia *Suidae*, por ejemplo cerdos.

Los términos “polinucleótido” y el término “ácido nucleico” se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos.

- 5 Los términos “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido”, “poliproteína” y el término “proteína” se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, cuya secuencia les permite ejercer una función biológica.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra “comprende” y sus
10 variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la
15 presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ensayo de virulencia de la cepa BA71 crecida en células COS.

20 Se ensayó la virulencia de virus de la cepa BA71 crecido en células COS para comprobar que su virulencia no se veía afectada por su crecimiento en dicha línea celular. **A**, determinación de la temperatura rectal de cerdos infectados con distintas dosis (10^4 DI₅₀ y 100 DI₅₀, siendo DI₅₀ la dosis infecciosa 50%) de virus BA71 antes (BA71) y después (BA71Cos) de 10 ciclos de proliferación en
25 células COS. d0, día en el que se realizó la inoculación con el virus; d1-10, días post inoculación. **B**, ensayo de supervivencia de los cerdos infectados según se ha descrito en A; “n” es el número de animales en cada grupo.

Figura 2. Construcción del virus recombinante deficiente en replicación,

30 **BA71.v220i.TK-**. Se construyó el virus BA71.v220i.TK- que expresa induciblemente la poliproteína pp220 y no es virulento al no expresar la timidina quinasa (TK), utilizando las herramientas moleculares descritas previamente

partiendo de la cepa no patogénica BA71V. **A**, esquema del virus BA71.v220i.TK-. Se aprecia que el gen del represor *Lac I* y el gen marcador de la β -glucuronidasa (β -gus) se insertan en el locus de la TK para generar el virus intermedio BA71.vGUSREP.TK-. A partir de éste, se obtiene el virus

5 BA71.v220i.TK- situando el gen de la poliproteína pp220 bajo el control del promotor inducible *p72.I*. Un gen marcador, *lac Z*, que codifica para la β -galactosidasa permite la selección de los recombinantes. **B**, *Western blot* para detectar la expresión de pp220 en células COS tras infección con el virus BA71.v220i.TK- en presencia (+) o en ausencia (-) del inductor IPTG. Se

10 muestra la ausencia de pp220 en dos clones de células COS infectadas y crecidas en ausencia de IPTG (1 y 2) y como la presencia de IPTG en el medio de cultivo resulta en la expresión de pp220. Como control de carga se utilizó la proteína de la cápsida p72. NI, células no infectadas.

15 **Figura 3 Construcción del virus recombinante deficiente en replicación BA71.v220i.CD2-**. Se construyó el virus BA71.v220i.CD2- que expresa induciblemente pp220 y no expresa la proteína CD2, utilizando las herramientas moleculares descritas previamente partiendo de la cepa no patogénica BA71V. **A**, Vector de transferencia para la construcción de los virus

20 CD2- que contiene el *cassette* represor+selección que contiene el gen *lac I* bajo el control del promotor constitutivo *pU104* del virus, el gen marcador β -gus bajo el control del promotor viral tardío *p72* y las regiones flanqueantes del gen *EP402R* (CD2 viral) para la recombinación homóloga con BA71, donde 10T son señales de terminación de la transcripción. Se señalan las dianas de restricción

25 utilizadas: *SpeI* y *AflI*. **B**, esquema del virus BA71.v220i.CD2- El gen de la poliproteína pp220 se sitúa bajo el control del promotor inducible *p72.I*. Un gen marcador, *lac Z*, que codifica para la β -galactosidasa permite la selección de los recombinantes. Se aprecia que el gen del represor *Lac I* y el gen marcador de la β -glucuronidasa (β -gus) se insertan en el locus del gen de CD2 bajo el

30 control de los promotores *pU104* y *p72*, respectivamente.

Figura 4. Construcción del virus recombinante deficiente en replicación BA71.v220i.CD2-.PolX-. Se construyó el virus BA71.v220i.CD2-.PolX- utilizando las herramientas descritas previamente para los virus recombinantes deficientes en replicación derivados de la cepa no patogénica BA71V. En una primera fase se generó el virus intermedio BA71.pp220 con el gen de pp220 bajo el control del promotor *p72.1* y, como gen marcador, *lac Z*, que codifica para la β -galactosidasa permitiendo la selección de los recombinantes según se ha descrito anteriormente. Posteriormente se insertan el gen del represor *Lac I* y el gen marcador β -*gus* o *gusA* en el locus del gen de la CD2, generándose así el virus BA71.v220i.CD2-. Partiendo de dicho virus, se deletiona la expresión del gen pol X mediante inserción del gen EGFP (“enhanced green fluorescent protein”) bajo el promotor *p72.061R* es un gen utilizado en esta construcción para la recombinación homóloga.

Figura 5. Ensayos inmunológicos con el virus BA71.v220i.TK-. A, ELISA que muestra los niveles de anticuerpos anti-VPPA en cerdos vacunados con 10^5 DI₅₀ (P4 a P9), 10^7 DI₅₀ (P10 a P15) del virus inducible BA71.v220.TK- o inoculados con PBS (tampón fosfato salino) como control (P1 a P3), e infectados posteriormente con 10^3 DI₅₀ del virus parental virulento BA71. El análisis se realizó con muestras obtenidas antes de la inmunización (preinm), tras la primera inmunización (1st-inmun), tras la segunda inmunización (2nd-inmun) y en los días 3, 5 y 7 después de la segunda inmunización, (d3pi, d5pi y d7pi, respectivamente). La flecha indica que el día en el que se realizó la segunda inmunización también se infectó con 10^3 DI₅₀ del virus parental virulento BA71. **B,** ELISPOT que muestra la producción de INF- γ por parte de células T específicas en respuesta a la estimulación *in vitro* con el virus BA71.v220.TK- inducible (BA71ind). Las barras blancas corresponden a la primera vacunación (1st vac) y las negras a la segunda (2nd vac). **C,** Ensayo de supervivencia de cerdos vacunados con el virus BA71.v220i.TK- (BA71ind) a las mismas concentraciones que en A, o con PBS; “n” es el número de animales en cada grupo.

EJEMPLOS DE REALIZACION DE LA INVENCION

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

10 EJEMPLO 1: El virus BA71 conserva la virulencia tras crecimiento en células COS.

Dado que para la generación de los virus recombinantes y las partículas virales vacías se utilizan las células COS (ATCC, CRL-1650TM), para comprobar que el crecimiento en dichas células no atenúa la cepa virulenta BA71, se analizó si la virulencia de la cepa BA71 se veía afectada por su proliferación en dichas células.

Para ello, se inocularon 12 cerdos machos de la raza Duroc x Landrace, de tres meses e inmunológicamente maduros. La inoculación se llevó a cabo después de 5 días de adaptación, utilizando 3 cerdos por dosis y aislado de virus, como se indica en la Tabla 1. Los cerdos se inocularon intramuscularmente con 2 ml de PBS conteniendo 10^2 ó 10^4 DI₅₀ (dosis infecciosa 50%) del aislado virulento BA71 antes (BA71) y después (BA71Cos) de 10 ciclos de proliferación en células COS. Se recogió suero a los 3, 5, 7 y 9 días post-inoculación para titular el virus y se determinó la temperatura rectal (Fig. 1A) y la supervivencia (Fig. 1B).

Tabla 1. Composición de los grupos de inmunización con BA71

	10^2 DI ₅₀	10^4 DI ₅₀
BA71	(cerdos 1-3)	(cerdos 4-6)
BA71Cos	(cerdos 7-9)	(cerdos 10-12)

Como se esperaba, la inoculación con virus de la cepa BA71 fue muy patogénica, causando síntomas clínicos severos, incluyendo fiebre alta desde el día 3 post-inoculación hasta el final del experimento, e independientemente de la dosis utilizada. Con una dosis de 10^4 DI₅₀ del virus BA71 pasado por COS (Ba71Cos), la enfermedad seguía el mismo curso que con el virus BA71 sin ese pase (BA71), aunque con dosis más bajas (10^2 DI₅₀) algunos cerdos sufrían un ligero retraso en la aparición de los síntomas clínicos, incluyendo la fiebre (Fig. 1A), y en la disminución de su supervivencia (Fig. 1B).

10 **EJEMPLO 2: Obtención de los virus recombinantes que no expresan el gen de la timidina quinasa BA71.v220i.TK-, BA71.v62i.TK- y BA71.vB438Li.TK- y en los que la expresión de las proteínas pp220, pp62 y pB438, respectivamente, es inducible.**

15 Para obtener estos virus recombinantes deficientes en replicación, timidina quinasa negativos (TK-) a partir de la cepa BA71 se utilizaron las herramientas moleculares descritas anteriormente y en Andrés et al. 2002. J Virol 76:2654-2666; Suárez et al. 2010. J Virol 84:176-187; y Epifano et al. 2006. J Virol 80:11456-11466; con alguna modificación que pasamos a detallar.

20

Para generar el virus BA71.v220i.TK-, un virus recombinante atenuado, deficiente en replicación y en el que la expresión de la pp220 es inducible por IPTG, se partió de un virus de la cepa BA71. Primero se deletionó la expresión de la TK (Fig.2A) utilizando un *cassette* represor+selección de recombinación homóloga que se inserta en el locus de la TK. Este *cassette* contenía (i) el gen del represor de la lactosa (*Lac I*) bajo el control del promotor temprano/tardío del gen *U104L* del VPPA (pU104) y (ii) el marcador p72GUS, que consiste en el gen de la β-glucuronidasa bajo el control del promotor tardío *p72* (Fig. 2A). El virus intermedio, BA71.GUSREP.TK- se purificó mediante rondas sucesivas de proliferación y aislamiento de placas de lisis en células COS hasta su completa pureza. En una segunda fase, se construyó el virus BA71.v220i.TK- inducible en el gen de la poliproteína pp220 a partir del virus intermedio

25

30

BA71.GUSREP.TK-, mediante la introducción del gen de pp220 bajo el control del promotor inducible por IPTG (*p72.l*), que consiste en el promotor *p72*, el operador *lac* de *E. coli* y el gen *lac Z* (que codifica la β -galactosidasa utilizada como marcador para seleccionar los virus recombinantes), siguiendo el
5 procedimiento descrito para la construcción de un virus recombinante similar partiendo de la cepa BA71V descrito en Andrés et al. J Virol 2002. 76:2654-2666. El virus BA71.v220i.TK- resultante se purificó mediante rondas sucesivas de aislamiento de placas de lisis en células COS.

10 Para validar la construcción vírica BA71.v220i.TK-, se determinó la expresión de pp220 en células COS infectadas con este virus y crecidas en medios con y sin IPTG. La expresión de la poliproteína pp220 se examinó por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos (Andrés et al. J Virol 202. 76:2654-2666). Como se muestra en la Fig. 2B, la expresión de pp220 sólo se produce al
15 cultivar las células infectadas en un medio suplementado con IPTG.

Los virus BA71.v62i.TK- y BA71.vB438Li.TK- se generaron con las mismas herramientas que para el BA71.v220i.TK- pero los genes que se regulan por el promotor inducible codifican para la pp62 y la pB438L, respectivamente.

20

EJEMPLO 3: Obtención del virus inducible BA71.v220i.CD2-.

Para obtener este virus deficiente en replicación y que no expresa la proteína CD2 (implicada en la respuesta inmune del hospedador) y en el que la
25 expresión de la pp220 es inducible se utilizaron las herramientas para la elaboración de virus deficientes en replicación aplicadas a la cepa BA71V descritas en García-Escudero et al. 1998. J Virol 72:3185-3195; Rodríguez et al. 1993. J Virol 67:5312-5320; y Andrés et al. 2002. J Virol 76:2654-2666; con alguna modificación que pasamos a detallar.

30

Para generar el virus recombinante deficiente en replicación que carezca de algún gen implicado en la respuesta inmune, primero se construyó un virus con

la expresión de la pp220 inducible, partiendo de un virus de la cepa BA71 y colocando el gen de la poliproteína pp220 bajo el control del promotor inducible por IPTG (*p72.I*) (Fig. 3B). En el virus intermedio BA71.pp220, se insertó, por recombinación homóloga un *cassette* represor+selección (esencialmente
5 idéntico al empleado para la construcción de los virus TK-) en el gen de la CD2, el *EP402R* (Fig. 3A), delecionando así su expresión.

EJEMPLO 4: Obtención del virus inducible BA71.v220i.CD2- PolX-.

10 Para obtener este virus recombinante deficiente en replicación, con expresión de la DNA polimerasa X y la CD2 delecionada, y expresión inducible de la pp220 como se ha explicado anteriormente, se utilizaron las herramientas para la elaboración de virus deficientes en replicación derivados de la cepa BA71V descritas en García-Escudero et al. 1998. J Virol 72:3185-3195; Rodríguez et al.
15 1993. J Virol 67:5312-5320; y Andrés et al. 2002. J Virol 76:2654-2666; con alguna modificación que pasamos a detallar.

Para generar una vacuna contra el virus VPPA basada en virus recombinantes deficientes en replicación que carezcan de un gen implicado en el sistema de
20 reparación del DNA, se construyó otro virus que era TK+ y CD2- y que no expresaba el gen *O174L*, que codifica para la DNA polimerasa reparativa, pol X.. La metodología utilizada es la descrita anteriormente. Se siguieron los procedimientos que se han descrito previamente en la presente invención partiendo del virus BA71.v220i.CD2- que tiene el *cassette* represor+selección
25 insertado en el gen de la CD2. El virus pol X- se generó introduciendo en el gen de la pol X el gen *EGFP*, que sirve como marcador de selección, bajo el control del promotor p72, como se muestra en el esquema de la Figura 4.

**EJEMPLO 5: Ensayos de inmunización y supervivencia con el virus
30 inducible BA71.v220i.TK-.**

Para evaluar la actividad de los virus recombinantes deficientes en replicación como vacunas frente a la peste porcina africana, se inmunizaron grupos de cerdos con 10^7 ufp o 10^5 ufp (unidades formadoras de placas) de BA71.v220i.TK- (seis cerdos por grupo, dos veces en un intervalo de dos semanas) y se compararon los resultados con cerdos control a los que se les inoculó PBS (tres animales). Al mismo tiempo que se inmunizó la segunda vez con el virus BA71.v220i.TK-, todos los cerdos se infectaron con 10^3 DI_{50} de virus parental virulento BA71. Se recogieron muestras de suero y sangre después de cada dosis de vacuna a distintos días después de la infección para estudiar la respuesta humoral y celular inducida mediante un ensayo de ELISA específico para detectar VPPA (Fig. 5A) y un ensayo de ELISPOT (Fig. 5B). Como estímulo específico en el ensayo ELISPOT, se utilizó 10^5 ufp de BA71.v220i.TK- por millón de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) en un ensayo de 20 h.

Se observó una respuesta humoral significativa en la mayoría de los once cerdos vacunados (9 de 12) a partir del día 7 tras la inoculación con cualquiera de las dos dosis de virus (Fig. 5A). Un animal (P5) presentó respuesta significativa en el segundo día post-inoculación con la dosis más baja. Además, también se observó aumento en el número de células T específicas capaces de secretar interferón-gamma (INF- γ) en respuesta a la estimulación *in vitro* con el virus BA71.v220i.TK- (Fig. 5B).

El ensayo de supervivencia reveló que los cerdos inoculados con PBS morían antes del día 7 tras la infección, mientras que el 50% de los cerdos vacunados con la dosis máxima de BA71.v220i.TK- sobrevivían hasta el día 9 tras la infección (Fig. 5C).

EJEMPLO 6: Obtención de partículas icosaédricas vacías y estructuras virales tubulares.

Como ya se ha mencionado, en condiciones represoras (ausencia del inductor IPTG) se producen partículas icosaédricas vacías que contienen los dominios externos del virus (envuelta interna, cápsida y envuelta externa), pero no los internos (dominio intermedio y nucleoide) y por lo tanto carecen también del DNA del virus. Para producir estas partículas virales vacías se infectaron 5 células COS con 0,1 ufp del virus inducible BA71.v220i.TK-, BA71.v62i.TK- o BA71.vB438Li.TK- por célula y se cultivaron en ausencia del inductor. Las partículas virales se purificaron del medio por centrifugación en gradiente de Percoll y cromatografía en columnas de Sephacryll (Carrascosa et al. J Virol 10 1985. 54:337-344). Se obtuvieron partículas virales vacías generadas por represión de pp220, pp62 y pB438L, respectivamente.

MATERIAL Y MÉTODOS EMPLEADOS.

15 Obtención de los virus BA71.v220i.TK-, BA71.v62i.TK- y BA71.vB438Li.TK-

Se infectaron monocapas preconfluentes de células COS (25 placas P150) con el virus BA71.v220i.TK-, el virus BA71.v62i.TK- o el virus BA71.vB438Li.TK-, a una multiplicidad de infección de 0,1 ufp por célula. Las células se mantenían 20 en medio DMEM con suero fetal de ternera al 2% e IPTG al 1 mM. Después de 2 horas de adsorción del virus a 37°C, en un incubador con CO₂ al 5%, se retiró el inóculo y se añadió medio fresco con IPTG a la misma concentración, incubándose como antes a 37°C hasta que se observó un efecto citopático total (generalmente después de 48-72 horas). Se recogió el medio de cultivo que 25 contenía el virus extracelular producido y se centrifugó a baja velocidad (rotor Sorvall GS3 a 2500 rpm durante 15 min a 4° C) para eliminar restos celulares y, a continuación, se centrifugó a alta velocidad (rotor Sorvall GS3 a 6500 rpm durante 8.5 h a 4° C) para sedimentar el virus. El sedimento se resuspendió en 1/100 del volumen inicial y se purificó el virus por centrifugación durante 1 h a 30 4° C sobre un colchón de sacarosa al 25 % en PBS, usando un rotor Sorvall SW41.Ti a 100.000g. El sedimento obtenido se resuspendió en 1/500 del volumen inicial y se tituló en células COS en presencia de la misma

concentración de IPTG por el método de formación de placas de lisis (Enjuanes et al. 1976. J Gen Virol 32:471-477). La concentración del virus se expresa como unidades formadoras de placa (ufp) por ml.

5 **Análisis por *western blot*.**

Se lisaron células COS infectadas por BA71.v220i.TK- en presencia o ausencia del inductor IPTG y se analizaron los niveles de pp220 mediante *immunoblot* o *western blot* con anticuerpos específicos descritos en Andrés et al. J Virol 202. 10 76:2654-2666. Se utilizó el anticuerpo frente a p72 como control de carga.

Ensayos de protección y supervivencia tras inmunización con el virus BA71.v220i.TK-.

15 Se utilizaron cerdos inmunológicamente maduros de la estirpe Duroc x Landrace. Se inmunizaron dos grupos de 6 cerdos dos veces (en un intervalo de dos semanas) con 10^5 y con 10^7 ufp del virus BA71.v220i.TK-, respectivamente y otros 3 cerdos se inmunizaron con PBS como control del ensayo. Quince días después de la segunda inmunización, todos los cerdos se 20 inocularon por vía intramuscular con 10^3 ID₅₀ de virus BA71. A distintos días después de la inoculación, se obtuvieron muestras de suero y sangre para estudiar la respuesta humoral y celular utilizando un ensayo de ELISA específico de VPPA y un ensayo IFN- γ -ELISPOT, respectivamente. Para el ensayo de supervivencia, se comparó la supervivencia de los tres grupos de 25 animales. Además, también se monitorizó en dichos animales la viremia y los síntomas clínicos de la enfermedad tales como fiebre anorexia, letargia y temblores.

Determinación de anticuerpos frente al VPPA en el suero de cerdos 30 vacunados mediante ELISA

La determinación de la presencia de anticuerpos específicos frente al VPPA en el suero de cerdos vacunados se realizó como se describe en Díaz y Mateu. 2005. Vet Immunol Immunopathol.106:107-12, utilizando antígeno soluble obtenido a partir de células infectadas con VPPA (Escribano et al. 1989. Am J
5 Vet Res 50:1118-1122).

Cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos se tapiza durante 12 horas a 4° C con 100 µl de la proteína correspondiente diluida (5 µg/ml) en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6, y se incuba durante 12 horas a 4°C. Tras lavar 3
10 veces las placas con PBS-Tween 20 al 0,05% (v/v), éstas se bloquean con 100 µl de PBS-1% albúmina sérica bovina (BSA) durante 1 hora a 37°C. Se añaden las muestras de suero a las diluciones pertinentes a cada pocillo y se incuban 1 hora a 37°C, tras lo cual se lavan las placas y se añade el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (anti-IgG de cerdo a 1:20000; Sigma), y se
15 incuban 1 hora a 37°C. Tras los últimos lavados, las placas fueron reveladas utilizando TMB soluble (Calbiochem) como sustrato, parando la reacción con ácido sulfúrico 3N. Los resultados obtenidos para cada reacción se representan como la absorbancia de la solución de cada pocillo a una longitud de onda de 405nm.

20

Obtención de PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) para el ensayo de ELISPOT

Las PBMCs se purificaron a partir de sangre recogida en presencia del
25 anticoagulante EDTA (2,5 mM), utilizando un gradiente de densidad sobre Histopaque 1077 (Sigma). Se depositaron 20 ml de sangre diluida 1:1 con PBS sobre un colchón de 4 ml de Histopaque 1077 y, tras su centrifugación durante 30 minutos a 500xg, se recogió la interfase entre el plasma y el Histopaque, que contiene las PBMCs y a continuación se lisaron los eritrocitos.

ELISPOT

La cantidad de células secretoras de IFN γ porcino específicas frente al VPPA se determinó mediante un ensayo de ELISPOT siguiendo el método descrito en

5 Diaz and Mateu. 2005. Vet Immunol Immunopathol 106:107-12. Para ello, se tapizaron placas de 96 pocillos (Costar 3590, Corning) con 50 μ l/pocillo de un anticuerpo anti-IFN γ porcino (BD Pharmingen, clon P2G10) a una dilución 1:100 en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6, durante 14 horas a 4°C. Tras lavar 3 veces con PBS-1% Tween 20 y bloquear las placas con medio RPMI

10 completo durante 1 hora a 37°C, se añadieron 5×10^5 PBMCs en cada pocillo en ausencia o presencia de los estímulos correspondientes y en un volumen total de 200 μ l de medio por pocillo. Como estímulo específico se utilizó 10^5 ufp del virus BA71.v220i.TK- por millón de PBMCs. Como control positivo de estimulación, se utilizó fitohemaglutinina (10 μ g/ml). Tras 20 horas de

15 estimulación a 37°C las células se retiraron y tras extensos lavados, se procedió a realizar la inmuno-tinción. Para ello, se utilizaron 50 μ l/pocillo de un anticuerpo anti-IFN γ porcino biotinilado (BD Pharmingen) diluido 1:1000 en PBS, y, tras 1 hora de incubación a 37°C, se añadió estreptavidina-peroxidasa (Biosource) diluida a 0,5 μ g/ml, como anticuerpo secundario. Finalmente, la

20 reacción fue revelada utilizando como sustrato TMB insoluble (Calbiochem). Los resultados obtenidos con el ELISPOT se representan como el número de células secretoras de IFN γ por cada millón de PBMCs, una vez sustraídos los valores obtenidos a partir de los pocillos control sin estímulo (medio solo). En todos los caso, los experimentos con los estímulos se hicieron por triplicado.

25

Producción, expansión y purificación de las partículas virales vacías BA71.v220i.TK-, BA71.v62i.TK- y BA71.pB438L.TK- en células COS

Se infectaron células COS crecidas en medio DMEM con suero fetal de ternera

30 al 2% en ausencia del inductor IPTG a una concentración de 0,1 ufp/célula de los virus BA71.v220i.TK-, BA71.v62i.TK- y BA71.pB438L.TK-. Las partículas

virales vacías se purificaron según se ha descrito para purificar los virus BA71.v220i.TK-, BA71.v62i.TK- y BA71.vB438Li.TK-.

REIVINDICACIONES

1. Virus recombinante caracterizado porque se obtiene a partir de la cepa virulenta BA71 del virus de la peste porcina africana y porque es deficiente en su replicación.
5
2. Virus recombinante según la reivindicación 1, donde dicho virus tiene reprimida la expresión de al menos un gen que codifica para la proteína seleccionada de la lista que comprende poliproteína pp220, poliproteína pp62 o proteína pB438L.
10
3. Virus recombinante según la reivindicación 2, donde el gen reprimido es el que codifica para la poliproteína pp220.
- 15 4. Virus recombinante según la reivindicación 2, donde el gen reprimido es el que codifica para la poliproteína pp62.
5. Virus recombinante según la reivindicación 2, donde el gen reprimido es el que codifica para la proteína pB438L.
20
6. Virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, donde dicho virus comprende una construcción genética que comprende un promotor inducible capaz de dirigir dicha represión.
- 25 7. Virus recombinante según la reivindicación 6, donde la construcción genética comprende además al menos un gen marcador de selección.
8. Virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, donde el promotor se induce por IPTG.
30
9. Virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que además no expresa al menos un gen dispensable para la replicación.

10. Virus recombinante según la reivindicación 9 donde los genes dispensables para la replicación comprenden al menos un gen que se selecciona de la lista que comprende: gen que participa en la virulencia del virus, gen que participa en inmunosupresión, o gen que participa en la reparación del DNA.
- 5
11. Virus recombinante según la reivindicación 10, donde el gen o genes dispensables para la replicación se selecciona de la lista que comprende: el gen de la timidina quinasa, el gen de la CD2 o el gen de la pol X.
- 10
12. Ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para el virus recombinante descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 15
13. *Cassette* de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 12, unido operativamente a elementos de control de la transcripción.
- 20
14. Vector recombinante que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 12.
- 25
15. Vector según la reivindicación 14, donde dicho vector es un plásmido.
16. Célula hospedadora que comprende el ácido nucléico según la reivindicación 12, o el *cassette* de expresión según la reivindicación 13 o el vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15.
17. Célula hospedadora según la reivindicación 16 donde la célula es una célula de mamífero, de insecto, levadura o bacteria.
- 30
18. Proceso para producir el virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende cultivar una línea celular según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17.

19. Uso del virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la elaboración de una composición farmacéutica.
20. Uso según la reivindicación 19, en el que la composición farmacéutica se aplica para la profilaxis de la peste porcina africana.
21. Uso según la reivindicación 20 donde dicha composición farmacéutica es una vacuna.
22. Vacuna frente al virus de la peste porcina africana que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
23. Vacuna según la reivindicación 22 que además comprende al menos un excipiente y/o al menos un vehículo, ambos farmacéuticamente aceptables.
24. Vacuna según la reivindicación 23 que además comprende al menos otro principio activo.
25. Uso de la vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 para la fabricación de una composición farmacéutica para la profilaxis de la peste porcina africana de animales mamíferos, preferiblemente de la familia *Suidae*.
26. Procedimiento para la obtención de partículas virales vacías que comprende la infección de células aisladas con el virus recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
27. Partícula viral vacía generada por infección de células aisladas con el virus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

28. Uso de la partícula viral vacía según la reivindicación 27 para la elaboración de una composición farmacéutica.
29. Uso de las partículas virales vacías según la reivindicación 28, en el que la
5 composición farmacéutica se aplica para la profilaxis de la peste porcina africana.
30. Uso de las partículas virales vacías según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 29 donde dicha composición farmacéutica es una vacuna.
10
31. Vacuna frente al virus de la peste porcina africana que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de las partículas virales vacías según la reivindicación 27.
- 15 32. Vacuna según la reivindicación 31 que además comprende al menos un elemento de la lista formada por: adyuvantes, excipientes o vehículos, en todos los casos farmacéuticamente aceptables.
- 20 33. Vacuna según la reivindicación 32 que se caracteriza porque el adyuvante es el adyuvante de Freund's.
34. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33 que además comprende al menos otro principio activo
- 25 35. Uso de la vacuna frente al virus de la peste porcina africana según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, para la elaboración de una composición farmacéutica para la profilaxis de animales mamíferos, preferiblemente de la familia *Suidae*.

FIG. 1 A

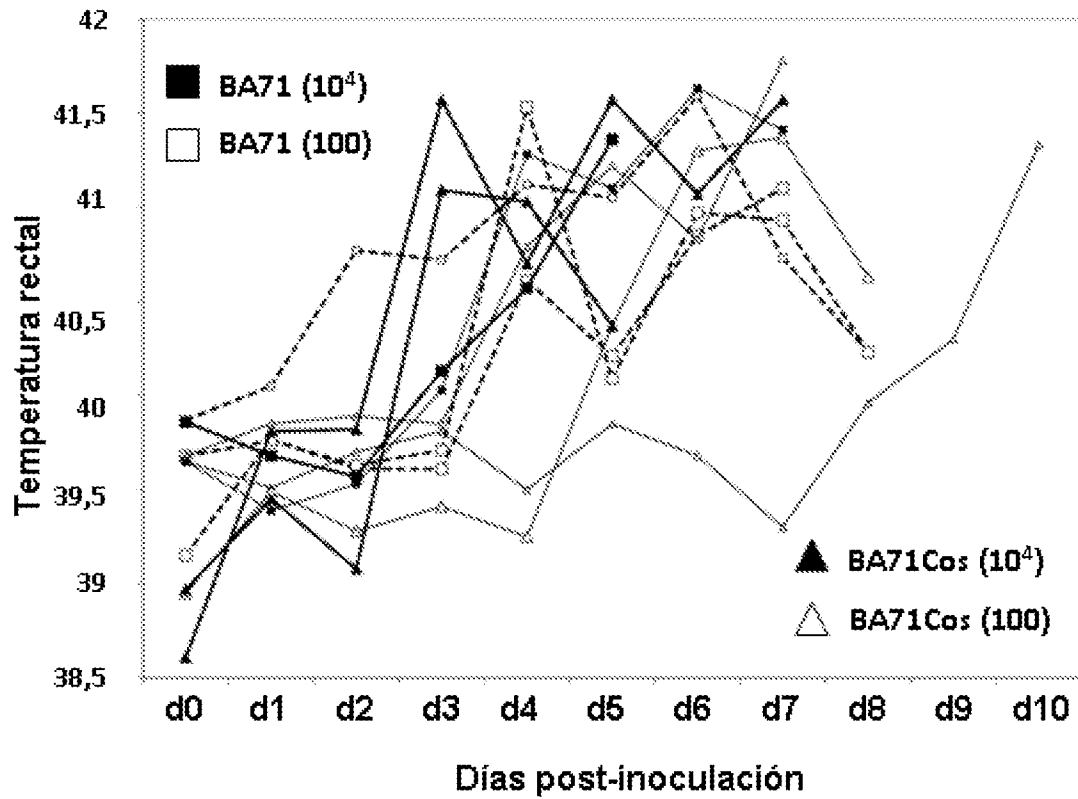


FIG 1B

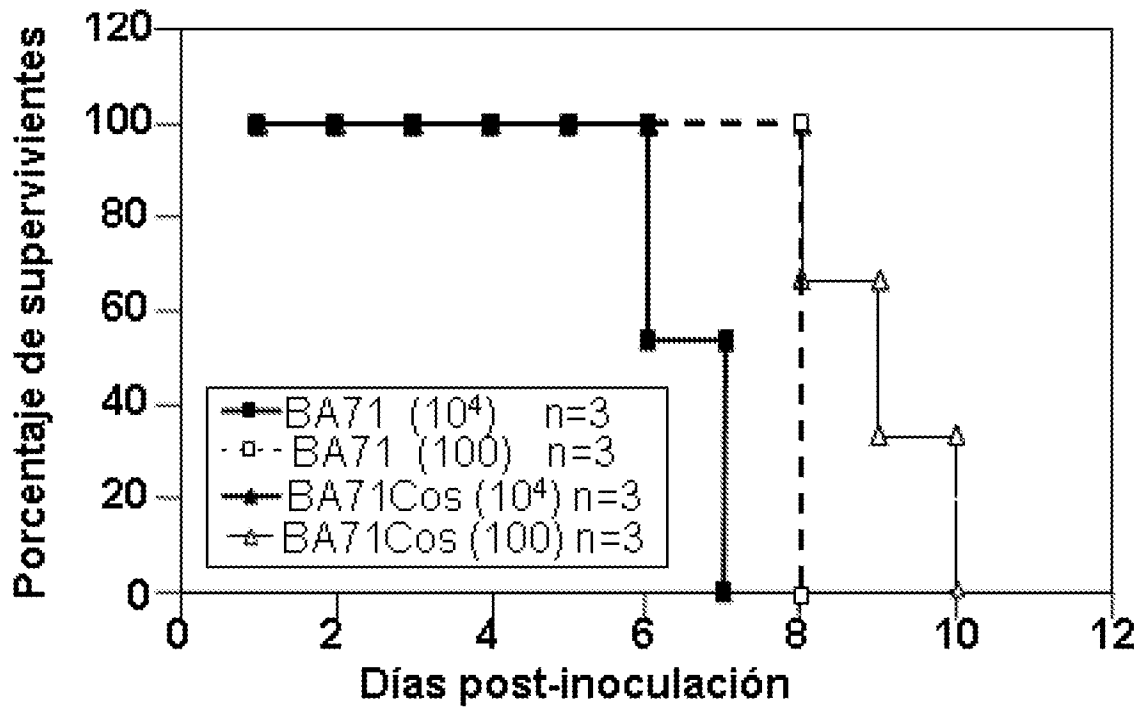


FIG. 2 A

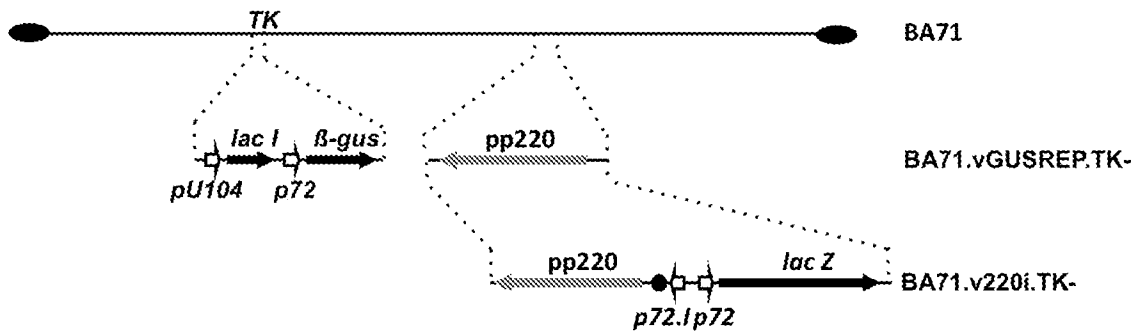


FIG. 2 B

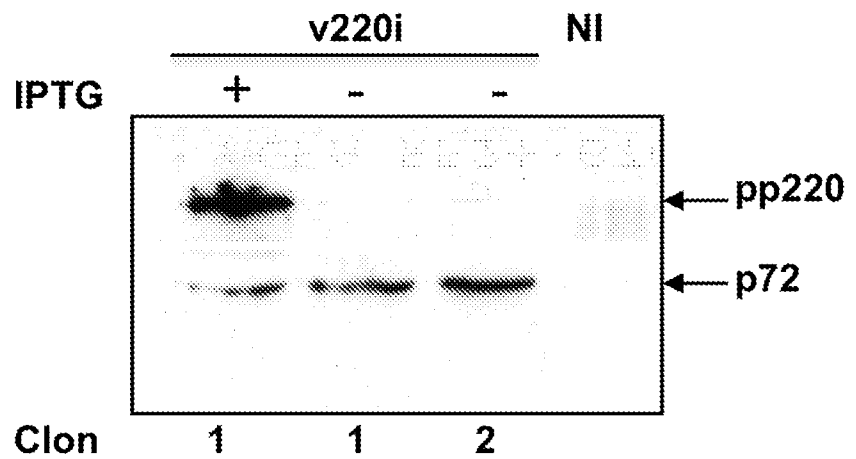


FIG. 3A

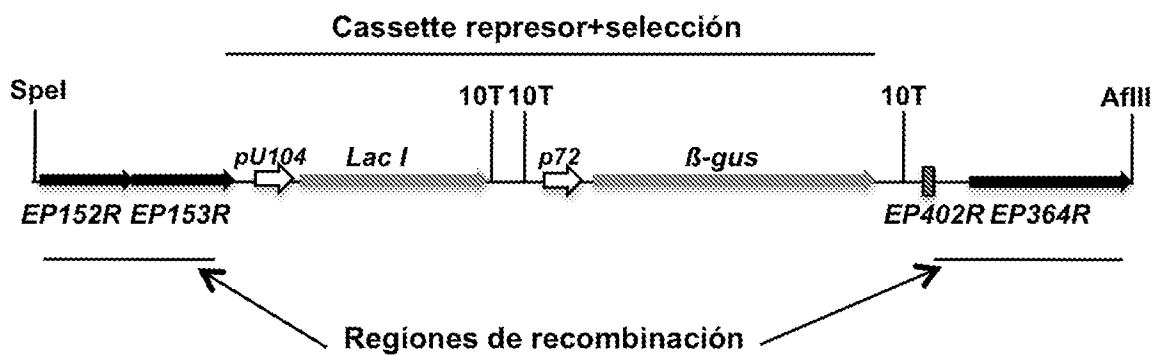


FIG 3 B

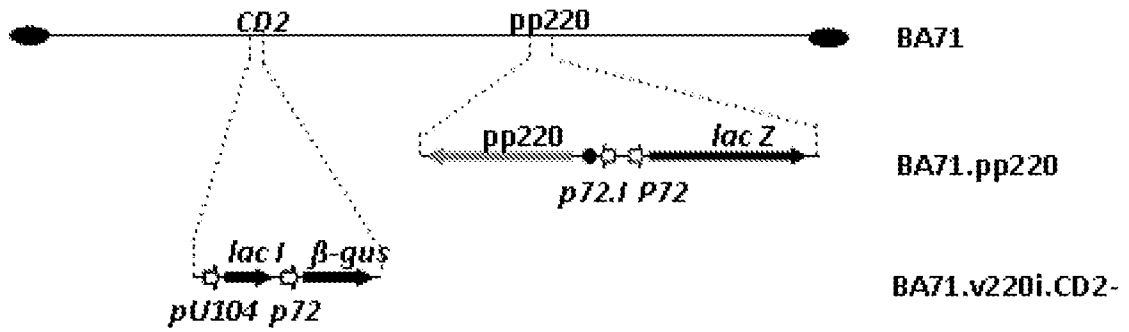


FIG 4

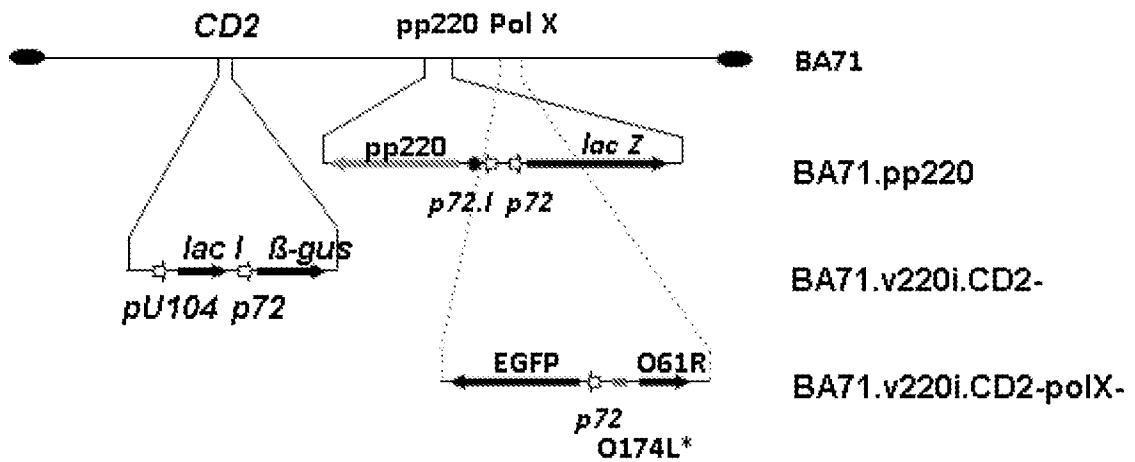


FIG 5 A

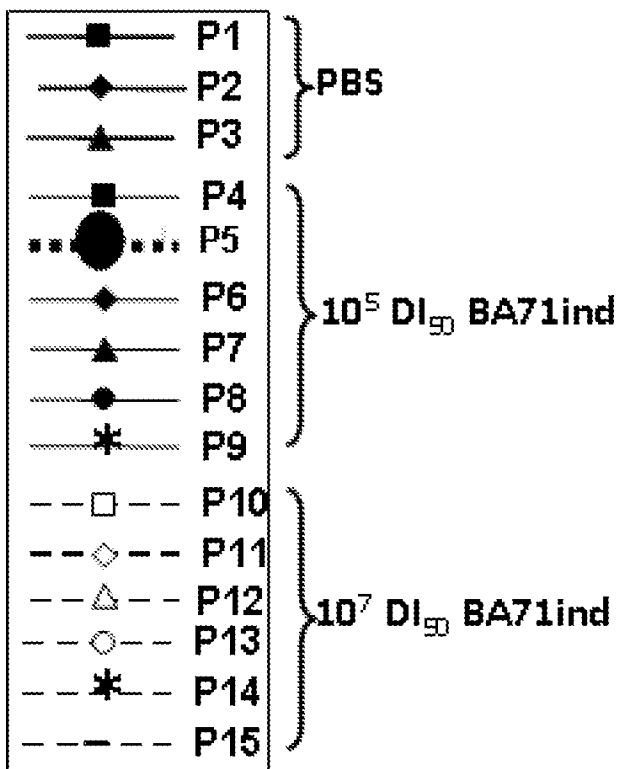
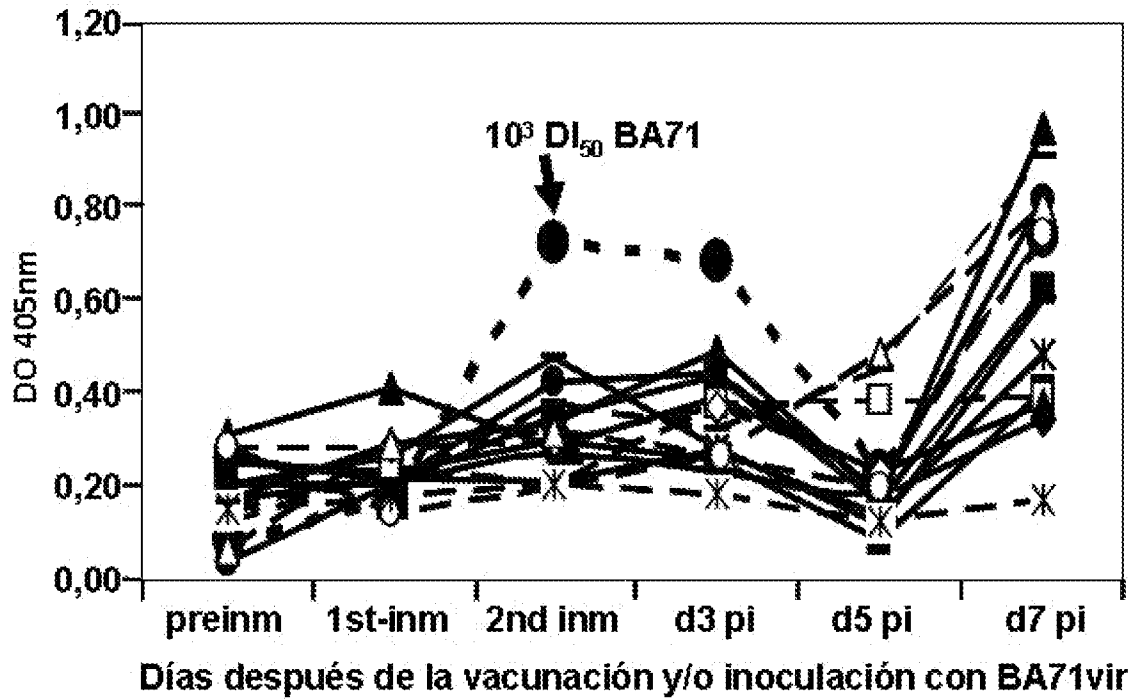


FIG 5 B

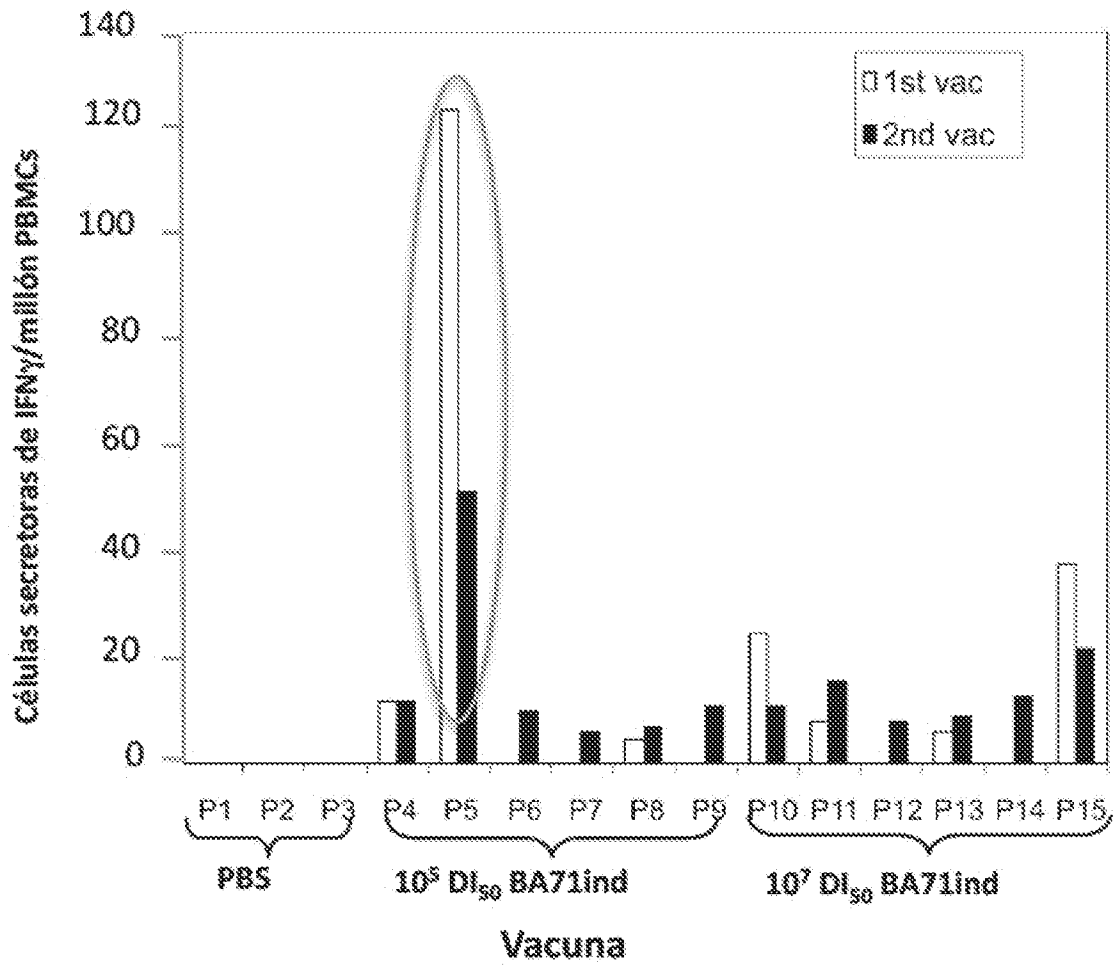
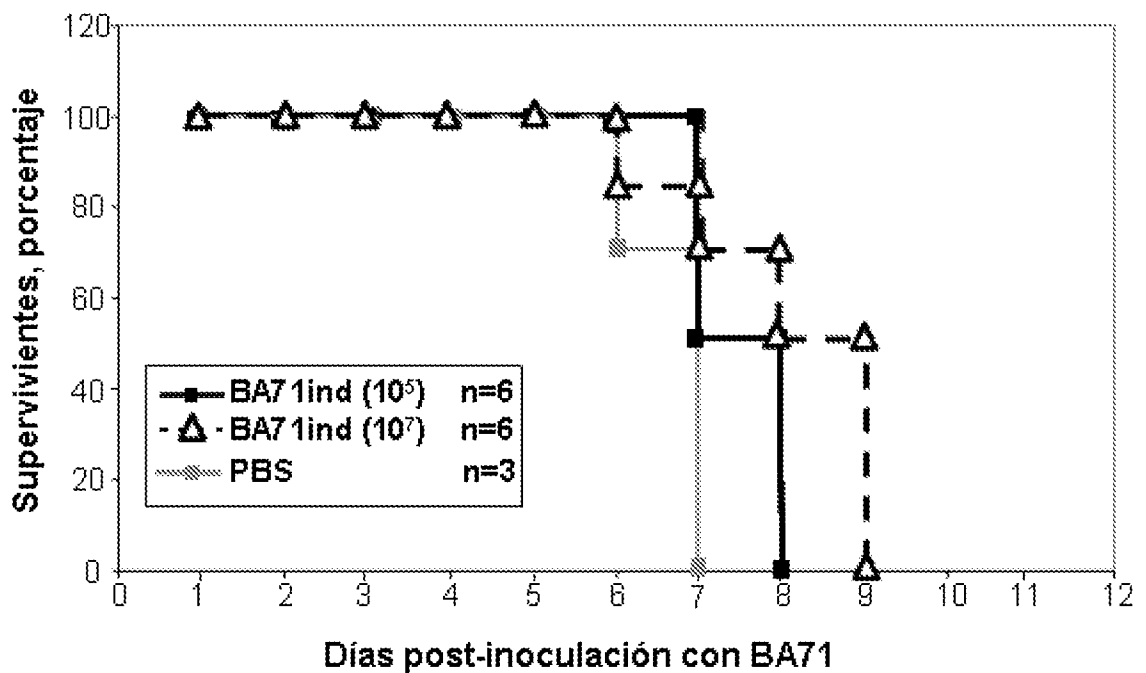


FIG 5C



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, XPESP, XPESP2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOORE, D. M., ZSAK, L. NEILAN, J. G. et al. The African swine fever virus thymidine kinase gene is required for efficient replication in swine macrophages and for virulence in swine. Journal of Virology. December 1998, Vol. 72, N° 12, pages 10310-10315. ISSN 0022-538X.	1-3, 6-35
Y	ANDRÉS, G., GARCÍA-ESCUADERO, R., SALAS, M. L., RODRÍGUEZ, J. M. Repression of African swine fever virus polyprotein pp220-encoding gene leads to the assembly of icosahedral core-less particles. Journal of Virology. March 2002, Vol. 76, N° 6, pages 2654-2666. ISSN 0022-538X. <Doi:10.1128/JVI.76.6.2654-2666.2002>	1-3, 6-35

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20/06/2012

Date of mailing of the international search report

(22/06/2012)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer

E. Relaño Reyes

Telephone No. 91 3498504

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070058

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BORCA, M. V., CARRILLO, C., ZSAK, L. et al. Deletion of a CD2-like gene, δ -DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. <i>Journal of Virology</i> . April 1998, Vol. 72, N° 4, pages 2881-2889. ISSN 0022-538X.	1, 9-25
A	BRUN, A., RODRÍGUEZ, F., PARRA, F. et al. Design and construction of African swine fever virus chimeras incorporating foreign viral epitopes. <i>Archives of Virology</i> . 1999, Vol. 144, N° 7, pages 1287-1298. ISSN 0304-8608.	1, 9-25
A	BROOKES, S. M., HYATT, A. D., WISE, T., PARKHOUSE, R. M. E. Intracellular virus DNA distribution and the acquisition of the nucleoprotein core during African swine fever virus particle assembly: ultrastructural <i>in situ</i> hybridisation and DNase-gold labelling. <i>Virology</i> . September 1998, Vol. 249, N° 1, pages 175-188. ISSN 0042-6822. <Doi:10.1006/viro.1998.9308>	26-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070058

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: **1-3, 9-11, 19, 22, 28, 31 (all, partially)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

(See additional page)

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See additional page)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-2 (partially) , 3, 6-35 (partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

SUPPLEMENTAL BOX, CONTINUATION OF BOX II

Claims 1, 9 and 10 are not clear (PCT Article 6).

- Claim 1: The definition of the virus in terms of replication efficiency does not allow the technical features of the virus to be clearly known. Consequently, for the purposes of the search, the subject matter of the invention is considered to be a recombinant virus characterised in that it is obtained from a virulent strain of the African swine fever virus in which the pp220 polyprotein is expressed under the control of an inducible promoter, and the expression of thymidine kinase or CD2 is suppressed, in which latter case the expression of Pol X can be suppressed.
- Claims 9 and 10. The gene is not clearly defined. Consequently, a search has been carried out only for the gene of thymidine kinase, the CD2 gene and the Pol X gene.

Claims 2, 3, 9, 10, 11, 19, 22, 28 and 31 are not adequately supported by the description (PCT Article 6).

- Claims: 2, 3, 9, 10 and 11. It cannot be deduced from the description that all possible viral strains included in these claims are effective as vaccines. Consequently, the search has been carried out for strains of African swine fever virus in which the pp220 polyprotein is expressed under the control of an inducible promoter and the expression of thymidine kinase, or of CD2 optionally together with Pol X, is suppressed.
- Claims: 19, 22, 28 and 31. Only the activity of the BA71.v220i.TK virus can be deduced from the description. Consequently, account has been taken during the search only of strains in which the pp220 polyprotein is expressed under the control of an inducible promoter and the thymidine kinase gene is suppressed, or of empty viral particles derived therefrom.

SUPPLEMENTAL BOX, CONTINUATION OF BOX III

The present application discloses a series of modified African swine fever viruses derived from the virulent BA71 strain. For the application to show unity of invention, these viruses must share a common inventive concept which, in this case, would be that they share at least one of the modifications with respect to the wild strain. Since this condition is not met, they are not considered to meet the requirement in respect of unity of invention (PCT Rules 13.1, 13.2 and 13.3).

Consequently, the application is considered to contain three inventions:

- Invention 1: Recombinant virus characterised in that it is obtained from the virulent BA71 strain of African swine fever virus, in which at least the expression of pp220 is suppressed (part of claims 1 and 2, claim 3, and part of claims 6-11); the nucleic acid that encodes the recombinant virus, as well as the expression cassette, vector and cell comprising same (part of claims 12-17); the method for producing the virus (part of claim 18); the use of the virus (part of claims 19-21); the vaccine comprising said virus and the use thereof (part of claims 22-25); the method for producing empty viral particles from the virus, the particles and the use thereof (part of claims 26-30); the vaccine comprising said particles and the use thereof (part of claims 31-35);
- Invention 2: Recombinant virus characterised in that it is obtained from the virulent BA71 strain of African swine fever virus, in which at least the expression of pp62 is suppressed (part of claims 1 and 2, claim 4, and part of claims 6-11); the nucleic acid that encodes the recombinant virus, as well as the expression cassette, vector and cell comprising same (part of claims 12-17); the method for producing the virus (part of claim 18); the use of the virus (part of claims 19-21); the vaccine comprising said virus and the use thereof (part of claims 22-25); the method for producing empty viral particles from the virus, the particles and the use thereof (part of claims 26-30); the vaccine comprising said particles and the use thereof (part of claims 31-35)
- Invention 3: Recombinant virus characterised in that it is obtained from the virulent BA71 strain of African swine fever virus, in which at least the expression of pB438L is suppressed (part of claims 1 and 2, claim 5, and part of claims 6-11); the nucleic acid that encodes the recombinant virus, as well as the expression cassette, vector and cell comprising same (part of claims 12-17); the method for producing the virus (part of claim 18); the use of the virus (part of claims 19-21); the vaccine comprising said virus and the use thereof (part of claims 22-25); the method for producing empty viral particles from the virus, the particles and the use thereof (part of claims 26-30); the vaccine comprising said particles and the use thereof (part of claims 31-35);

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070058

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N7/04 (2006.01)

A61K39/187 (2006.01)

A61P31/20 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070058

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, XPESP, XPESP2

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	MOORE, D. M., ZSAK, L. NEILAN, J. G. et al. The African swine fever virus thymidine kinase gene is required for efficient replication in swine macrophages and for virulence in swine. Journal of Virology. Diciembre 1998, Vol. 72, Nº 12, páginas 10310-10315. ISSN 0022-538X.	1-3, 6-35
Y	ANDRÉS, G., GARCÍA-ESCUADERO, R., SALAS, M. L., RODRÍGUEZ, J. M. Repression of African swine fever virus polyprotein pp220-encoding gene leads to the assembly of icosahedral core-less particles. Journal of Virology. Marzo 2002, Vol. 76, Nº 6, páginas 2654-2666. ISSN 0022-538X. <Doi:10.1128/JVI.76.6.2654-2666.2002>	1-3, 6-35

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
20/06/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
22 de junio de 2012 (22/06/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
E. Relaño Reyes
Nº de teléfono 91 3498504

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070058

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	BORCA, M. V., CARRILLO, C., ZSAK, L. et al. Deletion of a CD2-like gene, <i>8-DR</i> , from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. <i>Journal of Virology</i> . Abril 1998, Vol. 72, Nº 4, páginas 2881-2889. ISSN 0022-538X.	1, 9-25
A	BRUN, A., RODRÍGUEZ, F., PARRA, F. et al. Design and construction of African swine fever virus chimeras incorporating foreign viral epitopes. <i>Archives of Virology</i> . 1999, Vol. 144, Nº 7, páginas 1287-1298. ISSN 0304-8608.	1, 9-25
A	BROOKES, S. M., HYATT, A. D., WISE, T., PARKHOUSE, R. M. E. Intracellular virus DNA distribution and the acquisition of the nucleoprotein core during African swine fever virus particle assembly: ultrastructural <i>in situ</i> hybridisation and DNase-gold labelling. <i>Virology</i> . Septiembre 1998, Vol. 249, Nº 1, páginas 175-188. ISSN 0042-6822. <Doi:10.1006/viro.1998.9308>	26-35

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070058

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

- Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
- Las reivindicaciones n^{os}: **1-3, 9-11, 19, 22, 28, 31 (todas parcialmente)**
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

(Ver recuadro suplementario)

- Las reivindicaciones n^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

(Ver recuadro suplementario)

- Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
- Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
- Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n^{os}:
- Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n^{os}: **1-2 (parcialmente), 3, 6-35 (parcialmente)**

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

COMPLEMENTARIO DE RECUADRO II

Las reivindicaciones 1, 9 y 10 no son claras (Art. 6 PCT).

- Reivindicación 1. La definición del virus por su eficiencia en la replicación, no permite saber de manera clara sus características técnicas. Por lo tanto, a efectos de la búsqueda, se ha considerado que el objeto de la invención es un virus recombinante caracterizado por que se obtiene a partir de una cepa virulenta del virus de la peste porcina africana que presenta la expresión de la poliproteína pp220 bajo el control de un promotor inducible, y suprimida la expresión de la timidina quinasa o de CD2, pudiendo tener en este último caso suprimida la expresión de pol X.
- Reivindicaciones 9 y 10. La definición del gen no es clara. Por lo tanto, tan solo se han buscado el gen de la timidina quinasa, el de la CD2 y el de la pol X.

Las reivindicaciones 2, 3, 9, 10, 11, 19, 22, 28, y 31 no están fundadas adecuadamente en la descripción (Art. 6 PCT).

- Reivindicaciones 2, 3, 9, 10 y 11. De la descripción no se deduce que todas las posibles cepas virales incluidas en estas reivindicaciones sean eficaces como vacunas. En consecuencia, se han buscado cepas del virus de la peste porcina africana que presentan la expresión de la poliproteína pp220 bajo el control de un promotor inducible y suprimida la expresión de la timidina quinasa, o de CD2 opcionalmente junto con pol X.
- Reivindicaciones 19, 22, 28 y 31. De la descripción tan solo se deduce la actividad del virus BA71.v220i.TK. Por lo tanto, tan sólo se ha tenido en cuenta en la búsqueda cepas con la expresión de la poliproteína pp220 bajo el control de un promotor inducible y que presenta suprimido el gen de la tirosin quinasa, o las partículas virales vacías procedentes de la misma.

COMPLEMENTARIO DE RECUADRO III

La presente solicitud, divulga una serie de virus de la peste porcina africana modificados, procedentes de la cepa virulenta BA71. Para que esta solicitud presente unidad invención, estos virus han de presentar un concepto inventivo común que, en este caso, sería que tuvieran en común al menos una de las modificaciones que sufren con respecto a la cepa silvestre. Dado que esta premisa no se cumple, se entiende que no se cumple el requisito de unidad de invención (Reglas 13.1, 13.2 y 13.3 PCT).

Por lo tanto, se considera que existen tres invenciones:

- Primera invención: Virus recombinante caracterizado por que se obtiene a partir de la cepa virulenta BA71 del virus de la peste porcina africana, y que al menos presenta la expresión de pp220 reprimida (parte de las reivindicaciones 1 y 2, reivindicación 3, y parte de las reivindicaciones de la 6 a la 11); el ácido nucleico que lo codifica, así como el cassette de expresión, el vector y la célula que lo comprenden (parte de las reivindicaciones de la 12 a la 17); el proceso de producción del virus (parte de la reivindicación 18); el uso del virus (parte de las reivindicaciones de la 19 a la 21); la vacuna que comprende dicho virus y su uso (parte de las reivindicaciones de la 22 a la 25); el procedimiento de obtención de partículas virales vacías a partir del virus, las partículas y su uso (parte de las reivindicaciones de la 26 a la 30); vacuna que comprende dichas partículas y el uso de la misma (parte de las reivindicaciones de la 31 a la 35).
- Segunda invención: Virus recombinante caracterizado por que se obtiene a partir de la cepa virulenta BA71 del virus de la peste porcina africana, y que al menos tiene reprimida la expresión de pp62 (parte de las reivindicaciones 1 y 2, reivindicación 4, y parte de las reivindicaciones de la 6 a la 11); el ácido nucleico que lo codifica, así como el cassette de expresión, el vector y la célula que lo comprenden (parte de las reivindicaciones de la 12 a la 17); el proceso de producción del virus (parte de la reivindicación 18); el uso del virus (parte de las reivindicaciones de la 19 a la 21); la vacuna que comprende dicho virus y su uso (parte de las reivindicaciones de la 22 a la 25); el procedimiento de obtención de partículas virales vacías a partir del virus, las partículas y su uso (parte de las reivindicaciones de la 26 a la 30); vacuna que comprende dichas partículas y el uso de la misma (parte de las reivindicaciones de la 31 a la 35).
- Tercera invención: Virus recombinante caracterizado por que se obtiene a partir de la cepa virulenta BA71 del virus de la peste porcina africana, y que al menos presenta la expresión de pB438L reprimida (parte de las reivindicaciones 1 y 2, reivindicación 5, y parte de las reivindicaciones de la 6 a la 11); el ácido nucleico que lo codifica, así como el cassette de expresión, el vector y la célula que lo comprenden (parte de las reivindicaciones de la 12 a la 17); el proceso de producción del virus (parte de la reivindicación 18); el uso del virus (parte de las reivindicaciones de la 19 a la 21); la vacuna que comprende dicho virus y su uso (parte de las reivindicaciones de la 22 a la 25); el procedimiento de obtención de partículas virales vacías a partir del virus, las partículas y su uso (parte de las reivindicaciones de la 26 a la 30); vacuna que comprende dichas partículas y el uso de la misma (parte de las reivindicaciones de la 31 a la 35).

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070058

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12N7/04 (2006.01)

A61K39/187 (2006.01)

A61P31/20 (2006.01)