

Nuevo candidato vacunal de subunidad proteica confiere protección temprana y previene la transmisión vertical del virus de la peste porcina clásica.

Entidad Ejecutora Principal del Resultado: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

Autores Principales: Marisela Fátima Suárez Pedroso^a (15%), Yusmel Sordo Puga^a(15%), María Pilar Rodríguez Molto^a(15%), Mario Pablo Estrada García^a(10%),

Otros autores: Iliana Sosa Teste^b(7%), Yanet Prieto Carratalá^a(4%), Danny Pérez Pérez^a(3%), Lídice Méndez Pérez^a(3%), Alina Rodríguez Mallón^a(3%), Elaine Santana Rodríguez^a(3%), Elianet Lorenzo Romero^a(3%), Nemecio González Fernández(3%), Carlos Antonio Duarte Cano^a(3%), María Teresa Frías Laporeau^c(3%), Paula Naranjo Valdez^d(3%), Yamila Carpio González^a(2%), Carlos Montero Espinosa^a(1%), Elsa Maria Rodríguez Rodríguez^a(1%), Milagros de la Caridad Vargas Hernández^a(1%), Talía Sardinás González^a(1%), Yoandy Fuentes Rodríguez^a(1%).

Colaboradores: Liliianne Ganges Espinosa^e, Sara Muñoz-González^e, Marta Pérez-Simó^e, Albert Canturri^e,

Otras entidades participantes en el resultado: Centro para la producción de animales de laboratorio (CENPALAB), Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Laboratorios Centrales de Sanidad Agropecuaria, ULCSA, MINAG y Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA, IRTA-UAB, España).

Afiliación de los autores:

^a Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

^b Centro para la producción de animales de laboratorio, CENPALAB.

^c Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA

^d Laboratorios Centrales de Sanidad Agropecuaria, ULCSA, MINAG

^e CReSA Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA, IRTA-UAB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona

AutorU para la correspondencia:

Marisela F. Suárez Pedroso, M.C.: Jefe del Grupo de Estudios Clínicos Veterinarios. Dirección de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Apto 6162, La Habana 10600; marisela.suarez@cigb.edu.cu

Resumen

Antecedentes: La peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad viral de los suidos con cifras de mortalidad cercanas al 100% y es la que mayores pérdidas económicas ocasiona para la porcicultura. El uso de vacunas vivas atenuadas (VVA) es la estrategia utilizada para su control y erradicación, su aplicación continua, ha llevado al endemismo de la enfermedad en algunos países como Cuba. Se han desarrollado las vacunas de subunidad proteica (VS), que permiten diferenciar animales infectados de vacunados, las mismas se basan en la glicoproteína E2, la más inmunogénica de la envoltura viral. Las VS son más seguras ya que no liberan al campo virus atenuado con el riesgo de reversión de la virulencia. Las dos VS comerciales actuales son incapaces de generar una inmunidad celular protectora temprana como la que inducen las vacunas convencionales o prevenir la transmisión vertical del virus.

Problema que se ha resuelto de acuerdo con los objetivos del trabajo: Se ha generado una novedosa VS, capaz de superar las limitantes de las VS precedentes. Provee protección y respuesta inmune celular temprana frente al VPPC y evita la transmisión vertical en cerdas gestadas. Características que la hacen muy atractiva para su empleo en las condiciones de endemismo que existen en nuestro país o en situaciones de reemergencias.

Resultados: Se desarrolló un novedoso candidato vacunal basado en la fusión de la proteína E2 del VPPC con la molécula coestimuladora CD154 de cerdo (E2CD154). Se obtiene la línea celular HEK293-E2CD154 que expresa de forma estable esta proteína al sobrenadante del cultivo sin suero, lo cual facilita su purificación. Este candidato vacunal es seguro, eficaz y confiere inmunidad esterilizante desde los 7 días post-vacunación (dpv) con una única dosis, ante reto intranasal (IN) con 2×10^3 DL₅₀ de la cepa Margarita del VPPC, altamente patogénica. Este nivel de protección temprana no había sido descrito antes para una VS contra PPC. Adicionalmente, el candidato E2CD154 induce títulos protectores de anticuerpos neutralizantes (AcN) que evitan la transmisión vertical del virus en cerdas gestadas vacunadas y confrontadas con 2×10^5 TCID₅₀, de la cepa Margarita. Este constituye el primer informe de una VS capaz de evitar la transmisión vertical del VPPC ante confrontación con elevada carga viral de una cepa altamente virulenta.

El conjunto de estos resultados convierten a este candidato vacunal en una alternativa muy promisoriosa a las VVA que se emplean en los países con endemismo de la enfermedad, ya que logra combinar las bondades de ambos tipos de vacunas. A diferencia de las anteriores VS basadas en la E2, que son recomendadas solo para la fase de erradicación, su introducción en el programa desde la fase de control puede ser muy exitosa y tener un gran impacto económico en nuestro país. En estos momentos el candidato vacunal ha completado la Fase III de Ensayos Clínicos. Se presentó el dossier para la obtención del Registro Sanitario. Y se obtuvo un permiso especial para la aplicación masiva, en curso, en el municipio de la Isla de la Juventud. Estos resultados se encuentran avalados por dos publicaciones en prestigiosas revistas de alto factor de impacto, Vaccine (FI: 3.3) y Veterinary Microbiology (FI: 2.7) y la publicación internacional de una patente presentada al PCT. Los resultados de la presente propuesta son independientes del premio conferido anteriormente por la Academia al CIGB en esta temática: *Obtención y caracterización del antígeno E2 del VPPC producido en la leche de cabras. Potencial candidato vacunal.*

Comunicación corta

Generación de una línea celular establemente transformada que expresa la proteína E2CD154

Se ensambló el gen E2CD154, que codifica para la proteína de fusión formada por la glicoproteína E2 del VPPC, un espaciador y el antígeno CD154 porcino. Se generó partículas de lentivirus que se usaron para obtener la línea celular establemente transformada HEK293-E2CD154. Esta línea crece en suspensión y expresa la proteína de interés al medio de cultivo libre de suero. Las bandas de alto peso molecular fueron reconocidas por un AcM contra E2.

Producción, purificación y formulación de la proteína E2CD154

Se estableció un proceso de producción en condiciones de BPP para la obtención del principio activo y los lotes del candidato vacunal que se utilizaron en los ensayos clínicos. El antígeno E2CD154 se produjo y purificó a partir del sobrenadante de cultivo del clon HEK293-E2CD154 por un procedimiento rápido y eficiente de ultrafiltración. El antígeno se formuló como una emulsión de agua en aceite con Montanide ISA50 V2 (SEPPIC, Francia) en una proporción porcentual 60/40. Se formularon dosis de 2 ml que contenían 50 µg o 100 µg de E2CD154 para su empleo en los experimentos. Se preparó una formulación similar sin el antígeno (placebo) que se administró en condiciones idénticas a los grupos controles.

El candidato vacunal E2CD154 confiere protección temprana contra el reto viral.

Para demostrar que el candidato vacunal es capaz de conferir protección temprana, semejante a la que inducen las VVA, se realizó un ensayo de inmunización y reto. Los grupos 1 y 2, con 5 animales cada uno, recibieron una inoculación única de 50 µg y 100 µg de E2CD154, respectivamente. Los 3 animales del grupo 3 recibieron placebo. A los 7 días de vacunados, los cerdos se desafían por vía intranasal con 2×10^3 LD₅₀ de la cepa Margarita del VPPC. Los animales vacunados y retados se mantuvieron hasta el final del ensayo (28 días post confrontación (dpc)) sin manifestaciones o signos clínicos característicos de la enfermedad, a diferencia de los 3 animales controles que a partir del cuarto dpc, comenzaron a manifestar signos clínicos compatibles con la PPC. En este grupo, la temperatura aumentó por encima de 40,4°C hasta valores superiores a los 41°C. A partir del sexto dpc se observó un marcado deterioro de la salud de los animales con la aparición de diarreas, conjuntivitis, trastornos respiratorios, anorexia, ataxia, postración y severos síntomas nerviosos (Fig. 1). Los animales se sacrificaron por razones éticas a los 8, 11 y 14 dpc. Estos resultados evidencian que el reto viral fue exitoso y que la vacuna logró la protección clínica deseada.

Títulos de Anticuerpos Neutralizantes (AcN)

Los títulos de AcN al momento de la confrontación fueron de $1:9 \pm 7,4$ y $1:10 \pm 10$ en los cerdos vacunados con 100 y 50 µg de la proteína E2CD154, respectivamente. A partir de los 8 dpc se detectaron niveles de AcN con medias geométricas de $1:290 \pm 159$ y $1:300 \pm 141$ en los cerdos inmunizados con 100 y 50 µg, respectivamente. Un título de AcN superior a 1:50 es considerado protector (3, 4). Los títulos de AcN aumentaron hasta llegar a $>1:1000$, a partir de la evaluación del día 14 dpc y se mantuvieron elevados durante todo el estudio. No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los niveles de AcN detectados en los animales inmunizados con las dos dosis estudiadas. Los animales vacunados con el placebo no mostraron AcN contra el VPPC.

Detección del VPPC en muestras de sangre y tejidos antes y después del reto

Las muestras de sangre, tonsila, bazo e íleon colectadas de los animales controles en el momento del sacrificio resultaron positivas a la presencia del VPPC. Se analizaron muestras similares de los animales vacunados al momento del sacrificio y no se detectó presencia de

ARN viral. La no replicación del VPPC en los animales vacunados evidencian que el candidato vacunal E2CD154, induce inmunidad esterilizante en cerdos.

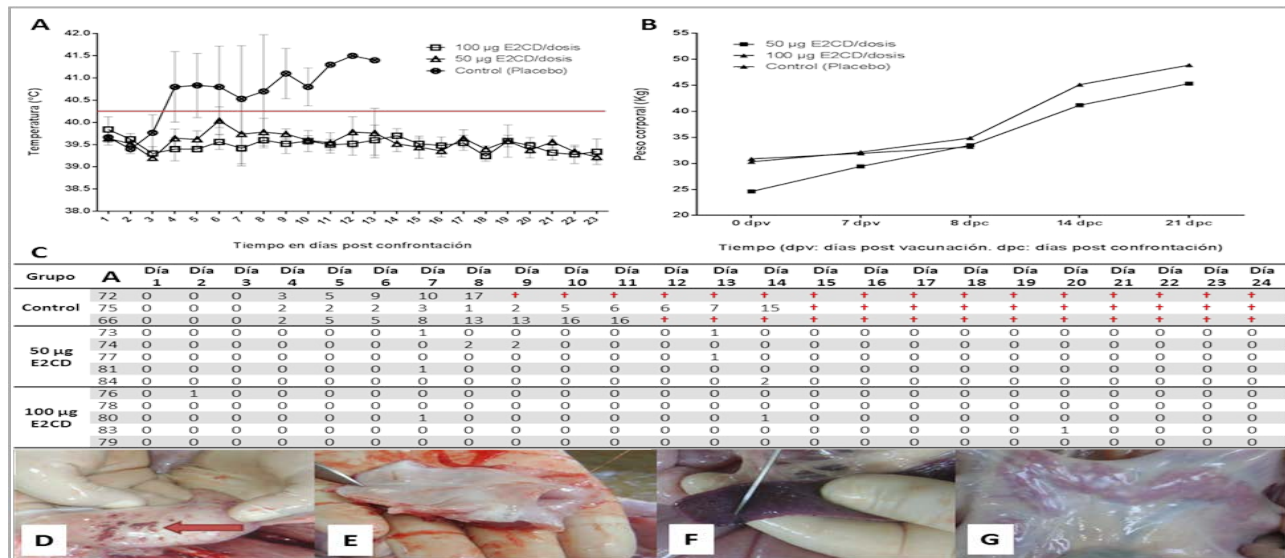


Figura 1: Seguimiento Clínico de los animales después de la confrontación. **A-** Medición diaria de la temperatura rectal en los animales del ensayo posterior a la confrontación con VPPC, como fiebre se consideraron las temperaturas superiores a 40,3 °C. **B-** Comportamiento del peso corporal promedio de los animales durante el ensayo. **C-** Puntuación clínica. Los resultados se describen de forma similar a lo reportado por Mittelholzer, et al, 2000, con cambios acorde a nuestras condiciones, † indica sacrificio de los animales. Lesiones encontradas en órganos de los animales controles. **D-** hemorragias petequiales en mucosa de la vejiga urinaria. **E-**Tonsilitis supurativa. **F-** Infarto hemorrágico marginal del bazo, **G-** Ganglios mesentéricos aumentados de tamaño y hemorrágicos.

Respuesta inmune celular en animales inmunizados con la proteína E2CD154

Los linfocitos procedentes de los animales previamente inmunizados con la E2CD154, fueron capaces de producir IFN γ al ser estimulados *in vitro* con el VPPC y la proteína E2CD154. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) encontradas en el número de células productoras de IFN γ entre los animales inmunizados y los controles a los 8 dpc, sugieren que el CD154 debe ser el responsable de la estimulación de esta citoquina ya que versiones anteriores de VS basadas en la proteína E2 no fueron capaces de inducir este tipo de respuesta (5). Existe una estrecha correlación entre la producción de IFN γ y la rápida protección inducida por las VVA (6). Nuestros resultados muestran una correspondencia entre la presencia de células secretoras de IFN γ en el día de la confrontación y la protección. Estos hallazgos sugieren que la inmunidad celular puede ser responsable de la protección en los primeros días posteriores a la vacunación, antes de que aparezcan los AcN como se ha descrito para las VVA (7). Este es el primer reporte de protección completa temprana inducida por una VS a solo 7 días después de una única dosis vacunal.

El candidato vacunal E2-CD154 evita la transmisión transplacentaria del VPPC.

Un grupo de 4 cerdas con 64 días de gestación se vacunó con 50 µg de E2CD154, con un esquema bifásico y un intervalo de 17 días entre las dosis. Otro grupo de 2 cerdas con 91 días de gestación recibió placebo. A los 27 dpv se realizó la confrontación viral. Se inocularon 2×10^5 TCID $_{50}$ de la cepa Margarita del VPPC.

Valoración clínica tras el desafío viral

Ninguna de las cerdas vacunadas presentó síntomas clínicos tras el reto. Por el contrario, las cerdas no vacunadas desarrollaron un cuadro clínico compatible con la PPC. Ambas cerdas del grupo control se sacrificaron 3 días antes a la fecha prevista por el deterioro de su condición clínica.

Anticuerpos neutralizantes

Al momento del reto viral todos los animales habían desarrollado títulos protectores de AcN. Al momento del sacrificio los títulos de AcN en todas las madres vacunadas eran superiores a 1:1000. Los animales controles también desarrollaron una respuesta de AcN frente a la infección, pero solo a partir de los 14 dpc y con títulos menores (<1:200). Las muestras de suero de fetos analizadas resultaron negativas a la presencia de AcN.

Detección del ARN del VPPC después del reto.

En ambas cerdas controles, se detectó ARN viral en el suero y en el exudado rectal para una de ellas, a los 4 dpc. A los 8 y 14 dpc se detectó el ARN viral tanto en el suero como en los exudados rectales y nasales de estos animales. Los valores de Ct fueron menores de 34, que corresponden a cargas virales de medias a altas. De igual forma se detectan en todos los órganos dianas evaluados el ARN viral (tonsilas, bazos y placas de Peyer).

Para las cerdas vacunadas, todos los sueros y exudados rectales o nasales evaluados, correspondientes a los diferentes dpc (4, 8, 14 y 17) fueron negativos. No hubo viremia ni excreción viral después de la alta carga de virus de desafío. En los órganos dianas para una de las cerdas, se encontró ARN viral, el mayor Ct igual a 32 en la tonsila, 34 y 37 para bazo y placas de Peyer. Evidencias de la relevancia de estos órganos dianas para secuestrar virus fuera de la circulación sistémica.

Detección del ARN del VPPC en las muestras de los fetos de ambos grupos de cerdas.

Se detectó una carga viral en el 100% de las muestras de suero, tonsila, bazo y timo procedente de los fetos de las madres no vacunadas. Con valores de Ct entre 20 al 29 en el 80 % de las muestras, correlacionando con cargas virales de media a alta. Importante considerar que las muestras se obtienen al sacrificar a las cerdas 3 días antes que a las cerdas vacunadas, este tiempo es significativo en la replicación y la carga viral detectada en los fetos provenientes de las cerdas no vacunadas.

De 208 muestras de los fetos de madres vacunadas, solo se detectó ARN viral en 2 (0,96%), una de tonsila y otra de bazo con Ct > 36. La inhibición de la infección transplacentaria del virus es muy importante para prevenir la aparición de portadores asintomáticos y reducir la excreción viral y mantenimiento del virus en las pjaras.

La alta carga de ARN del VPPC detectada en las cerdas no vacunadas y en el 100% de las muestras de sus fetos, demuestra la fuerte transmisión transplacentaria del virus en este tercio de la gestación y apoyan el alto nivel de protección virológica que confirió la vacuna en estudio para las camadas de las cerdas vacunadas. Este es el primer informe de una VS capaz de prevenir la transmisión transplacentaria del virus de las madres vacunadas a los fetos al ser desafiados con alta carga viral de una cepa de alta virulencia.

Estos resultados convierten al candidato vacunal en una alternativa muy promisoriosa a las VVA, ya que logra combinar las bondades de ambos tipos de vacunas: La seguridad y carácter DIVA de las VS con una respuesta protectora temprana de células T y el bloqueo de la transmisión transplacentaria de las VVA.

En estos momentos el candidato vacunal ha completado con éxito la Fase III de Ensayos Clínicos y se han valorado ser suficientes para otorgar el Registro sanitario. Se ha concedido por la Dirección de Sanidad Animal, del MINAGRI, una autorización excepcional para la aplicación de esta vacuna en el Municipio especial de la Isla de la Juventud.

Conclusión General: Se desarrolló un novedoso candidato vacunal contra la PPC basado en la proteína de fusión E2CD154, que confiere protección esterilizante en solo 7 días en cerdos, induce tanto respuesta de células T, como altos títulos de AcN y evita la transmisión transplacentaria del virus en cerdas gestadas.

Impacto Científico

Se obtiene por primera vez la proteína E2 del VPPC fusionada al antígeno CD154 porcino. Por primera vez se alcanza una protección temprana con una VS a solo 7 días después de una única dosis vacunal y frente a un desafío viral con una cepa de VPPC de alta patogenicidad. Es el primer informe de que una VS es capaz de proteger completamente de la transmisión transplacentaria del virus de las madres vacunadas a los fetos ante una confrontación con una carga viral elevada de una cepa de alta virulencia.

Los resultados están avalados por las siguientes publicaciones

- **Publicaciones**

1- **A single dose of the novel chimeric subunit vaccine E2-CD154 confers early full protection against classical swine fever virus.** Vaccine 35: 4437-4443. 2017 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.028>,

2- **Efficacy of E2 glycoprotein fused to porcine CD154 as a novel chimeric subunit vaccine to prevent classical swine fever virus vertical transmission in pregnant sows.** Veterinary Microbiology 205:110-116, 2017 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.05.003>

- **Patentes**

1. **Chimeric vaccine antigen against classical swine fever virus.** WO2007/098717A2. Cuba> CU2006-0052, fecha de prioridad 28.02.2006. Concedida en Cuba, Estados Unidos, Europa, Canadá, Rusia, Brasil, México, Corea del Sur, Japón, Colombia, Vietnam, Argentina y Chile.

Impacto Económico

El candidato vacunal en estudio puede ser utilizado en nuestro país, desde la fase de control en el programa de “Control y erradicación”. Las VS actuales solo se recomiendan para la fase de erradicación. Por la alta eficacia se logrará la disminución paulatina de los portadores y los susceptibles hasta la erradicación de la PPC como enfermedad endémica de nuestro país. La erradicación del endemismo de la PPC en Cuba, tendría un impacto muy positivo en la eficiencia y aumento de la producción porcina, de gran relevancia para la alimentación de nuestro pueblo.

Asimismo una vacuna con estas características sería un importante renglón para la industria biotecnológica cubana.

Introducción del Resultado

Se ha concedido por la Dirección de Sanidad Animal, del MINAGRI, una autorización excepcional para la aplicación de esta vacuna en el Municipio especial de la Isla de la Juventud (previo a la obtención del Registro sanitario del producto), que se encuentra ya en implementación. Con esta extensión se cumple con una de las estrategias concebidas en el Programa de Control y Erradicación para la PPC, de trabajar en la erradicación por zonas. La introducción de una vacuna segura y eficaz contra la PPC, nos enfoca al objetivo de Cuba dentro del Plan Continental de erradicar la enfermedad para el 2020.