

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 344 875**

21 Número de solicitud: 200801583

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 7/08** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **27.05.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2010**

Fecha de la concesión: **16.06.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **29.06.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**29.06.2011**

73 Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 70 %)  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**  
**Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)** (Titular al 30 %)

72 Inventor/es: **Escarmís Homs, Cristina;**  
**García Arriaza, Juan Francisco;**  
**Sanz-Ramos Rojo, Marta;**  
**Domingo Solans, Esteban;**  
**Sevilla Hidalgo, Noemí;**  
**Rodríguez Calvo, Teresa y**  
**Ojosnegros Martos, Samuel**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Vacuna atenuada para la fiebre aftosa.**

57 Resumen:

Vacuna atenuada para la fiebre aftosa.

Vacuna atenuada frente a la fiebre aftosa, con variantes víricas del virus de la fiebre aftosa que presentan el genoma delecionado, y que son capaces de complementar entre sí.

ES 2 344 875 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Vacuna atenuada para la fiebre aftosa.

5 La presente invención se engloba dentro del campo de la biología molecular, de la biotecnología, y de la medicina veterinaria, y específicamente se refiere a una vacuna atenuada, con virus de la fiebre aftosa que presentan el genoma deletado, que son capaces de complementar entre sí, y que actúan frente a la fiebre aftosa.

**Estado de la técnica anterior**

10 El virus de la fiebre aftosa (VFA) es un miembro de la familia *Picornaviridae*, género *Aphthovirus*, y es el agente causante de la glosopeda o fiebre aftosa (FA), una enfermedad muy contagiosa y económicamente devastadora que afecta a animales de pezuña hendida (vacas, cerdos, ovejas y cabras, entre otros animales), caracterizada por la aparición de vesículas en las patas y el hocico (Bachrach, H. L. 1978. Foot-and-Mouth disease: worldwide impact and control measures, p. 299-310. In E. K. a. K. Maramorosch (ed.), *Viruses and environment*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.; Rowlands, D. J. 2003. *Virus Res* 91: 1-161; Sobrino, F., and E. Domingo. 2004. Foot-and-mouth disease. Horizon Press, London). El impacto social y económico de FA puede ser catastrófico cuando un brote aparece en países libres de VFA con animales inmunológicamente *naive*. Este fue el caso del brote de FA en Taiwan en 1997 y el del Reino Unido en 2001, en el que millones de animales infectados y en contacto fueron sacrificados con un coste directo e indirecto de billones de Euros (Gibbens, J.C., y col. 2001. *Vet Rec* 149: 729-43; Knowles, N. J., y col. 2001. *Vet Rec* 148: 258-9; Yang, P. C., y col. 1999. *Vet Rec* 145: 731-4).

25 El genoma de VFA consiste en una sola molécula de ARN de polaridad positiva de unos 8500 nucleótidos que codifica para una sola poliproteína. Ésta es cortada por proteasas virales para producir las 4 proteínas de la cápsida y las 9 proteínas no-estructurales, implicadas en distintos pasos de la replicación del virus (Belsham, 1993, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 60: 241-260; Masón y col. 2003. *Virus Res.* 91: 9-32; Porter, 2003. *J. Virol.*, 67: 6917-6921). La cápsida viral, de simetría icosaédrica, está compuesta por 60 copias de cada una de las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4 (revisión en Bachrach, 1977. Foot and Mouth Disease virus, properties, molecular biology and immunogenicity, JA (Ed.), *Beltsville Symposia in Agricultural Research, I, Virology in Agriculture*. Allanheld, Osmun, Montclair, NJ). Similar a otros virus ARN, las poblaciones virales de VFA presentan una gran heterogeneidad genética reflejada en la gran diversidad serológica que presenta, con siete serotipos antigénicamente distintos, O, A, C, South African Territories (SAT) 1, SAT 2, SAT 3 y Asia 1 (Pereira 1981. Foot-and-mouth disease virus. Pg. 333-363. In G. RPG (Ed.). *Virus diseases of food animals*, Vol. 2, Academic Press, NY). La inmunidad protectora frente a un serotipo no protege frente a otros serotipos, lo que complica el diseño de vacunas.

35 Las vacunas frente a la FA actualmente en el mercado se obtienen a partir del crecimiento de virus en cultivos celulares de células BHK (Radlett y col., 1985. *Dev. Biol. Standard*, 60: 163; Telling, 1975. Industrial production of FMD vaccine using BHK suspensión cells. Some comparative results relating *in vitro* assays and cattle potency. In Report of the research Group of the Standing technical Committee of the European Commission for the control of Foot-and-Mouth Disease, Brescia, Italy. Food and Agriculture Organization. Rome, 95). Este virus se inactiva químicamente con un compuesto de aziridinas, de manera más concreta etilen-amina binaria (BEI en sus siglas inglesas) (revisión en Brown, F., 2001, *Vaccine*, 20: 322-327). Las vacunas de virus inactivados, como es el caso de FA, deben llevar adyuvantes que confiera la inmunidad suficiente en los animales. El adyuvante más utilizado para el ganado vacuno y ovino es hidróxido de aluminio, pero para el ganado porcino es preciso utilizar aceite mineral como adyuvante incompleto de Freund (Freund & Thompson, 1945, *Science* 101: 468). Por lo general, se preparan vacunas monovalentes, pero en los países en los que circula más de un tipo de virus, se pueden utilizar las vacunas polivalentes correspondientes.

Las vacunas actualmente en uso tienen que cumplir los siguientes requisitos en su producción:

50 1- el antígeno viral se debe producir en grandes cantidades porque cada dosis de vacuna necesita contener altos niveles de virus inactivado para ser efectivas;

55 2- la preparación del virus se debe inactivar de tal manera que no quede ninguna infectividad residual pero que al mismo tiempo mantenga la inmunogenicidad del virus;

3- un adyuvante se debe añadir a la vacuna para potenciar la respuesta de anticuerpos frente a las proteínas virales.

60 Una vacuna viva debe mantener preferiblemente el complemento antigénico de la cepa de tipo salvaje. Además, la vacuna viva debe ser suficientemente avirulenta para evitar efectos patológicos inaceptables, pero por otra parte debe provocar un nivel suficiente de inmunidad en el hospedador. Finalmente, la vacuna viva atenuada no debe tener, preferiblemente, probabilidad de revertir a una cepa de tipo salvaje virulenta.

65 Estas vacunas tienen inconvenientes grandes:

1- el posible escape de virus durante la producción de grandes cantidades de virus virulento;

## ES 2 344 875 B1

2- posibilidad de un brote debido a la incorrecta inactivación del virus virulento usado para la producción de la vacuna con lo que se puede producir una infección que, aunque asintomática, de lugar a un brote;

3- la inmunidad no es muy duradera por lo que los animales necesitan dosis de recuerdo cada 6 meses.

5

Una manera de paliar estos inconvenientes sería el uso de virus atenuados que, aunque replicando, no provocan ningún tipo de enfermedad. Debido a la enorme variabilidad, ya comentada, de los virus ARN, no se ha elegido esta técnica como válida ya que puede resultar en la aparición de un revertiente de la atenuación y que se vuelva virulento, con el consiguiente peligro para la aparición de un nuevo brote de FA. Sin embargo, este tipo de vacunas daría una inmunidad larga y duradera, sin necesidad de dosis de recuerdo, ya que mimetizaría lo que ocurre en una infección natural.

10

Existe la necesidad de encontrar un sistema que proporcione soluciones completas al problema de encontrar nuevas vacunas frente a la FA y que carezca de los inconvenientes que presentan las vacunas actuales, principalmente el posible escape de virus virulento de las plantas de producción o la posibilidad de la presencia de virus virulento residual en la formulación de vacuna inactivada, lo que daría lugar a nuevos brotes de FA.

15

### Breve descripción de la invención

20

La presente invención proporciona una vacuna que tiene dos barreras de seguridad frente a la vacuna convencional: primera, está altamente atenuada *in vivo*, lo que hace que en caso de que haya un escape durante la producción de la misma no suponga ningún tipo de riesgo como posible inicio de un brote; segunda, está compuesta por virus defectivos que necesitan complementar para producir una infección productiva, y esto sólo sucede a muy alta multiplicidad de infección (MOI), lo que *in vivo* es altamente improbable que suceda. En cualquier caso, si esta posibilidad se diera en el punto de inoculación, aunque se obtuviera el virus completo por recombinación o por complementación, el virus resultante sería la población C-S8p260, que está totalmente atenuada. Además, dicha vacuna, al ser un virus completo, es capaz de conferir una inmunidad que será más larga que la conferida por la actual vacuna y más específica y robusta que la conferida por las vacunas recombinantes. La razón para todo ello es que, al tratarse de un virus completo, expresará un amplio repertorio de epítomos T y B necesarios para la completa eliminación del virus.

25

30

### Descripción de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una población de virus aislada, de aquí en adelante población de virus de la invención, caracterizada por que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homologa a la SEQ ID NO: 1, y al menos una de las secuencias seleccionada de entre:

35

a) una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homologa a la SEQ ID NO: 2,

40

b) una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homologa a la SEQ ID NO: 3,

para su uso como medicamento.

45

El término "homología", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre los aminoácidos de dos o más proteínas o secuencias aminoacídicas. Dos proteínas se consideran homologas si tienen el mismo origen evolutivo o si tienen función y estructura similares. En el caso particular de las variantes víricas con deleciones en el genoma, aunque las variantes de la invención se han obtenido a partir de un solo serotipo de VFA (*Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) strain C1-Santa Pau ó C-S8, perteneciente al serotipo C ó Aphthovirus C), a la que se hace referencia de aquí en adelante como VFA, es suficiente para permitir a un experto en la materia obtener variantes con genomas delecionados en las mismas regiones para otras cepas que estén comprendidas dentro de la especie. Así, entre los distintos tipos de VFA, y sin limitarse a estos, se incluye:

55

- Virus de la fiebre aftosa - tipo A (=Aphthovirus A).

- Virus de la fiebre aftosa - tipo Asia 1 (=Aphthovirus Asia 1).

60

- Virus de la fiebre aftosa - tipo C (=Aphthovirus C).

- Virus de la fiebre aftosa - tipo O (=Aphthovirus O).

- Virus de la fiebre aftosa - tipo SAT 1 (=Aphthovirus SAT1).

65

- Virus de la fiebre aftosa - tipo SAT 2 (=Aphthovirus SAT2).

- Virus de la fiebre aftosa - tipo SAT 3 (=Aphthovirus SAT3).

## ES 2 344 875 B1

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1999)). Puesto que dos proteínas se consideran homologas si tienen el mismo origen evolutivo o si tienen función y estructura similares, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 30% indican estructuras homologas. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 80%, mantendrán las mismas propiedades de dicho péptido.

Debido a la interrelación evolutiva de las cepas de VFA, las cepas de VFA putativas son identificables por su homología al nivel de genoma o de los polipéptidos codificados por el mismo. Generalmente, las cepas de VFA tienen una identidad mayor de 80%, preferiblemente una identidad mayor de 90%, y aún más preferiblemente una identidad mayor de 95%, y aún más preferiblemente una identidad mayor de 99% al nivel de las secuencias aminoacídicas. Los métodos para determinar la homología y porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos se puede determinar directamente y puede compararse con las secuencias que se proporcionan en esta memoria. Por ejemplo también, la secuencia de nucleótidos del material genómico del VFA putativo se puede determinar (usualmente por la vía de un compuesto intermedio de cDNA), y deducirse la secuencia de aminoácidos codificada en ella, para comparar con las regiones correspondientes de las secuencias proporcionadas en esta memoria.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la población de virus aislada de la invención está caracterizada por que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica, de aquí en adelante primera secuencia aminoacídica de la invención, que comprende un péptido con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 1, y al menos una de las secuencias seleccionada de entre:

a) una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica, de aquí en adelante segunda secuencia aminoacídica de la invención, que comprende un péptido con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 2,

b) una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica, de aquí en adelante tercera secuencia aminoacídica de la invención, que comprende un péptido con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 3,

para su uso como medicamento.

Los virus con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 pertenecen a la variante C-S8p260D417, presentan una deleción de 417 nucleótidos en la región que codifica para la proteasa L, respecto a la secuencia de polinucleótidos de la variante C-S8. La deleción  $\Delta 417$  incluye de las posiciones 1153 a 1571 (del genoma del VFA, siguiendo la numeración de Escarmís *et al.* 1996. Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an ARN virus. *J. Mol. Biol.* 264:255-267).

Los virus con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2 pertenecen a la variante C-S8p260D999, y presentan una deleción de 999 nucleótidos en la región que codifica para las proteínas estructurales ( $\Delta 999$ ), respecto a la secuencia de polinucleótidos de la variante C-S8. La deleción  $\Delta 999$  incluye de las posiciones 2793 a 3793 del genoma del VFA, siguiendo la misma numeración que en el caso anterior.

Los virus con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 pertenecen a la variante C-S8p260D1017, y presentan una deleción de 1017 nucleótidos en la región que codifica para las proteínas estructurales ( $\Delta 1017$ ), respecto a la secuencia de polinucleótidos de la variante C-S8. La deleción  $\Delta 1017$  incluye de las posiciones 1932 a 2950 del genoma del VFA, siguiendo la misma numeración que en los casos anteriores.

Los virus con las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 son incapaces de generar, cada uno individualmente, virus infeccioso con capacidad para replicar. Lo pueden originar por complementación (entre SEQ ID NO: 1 y o bien SEQ ID NO: 2 o bien SEQ ID NO: 3) o por recombinación. Pero aunque es posible que la complementación se de transitoriamente y que ello favorezca la inducción de anticuerpos y la respuesta inmune celular, la recombinación no es un problema porque la cepa C-S8p260 es atenuada.

En esta memoria se entiende por “población de virus” o “población viral” a una pluralidad de virus existente en cualquier forma, y que comprenda al menos dos variantes virales de un virus de la misma especie. Por ejemplo, una población de virus puede ser una suspensión de partículas de virus presentes en un medio de cultivo celular o en otra solución. Puede ser también un pellet o una preparación liofilizada conteniendo los virus.

Otro aspecto de la invención se refiere a una cápside proteica aislada, de aquí en adelante cápside proteica aislada de la invención, que comprende al menos una de las secuencias aminoacídicas de la invención, para su uso como medicamento.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una construcción genética, de aquí en adelante construcción genética de la invención, que dirigirá la transcripción *in vitro* o *intracelular* de las secuencias de

## ES 2 344 875 B1

polinucleótidos de la población de virus de la invención, y comprende la secuencia de polinucleótidos que codifica la primera secuencia aminoacídica de la invención y otra secuencia seleccionada de entre:

- a. secuencia de polinucleótidos, que codifica la segunda secuencia aminoacídica de la invención,
- b. secuencia de polinucleótidos, que codifica la tercera secuencia aminoacídica de la invención,
- c. moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a) y/o b),
- d. secuencia de nucleótidos de a), b), ó c), preferiblemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc...

Esta construcción genética incluye los vectores de clonación y expresión que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos del sistema de expresión de la invención. Tales vectores de expresión incluyen secuencias de control adecuadas, tales como, por ejemplo, elementos de control de la traducción (como códigos de iniciación y de parada) y de la transcripción (por ejemplo, regiones de promotor-operador, sitios de unión). Los vectores conforme a la invención pueden incluir plásmidos y virus (comprendiendo bacteriófagos y virus eucarióticos), de acuerdo con procedimientos bien conocidos y documentados en la técnica, y pueden expresarse en una variedad de sistemas de expresión diferentes, asimismo bien conocidos y documentados en la técnica. Muchos otros vectores virales y no virales están descritos y son conocidos en la técnica.

Se conoce, así mismo, una variedad de técnicas que pueden utilizarse para introducir tales vectores en células procarionóticas o eucarióticas para su expresión. Técnicas adecuadas de transformación o transfección están bien descritas en la bibliografía.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucléico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxiribonucleótidos.

Los términos “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

En esta memoria, el término “condiciones astringentes” o “condiciones astringentes de hibridación” hace referencia a condiciones en las cuales una secuencia de polinucleótidos híbrida con su secuencia blanco a un nivel superior que la de otras secuencias (es decir, al menos 2 veces superior al fondo). Las condiciones astringentes son dependientes de la naturaleza de la secuencia y pueden variar en función de las circunstancias. Controlando las condiciones de astringencia y de lavado, secuencias blanco con al menos un 80% de homología a la sonda pueden ser identificadas. Alternativamente, las condiciones de astringencia pueden ser ajustadas para permitir ciertos apareamientos no homólogos en las secuencias de manera a que niveles de homología inferior puedan ser detectados.

Las condiciones de astringencia generalmente serán aquellas en las que la concentración de sal sea inferior a 1% M de iones Na, y típicamente comprendidas entre 0.01 y 1.0 M de concentración de iones Na (u otras sales) a un pH de 7.0 a 8.3 y una temperatura de al menos 30°C para secuencias cortas (de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos 60°C para secuencias largas (mayores que 550 nucleótidos). Las condiciones astringentes pueden también ser obtenidas a partir de agentes desestabilizantes como la formamida. Ejemplos de condiciones de hibridación astringentes incluyen la hibridación con una solución reguladora de 30 a 35% de formamida, 1 M NaCl, 1% de SDS (dodecil sulfato de sodio) a 37°C, y un lavado en 1X a 2X SSC (20X SSC= 3.0 M NaCl/0.3 M citrato trisódico) a una temperatura de 50 a 55°C. Ejemplos de condiciones moderadas de astringencia incluyen hibridaciones en 40-45% formamida, 1 M NaCl, 1% SDS a 37°C, y un lavado en 0.1 X SSC a una temperatura de 60 a 65°C.

La especificidad está normalmente determinada por los lavados después de la hibridación, y los factores críticos son la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para híbridos ADN-ADN, el valor de T<sub>m</sub> puede ser aproximado a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984. *Anal. Biochem.* 138:267-284: T<sub>m</sub>=81,5°C + 16.6 (log M) + 0.41 (%GC) - 0.61 (% formamida) - 500/L; en donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % formamida es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. El T<sub>m</sub> es la temperatura (bajo condiciones determinadas de fuerza iónica y pH) a la cual el 50% de la secuencia blanco híbrida a una secuencia que le es perfectamente homóloga. El T<sub>m</sub> se reduce de 1°C por cada 1% de disparidad de apareamiento entre las secuencias y su blanco; por lo tanto, las condiciones de hibridación o de lavado pueden ser ajustadas para hibridar con secuencias deseadas. Por ejemplo, si se busca detectar secuencias que tienen solo 90% de homología con la sonda, el valor de T<sub>m</sub> puede ser disminuido en 10°C. Generalmente las condiciones de astringencia pueden ser seleccionadas para ser 5°C inferiores que el valor de T<sub>m</sub> correspondiente a la secuencia específica y su complemento bajo condiciones determinadas de pH

y de fuerza iónica. Sin embargo, condiciones de astringencia severa pueden utilizar una hibridación o lavados de 1 a 4°C inferiores al T<sub>m</sub>; condiciones de astringencia moderada pueden utilizar hibridaciones o lavados de 11 a 20°C inferiores al T<sub>m</sub>.

5 Utilizando la ecuación arriba mencionada las condiciones de hibridación, la composición de las soluciones de lavado y el T<sub>m</sub> deseado, aquellos que han sido rutinariamente entrenados en técnicas de biología molecular podrán entender que las variaciones en las condiciones de astringencia de una hibridación o de las soluciones de lavado están claramente descritas. Si el grado aceptable de apareamiento erróneo entre las dos secuencias resulta en un valor de T<sub>m</sub> inferior a 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida) es preferente incrementar la concentración de SSC de manera a que un valor de temperatura superior pueda ser utilizado durante la hibridación y/o los lavados. Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos son conocidas en el estado de la técnica.

15 La población de virus aislados de la invención, las secuencias aminoacídicas de la invención, la cápsida proteica aislada de la invención, la construcción genética de la invención, o cualquiera de sus combinaciones se pueden formular en composiciones para usar como inmunógeno (de aquí en adelante, inmunógenos de la invención). Estos inmunógenos pueden también ser usados como vacunas en animales, y más particularmente en mamíferos, incluyendo humanos, o producir una respuesta en la producción de anticuerpos en animales. Para la formulación de tales composiciones, una cantidad efectiva inmunológicamente de al menos uno de los virus, de las secuencias aminoacídicas o de las cápsidas es mezclado con un transportador adecuado aceptable fisiológicamente para la administración a mamíferos incluyendo humanos. Los inmunógenos pueden estar covalentemente ligados entre ellos, a otros péptidos, a una proteína transportadora o con otros transportadores, incorporados en liposomas u otras vesículas similares, y/o mezclados con un adyuvante o absorbente como es conocido en el campo de las vacunas. Por ejemplo, pueden ser mezclados con otros complejos inmunoestimuladores. Alternativamente, los inmunógenos no están acoplados y meramente mezclados con un transportador aceptable fisiológicamente tal como un compuesto tampón o salino normal adecuado para la administración a mamíferos incluyendo humanos.

25 Por tanto, y como se ha descrito anteriormente, los inmunógenos de la invención presentan secuencias antigénicas protectoras. Estos antígenos protectores son capaces de generar una respuesta inmune (inmunogénica) protectora del hospedador, es decir, una respuesta del hospedador que conduce a la generación de moléculas efectoras inmunes, anticuerpos o células que dañan, inhiben o matan a la entidad biológica invasora, "protegiendo" así al hospedador de una enfermedad clínica o sub-clínica y de una pérdida de productividad. Tal respuesta inmune protectora puede manifestarse comúnmente por la generación de anticuerpos.

30 En otro aspecto de la invención, los anticuerpos producidos tras la inmunización del animal, de aquí en adelante anticuerpos de la invención, son usados como medicamento.

35 Los anticuerpos de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas. Así, los anticuerpos pueden estar en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, los anticuerpos pueden prepararse para su administración en forma sólida. Los anticuerpos pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido alginico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

45 Los anticuerpos o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas. Tales medios incluyen, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

50 La dosificación de anticuerpos para obtener una cantidad farmacéuticamente eficaz depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia, ... del animal.

55 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de aquí en adelante composición de la invención, que comprende la población de virus aislada de la invención, de las secuencias aminoacídicas de la invención, una cápsida proteica aislada de la invención, un anticuerpo de la invención, la construcción genética de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso como medicamento. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención se usa para el tratamiento o prevención de la fiebre aftosa.

60 Más preferiblemente, los virus, las secuencias aminoacídicas, la o las cápsidas, las construcciones genéticas de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, se encuentran, o se traducen, en una cantidad terapéuticamente efectiva, capaz de generar anticuerpos para su uso en la elaboración de vacunas.

65 En el contexto de la presente invención el término "vacuna" se refiere a una preparación antigénica empleada para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad. Son preparados de antígenos que una vez dentro del

## ES 2 344 875 B1

organismo provocan la respuesta del sistema inmunitario, mediante la producción de anticuerpos, y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria.

5 El término “antígeno” en esta memoria se refiere a una molécula (generalmente una proteína o un polisacárido) de superficie celular, que puede inducir la formación de anticuerpos. Hay muchos tipos de moléculas diferentes que pueden actuar de antígenos, como las proteínas o péptidos, los polisacáridos y, más raramente, otras moléculas como los ácidos nucleicos.

10 El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere, también, a los virus de la invención, la cápside de la invención, la construcción genética de la invención, el plásmido de la invención o la composición de la invención, que es capaz de generar una respuesta inmune frente a un organismo dado, que está causando dicha enfermedad en el hombre o los animales. Incluye, por tanto, lo que se conoce como vacuna, tal y como se ha definido previamente en esta memoria.

15 Por tanto, en otra realización preferida, la composición de la invención es una vacuna, de aquí en adelante vacuna de la invención. En una realización más preferida, la vacuna además comprende excipientes farmacológicamente aceptables. En otra realización aún más preferida, la vacuna comprende un adyuvante. En otra realización la vacuna presenta un origen recombinante. En otra realización preferida la vacuna es polivalente.

20 En esta memoria, «I término “adyuvante” se refiere a un agente, mientras no posea un efecto antigénico por si mismo, que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la vacuna. Aunque sin limitarse a ellas, las sales de aluminio “fosfato de aluminio” e “hidróxido de aluminio” son los dos adyuvantes más comúnmente empleados en las vacunas. Otras sustancias, como por ejemplo el escualeno, también se pueden emplear como adyuvantes.

25 Tal y como se define en esta memoria, el término “polivalente” se usa para referirse a la vacuna que comprende la combinación de dos o más antígenos en total, incluyendo uno o más de cualquiera de los serotipos, tipos, variedades o mutantes que se incluyen dentro de la clasificación de Virus de la Fiebre Aftosa (VFA).

30 Un método alternativo de la producción de vacunas es el uso de técnicas de biología molecular para producir una proteína de fusión que contiene una o varias de las secuencias aminoacídicas de la presente invención y un péptido o proteína altamente inmunogénico/a, frente a una determinada infección. Por tanto, en otro aspecto, la vacuna de la invención presenta un origen recombinante.

35 Un “vector” es un replicón al que se ha unido otro segmento polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del segmento unido.

40 Un “replicón” es cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación polinucleótida dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control.

45 “Secuencia de control” se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificadoras a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariontes, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal, y señales de terminación; en eucariotes, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

50 “Unidos de forma operativa” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a una secuencia codificadora está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

55 Un “marco de lectura libre” (ORF) es una región de una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido; esta región puede representar una porción de una secuencia codificadora o una secuencia codificadora completa.

60 Una “secuencia codificadora” es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe a ARNm y/o se traduce a un polipéptido cuando está bajo control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora se determinan mediante un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificadora puede incluir, pero no se limita a ARNm, ADNc, y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

65 Tal y como se usa en esta memoria, el término “transfección” se refiere a la introducción o transferencia de una molécula de ácido nucleico exógena en una célula eucariota, incluyendo, pero no limitándose a ella, una molécula de ácido ribonucleico o desoxiribonucleico (por ejemplo, ARN ó ADN desnudo).

El término “plásmido” se refiere a fragmento circular de ADN bicatenario, que se encuentra en el interior de casi todas las bacterias, y que actúan y se replican de forma independiente al ADN cromosómico bacteriano y pueden transferirse de unas bacterias a otras. Se utilizan como vectores en manipulación genética.

5 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de virus, secuencias aminoacídicas, cápsides, anticuerpos o construcciones genéticas que permitan su expresión calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos virus, anticuerpos, secuencias 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.

10 Las composiciones proporcionadas por esta invención pueden ser facilitadas por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada y con los excipientes farmacológicamente aceptables a la vía de administración elegida.

15 El término “VFA”, como aquí se usa, denota una especie vírica de la familia PicoARNviridae, que pertenecen al grupo IV de la clasificación de Baltimore, cuyas formas patógenas causan la fiebre aftosa, y cuyas formas atenuadas, persistentes o defectivas derivadas de las mismas están relacionadas con esta enfermedad. El genoma del VFA está constituido por una cadena simple de ARN, de sentido positivo, de una longitud entre 7.2 y 9.0 kb. Se sabe que los virus que contienen ARN presentan frecuencias de mutación relativamente elevadas, del orden de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  por nucleótido incorporado. En consecuencia, las poblaciones de VFA están constituidas por un conjunto heterogéneo de variantes genéticas sometidos a rápida evolución, que han originado una gran diversidad de genotipos relacionados y de variantes fenotípicos, incluyendo siete serotipos diferentes.

20 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus 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. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### 30 Breve descripción de las figuras

Figura 1 (Fig. 1).- Esquema vacunación C-S8p260 en ratones C57BL/6.

35 Figura 2 (Fig. 2).- Supervivencia de ratones vacunados con C-S8p260.

Figura 3 (Fig. 3).- Títulos de ELISA en ratones vacunados con C-S8p260.

40 Figura 4 (Fig. 4).- Temperatura de los cerdos después del desafío con C-S8c1.

Figura 5 (Fig. 5).- Esquema de las distintas regiones del genoma del VFA. La región L que codifica para la proteasa Leader, las regiones VP1, VP2, VP3 y VP4, que codifican para las proteínas estructurales, y las regiones 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D, que codifican para las proteínas no estructurales. Se indican las regiones en las que se producen las deleciones de las variantes víricas  $\Delta 417$ ,  $\Delta 999$  y  $\Delta 1017$ .

45 Figura 6 (Fig. 6).- Alineamiento de los distintos serotipos de VFA, incluyendo las variantes delecionadas  $\Delta 417$ ,  $\Delta 999$  y  $\Delta 1017$ , e indicando la correspondencia de dichas regiones en los distintos serotipos.

### 50 Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de la vacuna.

#### 55 Ejemplo 1

##### *Aislamiento y posterior creación de la población de VFA C-S8p260 de la invención*

60 Los experimentos siguientes se llevaron a cabo con una población de VFA clonada, C-S8c1, de serotipo C (Sobrino, F.; Dávila, M.; Ortín, J. & Domingo, E. (1983) *Virology*, 128: 310-318.). Este virus fue pasado 260 veces a alta multiplicidad de infección (MOI) en células BHK, denominando a la población viral resultante C-S8p260. El análisis mediante RT-PCR del ARN de la población C-S8p260 reveló la presencia de tres moléculas distintas de ARN:

65 - una molécula que contiene una deleción de 417 nucleótidos en la región que codifica para la proteasa L ( $\Delta 417$ );

- una segunda molécula con una deleción de 999 nucleótidos en la región que codifica para las proteínas estructurales ( $\Delta 999$ ) y,

## ES 2 344 875 B1

- una tercera, con una deleción de 1017 nucleótidos en la misma región ( $\Delta 1017$ ) (García-Arriaza y col., 2004, J. Virol. 78: 11678-11685).

5 Ninguna de estas deleciones altera la fase de lectura abierta del genoma de VFA. Distintos análisis de cuantificación permitieron asegurar que la población C-S8p260 está formada mayoritariamente por los genomas delecionados, encontrándose al menos 10,000 veces menos ARN de virus estándar, o sin deleciones.

10 Mediante técnicas de biología molecular las deleciones  $\Delta 417$  y  $\Delta 999$  fueron generadas en un clon infeccioso del VFA C-S8c1 (pMT28), de tal manera que se generaron los transcritos VFA pMT $\Delta 417$  y VFA pMT $\Delta 999$ . Estos transcritos se introdujeron simultáneamente dentro de células BHK mediante co-electroporación y se obtuvo un efecto citopático (muerte celular) a las 72 horas post-electroporación, lo que indicó que ambos ARNs pueden infectar por complementación en ausencia de genoma estándar. Asimismo, mediante análisis de microscopía electrónica se determinó que cada genoma defectivo era capaz de encapsidarse en una sola partícula viral (García-Arriaza y col., 2004, J. Virol. 78: 11678-11685). Estos virus defectivos son estables en cultivos celulares ya que se mantuvieron por complementación en ausencia de virus estándar durante 200 pases adicionales en cultivos de células BHK (García-Arriaza y col., 2006, J. Mol. Biol. 360:558-572).

20 Es decir, todos estos datos permiten concluir que la población de VFA C-S8p260 está compuesta por virus defectivos capaces de complementar cuando la infección se realiza a una MOI muy alta.

### Ejemplo 2

25 *Utilización de la población viral C-S8p260 en la elaboración de una vacuna viva atenuada*

La población viral C-S8p260 se ha probado, inicialmente, como posible vacuna viva atenuada en un modelo de ratón desarrollado en el laboratorio de los inventores (Salguero y col., 2005, Virology 332: 384-396). Ratones C57BL/6 son altamente susceptibles a la infección con VFA C-S8c1. Así, la inoculación de VFA en la almohadilla plantar, inyección subcutánea, (sitio de inoculación equivalente al rodete coronario del cerdo, el hospedador natural) *produjo la aparición de síntomas de enfermedad a las 24 horas post-inoculación (pi)* (pelo erizado, apatía, postura encorvada y depresión), y muerte entre 36-48 horas pi).

35 2.1.- *Vacunación vía en la almohadilla plantar*

Un primer objetivo fue evaluar si la población viral C-S8p260 está atenuada *in vivo*. Para ello, 16 ratones fueron inoculados en la almohadilla plantar (AP) con  $10^7$  PFUs de C-S8p260 (la dosis más alta que se puede inocular con el volumen permitido en la AP que son  $50 \mu\text{l}$ ). Los animales fueron sangrados a distintos tiempos pi (días 1, 2, 3 15 y 30 pi) para determinar viremia y título de anticuerpos frente a VFA (Figura 1). Se determinó título viral en suero mediante titulación por plaqueo en células susceptibles BHK a tiempos cortos pi, 1, 2 y 3 días, y no se detectó replicación viral. Asimismo, los animales no detectaron ningún síntoma de enfermedad o muerte debido a la infección viral. Estos datos demuestran que la población C-S8p260 está atenuada en ratones.

45 Este mismo esquema de experimento se utilizó para determinar la protección de los ratones inoculados con C-S8p260 frente a un desafío con una dosis letal de nuestro virus de referencia C-S8c1. Así, los 16 animales fueron desafiados al día 90 pi con  $10^4$  PFUs de C-S8c1 en la AP. Se incluyeron 4 animales control sin vacunar. Los resultados (Figura 2) fueron que el 100% de los animales inoculados con C-S8p260 sobrevivieron al desafío con C-S8c1 (tiempo de observación de 30 días post-desafío) mientras que los animales control murieron a las 48 horas pi. Se determinó la viremia de los animales inoculados con C-S8p260 después del desafío con C-S8c1 con el objetivo de ver si, aunque los animales estaban protegidos porque no desarrollaron ningún síntoma de enfermedad, el virus había replicado. Los resultados mostraron ausencia completa de replicación de C-S8c1 en ratones previamente inoculados con C-S8p260. Estos datos indican que la población de VFA C-S8p260 está atenuada e induce protección estéril en ratones, lo que sugiere la posible utilización de C-S8p260 como vacuna.

55

2.2.- *Vacuna intramuscular*

60 Dado que la población C-S8p260 fue inoculada inicialmente en la AP y las vacunas en hospedadores naturales se inoculan generalmente por vía intramuscular, se evaluó si la inoculación intramuscular en ratones de la población C-S8p260 también protegía a los ratones frente a un desafío con una dosis letal de C-S8c1. Para ello se inocularon 12 ratones C57BL/6 intramuscularmente con  $10^7$  PFUs de C-S8p260. A los 60 días post-inoculación se les desafió con  $10^4$  PFUs de VFA C-S8c1 en la AP. Los resultados indicaron la completa ausencia de síntomas en los ratones vacunados intramuscularmente.

65

## ES 2 344 875 B1

### 2.3.- Vacunas con menor dosis de antígeno

Con el objetivo de determinar si una menor dosis de antígeno viral también inducía protección, 15 ratones se inocularon en la AP con  $10^3$  PFUs de C-S8p260. Estos ratones se sangraron a días 1, 2, 3, 15 y 30 pi (Figura 1). Los animales, como se esperaba por los resultados mostrados anteriormente, no mostraron ningún tipo de enfermedad ni viremia en sangre a tiempos tempranos post-inoculación. Estos ratones fueron desafiados con  $10^4$  PFUs de C-S8c1 en la AP a día 90 pi. Se incluyeron 4 animales control sin vacunar. El 100% de los animales inoculados previamente con  $10^3$  PFUs de C-S8p260 sobrevivieron al desafío con C-S8c1 mientras que los controles murieron a las 48 h pi. (Figura 2) Asimismo, no se detectó viremia en los animales vacunados después del desafío lo que una vez más indicaba protección estéril. Estos datos indican que menores dosis de antígeno protegen frente a una dosis letal de VFA.

Como medida de la inducción de una respuesta inmune frente a VFA por la población C-S8p260 se determinó la cantidad de anticuerpos anti-VFA totales mediante ensayo de ELISA (Figura 3) y por ensayo de neutralización (Tabla 1). Los resultados de ELISA muestran una alta cantidad de anticuerpos específicos frente a VFA que se incrementó después del desafío con C-S8c1, tanto en animales inoculados con  $10^7$  PFUs como con  $10^3$  PFUs de C-S8p260. Los títulos de neutralización en el momento del desafío y 72 h después del desafío son del orden de 2 (expresado como la inversa del logaritmo de la concentración de suero que produce la reducción de un 70% de la infectividad, PRN70). Estos datos indican que C-S8p260 es capaz de inducir una respuesta humoral frente a VFA capaz de inducir protección.

### 2.4.- Vacunación de cerdos

La vacuna propuesta en esta patente se evaluó también en cerdo, el hospedador natural de VFA, en un ensayo preliminar. Los animales se dividieron en cinco grupos. En cada uno de los grupos el protocolo seguido es común para todos ellos. El virus C-S8p260 se inoculó por vía intramuscular en 1 ml de PBS. El desafío se realizó en  $500 \mu\text{l}$  en el rodete coronario. Se tomaron muestras de sangre a D0, antes de la inoculación de C-S8p260, D2, D4, D7, D15 y D30 (antes del desafío). Después del desafío los animales fueron sangrados cada dos días y sometidos a observación cada día para determinar aparición de síntomas de FA hasta el día 11 post-desafío. Se determinó aparición de aftas primarias (en el sitio de inoculación) y aftas secundarias, así como estado general de los cerdos (síntomas de FA: apatía, depresión, imposibilidad de andar...). Asimismo, se tomó temperatura diaria de cada uno de los cerdos.

Grupo 1. 4 animales.

Se siguió el siguiente protocolo:

Nº cerdo	1ª Dosis D0 (Concentración de C-S8p260, PFUs)	1ª Dosis D15 (Concentración de C-S8p260, PFUs)	D30 Desafío
1	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$10^5$ PFUs C-S8c1
2	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$10^5$ PFUs C-S8c1
3	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$10^5$ PFUs C-S8c1
4	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$10^5$ PFUs C-S8c1

Grupo 2. 1 animal.

En este grupo se utilizó la misma dosis de C-S8p260 que en el grupo anterior pero se añadió adyuvante en la segunda dosis.

Nº cerdo	1ª Dosis D0 (Concentración de C-S8p260, PFUs)	1ª Dosis D15 (Concentración de C-S8p260, PFUs)	D30 Desafío
11	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$10^5$ PFUs C-S8c1

La segunda dosis de C-S8p260 se realizó en una dilución 1:1 con adyuvante completo de Freund.

## ES 2 344 875 B1

Grupo 3. 3 animales.

La dosis de C-S8p260 se diluyó 1:100 con el objetivo de evaluar si se necesitaba una dosis de defectivos alta.

5

10

15

<b>Nº cerdo</b>	<b>1ª Dosis D0 (Concentración de C-S8p260, PFUs)</b>	<b>1ª Dosis D15 (Concentración de C-S8p260, PFUs)</b>	<b>D30 Desafío</b>
7	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> PFUs C-S8c1
8	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> PFUs C-S8c1
10	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> PFUs C-S8c1

20

Grupo 4. 2 animales.

Se utilizó una dosis de defectivos 100 veces menor que inicialmente (igual que el grupo 3) pero se añadió adyuvante en la segunda dosis.

25

30

<b>Nº cerdo</b>	<b>1ª Dosis D0 (Concentración de C-S8p260, PFUs)</b>	<b>1ª Dosis D15 (Concentración de C-S8p260, PFUs)</b>	<b>D30 Desafío</b>
12	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> PFUs C-S8c1
13	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> PFUs C-S8c1

35

Se diluyó 1:1 con adyuvante completo de Freund en la segunda dosis de C-S8p260.

40

Grupo 5. 2 animales.

Estos animales son el control positivo del experimento en el que los cerdos fueron inoculados con PBS en vez de la vacuna y desafiados con la misma dosis de C-S8c1. Estos animales no estaban protegidos y mostraron los síntomas de FA.

45

50

<b>Nº cerdo</b>	<b>PBS</b>	<b>D30 Desafío</b>
21	0	10 <sup>5</sup> PFUs C-S8c1
22	0	10 <sup>5</sup> PFUs C-S8c1

55

Estos animales se pusieron muy enfermos y al día post-desafío fueron sacrificados por razones humanitarias.

Los resultados se pueden describir desde dos puntos de vista:

60

1. Temperaturas

2. Síntomas medido como la aparición de aftas.

65

## ES 2 344 875 B1

Grupo 1. Tabla de temperaturas expresada en °C.

Se ha incluido para comparar los animales #21 y #22 del grupo 5 que son los controles desafiados pero sin vacunar que desarrollaron todos los síntomas esperados de FA.

Día p.i.	#1	#2	#3	#4	#21	#22
0	39.3	39.2	39.2	39.1	39.2	38.8
1	39.6	39.2	39.3	39.5	39.1	39.3
2	40.1	40.4	39.6	39.2	40.8	40.8
3	40.2	40.5	40	39.6	40.7	40.9
4	41.4	39.9	40.1	40.1	40.2	40.5
5	39.9	40.6	40.5	40.8	40.2	39.3
7	39.1	38.8	39.9	38.6	38.1	38.8
8	SAC	39.7	40.3	38.9	SAC	SAC
9		38.5	37.9	37.6		
10		38.9	SAC	SAC		

Estos datos de temperatura están también recogidos en forma de gráfica en la figura 4. Se puede apreciar como todos los cerdos desarrollaron una temperatura alta. Sólo el animal #5 mostró un retraso en el pico de viremia.

### *Aparición de aftas*

Se define como la aparición de aftas primarias (en el sitio de inoculación) y de aftas en todas las patas (secundarias). Se indica el día que se sacrificaron los animales.

Día p.i.	#1	#2	#3	#4	#21	#22
0	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	Todas las patas	Todas las patas
3	Primaria	Primaria	-	-	Todas las patas	Todas las patas
4	Todas las patas	Primaria	Primaria	-	Todas las patas	Todas las patas
5	Todas las patas	Primaria	Todas las patas	-	Todas las patas	Todas las patas
7	Todas las patas	Primaria	Todas las patas	Primaria	SAC	SAC
8	SAC	Primaria	Todas las patas	Primaria		
9		Primaria	Todas las patas	Primaria		
10		SAC	SAC	SAC		

## ES 2 344 875 B1

Se puede observar que en general todos los animales mostraron un retraso en la aparición de síntomas en relación a los controles (animales #21 y #22). En especial los animales #2 y #4 mostraron protección parcial ya que sólo aparecieron aftas primarias, no observándose una progresión de la infección.

5

Grupo 2.

Se compara el animal #11 con los controles positivos.

10

<b>Día p.i.</b>	<b>#11</b>	<b>#21</b>	<b>#22</b>
<b>0</b>	39.4	39.2	38.8
<b>1</b>	39.1	39.1	39.3
<b>2</b>	39.5	40.8	40.8
<b>3</b>	39.8	40.7	40.9
<b>4</b>	39.7	40.2	40.5
<b>5</b>	38.4	40.2	39.3
<b>7</b>	38.5	38.1	38.8
<b>8</b>	39.2	SAC	SAC
<b>9</b>	38.2		
<b>10</b>	38.2		

15

20

25

30

Se puede observar como el animal #11 no desarrolla fiebre.

35

*Aparición de aftas*

40

<b>Día p.i.</b>	<b>#11</b>	<b>#21</b>	<b>#22</b>
<b>0</b>	-	-	-
<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	-	Todas las patas	Todas las patas
<b>3</b>	-	Todas las patas	Todas las patas
<b>4</b>	-	Todas las patas	Todas las patas
<b>5</b>	-	Todas las patas	Todas las patas
<b>7</b>	-	SAC	SAC
<b>8</b>	-		
<b>9</b>	-		
<b>10</b>	-		

45

50

55

60

65

## ES 2 344 875 B1

Este animal no desarrolló ningún tipo de síntoma asociado con FA u otra enfermedad. Se mantuvo completamente sano durante todo el experimento. Hay que hacer la apreciación de que se encontraba compartiendo box con los animales control por lo que estuvo en contacto con cerdos muy enfermos que exhalaban virus. Este animal se considera a efectos de evaluación de vacuna totalmente protegido.

5

Grupo 3.

Se comparan los animales #7, #8 y #10 con los controles.

10

<b>Día p.i.</b>	<b>#7</b>	<b>#8</b>	<b>#10</b>	<b>#21</b>	<b>#22</b>
<b>0</b>	39.1	39.3	39.2	39.2	38.8
<b>1</b>	39.6	39.3	39.4	39.1	39.3
<b>2</b>	40.9	41.5	39.2	40.8	40.8
<b>3</b>	40.7	41.2	40.1	40.7	40.9
<b>4</b>	40	41.2	40.6	40.2	40.5
<b>5</b>	40.5	40.7	41.1	40.2	39.3
<b>7</b>	39.4	39.9	40.3	38.1	38.8
<b>8</b>	30.9	SAC	39.9	SAC	SAC
<b>9</b>	SAC		SAC		
<b>10</b>					

15

20

25

30

Todos los animales mostraron temperaturas similares a los controles.

*Aparición de aftas*

35

<b>Día p.i.</b>	<b>#7</b>	<b>#8</b>	<b>#10</b>	<b>#21</b>	<b>#22</b>
<b>0</b>	-	-	-	-	-
<b>1</b>	-	-	-	-	-
<b>2</b>	Todas las patas	Todas las patas	-	Todas las patas	Todas las patas
<b>3</b>	Todas las patas	Todas las patas	-	Todas las patas	Todas las patas
<b>4</b>	Todas las patas	Todas las patas	Primaria	Todas las patas	Todas las patas
<b>5</b>	Todas las patas				
<b>7</b>	Todas las patas	Todas las patas	Todas las patas	SAC	SAC
<b>8</b>	Todas las patas	SAC	Todas las patas		
<b>9</b>	SAC		SAC		
<b>10</b>					

40

45

50

55

60

65

Estos animales no mostraron ningún tipo de protección.

## ES 2 344 875 B1

Grupo 4.

Se comparan los animales #12 y #13 con los controles.

5

Día p.i.	#12	#13	#21	#22
0	39.9	40.2	39.2	38.8
1	39.9	40.2	39.1	39.3
2	39.7	40.3	40.8	40.8
3	39.5	40.2	40.7	40.9
4	39.3	39.4	40.2	40.5
5	39.8	39.6	40.2	39.3
7	39.8	39.7	38.1	38.8
8	SAC	39.7	SAC	SAC
9		39.8		
10		SAC		

10

15

20

25

Estos animales no desarrollaron fiebre. Hay que tener en cuenta que el animal #13 tiene una temperatura basal (medida durante 25 días consecutivos) de 40.2°C, muy alta para la media de temperatura de cerdos.

30

*Aparición de aftas*

35

Día p.i.	#12	#13	#21	#22
0	-	-	-	-
1	-	-	-	-
2	-	-	Todas las patas	Todas las patas
3	Primaria	-	Todas las patas	Todas las patas
4	Primaria	-	Todas las patas	Todas las patas
5	Primaria	-	Todas las patas	Todas las patas
7	Está recuperado	-	SAC	SAC
8	SAC	-		
9		-		
10		SAC		

40

45

50

55

60

65

Estos animales mostraron protección parcial uno (#12) y total el otro (#13) ya que no tuvieron aftas o sólo en el sitio de inoculación.

## ES 2 344 875 B1

### Conclusiones del experimento de vacunación en cerdos

La dosis de VFA defectivo C-S8p260 de  $5 \times 10^6$  PFUs con adyuvante protegió completamente a un cerdo. Esa misma dosis sin adyuvante ha conferido protección parcial. La dosis  $10^5$  PFUs sólo tiene efecto protector cuando se inocula con adyuvante. Ahora mismo se está evaluando en un nuevo experimento de cerdos la capacidad de proteger de C-S8p260 con la menos dosis pero incluyendo adyuvante en las 2 inoculaciones. Asimismo, se está evaluando la capacidad protectora de C-S8p260 inactivado con BEI.

### 10 Ejemplo 3

#### Vacuna inactivada

La población C-S8p260 se inactivo siguiendo el protocolo de inactivación basado en la utilización de 2-Bromoetilamina Hidrobromuro (BEA), un derivado de azirinas. Se inocularon 7 ratones hembras C57Bl/6 de 8 semanas de edad con 50 microlitros de C-S8p260 inactivado por vía intramuscular, una dosis equivalente a  $10^7$  PFUs de C-S8p260. A los 14 días se les inoculó con un segundo booster. En ninguno de los boosters se usó adyuvante.

A los 30 días se realizó el desafío con 50 microlitros de  $10^4$  PFUs de C-S8c1 inoculado en la almohadilla plantar. Se utilizaron 2 controles positivos inoculados también con la misma cantidad de virus C-S8c1 y dos controles negativos inoculados con 50 microlitros de PBS en el mismo lugar.

Los ratones inoculados con defectivos estuvieron protegidos después del desafío, hasta un periodo de observación de 60 días. Los controles positivos murieron al cabo de 36 h.

TABLA 1

*Títulos de neutralizaciones en ratón C57BL/6 inmunizados con C-S8p260*

<b>Pre-desafío (<math>10^7</math> PFUs de C- S8p260)</b>		<b>Pre-desafío (<math>10^3</math> PFUs de C- Sp8260)</b>		<b>72h post-desafío (<math>10^7</math> PFUs de C- S8p260)</b>		<b>72h post-desafío (<math>10^3</math> PFUs de C- S8p260)</b>	
<b>Ratón</b>	<b>PRN 70</b>	<b>Ratón</b>	<b>PRN .70</b>	<b>Ratón</b>	<b>PRN 70</b>	<b>Ratón</b>	<b>PRN 70</b>
5	2,0	5	2,0	5	1,8	5	1,9
6	2,0	6	2,1	6	2,0	6	1,8
8	2,4	8	0	8	2,2	7	1,8
9	2,1	9	1,7	9	1,9	8	1,8
10	1,3	10	1,4	10	1,5	9	2,4
11	1,7	11	1,6	11	1,8	10	1,8
12	0,4	12	1,4	12	1,9	11	1,8
13	1,7	13	0,6	13	1,8	12	1,1
14	2,7	14	1,4	14	2,4	14	1,5
15	1,9	15	1,7	15	1,9	15	1,8
	1,8		1,4		1,9		1,8
+/-0,6		+/- 0,6		+/- 0,2		+/- 0,3	

**REIVINDICACIONES**

5 1. Población de virus aislada **caracterizada** por que comprende una secuencia de polinucleótidos capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 1, sobre la longitud completa de SEQ ID NO: 1, y al menos una secuencia seleccionada de entre:

10 a) una secuencia de polinucleótidos capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 2, respecto a la longitud completa de SEQ ID NO: 2, o

b) una secuencia de polinucleótidos capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 3, respecto a la longitud completa de SEQ ID NO: 3,

15 para su uso como medicamento.

20 2. Población de virus aislada según la reivindicación anterior, donde las secuencias aminoacídicas presentan una identidad de al menos un 90% con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respecto a la longitud completa de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente.

25 3. Población de virus aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde las secuencias aminoacídicas presentan una identidad de al menos un 95% con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respecto a la longitud completa de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente.

30 4. Población de virus aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde las secuencias aminoacídicas presentan una identidad de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respecto a la longitud completa de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente.

5. Población de virus aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde las secuencias aminoacídicas son la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente.

35 6. Uso de la población de virus aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para la elaboración de un medicamento.

7. Uso de la población de virus aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la fiebre aftosa.

40 8. Cápside proteica aislada que comprende una secuencia aminoacídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso como medicamento.

45 9. Construcción genética que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 1, sobre la longitud completa de SEQ ID NO: 1, y al menos otra secuencia seleccionada de entre:

a) secuencia de polinucleótidos, que codifica una secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 2, sobre la longitud completa de SEQ ID NO: 2, o

50 b) secuencia de polinucleótidos, que codifica una secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 3, sobre la longitud completa de SEQ ID NO: 3,

c) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida en condiciones astringentes con la secuencia polinucleotídica de (a) y/o (b),

55 d) secuencia de nucleótidos de (a), (b), ó (c), preferiblemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción.

60 10. Composición que comprende:

a) una población de virus aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-5,

65 b) una cápsida proteica aislada según la reivindicación 8,

## ES 2 344 875 B1

c) una construcción genética según la reivindicación 9,  
o cualquiera de sus combinaciones, para su uso como medicamento.

5 11. Composición según la reivindicación anterior donde el medicamento es una vacuna.

12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, para su uso en el tratamiento y/o la prevención  
10 de la fiebre aftosa.

13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, que además comprende excipientes farmacológicamente aceptables.

15 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, que además comprende un adyuvante.

15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-14, donde las secuencias aminoacídicas de la población de virus aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, la cápsida proteica aislada según la reivindicación 8, presenta un origen recombinante.

20 16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-15, que comprende dos o más tipos, serotipos, variedades o mutantes de virus de la aftosa.

17. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-16, para la elaboración de un medicamento.

25 18. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-16, para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento o prevención de la fiebre aftosa.

30

35

40

45

50

55

60

65

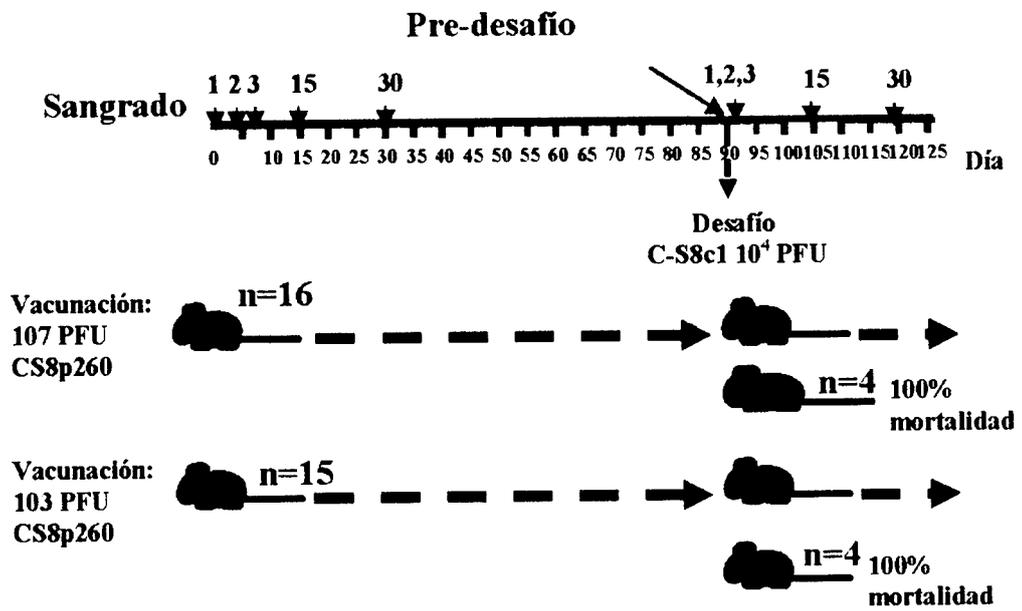
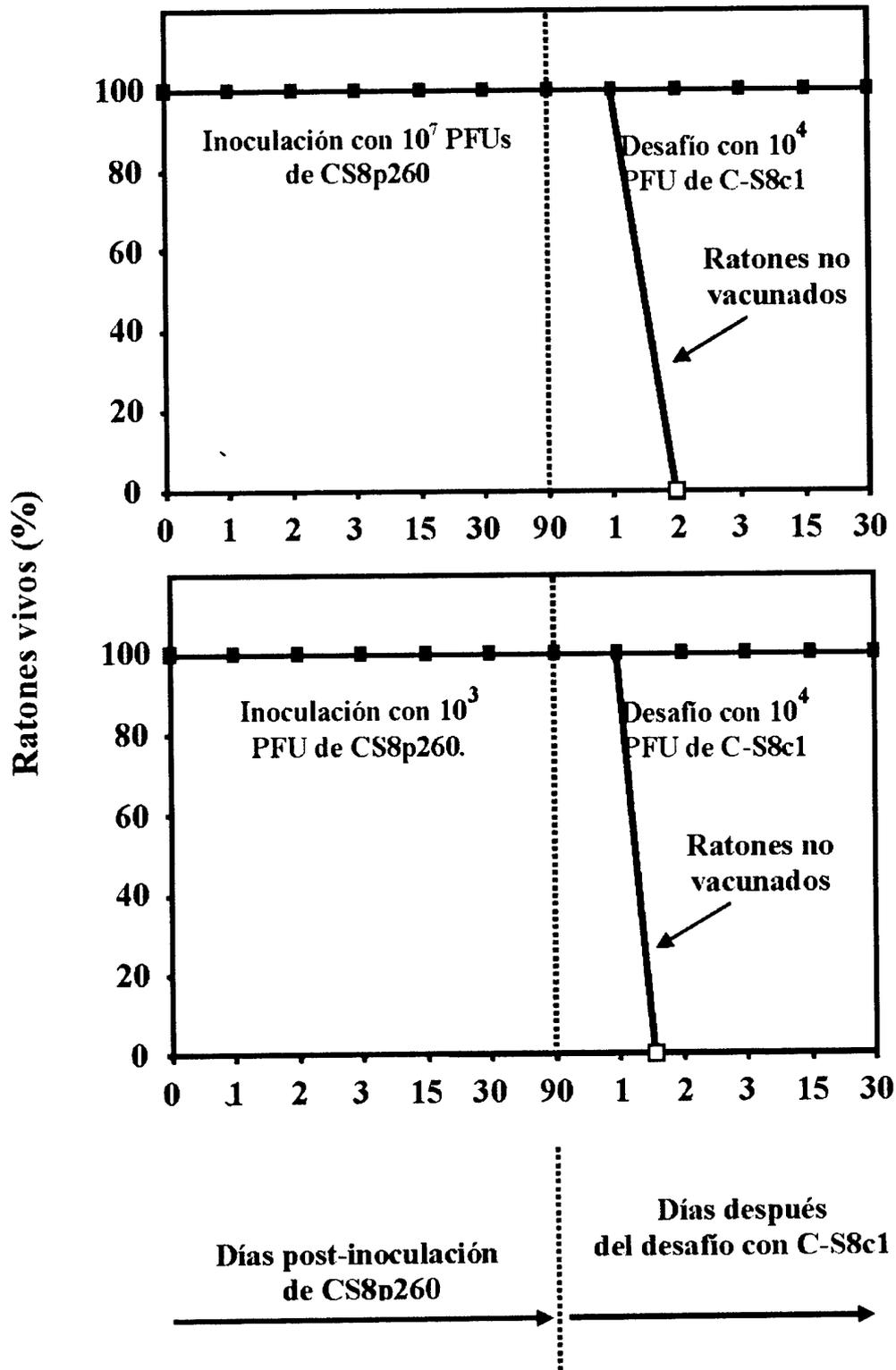
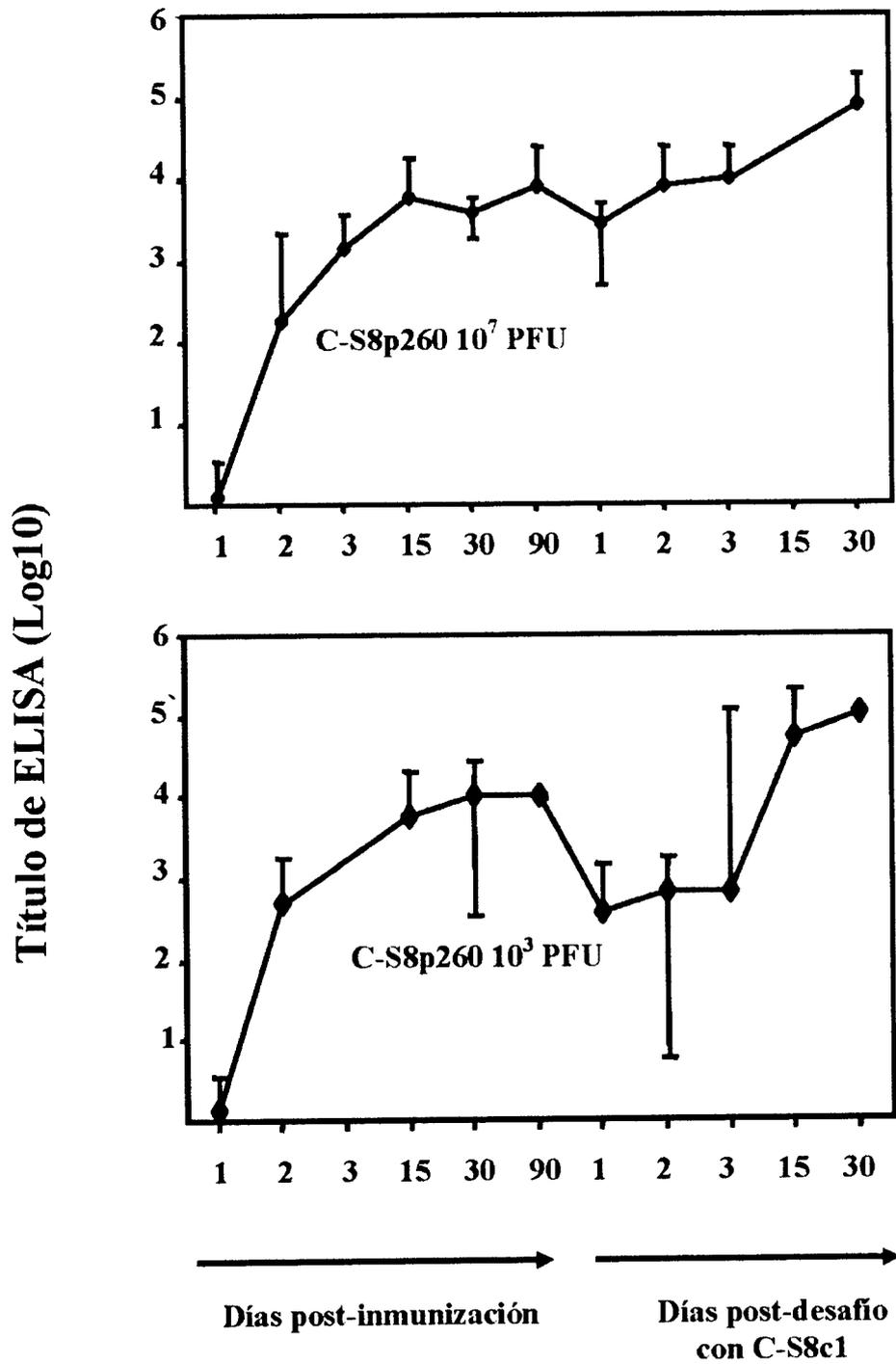


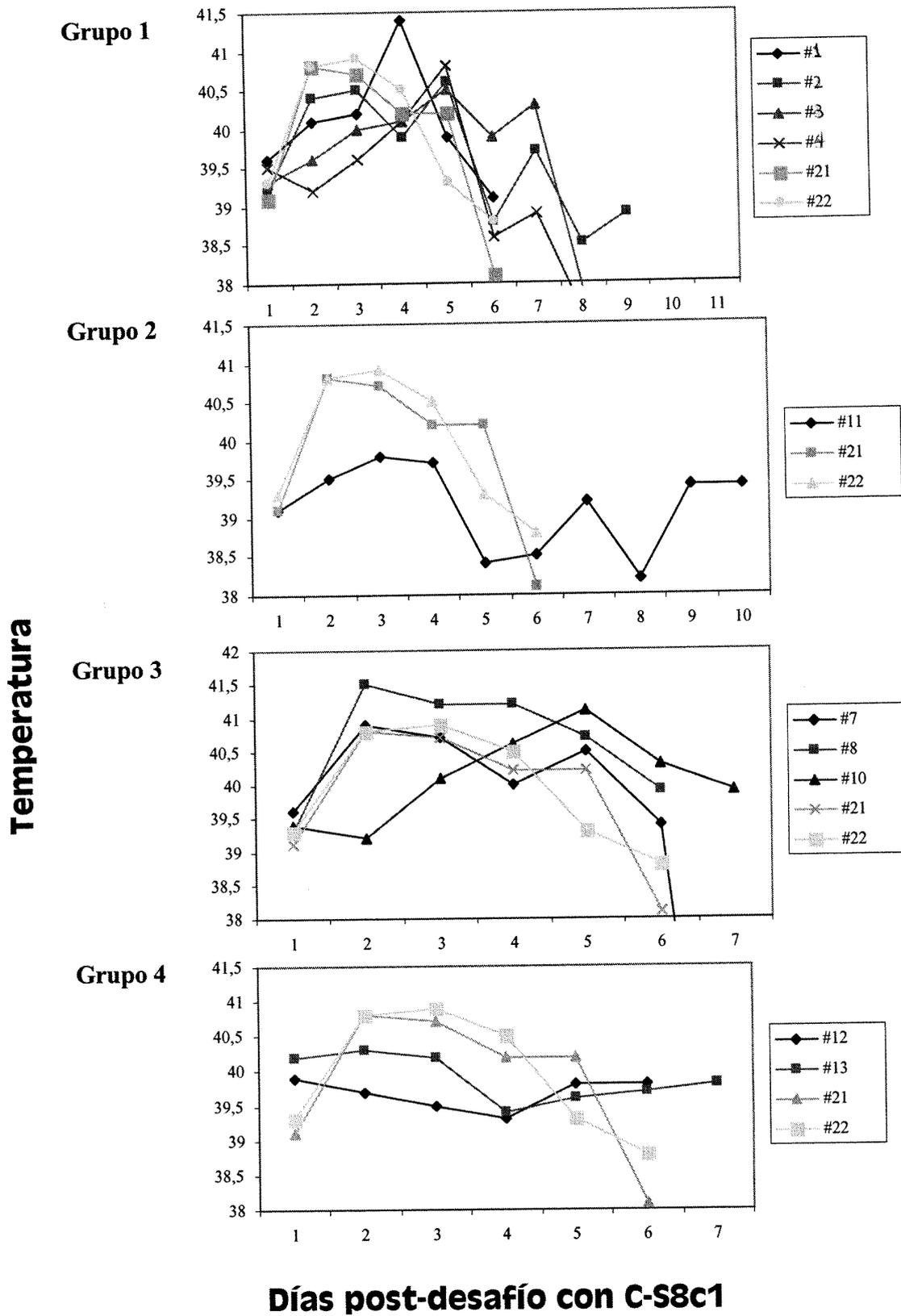
FIG. 1



**FIG. 2**



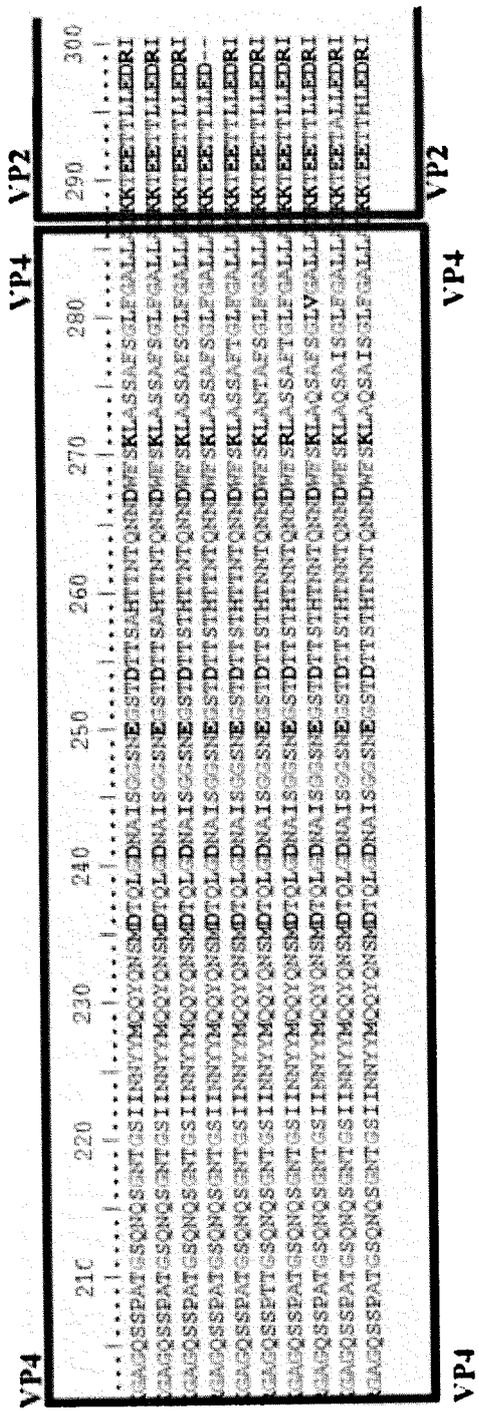
**FIG. 3**



**FIG. 4**



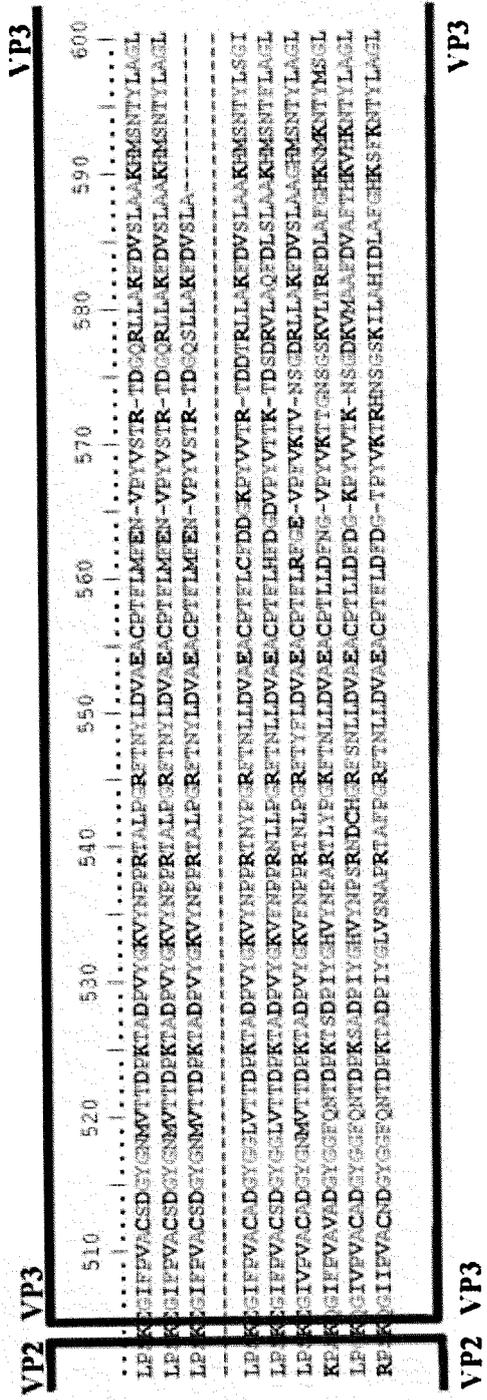




C-s8p260p3d  
 SEQIDNO:1 (D417)  
 SEQIDNO:2 (D999)  
 SEQIDNO:3 (d1017)  
 FMDV\_A  
 FMDV\_O  
 FMDV\_ASIA\_1  
 SAT1  
 SAT2  
 SAT3

FIG 6 (continuación)





C-88p260p3d  
 SEQIDNO:1 (D417)  
 SEQIDNO:2 (D999)  
 SEQIDNO:3 (dl017)  
 FMDV\_A  
 FMDV\_O  
 FMDV\_ASIA\_1  
 SAT1  
 SAT2  
 SAT3

FIG 6 (continuación)







# ES 2 344 875 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)  
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA

5

<120> Vacuna atenuada para la fiebre aftosa

<130> 1641.49

10

<160> 3

<170> PatentIn version 3.4

15

<210> 1

<211> 795

<212> PRT

20

<213> Virus de la fiebre aftosa (Aphthovirus) (D417)

<400> 1

25

Met Asn Thr Thr Asp Cys Phe Ile Ala Val Val Asn Ala Ile Lys Glu  
1 5 10 15

30

Val Arg Ala Leu Phe Leu Pro Arg Thr Ala Gly Lys Met Glu Phe Thr  
20 25 30

Leu His Asp Gly Glu Lys Met Val Phe Val Pro Tyr Asp Gln Glu Pro  
35 40 45

35

Leu Asn Glu Gly Trp Lys Ala Ser Val Gln Arg Lys Leu Lys Gly Ala  
50 55 60

40

Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser Gly Asn Thr  
65 70 75 80

45

Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln Asn Ser Met  
85 90 95

Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly Ser Asn Glu Gly  
100 105 110

50

Ser Thr Asp Thr Thr Ser Ala His Thr Thr Asn Thr Gln Asn Asn Asp  
115 120 125

55

Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Ser Gly Leu Phe Gly Ala  
130 135 140

60

Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu Asp Arg  
145 150 155 160

Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ser  
165 170 175

65

Val Gly Val Thr Phe Gly Tyr Ala Thr Ala Glu Asp Ser Thr Ser Gly

ES 2 344 875 B1

			180					185					190			
5	Pro	Asn	Thr 195	Ser	Gly	Leu	Glu	Thr 200	Arg	Val	His	Gln	Ala 205	Glu	Arg	Phe
10	Phe	Lys 210	Met	Ala	Leu	Phe	Asp 215	Trp	Val	Pro	Ser	Gln 220	Asn	Phe	Gly	His
15	Met 225	His	Lys	Val	Val	Leu 230	Pro	His	Glu	Pro	Lys 235	Gly	Val	Tyr	Gly	Gly 240
20	Leu	Val	Lys	Ser	Tyr 245	Ala	Tyr	Met	Arg	Asn 250	Gly	Trp	Asp	Val	Glu 255	Val
25	Thr	Ala	Val	Gly 260	Asn	Gln	Phe	Asn 265	Gly	Cys	Leu	Leu	Val 270	Ala	Leu	
30	Val	Pro	Glu 275	Met	Gly	Asp	Ile	Ser 280	Asp	Arg	Glu	Lys	Tyr 285	Gln	Leu	Thr
35	Leu	Tyr 290	Pro	His	Gln	Phe	Ile 295	Asn	Pro	Arg	Thr	Asn 300	Met	Thr	Ala	His
40	Ile 305	Thr	Val	Pro	Tyr	Val 310	Gly	Val	Asn	Arg	Tyr 315	Asp	Gln	Tyr	Lys	Gln 320
45	His	Arg	Pro	Trp	Thr 325	Leu	Val	Val	Met	Val 330	Val	Ala	Pro	Leu	Thr 335	Thr
50	Asn	Thr	Ala	Gly 340	Ala	Gln	Gln	Ile	Lys 345	Val	Tyr	Ala	Asn	Ile 350	Ala	Pro
55	Thr	Asn	Val 355	His	Val	Ala	Gly	Glu 360	Leu	Pro	Ser	Lys	Glu 365	Gly	Ile	Phe
60	Pro	Val 370	Ala	Cys	Ser	Asp	Gly 375	Tyr	Gly	Asn	Met	Val 380	Thr	Thr	Asp	Pro
65	Lys 385	Thr	Ala	Asp	Pro	Val 390	Tyr	Gly	Lys	Val	Tyr 395	Asn	Pro	Pro	Arg	Thr 400
70	Ala	Leu	Pro	Gly	Arg 405	Phe	Thr	Asn	Tyr	Leu 410	Asp	Val	Ala	Glu	Ala 415	Cys
75	Pro	Thr	Phe	Leu 420	Met	Phe	Glu	Asn	Val 425	Pro	Tyr	Val	Ser	Thr 430	Arg	Thr
80	Asp	Gly	Gln 435	Arg	Leu	Leu	Ala	Lys 440	Phe	Asp	Val	Ser	Leu	Ala	Ala	Lys

ES 2 344 875 B1

5 His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ala Gly Leu Ala Gln Tyr Tyr Thr Gln  
 450 455 460  
 Tyr Thr Gly Thr Ile Asn Leu His Phe Met Phe Thr Gly Pro Thr Asp  
 465 470 475 480  
 10 Ala Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Val Pro Pro Gly Met Asp Ala  
 485 490 495  
 15 Pro Asp Asn Pro Glu Glu Ala Ala His Cys Ile His Ala Glu Trp Asp  
 500 505 510  
 20 Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile Pro Tyr Ile Ser Ala  
 515 520 525  
 25 Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Lys Ala Glu Thr Thr Cys Val  
 530 535 540  
 30 Gln Gly Trp Val Cys Val Tyr Gln Ile Thr His Gly Lys Ala Asp Ala  
 545 550 555 560  
 35 Asp Ala Leu Val Val Ser Ala Ser Ala Gly Lys Asp Phe Glu Leu Arg  
 565 570 575  
 40 Leu Pro Val Asp Ala Arg Lys Gln Thr Thr Thr Thr Gly Glu Ser Ala  
 580 585 590  
 45 Asp Pro Val Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Val  
 595 600 605  
 50 Gln Arg Arg His His Thr Asp Val Ala Phe Val Leu Asp Arg Phe Val  
 610 615 620  
 55 Glu Val Thr Val Ser Gly Asn Gln His Thr Leu Asp Val Met Gln Ala  
 625 630 635 640  
 60 His Lys Asp Asn Ile Val Gly Ala Leu Leu Arg Ala Ala Thr Tyr Tyr  
 645 650 655  
 65 Phe Ser Asp Leu Glu Ile Ala Val Thr His Thr Gly Lys Leu Thr Trp  
 660 665 670  
 Val Pro Asn Gly Ala Pro Val Ser Ala Leu Asn Asn Thr Thr Asn Pro  
 675 680 685  
 Thr Ala Tyr His Lys Gly Pro Val Thr Arg Leu Ala Leu Pro Tyr Thr  
 690 695 700  
 Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Ala Tyr Thr Gly Thr Thr Tyr



ES 2 344 875 B1

Gly Arg Glu His Ala Val Phe Ala Cys Val Thr Ser Asn Gly Trp Tyr  
 145 150 155 160

5  
 Ala Ile Asp Asp Glu Asp Phe Tyr Pro Trp Thr Pro Asp Pro Ser Asp  
 165 170 175

10  
 Val Leu Val Phe Val Pro Tyr Asp Gln Glu Pro Leu Asn Glu Gly Trp  
 180 185 190

15  
 Lys Ala Ser Val Leu Arg Lys Leu Lys Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro  
 195 200 205

20  
 Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn  
 210 215 220

25  
 Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly  
 225 230 235 240

30  
 Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly Ser Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr  
 245 250 255

35  
 Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu  
 260 265 270

40  
 Ala Ser Ser Ala Phe Ser Gly Leu Phe Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys  
 275 280 285

45  
 Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg  
 290 295 300

50  
 Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ser Val Gly Val Thr Phe  
 305 310 315 320

55  
 Gly Tyr Ala Thr Ala Glu Asp Ser Thr Ser Gly Pro Asn Thr Ser Gly  
 325 330 335

60  
 Leu Glu Thr Arg Val His Gln Ala Glu Arg Phe Phe Lys Met Ala Leu  
 340 345 350

65  
 Phe Asp Trp Val Pro Ser Gln Asn Phe Gly His Met His Lys Val Val  
 355 360 365

70  
 Leu Pro His Glu Pro Lys Gly Val Tyr Gly Gly Leu Val Lys Ser Tyr  
 370 375 380

75  
 Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp Val Glu Val Thr Ala Val Gly Asn  
 385 390 395 400

80  
 Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu Val Ala Leu Val Pro Glu Met Asp  
 405 410 415

ES 2 344 875 B1

Asp Ile Ser Asp Arg Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Leu Tyr Pro His Gln  
 420 425 430  
 5 Phe Ile Asn Pro Arg Thr Asn Met Thr Ala His Ile Thr Val Pro Tyr  
 435 440 445  
 10 Val Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys Gln His Arg Pro Trp Thr  
 450 455 460  
 15 Leu Val Val Met Val Val Ala Pro Leu Thr Thr Asn Thr Ala Gly Ala  
 465 470 475 480  
 20 Gln Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn Ile Ala Pro Thr Asn Val His Val  
 485 490 495  
 25 Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu Gly Ile Phe Pro Val Ala Cys Ser  
 500 505 510  
 30 Asp Gly Tyr Gly Asn Met Val Thr Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro  
 515 520 525  
 35 Val Tyr Gly Lys Val Tyr Asn Pro Pro Arg Thr Ala Leu Pro Gly Arg  
 530 535 540  
 40 Phe Thr Asn Tyr Leu Asp Val Ala Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Met  
 545 550 555 560  
 45 Phe Glu Asn Val Pro Tyr Val Ser Thr Arg Thr Asp Gly Gln Ser Leu  
 565 570 575  
 50 Leu Ala Lys Phe Asp Val Ser Leu Ala Arg Arg Lys Gln Pro Leu Val  
 580 585 590  
 55 Ala Pro Ala Ala Val Cys Gly Asp Ala  
 595 600

50 <210> 3  
 <211> 595  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la fiebre aftosa (Aphthovirus) (D1017)

55 <400> 3  
 60 Met Asn Thr Thr Asp Cys Phe Ile Ala Val Val Asn Ala Ile Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Val Ile Ala Leu Phe Leu Ser Arg Thr Ala Gly Lys Met Glu Phe Thr  
 20 25 30  
 65 Leu His Asp Gly Glu Lys Lys Val Phe Tyr Ser Arg Pro Asn Asn His

ES 2 344 875 B1

		35				40						45					
5	Asp	Asn 50	Cys	Trp	Leu	Asn 55	Thr	Ile	Leu	Gln	Leu	Phe 60	Arg	Tyr	Val	Asp	
10	Glu 65	Pro	Phe	Phe	Asp	Trp 70	Val	Tyr	Asn	Ser	Pro 75	Glu	Asn	Leu	Thr	Leu 80	
15	Glu	Ala	Ile	Lys	Gln 85	Leu	Glu	Glu	Leu	Thr 90	Gly	Leu	Glu	Leu	Arg 95	Glu	
20	Gly	Gly	Pro	Pro 100	Ala	Leu	Val	Ile	Trp 105	Asn	Ile	Lys	His	Leu 110	Leu	His	
25	Thr	Gly	Ile 115	Gly	Thr	Ala	Ser	Arg 120	Pro	Ser	Glu	Val	Cys 125	Met	Val	Asp	
30	Gly 145	Thr	Asp	Met	Cys	Leu	Ala 135	Asp	Phe	His	Ala	Gly 140	Ile	Phe	Met	Lys	
35	Ala	Ile	Asp	Asp	Glu 165	Asp	Phe	Tyr	Pro	Trp 170	Thr	Pro	Asp	Pro	Ser 175	Asp	
40	Val	Leu	Val	Phe 180	Val	Pro	Tyr	Asp	Gln 185	Glu	Pro	Leu	Asn	Glu 190	Gly	Trp	
45	Lys	Ala	Ser 195	Val	Leu	Arg	Lys	Leu 200	Arg	Gly	Ala	Gly	Gln 205	Ser	Ser	Pro	
50	Ala	Thr 210	Gly	Ser	Gln	Asn	Gln 215	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly 220	Ser	Ile	Ile	Asn	
55	Asn 225	Tyr	Tyr	Met	Gln	Gln 230	Tyr	Gln	Asn	Ser	Met 235	Asp	Thr	Gln	Leu	Gly 240	
60	Asp	Asn	Ala	Ile	Ser 245	Gly	Gly	Ser	Asn	Glu 250	Gly	Ser	Thr	Asp	Thr 255	Thr	
65	Ser	Thr	His	Thr 260	Thr	Asn	Thr	Gln	Asn 265	Asn	Asp	Trp	Phe	Ser 270	Lys	Leu	
70	Ala	Ser	Ser 275	Ala	Phe	Ser	Gly	Leu 280	Phe	Gly	Ala	Leu	Leu 285	Ala	Asp	Lys	
75	Lys	Thr 290	Glu	Glu	Thr	Thr	Leu 295	Leu	Glu	Asp	Asn	Pro 300	Glu	Glu	Ala	Ala	

ES 2 344 875 B1

His Cys Ile His Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr  
 305 310 315 320  
 5 Phe Ser Ile Pro Tyr Ile Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser  
 325 330 335  
 10 Asp Lys Ala Glu Thr Thr Cys Val Gln Gly Trp Val Cys Val Tyr Gln  
 340 345 350  
 15 Ile Thr His Gly Lys Ala Asp Ala Asp Ala Leu Val Val Ser Ala Pro  
 355 360 365  
 20 Ala Gly Lys Asp Phe Glu Leu Arg Leu Pro Val Asp Ala Arg Lys Gln  
 370 375 380  
 25 Thr Thr Thr Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val Glu  
 385 390 395 400  
 30 Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Val Gln Arg Arg His His Thr Asp Val  
 405 410 415  
 35 Ala Phe Val Leu Asp Arg Phe Val Glu Val Thr Val Ser Gly Asn Gln  
 420 425 430  
 40 His Thr Leu Asp Val Met Gln Ala His Lys Asp Asn Ile Val Gly Ala  
 435 440 445  
 45 Leu Leu Arg Ala Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Ile Ala Val  
 450 455 460  
 50 Thr His Thr Gly Lys Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Val Ser  
 465 470 475 480  
 55 Ala Leu Asn Asn Thr Thr Asn Pro Thr Ala Tyr His Lys Gly Pro Val  
 485 490 495  
 60 Thr Arg Leu Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr  
 500 505 510  
 65 Ala Tyr Thr Gly Thr Thr Thr Tyr Thr Ala Ser Ala Arg Gly Asp Leu  
 515 520 525  
 Ala His Leu Thr Thr Thr His Ala Arg His Leu Pro Thr Ser Phe Asn  
 530 535 540  
 Phe Gly Ala Val Lys Ala Glu Thr Ile Thr Glu Leu Leu Val Arg Met  
 545 550 555 560  
 Lys Arg Ala Glu Leu Tyr Cys Pro Arg Pro Ile Leu Pro Ile Gln Pro

ES 2 344 875 B1

565

570

575

5 Thr Gly Asp Arg Arg Lys Gln Pro Leu Val Ala Pro Ala Ala Val Cys  
580 585 590

10 Gly Asp Ala  
595

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 875

② Nº de solicitud: 200801583

③ Fecha de presentación de la solicitud: 27.05.2008

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 7/00 (2006.01)  
C12N 7/08 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCÍA-ARRIAZA, J., OJOSNEGROS, S., DÁVILA, M. et al. Dynamics of mutation and recombination in a replicating population of complementing, defective viral genomes. Journal of Molecular Biology. Julio 2006, Vol. 360, Nº 3, páginas 558-572. ISSN 0022-2836. & Base de Datos Genbank; 20.07.2006; [en línea] [Recuperado el 05.10.2009]; Número de acceso DQ409183. Foot-and mouth disease virus - type C isolate C-S8p260d417, complete genome. & Base de Datos Genbank; 20.07.2006; [en línea] [Recuperado el 05.10.2009]; Número de acceso DQ409184. Foot-and mouth disease virus - type C isolate C-S8p260d999, complete genome.	1-5,8-16
Y		6,7,17,18
Y	US 5824316 A (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE) 20.10.1998, columnas 2-12.	6,7,17,18
A		1-5,8-16
X	GARCÍA-ARRIAZA, J. MANRUBIA, S. C., TOJA, M. et al. Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. Journal of Virology. Noviembre 2004, Vol. 78, Nº 21, páginas 11678-11685. ISSN 0022-538X.	1-5,8-16
Y		6,7,17,18
Y	CHINSANGARAM, J., MASON, P. W., GRUBMAN, M. J. Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. Vaccine. Octubre 1998, Vol. 16, Nº 16, páginas 1516-1522. ISSN 0264-410X.	6,7,17,18
A		1-5,8-16

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
24.08.2010

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
1/7



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 875

② N° de solicitud: 200801583

③ Fecha de presentación de la solicitud: 27.05.2008

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 7/00 (2006.01)  
C12N 7/08 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CHARPENTIER, N., DÁVILA, M., DOMINGO, E., ESCARMÍS, C. Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. Virology. Septiembre 1996, Vol. 223, N° 1, páginas 10-18. ISSN 0042-6822.	1-18
A	DÍEZ, J., HOFNER, M., DOMINGO, E., DONALDSON, A. I. Foot-and-mouth disease virus strains isolated from persistently infected cell cultures are attenuated for mice and cattle. Virus Research. Diciembre 1990, Vol. 18, N° 1, páginas 3-7. ISSN 0168-1702.	1-18

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.08.2010

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

2/7

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

C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBL, UniProt, aaGeneSeq, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.08.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	5-9, 13, 14, 17, 18	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-4, 10-12, 15, 16,	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones		<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-18	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GARCÍA-ARRIAZA, J. et al. Journal of Molecular Biology. Julio 2006, Vol. 360, N° 3, páginas 558- 572.	07-2006
D02	US 5824316 A	20-10-1998
D03	GARCÍA-ARRIAZA, J. et al. Journal of Virology. Noviembre 2004, Vol. 78, N° 21, páginas 11678-11685.	11-2004
D04	CHINSANGARAM, J. et al. Vaccine. Octubre 1998, Vol. 16, N° 16, páginas 1516-1522.	10-1998
D05	CHARPENTIER, N. et al. Virology. Septiembre 1996, Vol. 223, N° 1, páginas 10-18.	09-1996
D06	DÍEZ, J. et al. Virus Research. Diciembre 1990, Vol. 18, N° 1, páginas 3-7.	12-1990

**Observaciones sobre documentos:**

D01 presenta un estudio sobre la variabilidad génica del VFA variedad C-S8c1, tras sucesivas infecciones en serie en células BHK-21. Afirma que tras 260 pases, la población dominante es la delta-417 junto con delta-999 o delta-1017. En este trabajo, se secuenciaron diferentes poblaciones virales, que fueron depositadas con los números de acceso del DQ409183 al DQ409191 en la base de datos Genbank. Así, las secuencias DQ409183, DQ409186 y DQ409189, presentan en sus primeros 789 aminoácidos, un 100% de identidad en el primer caso y un 99,1% en el segundo y tercero, con la SEQ. ID. NO. 1, siendo siempre diferentes los últimos 6 residuos. Por otro lado, los primeros 595 aminoácidos de DQ409184 y los primeros 587 residuos de DQ409185, tienen un 100% y un 99,1% de identidad respectivamente, con la SEQ. ID. NO. 2, no solapándose los últimos 6 ó 14 residuos.

En D02 se anticipa una vacuna contra la fiebre aftosa, a partir de virus que presentan una delección de 192 nucleótidos en la proteasa L, que inactiva dicha proteína. Los animales vacunados con estos virus presentan protección frente a la infección con VFA virulentos.

D03 divulga una población de virus que presenta tres delecciones diferentes: una de 417 nucleótidos en la región codificante para la proteasa L, y otras dos de 999 y 1017 nucleótidos en la región que codifica la cápside. Estos virus son defectivos, produciéndose complementación entre ellos.

En D04 se investiga la eficiencia de VFA que presentan una delección en la proteasa L, como vacuna. Estas cepas confieren una protección parcial en cerdos y ganado frente a la infección con las cepas virulentas, haciéndolas candidatas para el desarrollo de futuras vacunas.

D05 anticipa un virus defectivo obtenido tras sucesivos pases del VFA C-S8c1 en células BHK-21, que presenta una delección de 417 nucleótidos entre las posiciones 1153 y 1571. Los autores apuntan el posible uso de estos virus como vacunas que expresen antígenos heterólogos en la región de la proteína L.

En D06 se afirma que durante la persistencia del VFA en células BHK-21, el virus se va volviendo más atenuado para ratones y ganado.

Hoja adicional

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la presente solicitud es: una población de virus de la fiebre aftosa (VFA), que comprende una secuencia de nucleótidos capaz de traducirse en una secuencia aminoacídica que comprende la SEQ. ID. NO. 1, y al menos otra secuencia capaz de traducirse a una secuencia polipeptídica que comprenda la SEQ. ID. NO. 2 o la SEQ. ID. NO. 3 (reivindicaciones de la 1 a la 5); una cápside proteica que comprende las SEQ. ID. NO. 1, 2 ó 3 (reivindicación 8); una construcción génica que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique para la SEQ. ID. NO. 1 y al menos la SEQ. ID. NO. 2 o SEQ. ID. NO. 3 (reivindicación 9); una composición que comprenda el virus, la cápside o la construcción génica (reivindicaciones de la 10 a la 16); así como el uso de la composición viral en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la fiebre aftosa (reivindicaciones 6, 7, 17 y 18). La SEQ. ID. NO. 1 se produce por una delección de 417 bases en la región que codifica para la proteasa L (nucleótidos 1153-1571). Por otro lado, las secuencias SEQ. ID. NO. 2 y 3 se traducen a partir de virus que presentan respectivamente, una delección de 999 bases entre los nucleótidos del 2793 al 3797, o de 1017 nucleótidos entre la posición 1932 y 2950, en la región codificante para la poliproteína.

**1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)**

**1.1. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 4, DE LA 10 A LA 12, 15 Y 16**

El objeto de la presente solicitud, de acuerdo con las reivindicaciones de la 1 a la 4, es una población de VFA aislada, caracterizada por comprender una secuencia de nucleótidos que codifique para una poliproteína que comprenda la SEQ. ID. NO. 1 con al menos un 99% de identidad, junto con otra secuencia nucleotídica que codifique para un polipéptido que comprenda con al menos un 99% de identidad la SEQ. ID. NO. 2 o la SEQ. ID. NO. 3. Por otro lado, las reivindicaciones de la 10 a la 12 y 15, tienen por objeto una composición que comprenda esta población de virus aislada, especificándose en la reivindicación 16 que la composición comprende dos o más tipos, serotipos, variedades o mutantes del VFA.

D01 presenta un estudio sobre la variabilidad génica del VFA variedad C-S8c1, tras sucesivas infecciones en serie en células BHK-21. Afirma que tras 260 pases, la población dominante es la delta-417 junto con delta-999 o delta-1017. Delta-417 y delta-999 son infectivos por complementación, ya que la electroporación de delta-417 y delta-999 sintetizados in vitro, produce placas de lisis celular y se obtienen partículas virales de tamaño normal. En este trabajo, se secuenciaron diferentes poblaciones virales, que fueron depositadas con los números de acceso del DQ409183 al DQ409191 en la base de datos Genbank. Así, la secuencia DQ409183 correspondiente a delta-417, presenta un 99,2% de identidad con respecto a la SEQ. ID. NO.1 (teniendo un 100% de identidad en los primeros 789 residuos), y DQ409184, perteneciente a un virus que presenta una delección delta-999, tiene un 99% de identidad con la SEQ. ID. NO. 2, siendo la identidad en los primeros 595 aminoácidos del 100%.

En consecuencia, el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones de la 1 a la 4, de la 10 a la 12, 15 y 16, ha sido divulgado idénticamente en D01, por lo que estas reivindicaciones no cumplen con el requisito de novedad.

**1.2. REIVINDICACIONES DE LA 5 A LA 9, 13, 14, 17 y 18.**

Las reivindicaciones de la 5 a la 9, 13, 14, 17 y 18 son nuevas.

**2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)**

**2.1. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 5** Las reivindicaciones de la 1 a la 4, tienen por objeto una población de virus aislada, que comprende una secuencia de nucleótidos codificante para una poliproteína que comprende, con al menos un 99% de identidad, la SEQ. ID. NO. 1, junto con al menos otra secuencia de nucleótidos codificante para otra poliproteína que comprenda, con al menos un 99% de identidad, la SEQ. ID. NO. 2 o la SEQ. ID. NO. 3. En la reivindicación 5 se especifica que las secuencias aminoacídicas han de comprender la SEQ. ID. NO. 1 y la SEQ. ID. NO. 2 o la SEQ. ID. NO. 3.

Aunque las secuencias divulgadas en D01 presentan un 99% de identidad con respecto a la SEQ. ID. NO. 1 ó 2, de la memoria de la solicitud no se deduce que esta diferencia produzca un efecto técnico sorprendente, sino que es una mera variante del virus debido a mutaciones al azar, y con las mismas características que las cepas divulgadas en D01.

Hoja adicional

Por otro lado, D03 anticipa una población de virus que presenta tres deleciones diferentes, una de 417 nucleótidos en la región codificante para la proteasa L (posición de 1153 a 1571), y otras dos de 999 y 1017 nucleótidos en la región que codifica la cápsida (posiciones de 2793 a 3793 y de 1932 a 2950 respectivamente), encontrándose la cepa estándar en minoría. Esta población viral se aisló a partir de 260 pases del virus VFA C-S8c1. Mediante la transfección de células con dos plásmidos que permitían la transcripción de los ARNs defectivos con la deleción delta-417 o la delta-999, se demostró que la transfección conjunta de ambos vectores producía la complementación de los ARNs y la producción de cápsidas virales.

Aunque en D03 no se muestran las secuencias de esta población viral, ésta presenta las deleciones en los mismos loci que los virus de la presente solicitud, y se han obtenido mediante la misma metodología y a partir de la misma cepa viral de origen. Además, los virus de la solicitud, no presentan ninguna característica sorprendente que los diferencie de los descritos en D03.

En vista de todos estos razonamientos, y de los argumentos desarrollados en el apartado 1.1, las reivindicaciones de la 1 a la 5 no presentan actividad inventiva.

#### 2.2. REIVINDICACIONES 8 y 9

Dado que la población vírica no tiene novedad o actividad inventiva, la cápsida que comprenda alguna de estas secuencias (reivindicación 8), o la construcción génica que incluya secuencias codificantes para SEQ. ID. NO. 1 y 2 ó 3 (reivindicación 9), no presentan actividad inventiva, ya que se considera que un experto en la materia sabría, con los conocimientos actuales en este campo técnico, cómo obtenerlas.

#### 2.3. REIVINDICACIONES DE LA 10 A LA 16

El objeto de las reivindicaciones de la 10 a la 16 es una composición que comprenda la población de virus, la cápsida o la construcción génica de las anteriores reivindicaciones.

En vista a los argumentos expuestos en los puntos, 1.1, 2.1 y 2.2, las reivindicaciones de la 10 a la 16 no cumplen con el requisito de actividad inventiva.

#### 2.4. REIVINDICACIONES 6, 7, 17 y 18

Las reivindicaciones 6, 7, 17 y 18 tienen por objeto el uso de la población viral, la cápsida, o la construcción génica, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la fiebre aftosa.

D02 y D04 anticipan el uso de virus con deleciones en la proteasa L en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la fiebre aftosa. Estos virus presentan un fenotipo atenuado frente a los virus silvestres.

La diferencia entre D02 o D04 y la presente solicitud, es que las deleciones en la proteasa L no son las mismas que la anticipada en la SEQ. ID. NO. 1 de la presente solicitud, y además carecen de las deleciones en la región de las proteínas estructurales.

El efecto técnico es el desarrollo de vacunas más seguras, ya que están formadas por virus defectivos que necesitan complementar para producir una infección productiva.

En consecuencia, el problema a resolver, es el desarrollo de vacunas contra el VFA más seguras.

Tanto D01 como D03, divulgan poblaciones virales del VFA con deleciones en la región de la proteasa L y en la codificante para las proteínas estructurales, que afectan a la novedad o actividad inventiva de las poblaciones virales objeto de la presente solicitud, afirmando además que son virus complementarios defectivos.

Por lo tanto, un experto en la materia intentaría el uso de la población viral que comprende una secuencia codificante para una poliproteína que comprenda la SEQ. ID. NO. 1, y al menos otra secuencia codificante para otra poliproteína que comprenda la SEQ. ID. NO. 2 ó 3 (D01 o D03), en elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la fiebre aftosa (D02 o D04), con una expectativa razonable de éxito.

En consecuencia, las reivindicaciones 6, 7, 17 y 18 no presentan actividad inventiva.