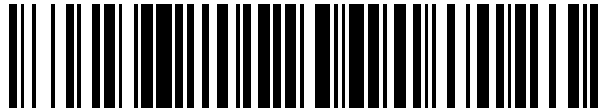


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 791**

21 Número de solicitud: 201330779

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 7/06** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**28.05.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**01.12.2014**

71 Solicitantes:

**ORGANIZACIÓN INTERPROFESIONAL PARA  
IMPULSAR EL SECTOR CUNÍCOLA - INTERCUN  
(100.0%)**

**Juan XXIII, 16, B, 3º  
20730 Azpeitia (Gipuzkoa) ES**

72 Inventor/es:

**PARRA FERNÁNDEZ, José Francisco;  
DALTON, Kevin Paul y  
RODRÍGUEZ SERRANO, Tomás Miguel**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

54 Título: **Cepa del virus hemorrágico de conejo (RHDV)**

57 Resumen:

Cepa del virus hemorrágico del conejo (RHDV).  
El objeto de la presente invención es una nueva cepa del virus que produce la enfermedad hemorrágica del conejo, RHD, y de una vacuna basada en la nueva cepa inactivada, de composiciones farmacéuticas que comprenden la vacuna, así como de su uso en profilaxis. La presente invención también está relacionada con un procedimiento para la preparación de la vacuna.

ES 2 523 791 A1

## DESCRIPCIÓN

### Cepa del virus hemorrágico de conejo (RHDV)

5 La presente invención está relacionada con el campo de la veterinaria en general y específicamente con la inmunología. En particular, la presente invención se refiere a una nueva cepa del virus hemorrágico de conejo y a una vacuna que incluye dicha cepa así como a las aplicaciones derivadas de su uso como inmunógeno.

### 10 ESTADO DE LA TÉCNICA

La enfermedad hemorrágica de conejo (RHD - rabbit haemorrhagic disease) es una enfermedad de origen viral, altamente infecciosa y con un porcentaje de mortalidad muy alto, que afecta a los conejos tanto salvajes como domésticos. Las primeras  
15 descripciones de animales contagiados por este virus se remontan a 1984 en la provincia de Jiangsu, en China. Desde entonces, se han descrito múltiples epidemias en varios países europeos, entre ellos España, Francia, Alemania o Italia, así como en varios países africanos y asiáticos. La infección produce grandes pérdidas económicas en el sector agropecuario.

20

La enfermedad, en su forma clásica, afecta primordialmente a conejos adultos. Los conejos lactantes parecen no ser susceptibles a la infección por un mecanismo desconocido. El período de incubación de la enfermedad es de 2-3 días, y la mortalidad puede llegar a ser del 90%. Los signos clínicos en animales infectados son  
25 fiebres altas, convulsiones, anorexia, y en ocasiones incoordinación, y problemas respiratorios. Un porcentaje pequeño de animales infectados desarrollan un curso crónico de la enfermedad en el que se detecta ictericia, pérdida de peso y letargia, y que acaba con la muerte del animal en 1 o 2 semanas desde la infección. El análisis patológico de los animales infectados revela hemorragias internas a nivel de corazón,  
30 traquea, pulmón, hígado y riñón.

El virus que causa la RHD, denominado de aquí en adelante RHDV, pertenece al género Lagovirus, y a la familia Caliciviridae. El genoma del virus ha sido clonado y secuenciado en su totalidad. Es un virus de RNA de cadena única y de sentido  
35 positivo, de 7.4Kb de longitud. El genoma del virus tiene dos marcos de lectura (Open

Reading Frame - ORF). El primero de ellos (ORF1), que abarca la mayor parte del genoma, codifica una poliproteína de gran tamaño que tras su autoproteólisis da lugar a las proteínas no estructurales y a la proteína mayoritaria de la cápside que deriva de su región carboxilo terminal. La proteína de la cápside se denomina VP60 (la nomenclatura actualizada para esta proteína es VP1) porque tiene una masa molecular aproximada de 60 KDa. Su secuencia se utiliza para determinar la filogenia y el parentesco entre las diferentes cepas conocidas del RHDV, así como la relación con otros virus relacionados. La tipificación del virus se realiza mediante técnicas inmunológicas utilizando anticuerpos monoclonales específicos, así como la aglutinación de los glóbulos rojos de la sangre humana. Se comprueba que algunos calicivirus, incluidos los norovirus humanos y el RHDV, se unen a los antígenos del glóbulo rojo que determinan el grupo sanguíneo, pero el patrón varía entre las diferentes cepas (Nystrom et.al. "Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner" PLoS Pathol. 2011, vol. 7, pp. 1-22).

La RHD se combate a nivel profiláctico mediante la vacunación preventiva de los animales (ver por ejemplo EP2034012B1). Hasta el momento presente el RHDV no ha podido ser cultivado de forma reproducible en una línea celular de laboratorio, de ahí que el genoma del virus y los viriones que se utilizan para fabricar las vacunas provengan de infecciones experimentales controladas en el laboratorio. Actualmente existen numerosas vacunas comerciales. Estas vacunas consisten en virus inactivados preparados a partir de extractos de hígado de animales infectados experimentalmente. El virus de estos extractos puede ser inactivado térmicamente o químicamente.

El virus RHDV, como la mayoría de los virus con genoma de RNA, tiene una tasa de mutación alta, lo que dificulta que una única vacuna proteja a toda la población y sea efectiva a lo largo del tiempo. En términos generales, las vacunas existentes protegen a los animales de las infecciones causadas por las variantes descritas hasta 2010, pero parecen no tener suficiente capacidad de protección contra otras cepas circulantes en la actualidad.

Recientemente, se han detectado variantes nuevas del virus en diferentes puntos del continente europeo (ver por ejemplo Le Gall-Reculé G., et.al. "Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France", Veterinary Record 2011, vol.

168, pp. 137-138). Se comprueba en esta última referencia que estas variantes nuevas parecen haber desarrollado una antigenicidad e inmunogenicidad diferente, lo que las lleva en numerosos casos a ser mortales incluso en animales previamente vacunados con vacunas basadas en cepas conocidas (Dalton KP. et. al. "Variant rabbit  
 5 hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain" Emerg. Inf. Dis. 2012, vol. 18, pp. 2009-2012). Es decir, las vacunas actualmente disponibles parecen no tener suficiente efectividad contra las infecciones de estas nuevas cepas del RHDV.

Así, existe la necesidad urgente de tener nuevas herramientas con las que hacer  
 10 frente a las nuevas variantes del virus RHDV.

#### EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con una nueva cepa del virus RHDV. En  
 15 particular, los inventores han comprobado que esta nueva cepa tiene un comportamiento funcional y un patrón infectivo diferente a otras variantes que han sido descritas en el estado de la técnica. Se ha comprobado que esta nueva cepa es capaz de infectar y producir tasas de mortalidad superiores al 50% en gazapos menores de 40 días de edad y que tiene un tropismo diferente ya que se replica y produce daños a  
 20 nivel intestinal además de los órganos típicos afectados por otras cepas conocidas del RHDV como son los pulmones, el hígado o el riñón. Adicionalmente, se ha comprobado que esta cepa tiene un patrón de aglutinación de glóbulos rojos diferente a las variantes conocidas. Así, las cepas descritas en la técnica aglutinan glóbulos rojos humanos del grupo 0, mientras que la cepa que es objeto de la presente  
 25 invención no aglutina dicho grupo sanguíneo. Notablemente, esta nueva cepa, denominada por los inventores como RHDV-N11, y cuya secuencia nucleotídica se encuentra representada según la SEQ ID NO:1 (representada también en la Tabla 1, abajo), provoca una alta tasa de mortalidad incluso en conejos que han sido vacunados con las vacunas comerciales existentes en la actualidad.

30

Tabla 1. SEQ ID:1 del RHDV-N11.

GTGAAAATTATGGCGGCTATGTGCGCCTTACTGGCATGACAACCTGCTATTCTCCCAGTAAAGAAACCT TAAGTTTCTTCCCTGGACCTCAGGGACAAGACCCCTCCCTGTTGTACTCGGGCACCCGGGAAACTGGCTTG GCCAGTCTTCCCTGGAACAAAACGGAAAAGAAGGACCTCTGGAGACATGTGACAAATGTGGCAAATGGCTT
---

AACGGCTTTGGTACTTTCGGACTAGAGGATCTCGGTGATGTCTGCTTGTGCTCCGTGACCAAACAGCAAC  
ACAAATTTGGACCCACTTGTGTTGTGTAACCGTGCATACATACACGACTGCGGCCGCTGGCGGCCCGCAG  
TCGTTTTCTTAAACACTACAAGGCATTGAACAAAGTCATCCCCTGTGCTTACCGATTTCGGTGAAGGAGCC  
CCCACCCCGCTCTTTGAGGGCGAGGTTGATGACTTGTGTTATTGAGCTCGGGGCACCAACCAGCATGGGCT  
TTATGGACAAGAACTGCTTAAGAAAGGTAAGAACTGATGGACAAGTTTGTGATGTTGATGAGCCCTG  
CCTGACATCAAAGGACGCCAACCTTCTCGACTCCATCGCTTCTGACAGCACCATAACGCGCGAAGCTGGAG  
GAGGAGTATGGTGTGAGATGGTGCAGGCAGCAGGACAGGAAAGACTTTATGAGGAACCTCAGACTTG  
CTTTAGATAACCGGCCCGCTAACCCATGACTTGGTACACCAGACTTGGCAATATCACGGTAAAAGGAAA  
ACAGTGGGCAAAGAAGATTGTTTATGGTGTCCATAGAGTTACTGACCCACTGAAGACGTTGGCCTCAATC  
TTATTGGTTGGCCTCCACAACGCTATTGCTGTGGACACAACAGTGATGCTGTCAACGTTTAAACCTGTAA  
ACCTGCTGGCTATTCTCATGGACTGGACCAACGACTTACTGGATTTCATCACCACGCTTGTGAGGCTACT  
AGAGTTGTACGGTGTGTCAGGCCACCGTCAACTTGATTATTGAAGGTGTGAAGAGCTTCTGGGACAAG  
GTAATTTGTGCGACGGAACGTTGCTTTGACTTGTCAAAGGCTGTTTGACACATTTCGAGGAATCTGTCC  
CCACAGGACCAACTGCAGGCTGCCTCATCTTCATGGCTTTCGTCTTTTCCACTGTTGTGGGGTACTTGCC  
CAACAACAGTGTGATCACAACCTTCATGAAGGGCGCCGGTAAGCTCACAACGTTTGCAGGGGTGGTTGGT  
GCTATTTCGAACGTTGTGGATCACCATCAACCAACACATGGTGGTACCAAGGACCTCACCAGCATAACAGAAA  
AGGTTATGACAGTTGTGAAAATGGCTAATGAGGCAGCGACGTTGGACCAACTAGAGATCGTCAGCTGCCT  
CTGCTCAGAACTGGAGAACACACTGACAAACAGGTGTACCCTACCATCATAACAACCAACACCTTGAATC  
TTGAATGCGTCTCAGAAGGTCATAAGTGACCTGCACACCATGATCCTTGGGAAGATCAACATGACAAAAGC  
AGAGGTGCGAGCCTGTAGCTGTTATTTTCAAAGGAGCCCCAGGTATCGGTAAAACCTTACTTGGTTACAG  
GCTTGGCGGGGACTTGGGCTGCCAACCCCAAGCAGATTAACCTTGGCCTTGACCATTTTACTCATAT  
ACGGGTGAGGAGGTGGCCATTGCGGACGAGTTCAACACCTGTGGGGACGGGGAGAGTTGGGTTGAGCTGT  
TTATCCAAATGGTTAACACAACCCCGTGCCTCACTGTGACAAAGCTGAAAACAAAAACAAGGTCTT  
CAACTCAAAGTACTTGTATGCACAACAACCTCCAACATGATACTGAATGCAACCCACCCTCGTGCTGGT  
GCGTTTTACAGGAGGGTTCATGATCGTTGAAGCAGAAATAAGGCTGTGAGAGCTGGCAGAACACTAGAC  
ACGGTTCCAAGCCAGGGAAGTCGTGCTTCCAGCAAGGACATGTCACACCTCACCTTTCAGGTGTACCCTCA  
CAACATGCCTGCTCCAGGATTTGTGTTTGTGCGGGGAGAACTGGTAAAGTCACAGGTGCGGCCCCAGGGAG  
TACAAGTACAGTGAGCTCTTGGACTTGATCAAAGCGAGCACCCCGATGTGGCCTCATTCGAGGGTGCCA  
ACAAGTTCAACTTCATCTACCCAGACGCCCAATACGAACAAGCGCTTCTCATGTGGAAAACAGTATTTTGT  
CATGTATGGATGTGTGGCAAGGCTTGCAAAGAATTTTGTGGAAGACATCCCATACAACCAAGTTACATA  
TCAAAGGCAAGTGACCCAAAATTTGGCGGGTGTGTGGAGTACCAGTGAAGTTCCAACATCTTTGGCGTA  
TGGTCCCACAGTTTGTGTTGGGGTGTGTGAACATGACAAACCAACTTGGCACCCCTTAAACCCAGCAACA  
GTTAGACAGGATCACCACGGGGTTGAGGGTGTCAACCGTCAACAGTGAACAACACTCCTGCCGTTCCAT  
TCACAAACTACACTATAAACCCCTCTTTCATCAAGCTGATTTGGGCAGTCAGAAAGCACCTTAAAGGAC  
TCAGTGGTGTAAACGAGGGTGGCTCAATTCGTCTGGCGTGTATGACCAACCCAGTTGATGCCTATGGTAC  
CCTTGTGACAACACTCACTGGGGCTGCCACCTTCTCGGATGACCCAGTTTTCGACAACCATAATATGTTCC  
AACTGCACGATCCAAATCCACTCCTGCGGTGGGTTGCTTGTGAGGTATTCAAGAGATCCTGCCCCGTTAG  
CGTCAGACAATGTTGACCGTGGCGATCAAGGTGTTGACGTGTTCACTGACCCCAATCTCATTTCTGGGTT  
TAGTTGGAGGCAGATTGCCCACTTGTTCGTTGAGGTGCTTTCACACTTGTGCGCAAACACCTTGTAAAC  
CTTGGCACCGTGGCAGCGCTGGGTGCTGTTGCGACGAAAGGCTTCCAGGGTGTGAAAGGCAAGACAAAAC  
GTGGTCTGTGTAAGGGTAAATTTGGGGAACGATGAGTACGACGAGTGGCAAGCTGCGCGTAGAGAATT  
TGTCACGCACATGACATGACTGCGGAGGAGTACCTCGCCATGAAGAACAAGCCGCCATGGGAAGTGAC  
GACCAAGACTCCATCATGTTTAGGAGTTGGTGGACCCGAAGACAGTTGAAACCTGACGAGGACCAAGTTA  
CTATTGTCGGTAGGGGCGGAGTGAGAAACGAGGTCAATTCGTACCAGGGCTAGGCAAGCCCCAAAAGGGCC  
AAAGACACTGGATGATGGTGGTTTTCTATGACAATGACTATGAGGGTCTGCCAGGGTTCATGAGACATAAC  
GGCAGTGGTTGGATGATTACATAGGTAACGGGTGTACATATCTAACACCCACACCGCCCCGTTCAAGCT  
GCTCAGAGATAGTCACATGTTCAACCCACTGACCTGTGCCTTGTAAAGGTGAGACAATCCGCAGTGT  
TGCCCAAATTGCCGAGGGAACCCAGTTAGTGACTGGAAGAAAGTCCCCATCACGACCTATGGTATTAAG  
AAAATTTGTCAGATTCCACCAAGATTGACGTGCTGGCGTATGACGGTTGCACACAGACGACCCATGGGG  
ACTGTGGGCTCCCGTTATATGACTCCAGCGGGAAGATTGTTGCCATACACACCCGCAACACTACTGGGGT  
TTCAAAGATGTGTACGTTGATTGACCTTACCCTAACAAAGGGGGTGTATGAAACCTCAAACCTTTTCTGT  
GGTGAACCAATCGAGTACAGGGGCATCACTGCGCACAGGCTTGTGGCGCGAACCTAGGCCCCCTGTTA  
GTGGGACTAGGTATGCCAGGGTCCCAGGTGTGCCAGATGAGTATAAGACTGGTTACAGACCAGCCAATCT  
TGGGCGCGGTGACCCAGACAGTGACAAGTCACTTATGAACATTGCAGTAAAGAATCTGCAGGTTTACCAG  
CAAGAACCCAAAGCTTAACAAGGTGGACGAGTTTATTGAGCGGGCAGCTGCCGACGTTTTGGGCTACTTGC  
GTTTCCCTAACCAAGGGAGAGCGCCAGTCAAATCTGAACTTAAAGGCGGCTTTTAAACACCCCTAGACCTGTC  
CACCTCTTGTGGTCCCTTTGTTCCGGGAAAGAAGATCAACCATGTGAAAGATGGGGTGTGACCAAGTT  
CTAGCAAAACATCTTTACAATGCTGGAGTGTGCTAACTCTGGCAAGGCTCTCCACCACATATACGCGT

```

GTGGGCTGAAGGATGAGCTCAGACCCCTTGACAAGGTGAAGGAGGGAAAGAAGAGACTGTTGTGGGGCTG
TGACGTCGGCGTTGCTGTGTGTGCCGCGGCCGTTTTCCACAACATATGCTACAAGCTAAAGATGGTTCGCA
CGGTTTGGCCCTATTGCAGTCGGCGTTGACATGACATCCCGTGACGTCGACGTTATCATCAACAACCTCA
CCGCCAAGGCCAGCGACTTCCGTGTGCTTGGATTACTCAAAATGGGATTCTACCATGTACCATGTGTAGT
TAGGCTGGCTATTGACATCTTGGCTGACTGCTGTGAACAGACGGAACCTACCAAGAGTGTGTGTCTCACA
TTGAAGTCTCACCCCATGACCATTCTTGCAGCCATGATTGTGCAAACCAAGCGTGGCCTTCCAAGTGCCA
TGCCCTTTACCTCGGTTCATCAACTCTATTTGCCACTGGTTGCTTTGGTCCGCGGCTGTTTACAAGTCTTG
TGCTGAGATTGGTCTGCACTGCTCTAACTTGTACGAGGATGCCCTTTCTACACGTACGGTGACGACGGT
GTGTACGCCATGACCCCAATGATGGTGAGCCTCCTGCCCGCCATAATAGACAACCTTGAGGGACTATGGAT
TGTCACCCACTGCCGCGGACAAGACGGAGTACATAGATGTTTGGCCGCTCAACAAAATTTTCATTTTTGAA
GCGCACCTTTGAGCTCACAGACATCGGGTGGGTGTCAAATTTGGACAAGTCCAGTATACTTAGGCAACTG
GAGTGGAGCAAGACAACATCCAGGCATATGGTGATTGAAGAGACACATGACCTGGCCAAGGACGAGCGTG
GTGTGCAGCTTGAAGAGCTGCAGGTTGCTGCTGCTGCCACGGCCAAGAATTTTTCGACTTTGTATGCAA
GGAGCTCAACCGACAACAAGCATAACACACAGTTTAGTGTTTACAGCTATGATGCTGCCAGGAAGATACTG
GCAGATCGGAAAAGGGTCGTCTCGGTAGTACCTGACGACGAATTTGTGAATGTTATGGAGGGCAAAGCCC
GCACGGCGTCGCAAGCGAGACAGCGGGCCTGCTACCACAGCATCAGTCCCTTGAACACCAACCGACGG
TATGGACCTTGGTGTGTGGCCACTACTAGTGTGGTACCACCGAGAACGCGTCCACGTCGATTGCAACG
GCGGGGATTGGCGGTCCACCCCAACAAGTGGACCAACAAGAACTTGGAGGACAAACTTTTACTACAATG
ATGTTTTTACATGGTCAGTTGCAGACGCCCGGGCAACATCCTGTACACTGTCCAACACTCGCCACAAAA
CAACCCGTTACAGCTGTTCTAAGTCAAATGTACGCTGGCTGGGCCGGTGGCATGCAGTTCCGGTTTTATA
GTCGCTGGGTGAGGTGTCTTCGGTGGGCGTCTGGTTGCAGCGGTTATACCACGGGCATTGAGATTGGGC
CGGGTTTGAAGTCAGACAATTCCTCATGTTGTTCATTGACGCTCGTTCACTCGAACCAGTACCATCAC
CATGCCGGACTTGCCTCCTAACATGTACCACCGACAGGCAACCCTGGCCTCGTTCCACGTTGGTCCTG
AGCGTTTACAACAACCTCATCAATCCATTTGGTGGATCCACGAGCGCGATCCAGGTCACGGTGGAAACAA
GGCCCAGTGAGGACTTTGAGTTTGTGATGATCCGTGCCCCCTCCAGTAAGACCGTTGACTCGATCTCGCC
CGCAGATCTCCTCACAACCCAGTTCCTCACTGGGGTGGTACCACAGATGGAATGGTGGATAGTT
GGGCTGCAGCCAGTCCCGGTGGGTTTTCTACGTGCAACAGACACTGGAACCTAAATGGTAGCACATTTG
GATGGTCAAGCCCGCGGTTTTGCCGCCATTGACCACGACAGAGGTAACGCAAGTTACCCTGGAAGCAGTTC
GTCAAATGTACTTGAGCTTTGGTATGCTAGTGCCGGGTCTGCAGCTGACAACCCCATCTCCCAAATTTGCT
CCAGATGGTTTTCCCTGACATGTCAATTTGTACCCTTCAGCGGCACCACCGTCCCTACCGCAGGGTGGGTGCG
GGTTCGGTGGGATCTGGAACAGCAGTAATGGTGCCCCCTTCGTACGACCGTGCAGGCTTATGAGTTGGG
CTTTGCCACTGGAGCACCAGCAACCCTCAACCTACCACCACCACTTCAGGGGCTCAGATTGTTGCCAAG
TCCATATAGCGTTGCAACTGGCATAAACCAGGCAACAGCCGGGTTGTTTGTGATGGCATCGGGTGTCA
TATCCACCCCAAACAGTAGTGCCATTACGTACACACCTCAGCCAAACAGGATTGTCAATGCACCTGGCAC
CCCTGCTGCCGCTCCTATTGGCAAGAACACACCCATCATGTTTCGCGTCTGTTGTTAGGCGCACCGGCGAC
ATCAACGCTGAGGCCGGTTCAACTAACGGAACCCAGTACGGCGCGGGATCACAACCACTGCCGGTGACAG
TTGGACTTTCACTGAACAATTACTCGTCGGCACTTATGCCTGGGCAGTTCCTTTGTTTGGCAGCTGAACTT
CGCTTCCGGCTTCATGGAACCTGGCTTGGTGTGATGGATACTTCTATGCGGGGACAGGGGCTTCAGCC
ACCCTCATTGACCTGTCAGAACTTGTGACATCCGCCCTGTGGGACCCAGACCGTCCACAAGCACGCTTG
TGTACAACCTGGGGGGCACAACCAATGGCTTTTCTTATGTCTGAATTTGTTGGACTTGGACTTGCAGGTG
CCAGCGTTTTGAGCAGCGCTCTGCTCCGACGGCAGGAGTTGCAACTACAAAACAAGCTTTAGAAAATGG
GTTGGTTTTAAAGGCCAATCAGTTGAGTAGATTAGGTTTTAACCTAATGAAGTTAAGAGTATGATTGTA
GGTAGTAATTTTAGTGGCAATGTTAAGTTAAGTAATATGCATAATGATGCTAGTGTAGTTAGTGCTTATA
GTATGTATAATCCTGCCAGTAATGGCATTAGGAAGAAAATTAAGGCTTTAATGATAGTGTAAAGGTTTA
TAATACCCTGGCGAGTCCAGTGCTTGATTAGAATTGACTTAAATTTAATTTGGTTTTAGTTATGAATTTAA
TTGGCTTTTATAGTTTAGAGTAAGCTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

La cepa RHDV-N11 ha sido depositada y aceptada en la European Collection of Cell Cultures (ECACC), Centre for Emergency Preparedness and Response (CEPR),  
 5 Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Reino Unido con el número de depósito de referencia 13011501, el 15 de Enero del 2013. Este depósito se realizó bajo los mismos requerimientos que aquéllos establecidos según el Tratado de Budapest, por

parte de la Universidad de Oviedo quien actuó como depositante. Paralelamente, el depositante ha autorizado por escrito a la Organización Interprofesional Cunícola (Intercun) a hacer referencia a dicho material biológico citado en la presente solicitud, o a cualquier solicitud de patente posterior que se derive de ésta o que reivindique prioridad de la misma, y ha dado su consentimiento irrevocable y sin reservas para que el material biológico depositado esté disponible al público.

Así, un primer aspecto de la presente invención es una cepa del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo depositada en la European Collection of Cell Cultures (ECACC), Centre for Emergency Preparedness and Response, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Reino Unido con el número de depósito 13011501.

Los inventores han comprobado que la cepa objeto de la presente invención, una vez inactivada, confiere protección efectiva contra la nueva variante del virus RHDV, protegiendo de manera total a los animales inmunizados, a diferencia de las vacunas comerciales existentes en la actualidad. Es decir, la capacidad profiláctica que muestra la cepa inactivada de la presente invención contra una infección provocada por RHDV-N11 es mucho mayor que la que muestran las vacunas disponibles en el estado de la técnica para esa variante.

Así, en una realización preferida, la cepa del virus que representa el primer aspecto de la presente invención está inactivada.

En otra realización preferida, la inactivación del virus se realiza mediante tratamiento por calor.

En otra realización preferida, la inactivación del virus se realiza mediante tratamiento químico.

En otra realización preferida, la inactivación del virus mediante tratamiento químico se realiza con un agente seleccionado del grupo que consiste en [beta]-propiolactona y formaldehído.

En otra realización preferida, la cepa inactivada mediante tratamiento químico es aquella depositada en la European Collection of Cell Cultures (ECACC), Centre for

Emergency Preparedness and Response, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Reino Unido con el número de depósito 13042401, el 24 de Abril del 2013. Este depósito se realizó bajo los mismos requerimientos que aquéllos establecidos según el Tratado de Budapest, por parte de la Universidad de Oviedo quien actuó como depositante.

5 Paralelamente, el depositante ha autorizado por escrito a la Organización Interprofesional Cunicola (Intercun) a hacer referencia a dicho material biológico citado en la presente solicitud, o a cualquier solicitud de patente posterior que se derive de ésta o que reivindique prioridad de la misma, y ha dado su consentimiento irrevocable y sin reservas para que el material biológico depositado esté disponible al público.

10

En otra realización, utilizando técnicas de biología molecular bien establecidas en el área de la técnica, se aísla la secuencia de cDNA que codifica por la proteína mayoritaria de la cápside VP60 de la cepa según el primer aspecto de la invención, se clona, y se expresa en un sistema heterólogo, que puede ser tanto procariota como eucariota. Entre los primeros destaca *E.coli*, y entre los segundos las levaduras (*Saccharomyces*, *Pichia*), las células de insecto y las células de ovario de hámster chino (CHO). La clonación y expresión de la proteína VP60 recombinante de la cepa según el primer aspecto de la invención permite obtener de forma aislada la proteína antigénica principal de la nueva cepa.

20

En otra realización, utilizando las mismas técnicas de biología molecular, se aíslan las secuencias de cDNA que, dentro de la secuencia global de la VP60, codifican por los dominios más expuestos de la VP60 cuando está plegada correctamente en una partícula vírica. La clonación y expresión de los dominios antigénicos más importantes de la VP60 de la cepa según el primer aspecto de la invención permite obtener las mínimas unidades estructurales inmunogénicas de la nueva cepa.

25

En otra realización, el fragmento de secuencia de cDNA que se clona y se expresa aisladamente de la VP60 de la cepa según el primer aspecto de la invención es el que codifica por el dominio P (nucleótidos 5986 a 7044 de la SEQ ID NO: 1).

30

Un segundo aspecto de la presente invención es una vacuna que comprende una cantidad inmunogénicamente efectiva de la cepa inactivada definida anteriormente junto con un vehículo veterinariamente aceptable.

35



En otra realización preferida, la vacuna además comprende al menos un adyuvante veterinariamente aceptable.

5 En otra realización preferida, la vacuna definida anteriormente es adecuada para su administración por vía intramuscular.

En otra realización preferida, la vacuna definida anteriormente es adecuada para su administración por vía subcutánea.

10 En otra realización preferida, la vacuna definida anteriormente es adecuada para su administración por vía intradermal.

15 En otra realización preferida, la vacuna definida anteriormente contiene una dosis efectiva viral que está entre 1000 y 10000 HAU/dosis (Unidades de Hemaglutinación por dosis). La dosis efectiva, sin embargo, puede ser ajustada fácilmente por el experto en la materia en una serie de experimentos estándar de ensayo y error.

20 En otra realización, la vacuna comprende una cantidad inmunogénicamente efectiva de la proteína VP60 expresada aisladamente mediante técnicas de DNA recombinante, junto con un vehículo veterinariamente aceptable.

25 En otra realización, la vacuna comprende una cantidad inmunogénicamente efectiva de al menos un dominio expuesto de la proteína VP60 de la cepa según el primer aspecto, expresado aisladamente mediante técnicas de DNA recombinante, junto con un vehículo veterinariamente aceptable.

30 En otra realización, la vacuna comprende una cantidad inmunogénicamente efectiva del dominio P de la VP60 de la cepa según el primer aspecto, expresado aisladamente mediante técnicas de DNA recombinante, junto con un vehículo veterinariamente aceptable.

Un tercer aspecto de la presente invención es la vacuna para su uso como medicamento.

35 Este tercer aspecto puede ser reformulado como el uso de la vacuna anteriormente

descrita para la fabricación de un medicamento.

En otra realización preferida, el uso como medicamento definido anteriormente está destinado a la prevención de la enfermedad hemorrágica del conejo. Esta realización  
5 preferida puede ser reformulada como el uso de la vacuna según se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento para la prevención de la enfermedad hemorrágica del conejo. Alternativamente, la invención se refiere a un método para la prevención de la enfermedad hemorrágica del conejo que comprende administrar una cantidad profilácticamente y/o terapéuticamente efectiva de la vacuna  
10 según se ha definido anteriormente a un conejo que lo precise necesario.

Un cuarto aspecto de la presente invención es la cepa del virus inactivada definida anteriormente para su uso como inmunógeno. Con ello, la cepa de virus en forma inactivada definida anteriormente se emplea para inducir una respuesta del sistema  
15 inmune, ya sea una respuesta humoral y/o celular, y con ella en una realización particular se preparan medicamentos para la prevención de la enfermedad hemorrágica del conejo.

Un quinto aspecto de la presente invención es un método para preparar la vacuna  
20 definida anteriormente, que comprende:

- a) obtener una muestra de la cepa del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo como la definida en el primer aspecto;
- b) inactivarla; y
- c) añadirle excipientes y opcionalmente adyuvantes veterinariamente aceptables para  
25 dar un producto final administrable.

En una realización preferida del quinto aspecto, la inactivación del virus se realiza por tratamiento químico.

30 En otra realización preferida del quinto aspecto, la inactivación química se realiza mediante tratamiento con [beta]-propiolactona o formaldehído.

Un sexto aspecto de la presente invención es la proteína VP60 o los dominios más expuestos de la VP60 expresados y purificados aisladamente mediante técnicas del  
35 DNA recombinante para su uso como antígeno en la detección de la presencia de

anticuerpos contra la cepa según el primer aspecto de la invención. El uso de la VP60 o de alguno de sus dominios aisladamente permite mediante técnicas rutinarias de diagnóstico, como por ejemplo las técnicas inmunoquímicas (ELISA, western blot, etc), la detección de los anticuerpos contra la nueva cepa.

5

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. Además, la palabra "comprende" incluye el caso "consiste en". Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenden en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

15 Definiciones:

El término "vacuna" como se usa aquí, se refiere a cualquier tipo de agente biológico, que se administra de cualquier forma, que es capaz de estimular una respuesta inmune en un animal inoculado con la vacuna. La vacuna típicamente incluye un agente viral en forma inactivada, aunque pueden contener agentes virales atenuados o incluso vivos. Las vacunas usualmente se basan en el propio virus o en una parte inmunogénica (antigénica) del mismo.

El término "cantidad inmunogénicamente efectiva" como se usa aquí, se refiere a la cantidad de antígeno (es decir de la cepa inactivada de la invención) suficiente para inducir una respuesta inmune a nivel celular y/o humoral detectable en un animal vacunado. La cantidad particular administrada puede variar en función de las circunstancias asociadas a cada caso, como por ejemplo la ruta de administración.

El término "cantidad profilácticamente y/o terapéuticamente efectiva" como se usa aquí, se refiere a la cantidad de vacuna suficiente para inducir o potenciar una respuesta inmune a nivel celular y/o humoral detectable en un animal. Por profilácticamente se entiende aquí que se administra la vacuna a un animal que no está infectado, mientras que por terapéuticamente se refiere a que se administra la vacuna a un animal que padece la enfermedad, con el fin de potenciar su respuesta

inmune. La cantidad particular administrada puede variar en función de las circunstancias asociadas a cada caso, como por ejemplo la ruta de administración.

5 El término "virus inactivado" como se usa aquí, se refiere a un virus que en condiciones naturales es virulento, pero que ha sido modificado de tal manera que no es capaz de colonizar a un huésped, que no es capaz de causar una enfermedad o que causa una enfermedad con síntomas significativamente reducidos, y además sí que es capaz de inducir una respuesta inmune protectora. Típicamente los virus se inactivan mediante un tratamiento químico o por calor.

10

El término "respuesta inmune protectora" como se usa aquí, se refiere a una respuesta inmunológica celular y/o humoral que previene o demora la infección y la enfermedad producida por el RHDV.

15

El término "composición veterinaria" se refiere a una la mezcla de una cantidad inmunogénicamente efectiva de la cepa inactivada de la presente invención junto con otros componentes químicos, como por ejemplo excipientes, diluyentes, portadores, vehículos o adyuvantes aceptables. La composición veterinaria facilita la administración de la vacuna al organismo.

20

El término "excipiente veterinariamente aceptable" se refiere a un material, composición o vehículo veterinariamente aceptable, como por ejemplo un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente, o material de encapsulación. Cada componente tiene que ser aceptable veterinariamente en el sentido de ser compatible  
25 con los otros ingredientes de la composición veterinaria. Ha de ser adecuado para el uso en contacto con tejidos u órganos de animales sin demasiada toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones acordes con un ratio razonable de riesgo/beneficio.

30

El término "adyuvante veterinariamente aceptable " como se utiliza aquí, se refiere a un agente farmacológico que potencia el efecto de otro agente (en este caso la vacuna). Los adyuvantes se incluyen típicamente en vacunas para mejorar la respuesta inmune (del animal inmunizado) contra los antígenos de la vacuna. Esto lo pueden conseguir por diferentes mecanismos. Algunos adyuvantes actúan como un  
35 depósito para el antígeno, potenciando su presentación al sistema inmune del animal

infectado. Otros actúan como irritante lo que produce que el organismo del huésped reclute y amplifique su respuesta inmune. Además los adyuvantes ayudan en la estabilización de la formulación de los antígenos. Típicamente son aceites minerales, glicéridos o derivados de ácidos grasos.

5

El término “inmunógeno” como se utiliza aquí, se refiere a una sustancia que es capaz de inducir una respuesta del sistema inmune, ya sea una respuesta humoral y/o celular.

10 A lo largo de la descripción, se hace referencia al genoma o partes del genoma del virus en forma de DNA. Por DNA se entiende aquí el cDNA (DNA complementario) que ha sido sintetizado utilizando como molde el RNA original del virus.

## EJEMPLOS

15

### **Materiales y métodos**

#### Animales.

20 Se han empleado conejos de raza híbrida de 25 a 30 días de edad al inicio de la experimentación. Los animales provienen de explotaciones ganaderas sin historia clínica reciente de enfermedad hemorrágica.

#### Extracto de hígado conteniendo RHDV-N11.

25 Se partió de una mezcla de hígados de gazapos procedentes de un mismo brote de enfermedad hemorrágica (RHD) detectado en Navarra en 2011, en los que se había demostrado (mediante RT-PCR y aglutinación de glóbulos rojos humanos de tipo B la presencia del virus RHDV-N11. Los hígados troceados (peso total aproximado 60g) se mezclaron con 300ml de tampón fosfato salino (PBS) pH= 7,5 y se homogenizaron con un aparato Ultra-turrax 25 a temperatura ambiente. El extracto resultante se centrifugó  
30 a 1000g durante 10 min a temperatura ambiente y se desechó el sedimento. El sobrenadante resultante se centrifugó a 30000g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante de la segunda centrifugación se almacenó a -80°C en alícuotas de 10 y 1 ml hasta su uso. Este extracto soluble se denominará en adelante “Extracto RHDVN11 02/08/2012”. Se han depositado muestras de este extracto en la  
35 Collection of Cell Cultures” (Health Protection Agency. Porton Down, UK) con la

referencia nº 13011501.

Medida de la aglutinación de glóbulos rojos tipo B.

Se emplearon suspensiones de glóbulos rojos humanos de tipo B (GRH-B) al 2% en  
5 PBS. Para la medida de la capacidad aglutinante de los extractos de hígado  
conteniendo el RHDV-N11 se añadieron alícuotas de 25 microlitros del extracto  
descrito en el apartado anterior diluidas en serie (1/2) en 12 pocillos consecutivos  
utilizando PBS frío en placas con fondo en V. Posteriormente se añadió a cada pocillo  
10 un volumen igual de la suspensión de GRH-B al 2%, mezclando suavemente el  
contenido de los pocillos e incubando a 4°C. Las unidades de aglutinación (UA) se  
obtienen hallando el inverso de la mayor dilución que aún permite ver aglutinación. El  
análisis del extracto RHDVN11 02/08/2012 mostró tener una capacidad aglutinante de  
20480 UA/ml extracto.

15 Muestras de suero sanguíneo.

Para obtener suero sanguíneo para los análisis de presencia de anticuerpos se  
extraen muestras de sangre de la vena marginal de la oreja con agujas 25G y jeringas  
de 1ml. Las muestras se dejan coagular y el suero obtenido se guarda a -20° hasta su  
uso.

20

ELISA para la detección de anticuerpos frente al RHDV.

Para este propósito se ha utilizado el sistema INGEZIM Rabbit 17. RHD. K.1  
(INGENASA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

25 ELISA de captura para la detección de antígeno del RHDV.

La presencia de antígeno de RHDV en muestras de hígado de conejo se investigó  
utilizando el sistema INGEZIM RHDV das 17.RHD.K2 siguiendo las instrucciones del  
fabricante.

30 RT-PCR.

La transcripción reversa (RT) y posterior amplificación mediante PCR se realizó con  
RNA extraído de 20mg de hígado de conejo utilizando el sistema comercial RNAeasy y  
RNA extraction kit (QIAGEN Iberia), la transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen  
Corp) y LA-Taq polimerasa (Takara Bio, Otsu, Japan), empleando los cebadores  
35 RhdF1 (5'-TTGGCAATGACAACAGGTGG-3') (SEQ ID NO:2) y RhdR4 (5'-

GGTGTGTTCTTACCCACAGG-3') (SEQ ID NO:3) 0.2µM, y MgCl<sub>2</sub> 1.5mM. La  
amplificación se realiza empleando el siguiente programa: 94°C 3 min; 30 ciclos de  
94°C, 30 s; 53°C, 30 s y 68°C, 30 s, con una extensión final de 5 min a 72°C. Para  
confirmar el tipo de RHDV, la banda amplificada de aproximadamente 738 pb se  
5 purifica mediante electroforesis y se somete a secuenciación.

La secuencia obtenida al analizar los extractos que contienen RHDV-N11 ha sido  
depositada en GenBank con el número de acceso JX133161 (versión 1 de 10.12.2012)  
(corresponde a una parte de la secuencia de la proteína de la cápside – VP1).

## 10 **Resultados**

### Valoración de la infectividad del RHDV-N11.

Para investigar la patogenicidad del virus presente en el extracto RHDVN11  
02/08/2012 se realizaron infecciones experimentales empleando tres grupos de  
15 animales (dos grupos de 10 animales y uno de cinco) y dos cantidades diferentes de  
inoculo viral formuladas en tampón fosfato salino como se describe a continuación:

Dosis alta (A): 7ml Extracto RHDVN11 + 7 ml de PBS. La mezcla contiene >10.000  
UA/ml. Dosis baja (B): 0,7ml Extracto RHDVN11 + 13,3 ml de PBS. La mezcla  
20 contiene >1.000 UA/ml.

Grupos experimentales: Todos los animales empleados (gazapos de 35 días)  
proceden de una explotación sin historia reciente de RHD. Antes del desafío se  
tomaron muestras de sangre para valorar la presencia de anticuerpos frente al RHDV.  
Dos de los grupos de animales fueron retados con el extracto que contiene el RHDV-  
25 N11 mediante inyección intramuscular en una pata trasera empleando las dosis que se  
indican a continuación.

Grupo 1: 10 animales retados con 1ml de la dosis A (10.000 UA)

Grupo 2: 10 animales retados con 1ml de la dosis B. (1.000 UA)

30 Grupo 3: 5 animales centinela. No retados y mantenidos en otra habitación.

Tras la aplicación del virus los animales fueron observados diariamente para evaluar  
su estado sanitario. A las 24h tras el desafío se encontraron muertos dos animales del  
grupo 1 y un animal del grupo 2. Antes de las 48h desde el reto murió un animal del  
35 grupo 1 y cuatro del grupo 2, encontrándose muerto otro animal del grupo 2 antes de

las 72h desde el reto. En la semana siguiente al reto no se produjeron más muertes en los grupos de animales infectados. No se observaron bajas en el grupo 3 de animales centinela. La mortalidad registrada en el grupo 1 retado con la dosis alta de virus fue del 50% (5/10) mientras que en el grupo 2, desafiado con la dosis menor de virus, fue del 60% (6/10).

Los resultados obtenidos indican que el virus RHDV-N11 presente en los extractos de hígado era altamente infeccioso y que una dosis conteniendo 1000 UA de RHDV-N11/animal fue suficiente para producir índices de mortalidad promedio del 55% en animales de 35 días de edad cuando éstas se administran por vía intramuscular. Estos porcentajes de mortalidad son semejantes a los observados en el campo en infecciones naturales.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos en los dos grupos experimentales indican que la dosis letal 50 (DL50) será una cantidad inferior a la empleada en el grupo 2.

En los experimentos de desafío posteriores se emplearán dosis equivalentes a la utilizada en el grupo 2 (1000 UA/animal).

#### 20 Elaboración de una vacuna inactivada frente al RHDV-N11.

20 ml del extracto de hígado conteniendo RHDV-N11 se trataron con 60 microlitros de [beta]-propiolactona (BPL) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente hasta su total disolución. Posteriormente se incubó a 37°C durante 24 horas. La preparación con el virus inactivado se almacenó a 4°C hasta su uso.

25

Para su aplicación en animales, el antígeno inactivado se mezcló con un volumen igual (20 ml) de tampón fosfato salino (PBS).

La vacunación de los animales se realiza administrando 1 ml/animal de la mezcla anterior (> 10000 UA) por vía subcutánea.

30

#### Eficacia vacunal del antígeno RHDV-N11 inactivado con BPL.

Con objeto de evaluar la eficacia de una vacuna elaborada con el RHDV-N11 inactivado químicamente con BPL se utilizaron 53 conejos de aproximadamente 22 días de edad procedentes de una explotación ganadera sin historia reciente de RHD.

35



Los animales se distribuyeron en 5 grupos experimentales como se indica a continuación:

Grupos 1 a 4: 12 animales/grupo

5 Grupo 5: 5 animales.

Los animales de los grupos 1 y 2 se alojaron en un mismo box, los grupos 3 y 4 se alojaron en otro box y el grupo 5 en un tercer box independiente del área de contención biológica del animalario.

10

Después de 5 días de aclimatación en el animalario, un día antes de la vacunación, se tomó una muestra de sangre de todos los animales para investigar la posible presencia de anticuerpos frente al RHDV empleando el test INGEZIM Rabbit 17. RHD. K.1. Se observó que 9/53 tenían reacción positiva en el ELISA. Los animales seropositivos se distribuyeron uniformemente entre los 5 grupos experimentales a razón de 2 o 3 por grupo.

15

Tras el análisis serológico los animales de los grupos 1 y 3 (27 días de edad) se vacunaron por vía subcutánea con 1 ml/animal de la solución del virus RHDV-N11, inactivado previamente con [beta]-propiolactona (BPL). Los animales de los grupos 2 y 4 se inyectaron con 1 ml de suero salino estéril por la misma vía con agujas de 23 G y jeringas de 2 ml (vacunación-placebo). Los conejos del grupo 5 no se trataron y actuaron como testigos.

20

Durante los días siguientes se realizó revisión general de todos los animales apuntando posible reacción a la vacuna en el punto de inoculación o posibles síntomas digestivos, respiratorios o nerviosos. No se observaron signos reseñables en la mayoría de los animales.

25

A los 7 días después de la vacunación se extrajo una muestra sanguínea de todos los animales de los grupos 1, 2 y 5. El análisis de los sueros permitió observar que ningún animal tenía anticuerpos detectables frente al RHDV, incluyendo los vacunados (grupo 1) y aquellos que en el análisis previo a la vacunación parecían tener anticuerpos contra el virus.

30

35

Posteriormente al sangrado, se inoculó 1 ml/animal de una solución del virus RHDV-N11 ( > 1000 UA) por vía intramuscular en la extremidad posterior derecha a los animales de los grupos 1 y 2 cuando éstos tenían aproximadamente 34 días de vida.

- 5 Para el seguimiento de la infección se tomó la temperatura rectal una vez al día a todos los animales y se apuntan aquellos síntomas observados.

A las 48 del desafío aparecieron muertos 4 conejos, todos ellos pertenecientes al grupo 2 de animales no vacunados. Al siguiente día (72hpd) apareció muerto otro animal, también del grupo 2. De todos ellos, se extrajo muestra hepática para su posterior análisis. Los hígados eran de consistencia friable y con disminución de la coloración. No se observaron otras lesiones anatómicas reseñables.

En la mayoría de los animales muertos no se habían observado previamente signos comunes destacables. En algunos casos se detectaron signos de ataxia, disnea, ictericia o deshidratación sin que hubiera un patrón común. En todos los casos de los animales muertos se observó una subida de la temperatura rectal por encima de 40° un día antes de la muerte.

20 7 días después del reto todos los animales supervivientes de los grupos 1 y 2 fueron sacrificados recogiendo muestra sanguínea por punción intracardiaca con agujas de 21 G y 40 mm previa anestesia con Ketamina + xylacina y muestra hepática en la necropsia de cada animal. No se observaron lesiones macroscópicas en los órganos de los animales sacrificados.

25

Todos los animales del grupo 1 (vacunados) sobrevivieron al reto durante 7 días. Solamente 7 de ellos presentaban niveles positivos de anticuerpos anti-RHDV medidos por ELISA. El análisis de muestras de hígado de los 12 animales vacunados y sacrificados a los 7 días después del reto no permitió detectar la presencia de antígeno viral por ELISA de captura ni el RNA viral mediante RT-PCR.

30

El porcentaje de mortalidad en el grupo 2 (placebo) fue del 41,6% (5 de 12 animales). El análisis de los sueros de los animales supervivientes no permitió detectar la presencia de anticuerpos anti-RHDV. El análisis de las muestras de hígado de los 5 animales muertos del grupo 2 permitió encontrar tanto RNA (RT-PCR) como antígeno

35

viral (ELISA). El análisis de las muestras de hígado de los conejos supervivientes fue negativo para estas dos pruebas.

Los resultados del desafío de los animales vacunados con el antígeno RHDV-N11  
5 inactivado indican que este tratamiento protege el 100% de los animales tratados mientras que la mortalidad en el grupo placebo es del 41,6%, en el rango de lo observado en las infecciones naturales detectadas en las explotaciones industriales de conejos.

10 A los 15 días de la vacunación, se extrajo una muestra sanguínea de todos los animales de los grupos 3, 4. El análisis de los sueros permitió observar que el 50% de los animales vacunados (grupo 3) tenía anticuerpos detectables frente al RHDV. Ninguno de los animales del grupo 4 (placebo) tenía niveles detectables de anticuerpos, incluyendo aquellos que en el análisis previo a la vacunación parecían  
15 tener anticuerpos contra el virus.

Posteriormente al sangrado, se inoculó 1 ml/animal de una solución del virus RHDV-N11 ( > 1000 UA) por vía intramuscular en la extremidad posterior derecha a los animales de los grupos 3 y 4 cuando éstos tenían aproximadamente 42 días de vida.

20

Para el seguimiento de la infección se les tomó temperatura rectal una vez al día a todos los animales y se apuntaron aquellos síntomas observados.

A las 24 horas del desafío apareció muerto 1 conejo del grupo 3 (vacunados) que ya  
25 presentaba signos de pérdida de peso, heces blandas, anorexia y debilidad antes de la inoculación del virus. Se le realizó la necropsia observando un cuadro neumónico generalizado en ambos pulmones sin lesiones hepáticas aparentes. Se recogió muestra hepática y los análisis de RT-PCR y captura de antígeno no permitieron detectar la presencia del RHDV.

30

A las 96 horas después del reto apareció muerto un animal del grupo 4 (placebo). En la necropsia se observó neumonía hemorrágica bilateral con sangre en ambos ollares y pérdida ligera de coloración hepática y consistencia disminuida. Se tomó muestra hepática para su posterior análisis. En este animal, como en los casos de los  
35 animales muertos tras el desafío a los 7 días después de la vacunación, se observó

una subida de la temperatura rectal por encima de 40° un día antes de la muerte.

7 días después del reto todos los animales supervivientes de los grupos 3 (11 animales) y 4 (11 animales) fueron sacrificados recogiendo muestras sanguíneas por  
5 punción intracardiaca con agujas de 21 G y 40 mm previa anestesia con Ketamina + xylacina y muestra hepática en la necropsia de cada animal. No se observaron lesiones macroscópicas en los órganos de los animales sacrificados.

10 de los 11 animales del grupo 3 (vacunados) que sobrevivieron al reto durante 7  
10 días mostraban niveles positivos de anticuerpos anti-RHDV medidos por ELISA. El análisis de los sueros de los animales supervivientes del grupo 4 (placebo) permitió detectar la presencia de anticuerpos anti-RHDV en 3 de los 11 animales supervivientes.

15 El porcentaje de mortalidad en el grupo 4 (placebo) fue del 8,3% (1 de 12 animales). El análisis de la muestra de hígado del animal muerto en el grupo 4 permitió encontrar tanto RNA (RT-PCR) como antígeno viral (ELISA).

El análisis de las muestras de hígado de los conejos supervivientes, tanto los  
20 vacunados (grupo 3) como los no vacunados (grupo 4) fue negativo para estas dos pruebas.

Los resultados indican que la mortalidad debida al RHDV-N11 en animales de más de 40 días de edad es menor que la observada en los animales de menor edad. No  
25 obstante, la vacunación de este tipo de animales permite proteger el 100% de los mismos frente a un reto virulento con RHDV-N11.

#### REFERENCIAS CITADAS EN LA SOLICITUD

30 Nystrom et. al. "Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner" PLoS Pathol. 2011, vol. 7, pp. 1-22.

Le Gall-Reculé G., et. al. "Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease  
35 virus in France", Veterinary Record 2011, vol. 168, pp. 137-138.

Dalton KP. et. al. "Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain"  
Emerg. Inf. Dis. 2012, vol. 18, pp. 2009-2012.

5

10

15

20

25

30

35

## REIVINDICACIONES

1. Cepa del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo depositada en la European Collection of Cell Cultures (ECACC), Centre for Emergency Preparedness and Response, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Reino Unido con el número de depósito 13011501.  
5
2. Cepa de virus según la reivindicación 1, en forma inactivada.
- 10 3. Cepa de virus según la reivindicación 2, en donde la inactivación del virus se realiza mediante tratamiento químico.
4. Cepa de virus según la reivindicación 3, en donde la inactivación del virus mediante tratamiento químico se realiza con un agente seleccionado del grupo que consiste en  
15 [beta]-propiolactona y formaldehído.
5. Cepa de virus según la reivindicación 4 depositada en la European Collection of Cell Cultures (ECACC), Centre for Emergency Preparedness and Response, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Reino Unido con el número de depósito 13042401.  
20
6. Vacuna que comprende una cantidad inmunogénicamente efectiva de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 2-5 junto con un excipiente veterinariamente aceptable.
- 25 7. Vacuna según la reivindicación 6, que además comprende al menos un adyuvante veterinariamente aceptable.
8. Vacuna según las reivindicaciones 6-7, en donde la vacuna es adecuada para su administración por vía intramuscular.  
30
9. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 6-8 para su uso como medicamento.
10. Vacuna para el uso según la reivindicación 9, donde el medicamento está  
35 destinado a la prevención de la enfermedad hemorrágica del conejo.

11. Cepa del virus según cualquiera de las reivindicaciones 2-5 para su uso como inmunógeno.

- 5 12. Método para preparar la composición de una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que comprende:
- a) obtener una muestra de la cepa del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo según la reivindicación 1;
  - b) inactivarla; y
- 10 c) añadirle excipientes y opcionalmente adyuvantes veterinariamente aceptables para dar un producto final administrable.

13. Método según la reivindicación 12, en donde en la etapa b) la inactivación del virus se realiza por tratamiento químico.

15

14. Método según la reivindicación 13, en donde la inactivación química se realiza mediante tratamiento con [beta]-propiolactona o formaldehído.

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> Organizacion Interprofesional para Impulsar el Sector Cunicola INTERCUN

<120> RHDV-N11

5

<160> 3

<170> BiSSAP 1.0

10

<210> 1

<211> 7472

<212> DNA

<213> Viruses

15

<220>

<221> source

<222> 1..7472

<223> /mol\_type="DNA"

    /organism="Viruses"

20

<400> 1

gtgaaaatta tggcggctat gtcgcgctt actggcatga caactgctat tctcccagta     60

aagaaacct taagtttctt cctggacctc aggacaaga ccctccctg ttgtactcg     120

25

gcacccggga aactggctg gccagtctc ctggaacaaa acggaaaaga aggacctctg     180

gagacatgtg acaaatgtgg caaatggctt aacggcttg gtactttcgg actagaggat     240

30

ctcggatgat tctgcttgct ctcctgacc aaacagcaac acaaatttg acccactgt     300

ttgtgaacc gtgcatacat acacgactgc ggcccgtggc ggcgccgag tcgttttctt     360

aaactacta aggattgaa caaagtcac cctgtgctt accgattcgg tgaaggagcc     420

35



ES 2 523 791 A1

cccacccccg tcttgaggg cgagggtgat gacttgttta ttgagctcgg ggcaccaacc 480

agcatgggct ttatggacaa gaaactgctt aagaaaggta agaaactgat ggacaagttt 540

5 gttgatgtg atgagccctg cctgacatca aaggacgcca accttctcga ctccatcgct 600

tctgacagca ccatacgcgc gaagctggag gaggagtatg gtgttgagat ggtgcaggca 660

gcacgagaca ggaaagactt tatgaggaac ctgagactg cttagataa ccggcccgct 720

10 aaccctatga ctggtacac cagacttggc aatatcacgg taaaaggaaa acagtgggca 780

aagaagattg ttatggtgt ccatagagt actgaccac tgaagacgtt ggcctcaatc 840

15 ttattggtg gcctccaaa cgctattgct gtggacacaa cagtgatgct gtcaacgttt 900

aaacctgtaa acctgctggc tatttcatg gactggacca acgactgac tggattcatc 960

accacgctg tgaggctact agagttgtac ggtgtgtgc aggccaccgt caactgatt 1020

20 attgaagggtg tgaagagctt ctgggacaag gtaatttgtg cgacggaacg ttgcttgac 1080

ttgctcaaaa ggctgttga cacattcgag gaatctgtcc ccacaggacc aactgcaggc 1140

25 tgctcatct tcatggctt cgcttttcc actgttggg ggtactgcc caacaacagt 1200

gtgatcacia cctcatgaa gggcgccggt aagctcacia cgttgcagg ggtggttgg 1260

gctattcgaa cgttggtgat caccatcaac caacacatg tagccaagga cctcaccagc 1320

30 atacagcaaa aggttatgac agttgtgaaa atggctaag aggacgagc gttggaccaa 1380

ctagagatcg tcagctgcct ctgctcagaa ctggagaaca cactgacaaa caggtgtacc 1440

35 ctaccatcat acaaccaaca ccttgaatc ttgaatgct ctcagaaggt cataagtac 1500

ES 2 523 791 A1

ctgcacacca tgatccttgg gaagatcaac atgacaaagc agaggtcgca gcctgtagct 1560

gttattttca aaggagcccc aggtatcggg aaaacttact tggttcacag gcttgcgcg 1620  
5 gacttgggct gccaacaccc aagcacgatt aactttggcc ttgaccattt tgactcatat 1680

acgggtgagg aggtggccat tgcggacgag ttcaaacacct gtggggacgg ggagagtgg 1740

10 gttgagctgt ttatccaaat ggtaacaca aaccctgccc cactcaactg tgacaaagct 1800

gaaaacaaaa acaaggtctt caactcaaag tacttgctat gcacaacaaa ctccaacatg 1860

atactgaatg caaccaccc tcgtgctggt gcgttttaca ggagggtcat gatcgttgaa 1920  
15 gcacgaaata aggctgtcga gagctggcag aacactagac acggttcaa gccaggaag 1980

tcgtgcttca gcaaggacat gtcacacctc accttcagg tgtaccctca caacatgcct 2040

20 gctccaggat ttgttttgt cggggagaaa ctggtaaagt cacaggctgc gcccaggag 2100

tacaagtaca gtgagctctt ggactgatc aaaagcgagc accccgatgt gccctcattc 2160

gagggtgcca acaagtcaa cttcatctac ccagacgccc aatacgaaca agcgcttctc 2220  
25 atgtgaaac agtattttgt catgatgga tgtgtggcaa ggcttgcaaa gaattttgt 2280

gaagacatcc catacaacca agttcacata tcaaaggcaa gtgaccccaa aattggcggg 2340

30 tgtgtggagt accagtgcaa gttccaacat ctttggcgta tggcccaca gtttgtttg 2400

gggtgtgtga acatgacaaa ccaactggc acccccttaa cccagcaaca gttagacagg 2460

atcaccaacg ggggtgaggg tgcaccgtc acaacagtga acaacatcct gccgttccat 2520  
35

ES 2 523 791 A1

tcacaaacta cactcataaa ccctctttc atcaagctga tttgggcagt cagaaagcac 2580

cttaaggac tcagtggtgt aacgagggtg gctcaattcg tctggcgtgt tatgaccaac 2640

5 ccagttgatg cctatggtac cctgtcaga aactcactg gggctgccac cttctcggat 2700

gaccagttt cgacaacat aatatgttc aactgcacga tccaaatcca ctctgcggt 2760

gggttgcttg tgaggtattc aagagatcct gccccgtag cgtcagacaa tgttgaccgt 2820

10 ggcgatcaag gtgttgacgt gttcactgac cccaatctca tttctgggtt tagttggagg 2880

cagattgcc actgttcgt tgagtgctt tcccactgt gcgcaaacca ccttgtaac 2940

15 ctgcgaccg tggcagcgt gggtgctgt gcgacgaaag gctccaggg tgtgaaaggc 3000

aagacaaaac gtggctgtgg tgcaagggtg aattgggga acgatgagta cgacgagtgg 3060

caagctgcbc gtagagaatt tgtcaacgca catgacatga ctgcbggagga gtacctgcc 3120

20 atgaagaaca aagccgcat gggaagtac gaccaagact ccatcatgtt taggagttg 3180

tggacccgaa gacagtgaa acctgacgag gaccaagtta ctattgtcgg taggggcgga 3240

25 gtgagaaacg aggtcattcg taccagggtc aggcaagccc caaaagggcc aaagacactg 3300

gatgatggtg gtttctatga caatgactat gagggctgc cagggtcat gagacataac 3360

ggcagtggtt ggatgattca cataggtaac ggggtgtaca tatctaacac ccacaccgcc 3420

30 cggtaagct gctcagagat agtcacatgt tcaccacca ctgacctgtg ccttgtaaa 3480

ggtgagacaa tccgcagtgt tgcccaaatt gccgaggaa cccagttag tgactggaaa 3540

35 aagtcccca tcacgaccta tggattaag aaaacttgt cagattccac caagattgac 3600

ES 2 523 791 A1

gtgctggcgt atgacggttg cacacagacg acccatgggg actgtgggct cccgttatat 3660

gactccagcg ggaagattgt tgccatacac accggcaaac tactgggggt ttcaaagatg 3720

5 tgtacgttga ttgaccttac cgtaacaaag ggggtgtatg aaacatcaaa cttttctgt 3780

ggngaacca tcgagtacag gggcatcact ggcacaggc ttgtggcgc ggaacctagg 3840

10 cccctgtta gtgggactag gtatgccagg gtcccagggt tgccagatga gtataagact 3900

ggttacagac cagccaatct tgggcgcggt gaccagaca gtgacaagtc acttatgaac 3960

atgcagtaa agaactgca ggttaccag caagaacca agcttaaca ggtggacgag 4020

15 ttcattgagc gggcagctgc cgacgtttg ggctactgc gttcctaac caagggagag 4080

cgccagtcaa atctgaactt taaggcggct ttaacaccc tagacctgc cacctctgt 4140

20 ggtcccttg tccgggaaa gaagatcaac catgtgaaag atggggatg ggaccaagtt 4200

ctagcaaac atcttaca atgctggagt gttgtaact ctggcaaggc tctccaccac 4260

atatacgct gtgggctgaa ggatgagctc agacccttg acaaggtaa ggagggaaag 4320

25 aagagactgt tgggggctg tgacgtcggc gttgctgtgt gtgccgccc cgtttccac 4380

aacatagct acaagctaaa gatggtcga cggttggcc ctattgcagt cggcgttgac 4440

30 atgacatccc gtgacgtcga cggtatcacc aacaacctca ccgccaaggc cagcgacttc 4500

ctgtgctgg attactcaaa atgggattct accatgtcac catgtgtagt taggctggct 4560

attgacatct tggctgactg ctgtgaacag acggaactta ccaagagtgt tgtgctcaca 4620

35

ES 2 523 791 A1

ttgaagtctc accccatgac cattcttgac gccatgattg tgcaaaccaa gcgtaggcctt 4680

ccaagtggca tgccccttac ctggtcatc aactctattt gccactgggt gctttgtcc 4740

5 gcggtggtt acaagtctg tgctgagatt ggtctgact gctctaact gtacgaggat 4800

gccccttct acacgtacgg tgacgacggg gtgtacgcca tgacccaat gatggtgagc 4860

ctctgcccg ccataataga caactgagg gactatggat tgcacccac tgccgaggac 4920

10 aagacggagt acatagatg ttgccgctc aacaaaattt cattttgaa ggcaccttt 4980

gagctcacag acatcgggtg ggtgtcaaaa ttgacaagt ccagtatact taggcaactg 5040

15 gaggggagca agacaacatc caggcatatg gtgattgaag agacacatga cctggccaag 5100

gacgagcgtg gtgtgcagct tgaggagctg caggttgctg ctgctgcca cggccaagaa 5160

ttttcgact ttgatgcaa ggagctcaac cgacaacaag catacacaca gtttagtggt 5220

20 tacagctatg atgctccag gaagatactg gcagatcgga aaagggtcgt ctcggtagta 5280

cctgacgacg aatttgtaa tttatggag ggcaaagccc gcacggcgtc gcaaggcgag 5340

25 acagcgggca ctgctaccac agcatcagtc cctggaacca caaccgacgg tatggaccct 5400

ggtgtgtgg cactactag tgggtcacc accgagaacg cgtccacgtc gattgcaacg 5460

gcggggattg gcggtccacc ccaacaagtg gaccaacaag aaactggag gacaaacttt 5520

30 tactacaatg atgttttac atggtcagtt gcagacgccc cgggcaacat cctgtacact 5580

gtccaacact cgccacaaaa caaccgctc acagctgttc taagtcaat gtacgctggc 5640

35 tgggccggtg gcatgcagtt ccggtttata gtcgctgggt caggtgtctt cggtaggcgt 5700

ES 2 523 791 A1

ctggttcag cggttatacc accgggcatt gagattggc cgggttga agtcagacaa 5760

ttccctcatg ttgtcattga cgctcgttca ctgaaccag tcaccatcac catgccggac 5820

5 ttgctccta acatgtacca cccgacaggc aaccctggcc tcgttccac gttggtcctg 5880

agcgtttaca acaacctcat caatccattt ggtgatcca cgagcgcgat ccaggtcacg 5940

10 gtgaaacaa ggcccagtga ggactttgag tttgatga tccgtgcccc ctccagtaag 6000

accgttgact cgatctgcc cgcagatctc ctcaaaccc cagttctcac tggggttgg 6060

accgacaaca gatggaatgg tgagatagtt gggctgcagc cagtccccgg tgggtttct 6120

15 acgtgcaaca gacactggaa cttaaattgt agcacattg gatggtaag cccgcggttt 6180

gccgccattg accacgacag aggtaacgca agttaccctg gaagcagttc gtcaaatgta 6240

20 cttgagcttt ggtatgctag tgccgggtct gcagctgaca acccatctc ccaaattgct 6300

ccagatggtt tcctgacat gtcatttga ccctcagcg gcaccaccgt ccctaccgca 6360

gggtgggtcg ggttcggtgg gatctggaac agcagtaatg tgccccctt cgtcacgacc 6420

25 gtgcaggctt atgagttggg cttgccact ggagcaccga gcaacctca acctaccacc 6480

accactcag gggctcagat tgttgccaag tccatctatg gcgttgcaac tggcataaac 6540

30 caggcaacag ccgggttgtt tgtgatggca tcgggtgtca tatccacccc aaacagtagt 6600

gccattacgt acacacctca gccaaacagg attgtcaatg cacctggcac ccctgctgcc 6660

gctcctattg gcaagaacac acctatcatg ttcgcgtctg ttgtaggcg caccggcgac 6720

35

ES 2 523 791 A1

atcaacgctg aggccgggtc aactaacgga acccagtagc gcgcgggatc acaaccactg 6780

ccggtgacag ttgacttfc actgaacaat tactcgtcgg cacttatgcc tgggcagttc 6840

5 tttgttggc agctgaactt cgctccggc tcatggaac ttggcttgag tgttgatgga 6900

tacttctatg cggggacagg ggcttcagcc accctcattg acctgcaga acttgtgac 6960

atccgccctg tgggaccag accgtccaca agcacgcttg tgtacaactt ggggggcaca 7020

10 accaatggct tttctatgt ctgaattgt tggactgga ctgcaggtg ccagcgttt 7080

gagcagcgt ctgctccgca ggcaggagt gcaactacaa aaacaagct tagaaaatgg 7140

15 gttggttta aaggccaatc agttgagtag attagtttt aaccctaag aagtaagag 7200

tatgattgta gtagtaatt ttagtgcaa tgtaagta agtaatatgc ataatgatgc 7260

tagttagtt agtgctata gtatgataa tctgccagt aatggcatta ggaagaaaat 7320

20 taaaagctt aatgatagtg ttaaggtta taataccact ggcgagtcca gtgcttgatt 7380

agaattgact taaattaat tggtttagtt atgaattaa ttggcttat agtttagagt 7440

25 aagctataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 7472

<210> 2

<211> 20

30 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

35 <222> 1..20

<223> /mol\_type="unassigned DNA"

/note="Cebador anverso"

/organism="Artificial Sequence"

5 <400> 2

ttggcaatga caacaggtgg

20

<210> 3

10 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <221> source

<222> 1..20

<223> /mol\_type="unassigned DNA"

/note="Cebador reverso"

/organism="Artificial Sequence"

20

<400> 3

ggtgtgttct taccacagg

20





- ②① N.º solicitud: 201330779  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.05.2013  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DALTON KEVIN P et al. Variant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus in Young Rabbits, Spain. <i>Emerging Infectious Diseases</i> . 2012. VOL: 18 No: 12 Págs: 2009-2012 ISSN 1080-6040(print) ISSN 1080-6059(electronic) Doi: doi:10.3201/eid1812.120341, páginas 2009 y 2010.	1-5
Y		6-14
Y	EP 2034012 A1 (OVEJERO S A LAB) 11/03/2009, reivindicaciones.	6-14
A	RU 2416642 C1 (G NAUCHNOE UCHREZHDENIE VRNII VETERINARNOJ VIRUSOLOGII I MIKROBIOLOGII) 20/04/2011, (resumen) World Patent Index [en línea]. Thompson Publications, Ltd. [recuperado el 10.10.2014]. Recuperado de EPOQUENET.	1-14

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:

<p><b>Fecha de realización del informe</b> 10.10.2014</p>	<p><b>Examinador</b> I. Rueda Molíns</p>	<p><b>Página</b> 1/4</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N7/00** (2006.01)

**C12N7/06** (2006.01)

**A61K39/12** (2006.01)

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

C12N, A61K

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, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.10.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-14	<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 se publica.

**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	DALTON KEVIN P et al. Variant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus in Young Rabbits, Spain. <i>Emerging Infectious Diseases</i> . VOL: 18 No: 12 Págs: 2009-2012.	30.11.2012
D02	EP 2034012 A1 (OVEJERO S A LAB)	11.03.2009
D03	RU 2416642 C1 (G NAUCHNOE UCHREZHDENIE VRNII VETERINARNOJ VIRUSOLOGII I MIKROBIOLOGII)	20.04.2011

**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****NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 de la LP11/1986)**

En las reivindicaciones 1-5, de la solicitud de patente se reivindica una cepa del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo depositada en la European Collection of Cell Cultures (ECACC), Centre for Emergency Preparedness and Response, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, Reino Unido con el número de depósito 13011501.

En las reivindicaciones 6-10, de la solicitud de patente se reivindica una vacuna que comprende una cantidad inmunogénicamente efectiva de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 2-5 junto con un excipiente veterinariamente aceptable.

En la reivindicación 11, de la solicitud de patente se reivindica el uso de la cepa objeto de la invención como inmunógeno.

En las reivindicaciones 12-14, de la solicitud de patente se reivindica un método para preparar la composición de una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que comprende las siguientes etapas: a) obtener una muestra de la cepa del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo según la reivindicación 1; b) inactivarla; c) añadir excipientes y opcionalmente adyuvantes veterinariamente aceptables para obtener un producto final administrable.

El documento D01 muestra una nueva variante del virus que causa la enfermedad hemorrágica del conejo. Los estudios de aglutinación (que se muestran en la página 2010 del documento D01) practicados con esta nueva variante, reflejan que esta no aglutina glóbulos rojos del grupo O o del grupo A. Esta variante del virus RHDV afecta a diferentes órganos (tal y como se indica en la página 2009 del documento D01) como son: corazón, tráquea, pulmones, hígado, riñones e intestino. Las tasas de mortalidad en gazapos llegan al 50% (como se refleja en la página 2009 del documento D01). Esta variante del virus causa una alta tasa de mortalidad, incluso en conejos que han sido previamente vacunados (como se muestra en la página 2009 del documento D01).

En la página 4 de la descripción de la solicitud de patente se describen las características del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo reivindicado. Las características que se indican son: tasas de mortalidad superiores al 50% en gazapos menores de 40 días de edad, daños a nivel intestinal, además de los órganos típicos afectados por otras cepas conocidas del virus RHDV, un patrón de aglutinación diferente al de las variantes conocidas del virus, la cepa objeto de la invención no aglutina glóbulos rojos del grupo O. Además, se indica en la descripción de la solicitud de patente la secuencia nucleotídica de la cepa objeto de la invención.

No se ha encontrado una cepa del virus RHDV con la secuencia nucleotídica SEQ ID NO:1, que tal y como se indica en la página 4 de la descripción, de la solicitud de patente es la secuencia que representa a la cepa del virus RHDV reivindicada, pero si se ha divulgado en el documento D01 una variante de la cepa del virus que causa la enfermedad hemorrágica del conejo que presenta todas las características descritas la cepa del virus RHDV reivindicada, por lo que, las reivindicaciones 1-5 de la solicitud de patente presentan novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.

El documento D02 muestra (en sus reivindicaciones) la preparación de una vacuna para controlar la enfermedad hemorrágica del conejo a partir de una cepa inactivada del virus RHDV. Dicha inactivación se realiza mediante el agente químico inactivante [beta]-propiolactona o formaldehído (tal y como se muestra en las reivindicaciones del citado documento, D02). A partir de la información divulgada en el documento D02 resultaría evidente, para un experto en la materia, la preparación de una vacuna empleando una cepa del virus RHDV inactivada, por lo que teniendo en cuenta los documentos D01 y D02 las reivindicaciones 6-14 de la solicitud de patente presentan novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.