

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 351**

51 Int. Cl.:

C07K 14/175 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2013 PCT/US2013/043146**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO2013181270**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2013 E 13728288 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2855513**

54 Título: **Vacuna contra el virus de Schmallenberg (SBV), métodos de producción y sus usos**

30 Prioridad:

01.06.2012 EP 12170631
05.03.2013 EP 13157875

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.06.2017

73 Titular/es:

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
(100.0%)
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE

72 Inventor/es:

NIKOLIN, VELJKO;
STADLER, KONRAD;
LISCHEWSKI, AXEL;
BRIX, ALEXANDER;
KNITTEL, JEFFREY P. y
TOEPFER, KATHARINA HEDWIG

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 617 351 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra el virus de Schmallenberg (SBV), métodos de producción y sus usos

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención pertenece al campo de las vacunas y medicamentos para la profilaxis y tratamiento de enfermedades infecciosas. En particular, se refiere a virus inactivados útiles como vacuna o medicamento para prevenir o tratar la viremia, transmisión y síntomas clínicos, en particular malformaciones en rumiantes recién nacidos tales como vacas, ovejas y cabras, inducidas por el virus de Schmallenberg.

15 Antecedentes

20 En noviembre de 2011 se descubrió en Europa un nuevo orthobunyavirus, el virus de Schmallenberg (SBV). Después de la primera detección, los casos notificados de SBV en ovejas, vacas y cabras se acumularon dramáticamente en varios países europeos hasta varios miles de casos de corderos y terneros malformados PCR-positivo (1, 2). El virus fue detectado por metagenómica en el Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) en muestras de vacas con goteo de leche y fiebre. Las muestras investigadas se obtuvieron en una granja cercana a la ciudad de Schmallenberg (Renania del Norte-Westfalia, Alemania) y, consecuentemente, el virus se denominó virus de Schmallenberg (SBV). El SBV es un miembro del género *Orthobunyavirus* que pertenece a la familia *Bunyviridae*. Está relacionado con los denominados virus del serogrupo Simbu (1).

25 Los orthobunyavirus tienen un genoma de ARN segmentado de cadena negativa y se transmiten principalmente por vectores de insectos como insectos diminutos y mosquitos. Los tres segmentos (S, M y L) del genoma del orthobunyavirus permiten la reasignación genética que se produce naturalmente dando como resultado la emergencia de virus con nuevas propiedades biológicas (3). El segmento más largo L codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN. Los segmentos M codifican las glicoproteínas de la superficie viral Gn y Gc que son responsables de la fusión celular, la unión viral y la inducción de anticuerpos neutralizantes. El segmento pequeño S codifica la nucleocápside N que también está implicada en la fijación del complemento (4). La relación entre los orthobunyavirus se ha determinado frecuentemente solo por la reactividad cruzada serológica (5). En la era de la secuenciación del ADN, se evaluó la filogenética de forma adicional por comparación de secuencias genómicas parciales (gen N completo y gen Gc parcial) (6). En consecuencia, la información de las secuencias genómicas disponibles y publicadas de genomas de longitud total es escasa. Como consecuencia, los análisis filogenéticos en profundidad son difíciles. En conclusión, no se podía hacer una clasificación taxonómica detallada y fiable del SBV. Las investigaciones preliminares mostraron similitudes entre las secuencias de segmentos M y L con secuencias virales parciales del AKAV y el virus Aino (AINOV). El gen N estaba más estrechamente relacionado con el virus Shamonda (SHAV) (1).

40 El SBV es un virus tipo Akabane (AKAV) capaz de atravesar la barrera placentaria en vacas y ovejas preñadas, infecta el feto y causa defectos congénitos letales durante un estadio susceptible en la preñez (2). El serogrupo Simbu, denominado por el virus prototipo, es el serogrupo más grande de los orthobunyavirus y contiene al menos 25 virus, entre ellos virus médicamente importantes tales como el virus Akabane, el virus Oropouche, el virus Satuperi o virus el Douglas, la mayoría de los cuales pueden causar malformaciones en rumiantes recién nacidos, pero también pueden verse afectados los seres humanos. El virus Akabane, por ejemplo, causa defectos congénitos en rumiantes y circula por Asia, Oceanía y África, mientras que el virus Oropouche es responsable de grandes epidemias de la fiebre de Oropouche, una zoonosis similar a la fiebre del dengue, en poblaciones humanas en Sudamérica. El virus Satuperi debe su nombre al serogrupo Satuperi, al que también pertenecen el virus Douglas y el SBV.

50 El SBV fue el primer orthobunyavirus del serogrupo Simbu detectado en Europa. El virus se transmite aparentemente por vectores de artrópodos. Los insectos diminutos mordedores probablemente jueguen un papel importante en la transmisión. De acuerdo con el estado actual de conocimiento, los rumiantes son susceptibles a la infección por SBV. Los animales adultos pueden desarrollar una leve enfermedad, llegado el caso. Sin embargo, con frecuencia se produce la infección transplacentaria y puede causar una severa malformación congénita de la columna vertebral (cifosis, lordosis, escoliosis, tortícolis) y del cráneo (macrocefalia, braquignatia inferior), así como malformaciones variables del cerebro (hidrocefalia, porencefalia, hipoplasia cerebelar, hapoplasia del tronco cerebral) y de la médula espinal en corderos, cabritos y terneros. La infección se extiende rápidamente en grandes partes de Europa noroccidental. Bélgica, Alemania, Francia, Italia, Luxemburgo, los Países Bajos, España y el Reino Unido también han sido afectados.

60 En consecuencia, el SBV es una seria amenaza al ganado rumiante en Europa dado que actualmente no se dispone de vacunas.

65

Así, hay una gran necesidad de vacunas y medicaciones que efectúen una rápida inducción de anticuerpos neutralizantes para la profilaxis y el tratamiento de la infección por el virus de Schmallerberg.

Descripción de la invención

5 La solución al problema técnico anterior se logra con la descripción y las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

10 Así, la invención en sus diferentes aspectos se implementa de acuerdo con las reivindicaciones.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición inmunogénica que contiene uno o varios antígenos del virus de Schmallerberg (SBV), en el que la composición inmunogénica comprende preferiblemente el SBV.

15 Preferiblemente, el SBV está contenido como el uno o más antígenos del SBV en la composición de la divulgación, o el uno o más antígenos del SBV es/son preferiblemente SBV, respectivamente. Así, la composición inmunogénica de la divulgación es en particular una composición inmunogénica que comprende el virus de Schmallerberg (SBV).

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "antígeno" en particular se refiere a cualquier molécula, resto o entidad capaz de producir una respuesta inmunitaria. Esto incluye respuestas inmunitarias celulares y/o humorales. Dependiendo de la función pretendida de la composición, se pueden incluir uno o varios antígenos.

El antígeno del SBV o el SBV contenido en la composición inmunogénica de la invención está inactivado.

25 De acuerdo con un aspecto, la composición inmunogénica de la invención es por lo tanto una composición inmunogénica que comprende el virus de Schmallerberg (SBV) inactivado.

El término "inactivado", tal como se usa en la presente memoria, significa que el antígeno no causa la enfermedad, cuando se administra a un hospedador mamífero ni se replica en una célula hospedadora.

30 La invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende SBV o un antígeno del SBV, en la que el SBV comprende

- 35 • un segmento de ARN pequeño (S) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 97,8 %, preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:7,
- un segmento de ARN medio (M) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2 y/o
- 40 • un segmento de ARN grande (L) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:3.

45 Preferiblemente, dicho SBV comprende dicho segmento de ARN pequeño (S), dicho segmento de ARN medio (M) y dicho segmento de ARN grande (L).

De acuerdo con otro aspecto, el SBV o el antígeno del SBV se puede obtener mediante la inactivación del SBV o el antígeno del SBV, en el que dicho SBV comprende

- 50 • un segmento de ARN pequeño (S) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 97,8 %, preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:7,
- un segmento de ARN medio (M) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2, y/o
- 55 • un segmento de ARN grande (L) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:3.

60 Todas las secuencias del listado de secuencias están escritas en la dirección 5' - '3. Las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 3 y 7 codifican ADNc que tienen una polaridad positiva (cadena +). La expresión "inversamente complementaria" significa que la secuencia es antiparalela a la secuencia de referencia.

65 Preferiblemente, dicho SBV comprende dicho segmento de ARN pequeño (S), dicho segmento de ARN medio (M) y dicho segmento de ARN grande (L).

Se entiende que la expresión “segmento de ARN”, tal como se usa en la presente memoria, es equivalente a “segmento de genoma” o “segmento”, cuando se usa con frecuencia en el contexto del virus Schmallenberg.

5 Preferiblemente, el segmento de ARN pequeño (S) mencionado en la presente memoria tiene una secuencia de ARN que es inversamente complementaria a una secuencia de ADN que tiene al menos el 97,8 %, más preferiblemente al menos el 98,5 %, aún más preferiblemente al menos 99 %, incluso aún más preferiblemente al menos el 99,5 % o, en particular, el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:1, o preferiblemente el segmento de ARN pequeño (S) descrito en la presente memoria tiene una secuencia de ARN que es inversamente complementaria a una secuencia de ADN que tiene al menos el 97,8 %, más
10 preferiblemente al menos el 98,5 %, aún más preferiblemente al menos el 99 %, incluso aún más preferiblemente al menos el 99,5 % o, en particular, el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:7.

15 Preferiblemente, el segmento de ARN medio (M) mencionado en la presente memoria tiene una secuencia de ARN que es inversamente complementaria a una secuencia de ADN que tiene al menos el 83 %, más preferiblemente al menos el 85 %, aún más preferiblemente al menos el 90 %, incluso aún más preferiblemente al menos el 95 % o, en particular, el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2.

20 Preferiblemente, el segmento de ARN grande (L) mencionado en la presente memoria tiene una secuencia de ARN que es inversamente complementaria a una secuencia de ADN que tiene al menos el 94 %, más preferiblemente al menos el 96 %, incluso aún más preferiblemente al menos el 98 % o, en particular, el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleicos de SEQ ID NO: 3.

25 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “composición inmunogénica” en particular se refiere a una composición que provocará una respuesta inmunitaria en un mamífero y/o un insecto que ha sido expuesto a la composición. Una respuesta inmunitaria puede incluir la inducción de anticuerpos y/o la inducción de una respuesta de linfocitos T.

30 La identidad de secuencia en el contexto de la invención se entiende en base a alineaciones de secuencias por pares. A los fines de la presente invención, las alineaciones de secuencias por pares se realizan con ClustalW tal como está implementado en Mega5 (K. Tamura et al., MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2731-2739 (2011)), usando los parámetros por defecto (penalización por apertura de hueco de 15 y penalización por extensión de hueco de 6,66; matriz de peso de ADN: ClustalW 1.6; peso de transición de 0,5). Las identidades de secuencia de las secuencias alineadas se calculan usando BioEdit versión 7.0.9.0.
35

Se entiende que la expresión “identidad de secuencia con”, tal como se usa en la presente memoria, es equivalente a la expresión “identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de”. Así, tal como se menciona en la presente memoria, la expresión “identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO: 8” es equivalente a la
40 expresión “identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8”, la expresión “identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5” es equivalente a la expresión “identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:5” y la expresión “identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6” es equivalente a la expresión “identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:6”.

45 Tal como se usa en la presente memoria, se entiende en particular que la expresión “identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:X” es equivalente a la expresión “identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:X en toda la longitud de la SEQ ID NO: X” o a la expresión “identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:X en toda la longitud de SEQ ID NO: X”, respectivamente. En este contexto, “X” es cualquier número entero seleccionado de 1 a 8 de modo que la “SEQ ID NO: X” representa cualquiera de las SEQ ID NOs mencionadas en la presente memoria.
50

En otro aspecto preferido de la invención, el SBV mencionado en la presente memoria comprende

- 55 • un segmento S de ARN, caracterizado por que el segmento S de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 97,8 %, preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8,
- un segmento M de ARN, caracterizado por que el segmento M de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5 y/o
- 60 • un segmento L de ARN, caracterizado por que el segmento L de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6,

y en el que en particular dicho SBV comprende dicho segmento de ARN pequeño (S), dicho segmento de ARN medio (M) y dicho segmento de ARN grande (L).

65 Preferiblemente, el SBV mencionado en la presente memoria comprende

- un segmento de ARN S, caracterizado por que el segmento de ARN S tiene
 - una secuencia de ARN que tiene al menos el 97,8 %, más preferiblemente al menos el 98,5 %, aún más preferiblemente al menos el 99 %, incluso aún más preferiblemente al menos el 99,5 % o, en particular, el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4, o
 - una secuencia de ARN que tiene al menos el 97,8 %, más preferiblemente al menos el 98,5 %, aún más preferiblemente al menos el 99 %, incluso aún más preferiblemente al menos el 99,5 % o, en particular, el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:8, o
- un segmento de ARN M caracterizado por que el segmento de ARN M tiene una secuencia de ARN que tiene al menos el 83 %, más preferiblemente al menos el 85 %, aún más preferiblemente al menos el 90 %, incluso aún más preferiblemente al menos el 95 % o, en particular, el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5; y/o
- un segmento de ARN L, caracterizado por que el segmento de ARN L tiene una secuencia de ARN que tiene al menos el 94 %, más preferiblemente al menos el 96 %, incluso aún más preferiblemente al menos el 98 % o, en particular, el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6.

La expresión “que tiene 100 % de identidad de secuencia”, tal como se usa en la presente memoria, también se entiende como equivalente a la expresión “que es idéntica”.

Preferiblemente, el SBV inactivado se puede obtener mediante la inactivación del SBV por tratamiento térmico o preferiblemente con un agente inactivador de virus, en el que en particular un compuesto de aziridina, lo más preferiblemente etilenimina binaria (BEI), se usa para la inactivación.

De acuerdo con un aspecto preferido, se añade BEI al antígeno en una concentración final de 10 mM o menos, en el que se sorprendentemente se ha hallado que una concentración final de menos de 4 mM es suficiente para la inactivación del antígeno. Así, BEI se añade preferiblemente a una concentración final de menos de 4 mM al antígeno, más preferiblemente a una concentración final de 0,5 a 3,5 mM, lo más preferiblemente a una concentración final de 1 a 3 mM.

Después de la adición de BEI, la mezcla se mantiene preferiblemente en agitación durante 48 h o menos preferiblemente durante 24 h o menos, lo más preferiblemente durante 6 h y 18 h, como, por ejemplo, durante 12 h. La temperatura de la mezcla mientras se agita es preferiblemente de 37+/-5 °C, lo más preferiblemente de 37+/-1 °C.

Además, se halló que solo una etapa de inactivación, por ejemplo, por adición de BEI al antígeno, es suficiente para la inactivación del antígeno.

Después del procedimiento de inactivación, el agente inactivador de virus residual se neutraliza preferiblemente por adición de un agente neutralizante a la mezcla, en particular en un exceso molar en comparación con la cantidad de agente inactivador de virus añadido al antígeno. Si se usa un compuesto de aziridina para la inactivación, entonces se usa preferiblemente un nucleófilo que abre el anillo de tres miembros para la neutralización. BEI se neutraliza preferiblemente por adición de tiosulfato de sodio, en particular en un exceso molar de 1,1 a 10 veces, lo más preferiblemente en un exceso molar de 2 a 8 veces en comparación con la cantidad de BEI añadida al antígeno.

En un aspecto preferido, la composición inmunogénica de la invención comprende una cantidad de SBV que es equivalente a un título viral de al menos aproximadamente 10^5 TCID₅₀/m por dosis, preferiblemente entre 10^5 a 10^7 TCID₅₀/ml por dosis, más preferiblemente aproximadamente 10^6 TCID₅₀/ml por dosis.

Sorprendentemente, se halló que una composición inmunogénica de la invención que comprende una cantidad de SBV que es equivalente a un título viral de menos de 10^5 TCID₅₀/ml por dosis, preferiblemente menos de 10^5 TCID₅₀/ml por dosis, es suficiente para prevenir ARNemia por SBV en un animal, en particular en ovejas.

Así, la composición inmunogénica de la invención comprende preferiblemente una cantidad de SBV que es equivalente a un título viral de menos de $10^{5,5}$ TCID₅₀/ml por dosis preferiblemente menos de 10^5 TCID₅₀/ml por dosis, lo más preferiblemente entre 10^4 y 10^5 TCID₅₀/ml por dosis, en particular para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el SBV y/o para prevenir o reducir viremia o las malformaciones inducidas por SBV y/o para prevenir o reducir la transmisión del SBV preferiblemente en ovejas.

“ARNemia” tal como se describe en la presente memoria se entiende en particular como la detección de ARN (por ejemplo, por amplificación basada en de secuencias de ácidos nucleicos o PCR por transcripción inversa) en una muestra de un animal, en particular en muestras de plasma, suero o sangre entera.

Por lo tanto, se entiende en particular, de acuerdo con la invención, que la viremia inducida por SBV va a la par o está acompañada, respectivamente, con ARNemia de SBV en una muestra de suero sanguíneo de un animal. Así, la viremia inducida por SBV se puede examinar detectando el ARN específico del SBV en el suero de animales.

En otro aspecto preferido, la composición inmunogénica de la invención contiene SBV que tiene un título de preinactivación de al menos aproximadamente 10^6 partículas de SBV por mililitro preferiblemente entre 10^6 a 10^8 TCID₅₀/ml de partículas de SBV por mililitro, más preferiblemente aproximadamente 10^7 partículas de SBV por mililitro.

5 La expresión "título de preinactivación", tal como se usa en la presente memoria, en particular se refiere a la cantidad de SBV suspendido que se inactiva.

10 En particular, la composición inmunogénica de la invención también contiene uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, en la que dicho uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en disolventes, medios de dispersión, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la adsorción.

15 En un aspecto particularmente preferido, la composición inmunogénica de la invención también contiene uno o más adyuvantes preferiblemente hidróxido de aluminio y/o saponina, por ejemplo, Alhydrogel y/o Quil-A, en la que lo más preferido es una combinación de hidróxido de aluminio y saponina.

20 Otro aspecto se refiere a la composición inmunogénica de la invención para su uso como un medicamento preferiblemente como una vacuna.

Otro aspecto se refiere a la composición inmunogénica de la invención para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el SBV y/o para prevenir o reducir la viremia o las malformaciones inducidas por SBV y/o para prevenir o reducir la transmisión del SBV.

25 Este aspecto en particular se refiere a la composición inmunogénica de la invención para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el SBV en un rumiante y/o insecto y/o para prevenir o reducir la viremia en un rumiante y/o insecto y/o para prevenir o reducir malformaciones inducidas por el SBV en un feto de rumiante o neonato y/o para prevenir o reducir la transmisión del SBV por vectores artrópodos, preferiblemente insectos y/o para prevenir o reducir la transmisión del SBV desde el animal preñado (la madre) hasta el feto.

30 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "inducir una respuesta inmunitaria" a un antígeno o composición es el desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular en un animal a un antígeno presente en la composición de interés.

35 El término "prevención" o "reducción" o "prevenir" o "reducir", respectivamente, tal como se usa en la presente memoria, significa, pero sin limitación, un proceso que incluye la administración de un antígeno del SBV, concretamente el antígeno del SBV de acuerdo con la invención que se incluye en la composición de la invención, a un animal, en el que el antígeno del SBV, cuando se administra a dicho animal, provoca o es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en dicho animal contra el SBV. Sin embargo, este tratamiento tiene como resultado la reducción de los signos clínicos de una enfermedad causada por el SBV o de los signos clínicos asociados con la infección por SBV, respectivamente. Más específicamente, el término "prevención" o "prevenir", tal como se usa en la presente memoria, implica en general un proceso de profilaxis en el cual un animal se expone a la composición inmunogénica de la presente invención antes de la inducción o el inicio del proceso patológico causado por el SBV.

40 En la presente memoria, "reducción de los signos clínicos asociados con la infección por SBV" significa, pero sin limitación, reducir el número de sujetos infectados en un grupo, reducir o eliminar el número de sujetos que exhiben signos clínicos de infección o reducir la gravedad de cualquier signo clínico que está presente en los sujetos, en comparación con la infección de tipo silvestre. Por ejemplo, se ha de referir a cualquier reducción de la carga de patógenos, diseminación de patógenos, reducción en la transmisión de patógenos o reducción de cualquier signo clínico sintomático de infección por SBV, en particular de la transmisión de SBV de la madre al feto o de malformaciones inducidas por SBV en un feto o recién nacido rumiante. Preferiblemente, estos signos clínicos se reducen en sujetos que reciben la composición de la presente invención en al menos el 10 % en comparación con sujetos que no reciben la composición y se pueden infectar. Más preferiblemente los signos clínicos se reducen en sujetos que reciben la composición de la presente invención en al menos el 20 % preferiblemente en al menos el 30 %, más preferiblemente en al menos el 40 % e incluso más preferiblemente en al menos el 50 %.

45 La expresión "reducción de la viremia inducida por el SBV" (o, bien, "reducción de la ARNemia inducida por el SBV") implica, pero sin limitación, la reducción del virus SBV que entra en el torrente sanguíneo de un animal, en el que el nivel de viremia, es decir, el número de copias de ARN del SBV por ml de suero sanguíneo o el número de colonias formadoras de placa por decilitro de suero sanguíneo, se reduce en el suero sanguíneo de los sujetos que reciben la composición de la presente invención en al menos el 50 % en comparación con sujetos que no reciben la composición y pueden infectarse. Más preferiblemente el nivel de viremia se reduce en sujetos que reciben la composición de la presente invención en al menos el 90 % preferiblemente en al menos el 99,9 %, más preferiblemente en al menos el 99,99 % e incluso aún más preferiblemente en al menos el 99,999 %.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “viremia” se entiende en particular como una condición en la que las partículas de virus de Schmallenberg se reproducen y circulan por el torrente sanguíneo de un animal, en particular de un mamífero o de un insecto.

5 El término “animal”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere en particular a un mamífero o a un insecto.

Preferiblemente, el mamífero tal como se menciona en la presente memoria es un rumiante. Más preferiblemente el rumiante tal como se menciona en la presente memoria se selecciona del grupo que consiste en vacas, ovejas, cabras, ciervos, alces, jirafas, bisontes, alces americanos, yaks, búfalos, camellos, alpacas, llamas, antílopes, antílopes americanos y nilgós. Lo más preferiblemente, el mamífero o rumiante tal como se menciona en la presente memoria se selecciona del grupo que consiste en vacas, ovejas y cabras.

El insecto, tal como se menciona en la presente memoria, se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en insectos diminutos, en particular *Culicoides* spp., moscas mordedoras y mosquitos.

Además, la invención proporciona una composición de vacuna para el tratamiento o prevención de la infección por SBV o para la prevención o la reducción de la viremia o las malformaciones inducidas por el SBV y/o para la prevención o la reducción de la transmisión del SBV, en el que la vacuna comprende la composición inmunogénica de la invención.

En particular, la invención proporciona una composición de vacuna, que comprende la composición inmunogénica de la invención, para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el SBV en un rumiante y/o insecto y/o para prevenir o reducir la viremia en un rumiante y/o insecto y/o para prevenir o reducir malformaciones inducidas por el SBV en un feto o recién nacido rumiante y/o para prevenir o reducir la transmisión del SBV por vectores artrópodos preferiblemente insectos.

El término “malformaciones”, tal como se usa en la presente memoria, en particular se refiere a una malformación seleccionada de malformación congénita de la columna vertebral (cifosis, lordosis, escoliosis, tortícolis) y/o del cerebro (macrocefalia, braquignatia inferior), malformaciones variables del cerebro (hidracefalia, porencefalia, hipoplasia cerebelar, hapoplasia del tronco cerebral) y de la médula espinal, malformaciones y/o rigidez de las patas traseras y/o delanteras. Más en particular, el término “malformaciones” se refiere a malformaciones en corderos, cabritos y terneros.

La divulgación también proporciona un método para la producción de SBV infeccioso, que comprende las etapas de

- infectar células, preferiblemente células de mamífero o de insectos, con un SBV,
- cultivar las células infectadas,
- cosechar el SBV producido por dichas células.

40 El término “infección”, tal como se usa en la presente memoria, en particular se refiere al proceso de poner en contacto las células con el SBV, tal como por inoculación.

Dicha infección de las células con un SBV en particular incluye la unión del virus con una célula, la entrada del virus en la célula, el desprendimiento del virión en el citoplasma, la replicación y transcripción del genoma viral, la expresión de las proteínas virales y en ensamblaje y liberación de nuevas partículas virales infecciosas.

El término “cultivo”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere en particular al mantenimiento y preferiblemente al crecimiento celular en condiciones apropiadas.

50 El término “cosecha”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere en particular a la absorción de sobrenadantes celulares que contienen partículas virales, tales como por centrifugación de un recipiente que contiene un cultivo de células infectadas con virus y posterior decantación del sobrenadante celular.

Sorprendentemente, se halló que el SBV sigue siendo infeccioso y, por lo tanto, sigue manteniendo su potencial antigénico cuando pasa alternativamente entre células de insecto y células de mamífero.

Así, la divulgación en particular se refiere a un método para la producción preferiblemente de SBV infeccioso, en particular el método antes mencionado, en el que el SBV se pasa alternativamente entre células de insecto y células de mamífero.

Por consiguiente, el método para la producción de SBV infeccioso de acuerdo con la invención en particular comprende las etapas de:

- (a) infectar células de insecto con un SBV,
- (b) cultivar las células infectadas de la etapa (a),
- (c) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (b),

- (d) infectar células de mamífero con el SBV cosechado en la etapa (c)
- (e) cultivar las células infectadas de la etapa (d) y
- (f) cosechar el SBV producido por dichas células de la etapa (e)

5 o comprende las etapas de

- (d) infectar células de mamífero con un SBV,
- (e) cultivar las células infectadas de la etapa (d),
- (f) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (e)
- 10 (g) infectar células de insecto con el SBV cosechado en la etapa (f),
- (h) cultivar las células infectadas de la etapa (g) y
- (i) cosechar el SBV producido por las células en la etapa (h).

15 En este sentido, la numeración de las etapas (d)-(i) es equivalente a la numeración (a')-(f') y se seleccionó por razones de claridad en vista de las otras etapas descritas en la presente memoria (a partir de la etapa "(j)").

Preferiblemente, el método para la producción de SBV de la divulgación comprende las etapas de:

- (a) infectar células de insecto con un SBV,
- 20 (b) cultivar las células infectadas de la etapa (a),
- (c) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (b)
- (d) infectar células de mamífero con el SBV cosechado en la etapa (c),
- (e) cultivar las células infectadas de la etapa (d),
- (f) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (e)
- 25 (g) infectar células de insecto con el SBV cosechado en la etapa (f)
- (h) cultivar las células infectadas de la etapa (g), y
- (i) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (h).

30 Más preferiblemente el método para la producción de SBV infeccioso de acuerdo con la divulgación también comprende las etapas de:

- (j) infectar células de mamífero con el SBV cosechado en la etapa (i),
- (k) cultivar las células infectadas de la etapa (j) y
- (l) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (k) y opcionalmente
- 35 (m) infectar células de insecto con el SBV cosechado en la etapa (l),
- (n) cultivar las células infectadas de la etapa (m) y
- (o) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (n).

40 Así, en un aspecto, el método para la producción de SBV infeccioso de acuerdo con la divulgación comprende las etapas de:

- (a) infectar células de insecto con un SBV,
- (b) cultivar las células infectadas de la etapa (a),
- (c) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (b)
- 45 (d) infectar células de mamífero con el SBV cosechado en la etapa (c),
- (e) cultivar las células infectadas de la etapa (d),
- (f) cosechar el SBV producido por las células en la etapa (e),
- (g) infectar células de insecto con el SBV cosechado en la etapa (f),
- (h) cultivar las células infectadas de la etapa (g),
- 50 (i) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (h)
- (j) infectar células de mamífero con el SBV cosechado en la etapa (i),
- (k) cultivar las células infectadas de la etapa (j),
- (l) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (k),

55 y opcionalmente

- (m) infectar células de insecto con el SBV cosechado en la etapa (l),
- (n) cultivar las células infectadas de la etapa (m) y
- 60 (o) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (n).

Las células de insecto usadas en el método para la producción de SBV de la divulgación son preferiblemente células KC.

65 Como células de mamífero, se usan preferiblemente células BHK, en particular células BHK-21, en el método para la producción de SBV de acuerdo con la invención.

Lo más preferiblemente, en el método para la producción de SBV de acuerdo con la divulgación, las células de insecto son células KC y las células de mamífero son células BHK, en particular células BHK-21.

5 Además, la divulgación también comprende el SBV obtenible por el método para la producción de SBV de acuerdo con la invención.

La divulgación también proporciona un método para la producción de SBV inactivado o de una composición inmunogénica de la divulgación que comprende las etapas de:

- 10 (A) infectar células con un SBV, en el que las células son en particular células de riñón de mono preferiblemente células Ma104 o células Ma104-AK o en el que las células son células BHK, preferiblemente células BHK-21,
 (B) cultivar las células infectadas,
 (C) cosechar el SBV producido por dichas células e
 15 (D) inactivar dicho SBV por tratamiento térmico o con un agente inactivador de virus.

Si preferiblemente se usan células Ma104 o células Ma104-AK en el método para la producción de SBV inactivado o de la composición inmunogénica de la divulgación, esto tiene la ventaja de que las reacciones adversas, en particular las reacciones alérgicas, se pueden reducir o minimizar si el SBV inactivado o la composición inmunogénica producidos por dicho método se administran a un animal.

20 En particular, se prefiere si en la etapa (A) del método para la producción de SBV inactivado o de la composición inmunogénica de la divulgación, las células están infectadas con un SBV obtenible por el método para la producción de SBV de la invención.

25 La divulgación también proporciona, así, la combinación de (i) el método de producción de un SBV infeccioso de la divulgación y (ii) el método para la producción de SBV inactivado o de la composición inmunogénica de la divulgación, en el que dichos métodos se realizan posteriormente.

30 Preferiblemente, en el método para la producción de SBV infeccioso de la divulgación y/o en el método para la producción de SBV inactivado o de la composición inmunogénica de acuerdo con la invención, las células están infectadas con SBV a un MOI de 0,00001 – 0,01 preferiblemente a un MOI de 0,0001 – 0,001.

35 En particular, se prefiere si en el método para la producción de SBV de acuerdo con la divulgación y/o en el método para la producción de SBV inactivado o de la composición inmunogénica de la divulgación, las células se cultivan en un medio que contiene 1-10 % de FCS, más preferiblemente que contiene 2-6 % de FCS y/o si las células se cultivan a una temperatura de 25-38 °C preferiblemente de 36-38 °C, más preferiblemente de aproximadamente 37 °C. También es posible cultivar las células en ausencia de FCS.

40 Además, la divulgación comprende SBV obtenible por el método para la producción de SBV inactivado o de la composición inmunogénica de la divulgación, y, además, la divulgación también proporciona SBV inactivado obtenible por la combinación de (i) el método de producción de un SBV infeccioso de la invención y (ii) el método para la producción de SBV inactivado o de la composición inmunogénica de la divulgación, en el que dichos métodos se realizan posteriormente.

45 En otro aspecto, se prefiere si, en el método para la producción de SBV infeccioso de la divulgación y/o en el método para la producción de SBV inactivado o de la composición inmunogénica de la divulgación, el SBV comprende:

- un segmento de ARN pequeño (S) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 97,8 %, preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:7,
- 50 • un segmento de ARN medio (M) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2 y/o
- un segmento de ARN grande (L) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:3

y/o en la que dicho SBV comprende

- 60 • un segmento S de ARN, caracterizado por que el segmento S de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 97,8 %, preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8,
- un segmento M de ARN, caracterizado por que el segmento M de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5 y/o
- 65 • un segmento L de ARN, caracterizado por que el segmento L de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6,

La divulgación también proporciona un SBV, preferiblemente un SBV aislado, que comprende

- un segmento de ARN pequeño (S) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 97,8 %, preferiblemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:7,
- un segmento de ARN medio (M) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2 y/o
- un segmento de ARN grande (L) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:3.

La divulgación también proporciona un SBV preferiblemente aislado, en particular, el SBV antes mencionado, que comprende

- un segmento S de ARN, caracterizado por que el segmento S de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 97,8 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8,
- un segmento M de ARN, caracterizado por que el segmento M de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5 y/o
- un segmento L de ARN, caracterizado por que el segmento L de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6.

Además, la divulgación comprende una composición química obtenible por medio de cualquiera de los métodos antes mencionados, en la que la composición es preferiblemente una composición inmunogénica, en particular una vacuna.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición inmunogénica de la invención para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir el SBV y/o tratar o prevenir la viremia o malformaciones inducidas por el SBV y/o prevenir o reducir la transmisión del SBV en un animal que necesita de dicho tratamiento.

Además, la invención proporciona un método para generar una respuesta inmunitaria al SBV en un animal que comprende administrar a dicho animal la composición inmunogénica de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir la infección por SBV o tratar o prevenir la viremia o malformaciones inducidas por el SBV en un animal que necesita de dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición de vacuna de la invención.

La invención también proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el SBV y/o prevenir o reducir la viremia o malformaciones inducidas por el SBV y/o prevenir o reducir la transmisión del SBV en un animal o en una manada de animales que comprende la etapa de administrar la composición inmunogénica de la invención a un animal que lo necesita.

En los métodos antes mencionados, la composición inmunogénica de la invención o la vacuna de la invención, respectivamente, se administra preferiblemente en una dosis individual o más preferiblemente en dos dosis.

Ejemplo 1

Detalles de un primer aislamiento del SBV

Se usaron extensivamente células BHK-21 para el crecimiento de orthobynavirus. A continuación, se aisló el virus SBV exitosamente por primera vez usando esta línea celular, por investigadores del FLI en noviembre de 2011. Excepto las BHK, se usaron células de larvas de *Culicoides variipennis* (mencionadas como células KC de la Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Alemania). Se incubaron las células KC durante 10 días con sangre alterada por vía ultrasónica diluida en medio de Schneider. Las células se lisaron luego por congelamiento y descongelamiento. Se inoculó una monocapa de células de riñón de hámster bebé 21 (BHK, clon 13) con el lisado. Los inóculos se eliminaron después de 1 hora y se reemplazaron por medio esencial mínimo de Eagle (EMEM). Después de 5 días, era visible un efecto citopático y el sobrenadante de cultivo dio positivo para el nuevo virus, con un valor Cq de aproximadamente 14 en la cRT-qPCR específica (aislado 2) y 3×10^6 de TCID₅₀ por ml.

Proceso de fabricación: Descripción general

El proceso de fabricación, tal como se describe más abajo, se lleva a cabo según los métodos de fabricación estándar, por ejemplo, en condiciones de esterilidad y después de la verificación de las condiciones de operación correctas como la filtración de aire.

Descripción del proceso de fabricación

1. Producción de MSV (solución madre del virus)

5 El aislado de SBV 2 se usó para la producción de MSV solución madre del virus). Se infectaron botellas de cultivo rotatorias sembradas con células BHK-21 (5×10^7 células) a MOI 0,0001. Después de 54 h de incubación, las botellas de cultivo rotatorias se congelaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, se descongelaron y se centrifugaron a 2.000 g durante 5 min. Se recolectó el sobrenadante y se almacenaron alícuotas de 1 ml a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior procesamiento.

10 2. Producción de antígeno del SBV

Las células BHK-21 (lote celular de trabajo - WCS) se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido. El WCS se descongeló y se expandió en matraces de cultivo celular ($T160\text{ cm}^2$) usando medio EMEM y gamma FCS 10 % irradiado. Las células se tripsinizaron usando tripsina recombinante (origen no animal). Un matraz T160 se tripsinizó y se resuspendió en 150 ml de medio EMEM que contenía FCS 2 %. Esta suspensión celular se usó para sembrar una botella de cultivo rotatoria (495 cm^2). Las botellas de cultivo rotatorias con suspensión celular se colocaron en una incubadora a $37\text{ }^\circ\text{C}$ y girando a 0,5 rpm. De 12 a 16 h después de la siembra, las células se sembraron a una densidad de 5×10^7 por botella. Se usó la infección usando MOI 0,0001. Las células se incubaron de forma continua a $37\text{ }^\circ\text{C}$ y girando a 0,5 rpm durante 50-56 h hasta que el efecto citopático (CPE) del SBV específico no alcanzara a aproximadamente el 60-70 % de las células. En este punto temporal, las botellas de cultivo rotatorias completas se congelaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y se descongelaron en baño de agua a $37\text{ }^\circ\text{C}$ y se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior procesamiento.

La titulación viral se lleva a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento:

25

Materiales necesarios

1. Células BHK-21 (clon 13)
2. Matraces T75
- 30 3. Placas de 96 pocillos de fondo plano
4. Placas de 48 pocillos de fondo plano
5. Thermo Pipeta de matriz de 8 canales + puntas
6. Eppendorf Pipeta de 8 canales 50-1250 + puntas
7. Depósito para pipetas multicanal
- 35 8. Tripsina + edta
9. Medio ZB5
10. Pipetas de 5, 10 y 25 ml
11. Pipetboy
- 40 12. Microscopio invertido

Procedimiento

- Tripsinizar el matraz T75 altamente confluyente y resuspender bien las células en 20 ml de medio (FCS 10 %).
- Añadir 100 ml de medio (FCS 0 %) y mezclar bien
- 45 • Verter esta suspensión celular se vierte en el depósito para pipetas multicanal
- Usar la pipeta multicanal para llenar 100 μl de suspensión celular en los pocillos de las primeras 8 columnas de placas de 96 pocillos
- Dejar las placas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en una incubadora de CO_2 durante 6-12 h para la unión
- Después de transcurrido este tiempo, preparar una placa de 48 pocillos y llenar 1080 μl de medio libre de suero en cada pocillo
- 50 • Inocular en los pocillos de la primera columna 120 μl de material para la titulación
- Usar la pipeta de 8 canales Eppendorf con el programa P/M (pipeta 120 μl y mezclar 620 μl cuatro veces), mezclar primero la primera columna donde se inocula el material
- Desechar las puntas
- 55 • Pipetear de los pocillos de la primera columna (con las nuevas puntas), 120 μl en la segunda y mezclar
- Desechar las puntas
- Repetir este proceso hasta terminar la última columna
- Usando la pipeta de matriz, aspirar 800 μl de la primera fila de la placa de 48 pocillos (que contiene diluciones seriales de una muestra)
- 60 • Cuando se fijen las puntas, presionar firmemente, pero no demasiado fuerte porque la función de la matriz no funcionará
- Dispensar 100 μl en 8 filas de la placa de 96 pocillos
- Incubar a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante un período de 3-4 días
- Leer los resultados en el microscopio invertido

65

3. Formulaciones de vacuna

3.1 Procedimiento de inactivación

5 El proceso de inactivación del antígeno final dura un total de 72 horas y la concentración de BEI usada es de 15 mM. El antígeno final se inactiva por adición de BEI 0,1 M en una proporción de 100 ml por litro de antígeno inactivado (concentración final 10 mM). Después de la adición de BEI, la mezcla se homogeneiza durante al menos 15 minutos y el pH se verifica. Después del proceso de homogenización, la mezcla se decanta en un recipiente estéril donde se
10 mantiene bajo agitación a 37 ± 1 °C, durante 24 horas. Después de 24 horas, se lleva a cabo una segunda inactivación del antígeno final mediante la adición de BEI 0,1 M en una proporción de 50 ml por litro de antígeno inactivado (concentración final 5 mM). Después de la segunda adición de BEI, el proceso se repite en las mismas condiciones que las descritas con anterioridad para la primera adición, pero manteniendo la mezcla bajo agitación durante 48 horas.

15 3.2 Neutralización de BEI residual

Una vez completado el proceso de inactivación, se añade una solución de tiosulfato de sodio 1 M en la proporción de 5 ml por litro de antígeno inactivado (concentración final 5 mM), a fin de neutralizar la BEI. Tras homogeneizar la mezcla, se verifica el pH. De ser necesario, se realiza un ajuste con ácido clorhídrico para obtener un pH de $7,2 \pm 0,2$.
20

3.3 Adyuvantes

25 Se usan Alhydrogel (hidróxido de aluminio) y Quil-A (saponina) como adyuvantes.

4. Experimento preliminar de la eficacia en vacas

Dieciocho (18) vacas de 7 meses de edad se usan para el experimento. Los animales se dividen en cuatro grupos con cuatro animales en cada grupo, mientras que se usan otros dos animales como controles de contacto. Todos los
30 animales son SBV seronegativos al comienzo del experimento. El primer grupo (de cuatro animales) se vacuna con la dosis de vacuna que contiene 10^6 SBV TCID₅₀/ml, el segundo con 10^5 SBV TCID₅₀/ml, el tercero con 10^4 SBV TCID₅₀/ml y finalmente, el cuarto grupo no se vacuna, así como dos animales dentro del control de contacto. Dentro de cada grupo, se vacuna a 4 animales por vía subcutánea (2 ml) y se vuelven a vacunar 3 semanas más tarde. Todos los animales en el estudio se estimulan dos semanas después de la revacunación (dosis de estimulación = 10^7 TCID₅₀ de virus vivo/animal) excepto los animales de control de contacto. Todos los animales no vacunados desarrollan viremia después de la estimulación con el SBV, empezando a los 3 dpi (días después de la infección) y que dura 2-3 días. Los animales vacunados muestran una viremia significativamente reducida y se redujo a síntomas no clínicos en comparación con los animales no vacunados después de la estimulación con el SBV.
35

40 EJEMPLO 2

1. Introducción

45 En este estudio, se produjeron varias formulaciones de vacuna inactivada y luego se ensayaron en ovejas y vacas respecto de su capacidad para inducir anticuerpos neutralizantes y para prevenir la viremia después de una infección de estimulación experimental.

2. Materiales y métodos

50 Vacunas

Se produjeron cinco diferentes formulaciones de vacuna prototípicas (Tabla 1); todas ellas eran preparaciones de SBV inactivado en solución acuosa. Se cultivó SBV en dos diferentes líneas celulares de riñón de hámster bebé (BHK-21) (vacunas "BHKCT-HT", "BHK13-HT", "BHK13-LT") o en células MA-104 (vacunas "MA-HT" y "MA-LT").
55

La concentración de antígeno se formuló usando el título infeccioso de SBV antes de la inactivación con etilenimina binaria (BEI) usando un protocolo largo (usando 10 mM de BEI durante 72 horas a 37 °C) o un protocolo corto (usando 2 mM de BEI durante 12 horas a 37 °C).

60 Los candidatos de vacuna contenían la siguiente concentración de antígeno: $6,1 \log_{10} 50$ % de dosis infecciosas de cultivo tisular por ml (TCID₅₀/ml) (MA-HT) o $5,7 \log_{10}$ TCID₅₀/ml (BHKCT-HT, BHK13-HT, MA-LT) o $4,7 \log_{10}$ TCID₅₀/ml (BHK13-LT). Se usaron como adyuvantes saponina e hidróxido de aluminio (0,125 µg de saponina por 1 ml y 6,65 mg de hidróxido de aluminio por ml en todas las formulaciones candidatas de vacuna). Todas las formulaciones se ensayaron para determinar la ausencia de contaminación bacteriana y por duplicado para comprobar el éxito de
65 la inactivación mediante dos pases ulteriores en células BHK-21. Los valores de pH de cada vacuna prototípica se ajustaron a 6,8-7,2 a 20 °C. Las vacunas se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

Tabla 1: Vacunas y grupos de animales

Vacunas Nombre	Línea celular	Título infeccioso usado	Inactivación	Animales Grupo animales	de	Cantidad animales	de
BHKCT-HT	BHK-21 clon CT	5,7 log ₁₀ TCID ₅₀ /ml	protocolo largo	A (ovejas) G (vacas)		S01 - S05 C01 - C06	
BHK13-HT	BHK-21 clon 13	5,7 log ₁₀ TCID ₅₀ /ml	protocolo corto	B (ovejas)		S06 - S10	
BHK13-LT	BHK-21 clon 13	4,7 log ₁₀ TCID ₅₀ /ml	protocolo corto	C (ovejas)		S11 - S15	
MA-HT	MA-104	6,1 log ₁₀ TCID ₅₀ /ml	protocolo corto	D (ovejas) H (vacas)		S16 - S20 C07 - C10	
MA-LT	MA-104	5,7 log ₁₀ TCID ₅₀ /ml	protocolo largo	E (ovejas) I (vacas)		S21 - S25 C11 - C16	
control no vacunado				F (ovejas) K (vacas)		S26 - S30 C17 - C22	

Animales

5 Veinticinco ovejas no expuestas anteriormente al SBV de cruces domésticas europeos (7-9 meses de edad) se asignaron a 5 grupos de 5 animales cada uno, los cuales se inmunizaron por vía subcutánea con una de las vacunas prototípicas (ver la tabla 1). Otras 5 ovejas se mantuvieron como controles no vacunados. Los animales machos y hembras se distribuyeron por igual.

10 Además, se asignaron 22 vacas hembras Holstein-Friesian con anticuerpos anti-SBV negativo a cuatro grupos de cuatro (grupo H) o seis animales (grupos G, I y K) cada uno. Los animales en el grupo G, H e I se inmunizaron por vía subcutánea con vacunas BHKCT-HT, MA-HT y MA-LT, respectivamente. Las vacas del grupo K se mantuvieron como controles no vacunados. El día de la primera vacunación, los animales tenían entre 8 y 12 meses de edad.

15 En cada caso, los animales se vacunaron dos veces con un intervalo de separación de tres semanas y tres semanas después de la segunda vacunación tanto los animales vacunados como los animales de control se inocularon con 2 x 0,5 ml de una cepa de campo del SBV que solo se pasó en el hospedador natural. Durante todo el estudio, se midieron diariamente las temperaturas corporales rectales y los animales fueron examinados por veterinarios respecto a los signos clínicos.

Recogida de muestras, RT-PCR en tiempo real y serología

25 Después de la primera vacunación, se recolectaron muestras de suero los días 0, 3, 4, 7 y luego semanalmente. Después de la segunda vacunación, se tomaron muestras de suero a intervalos semanales. Después de la infección de estimulación, se tomaron muestras de suero a diario durante los primeros ocho días y los días 14 y 21. Las muestras de bazo, amígdalas y ganglios linfáticos mesentéricos y mandibulares se recogen en la autopsia los días 22-29 después de la infección de estimulación y se homogeneizan en 1 ml de MEM.

30 El ARN de muestras de suero y de tejido tomadas en la autopsia se extrajo usando el kit MagAttract Virus Mini M4 8 Kit para la extracción automatizada (Qiagen, Alemania) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las cargas del genoma SBV se determinaron mediante una PCR en tiempo real por transcripción inversa (RT-qPCR) (7) con un patrón externo basado en el segmento genómico S. Por otra parte, se analizaron muestras de suero con ELISA para la detección de anticuerpos anti-SBV comercializado (ID Screen® Schmallenberg Virus Indirect, IDvet, Francia) usando el corte recomendado del 70 % de densidad óptica relativa en comparación con el control positivo y en un ensayo de microneutralización estándar.

3. Resultados

40 Observaciones clínicas y exámenes post-mortem

45 Después de la primera vacunación con los prototipos de vacuna, no se observaron efectos colaterales adversos; ninguno de los animales mostró fiebre ni ningún otro signo clínico. Después de la segunda vacunación, una de las vacas inmunizada con vacuna MA-HT (grupo H) desarrolló inflamación de grado bajo en el sitio de inyección durante 2 días.

Después de la infección de estimulación, una vaca no vacunada desarrolló fiebre el día 3, otra mostró una leve diarrea durante tres días. Un animal del grupo I tuvo rinorrea durante un día.

La autopsia de los animales no reveló ninguna lesión macroscópica significativa. Los ganglios linfáticos mesentéricos de todos los animales salvo uno (S30) no vacunados eran PCR-positivo; en promedio se detectaron $2,86E+03$ copias genómicas por mg (copias/mg). Además, se halló ARN del SBV en los ganglios linfáticos mandibulares de 3 de 5 ovejas no vacunadas (S27 - S29) y de todas las vacas de control (promedio $2,68E+01$ copias/mg), las amígdalas de S27 - S29 y C18 - C20 (promedio $9,90E+01$ copias/mg) y bazo de 4 de 5 ovejas no vacunadas (S26 - S29; promedio $4,57E+03$ copias/mg) y de dos terneros de control (C17, C21; promedio $1,40E+01$ copias/mg). No se detectó ARN viral en ninguno de los animales vacunados.

Respuesta de anticuerpos

El día de la primera vacunación, todos los animales eran negativos en ambos ensayos serológicos.

Antes de la infección de estimulación, no se pudieron detectar anticuerpos en los animales no vacunados. Tres semanas después de la infección, todas salvo una (S30) de las ovejas y vacas de control fueron positivas en el ensayo de neutralización. Se hallaron anticuerpos en vacas y también en 2 de 5 ovejas no vacunadas (S26, S29) por ELISA. A pesar de una mayor DO de la muestra respecto del valor de DO del control positivo (S/P), tanto las ovejas S27 como S28 de control fueron negativas en el ELISA.

Tres semanas después de la primera inmunización con la vacuna BHKCT-HT, BHK13-HT o BHK13-LT (SBV cultivado en células BHK), todas las ovejas y vacas fueron negativas en el ELISA, mientras que en S07, S08, S10 (BHKCT-HT) y S04 (BHK13- HT) se detectaron títulos de anticuerpos bajos en el ensayo de neutralización. Después de la segunda vacunación, se detectaron anticuerpos en al menos un ensayo serológico, en la mayoría de los casos, se observó un considerable aumento de anticuerpos neutralizantes. Tres semanas después de la infección de estimulación, 8 de 15 ovejas (S04, S06, S07, S09, S10, Sil, S12, S15) y 5 de 6 vacas (C01 - C05) eran positivas en ambos ensayos, 7 ovejas (S01 - S03, S05, S08, S13, S14) y las demás vacas (C6) eran positivas en el ensayo de neutralización solo y S15 en el ensayo de ELISA solo.

Después de una inmunización con vacunas MA-HT o MA-LT (SBV cultivado en células MA-104), todas las vacas y todas las ovejas salvo dos fueron negativas en ambos ensayos serológicos. S22 y S23 tenía títulos de 1:5 y 1:7, respectivamente, en el ensayo de neutralización. Después de la segunda vacunación, en S19, S24, C08 y C14 no se pudieron detectar anticuerpos. S16, S21, C07, C09 y C10 dieron positivo en ambos ensayos serológicos, mientras que los demás animales eran positivos en el ensayo de neutralización solo. Tres semanas después de la infección de estimulación, todas las ovejas del grupo D y 4 de 5 ovejas del grupo E eran positivas en el ensayo de neutralización, en los animales S16 se pudieron detectar anticuerpos por ELISA y el animal S24 era negativo en ambos ensayos. En todas las vacas del grupo H (título alto de SBV), los anticuerpos eran detectables por ELISA y el ensayo de neutralización. Lo mismo se aplica a C12 y C13 (grupo I, título bajo de SBV), C11, C15 y C16 fueron positivos solo en el ensayo de neutralización y en C14 no se pudieron detectar anticuerpos con ningún ensayo.

Después de la segunda inmunización, se observó un incremento de los títulos de anticuerpos neutralizantes promedio, mientras que, después de la infección de estimulación, la mayoría de los títulos de neutralización quedaron constantes en todos los grupos vacunados.

RT-PCR en tiempo real

Después de la primera vacunación, no se detectó el genoma de SBV en ningún animal (datos no mostrados), confirmando el éxito de la inactivación de SBV con un procedimiento de inactivación de BEI corto y largo.

Después de la infección de estimulación, todas salvo una (S30) de las ovejas no vacunadas dieron positivo en la RT-qPCR entre el día 2 y 4 (S27 - S29) o 5 (S26). En 1 de 6 vacas no vacunadas (C19), el genoma de SBV se detectó por primera vez el día 1 después de la infección, los otros 5 terneros dieron positivo por primera vez el día 2. El genoma de SBV permaneció detectable hasta el día 5 (C17, C19 - C21), 6 (C22) o 7 (C18). Tres de 6 vacas inmunizadas con vacuna MA-LT (C12, C13, C16) eran positivas en la RT-qPCR el día 3, mientras que los animales vacunados con vacunas MA-HT no desarrollaron ARNemia (ARN en la sangre) después de la estimulación.

En muestras séricas tomadas de todas las ovejas vacunadas, de las ovejas de control S30 y de todas las vacas de los grupos G y H (grupos de vacuna de título alto), no se pudo detectar ARN viral después de la infección de estimulación.

4. Conclusión

Se desarrollaron cinco diferentes formulaciones de vacuna inactivada y se ensayaron después en vacas y ovejas. En los experimentos, ninguno de los animales mostró efectos adversos significativos y todos los animales se seroconvirtieron después de la vacunación. Por otra parte, la mayoría pero no todos los animales desarrollaron

niveles de anticuerpos de SBV neutralizantes detectables después de la vacunación. Hay que destacar que después de la infección por estimulación, se previno completamente la ARNemia con cuatro vacunas prototípicas y se redujeron considerablemente con la quinta. Estos datos sugieren que la protección de la infección viral está mediada solo parcialmente por anticuerpos neutralizantes y que mecanismos adicionales aún no determinados, más probablemente asociados con la inmunidad celular, contribuyeron esencialmente con la remisión del virus después de la estimulación con SBV. Las dos principales características de vacunas inactivadas son (i.) la completa inactivación del virus infeccioso, que se demostró por pases de cultivo celular y la ausencia de ARNemia después de la primera inmunización y (ii.) la inducción de la inmunidad de protección. A pesar de que los anticuerpos neutralizantes no se detectaron en todos los animales vacunados antes de la infección de estimulación, se evitó la ARNemia por completo por medio de cuatro vacunas prototípicas y se redujo considerablemente por la quinta. En el presente estudio, la detección de ARN viral en el sistema linforreticular se usó como herramienta de diagnóstico aparte de la ARNemia. En contraste con los controles, todos los animales vacunados eran claramente negativos para el ARN del SBV en el sistema linfoide (en los órganos linfoides al momento de la autopsia) como los ganglios linfáticos mesentéricos. Una de las ovejas de control no vacunadas no mostró ARNemia, ni muestras de tejido RT-qPCR-positivo, ni seroconversión después de la infección de estimulación, razón por la cual la observación aún sigue sin aclarar. Las posibles explicaciones son una inyección fallada o un status de resistencia (natural) a la infección por SBV.

Sin embargo, la ausencia de ARN detectable en la mayoría de los grupos de vacuna permite sacar la conclusión de que, aunque no se puedan detectar genomas virales (en el suero), no se pudo transmitir un virus de estimulación al feto.

A pesar de que se evitó una ARNemia o se redujo notablemente por medio de vacunación, los anticuerpos no se detectan en todos los animales antes de la infección de estimulación en cada ensayo. En general, la correlación del ensayo ELISA y el ensayo de neutralización era mayor en muestras de bovinos que de ovinos, en especial después de la infección de estimulación de animales no vacunados.

Los mayores niveles de anticuerpos de todos los grupos de ovejas se detectaron por ensayo de neutralización después de la infección de estimulación de ovejas no vacunadas. Lo mismo se observó después de la inmunización con varias vacunas contra la fiebre de Rift Valley y posterior estimulación (8), donde las vacunas aplicadas, sin embargo, no proporcionaron una inmunidad estéril, sino solo una reducción de la viremia. Contrariamente a ello, los prototipos de vacuna contra el SBV caracterizados en este estudio evitaron la ARNemia en ovejas por completo a pesar de un bajo nivel de anticuerpos neutralizantes.

En nuestro estudio, el título de anticuerpos neutralizantes estaba influido por la línea celular de producción y el título viral antes de la inactivación. Una dependencia de la dosis del sobrenadante de cultivo celular usado para la preparación de vacunas también se describió para AKAV, independientemente del uso de vacunas inactivadas o vivas atenuadas (9; 10). Al menos se describió un nivel de $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml de virus como necesario para el desarrollo de vacunas. Como 2 ml de una vacuna que contiene 6,1 log₁₀ TCID₅₀/ml de virus cultivados en células MA-104 evitaron la ARNemia por completo, aunque en la mitad de los terneros que se inmunizaron con 5,7 log₁₀ TCID₅₀/ml el genoma viral era detectable durante un día, se puede asumir una dosis mínima similar para el SBV. Sin embargo, en vacunas producidas en células BHK-21, el título viral bajo (5,7 log₁₀ TCID₅₀/ml) evitó la ARNemia por completo en ambas especies animales, en ovejas solamente fueron necesarios 4,7 log₁₀ TCID₅₀/ml.

En conclusión, en esta caracterización de la eficacia preliminar de diferentes candidatos de vacuna, se pudo demostrar una alta eficacia para cuatro de cinco prototipos de vacuna contra el SBV en las dos especies diana mayores. Como resultado, se demuestra el desarrollo de una vacuna inactivada contra el virus de Schmallenberg, que es eficaz y segura en vacas y ovejas. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la vacuna contra el SBV inactivada se puede aplicar con éxito como apoyo de los esfuerzos para el control de la propagación del SBV, así como para la prevención de la enfermedad en ruminantes domésticos.

EJEMPLO 3

A continuación, se describe un procedimiento alternativo de inactivación y un posterior proceso de neutralización, que también permitió la producción (las demás etapas de producción se llevaron a cabo de acuerdo con el Ejemplo 1) de una vacuna efectiva para una exitosa prevención de la infección por SBV:

Procedimiento de inactivación

El proceso de inactivación del antígeno final duró un total de 12 horas y la concentración de BEI usada fue de 2 mM. El antígeno final se inactivó por adición de BEI 0,17 M en una proporción de 11,9 ml por litro de antígeno inactivado (concentración final 2 mM). Después de la adición de BEI, la mezcla se mantuvo bajo agitación a 37±1 °C, durante 12 horas.

Neutralización de BEI residual

Una vez completado el proceso de inactivación, se añadió una solución de tiosulfato de sodio 1 M en la proporción de 10 ml por litro de antígeno inactivado (concentración final 10 mM), a fin de neutralizar la BEI.

EJEMPLO 4

A continuación en la presente memoria se describe una producción alternativa de MSV (solución madre del virus), que asimismo permitió la fabricación (las otras etapas del proceso de fabricación se realizaron de acuerdo con el Ejemplo 1, en el que la inactivación se realizó tal como se describe en el Ejemplo 3) de una vacuna efectiva para una prevención exitosa de la infección por SBV:

5. Producción de MSV (solución madre de virus)

El aislado 2 de SBV se usó para la producción de MSV (solución madre del virus). Se infectó una botella de cultivo giratoria sembrada con Ma104-Ak (5×10^7 células) a moi 0,0001. Después de 54 h de incubación, la botella de cultivo giratoria se congela a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, se descongela y se centrifuga a 2.000 g durante 5 min. El sobrenadante se recolectó y las alícuotas de 1 ml se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el posterior proceso.

6. Producción de antígeno del SBV

Las células Ma104-Ak (lote celular de trabajo - WCS) se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido. El WCS se descongeló y se expandió en matraces de cultivo celular (T160 cm^2) usando medio EMEM y gamma FCS 10 % irradiado. Las células se tripsinizaron usando tripsina recombinante (origen no animal). Un matraz T160 se tripsinizó y se resuspendió en 150 ml de medio EMEM que contenía FCS 2 %. Esta suspensión celular se usó para sembrar una botella de cultivo rotatoria (495 cm^2). Las botellas de cultivo rotatorias con suspensión celular se colocaron en una incubadora a $37\text{ }^\circ\text{C}$ y girando a 0,5 rpm. De 12 a 16 h después de la siembra, las células se sembraron a una densidad de 5×10^7 por botella. Se usó la infección usando una moi de 0,0001. Las células infectadas se incubaron de forma continua a $37\text{ }^\circ\text{C}$ y girando a 0,5 rpm durante 72-96 h hasta que el efecto citopático (CPE) del SBV específico no alcanzara a aproximadamente el 60-70 % de las células. En este punto temporal, las botellas de cultivo rotatorias completas se congelaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y se descongelaron en baño de agua a $37\text{ }^\circ\text{C}$ y se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior procesamiento.

EN EL LISTADO DE SECUENCIAS:

La SEQ ID NO:1 corresponde a la secuencia genómica completa de un segmento S de un virus Schmallenberg infeccioso (BH80/11-4),

La SEQ ID NO:2 corresponde a la secuencia genómica completa de un segmento M de un virus Schmallenberg infeccioso (BH80/11-4),

La SEQ ID NO:3 corresponde a la secuencia genómica completa de un segmento L de un virus Schmallenberg infeccioso (BH80/11-4),

La SEQ ID NO:4 corresponde a una secuencia de ARN antiparalela (es decir, complementaria e inversa) de SEQ ID NO: 1,

La SEQ ID NO:5 corresponde a la secuencia de ARN antiparalela de SEQ ID NO:2,

La SEQ ID NO:6 corresponde a la secuencia de ARN antiparalela de SEQ ID NO:3,

La SEQ ID NO:7 corresponde a la SEQ ID NO:1, en la que el nucleótido en la posición 9 es "a" en lugar de "g", y

La SEQ ID NO:8 corresponde a la secuencia de ARN antiparalela de SEQ ID NO:7 y por lo tanto corresponde a la SEQ ID NO:4, en la que el nucleótido en la posición 831 es "u" en lugar de "c".

Las siguientes cláusulas que se han divulgado en la solicitud como se presentó originalmente también se describen en la presente memoria:

1. Una composición inmunogénica, que comprende uno o más antígenos del virus de Schmallenberg (SBV).

2. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1, en la que la composición inmunogénica comprende el SBV.

3. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1, en la que el antígeno del SBV o el SBV está inactivado.

4. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1, en la que el SBV comprende:

- (a) un segmento de ARN pequeño (S) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 97,8 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:7,

- (b) un segmento de ARN medio (M) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2,

- (c) un segmento de ARN grande (L) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:3 o
- (d) combinaciones de los mismos.

5 5. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1, en la que el SBV se obtiene por la inactivación del SBV que comprende:

- 10 - (a) un segmento de ARN pequeño (S) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 97,8 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:7,
- (b) un segmento de ARN medio (M) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2,
- 15 - (c) un segmento de ARN grande (L) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:3 o
- (d) combinaciones de los mismos.

20 6. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1, en la que el SBV comprende:

- (a) un segmento S de ARN, caracterizado por que el segmento S de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 97,8 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8,
- 25 - (b) un segmento M de ARN, caracterizado por que el segmento M de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5;
- (c) un segmento L de ARN, caracterizado por que el segmento L de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6, o
- (d) combinaciones de los mismos.

30 7. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 3, en la que el SBV está inactivado por tratamiento térmico o con un agente inactivador de virus.

35 8. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 7, en la que el agente inactivador de virus es un compuesto de aziridina.

9. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 8, en la que el compuesto de aziridina es etilenimina binaria (BEI).

40 10. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 2, que comprende una cantidad de SBV que es equivalente a una titulación de virus de por lo menos aproximadamente 10^5 TCID₅₀/ml por dosis.

45 11. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 2, en la que el SBV tiene un título pre-inactivación de por lo menos aproximadamente 10^6 partículas de SBV por mililitro.

12. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1, que contiene además uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

50 13. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 12, en la que uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste en disolventes, medios de dispersión, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la adsorción.

55 14. La composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1, que comprende además hidróxido de aluminio, saponina o combinaciones de los mismos.

15. Una composición de vacuna para el tratamiento o prevención de acuerdo con el SBV, que comprende la composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1.

60 16. Una composición de vacuna para la prevención o reducción de la viremia o las malformaciones inducidas por el SBV, que comprende la composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1.

17. Una composición de vacuna para la prevención o reducción de la transmisión del SBV, que comprende la composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1.

65 18. Un método para la producción de SBV, que comprende las etapas de:

- (a) infectar células con un SBV,
- (b) cultivar las células infectadas y
- (c) cosechar el SBV producido por dichas células.

5 19. El método para la producción de SBV de acuerdo con la cláusula 18, en el que el SBV se pasa alternativamente entre las células de insecto y las células de mamífero y en el que el método además comprende las etapas de:

- 10 (a) infectar células de insecto con un SBV,
 (b) cultivar las células infectadas de la etapa (a),
 (c) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (b),
 (d) infectar células de mamífero con el SBV cosechado en la etapa (c)
 (e) cultivar las células infectadas de la etapa (d) y
 (f) cosechar el SBV producido por dichas células de la etapa (e).

15 20. El método para la producción de SBV de acuerdo con la cláusula 19, en el que el método además comprende las etapas de:

- 20 (d) infectar células de mamífero con un SBV,
 (e) cultivar las células infectadas de la etapa (d),
 (f) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (e)
 (g) infectar células de insecto con el SBV cosechado en la etapa (f),
 (h) cultivar las células infectadas de la etapa (g) y
 (i) cosechar el SBV producido por las células en la etapa (h).

25 21. El método de acuerdo con la cláusula 18, que comprende las etapas de:

- 30 (a) infectar células de insecto con un SBV,
 (b) cultivar las células infectadas de la etapa (a),
 (c) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (b)
 (d) infectar células de mamífero con el SBV cosechado en la etapa (c),
 (e) cultivar las células infectadas de la etapa (d),
 (f) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (e)
 (g) infectar células de insecto con el SBV cosechado en la etapa (f)
 (h) cultivar las células infectadas de la etapa (g), y
 (i) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (h).

22. El método de acuerdo con la cláusula 21, que además comprende las etapas de:

- 40 (j) infectar células de mamífero con el SBV cosechado en la etapa (i),
 (k) cultivar las células infectadas de la etapa (j) y
 (l) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (k).

45 23. El método de acuerdo con la cláusula 30, que además comprende las etapas de:

- (m) infectar células de insecto con el SBV cosechado en la etapa (l),
 (n) cultivar las células infectadas de la etapa (m) y
 (o) cosechar el SBV producido por dichas células en la etapa (n).

50 24. El método de acuerdo con la cláusula 19, en el que las células de insecto son células KC y las células de mamífero son células BHK.

25. El método de acuerdo con la cláusula 24, en el que las células de mamífero son células BHK-21.

55 26. Un método para la producción de SBV inactivado o de una composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 3, que comprende las etapas de:

- 60 (A) infectar células con un SBV;
 (B) cultivar las células infectadas,
 (C) cosechar el SBV producido por dichas células e
 (D) inactivar dichas partículas virales por tratamiento térmico o con un agente inactivador de virus

27. El método de acuerdo con la cláusula 26, en el que las células son células de riñón de mono o células BHK.

65 28. El método de acuerdo con la cláusula 27, en el que las células de riñón de mono son células Ma104 o células Ma104-AK y las células BHK son células BHK-21.

29. El método de acuerdo con la cláusula 26, en el que las células se infectan con el SBV a un MOI de 0,00001-0,01.
- 5 30. El método de acuerdo con la cláusula 26, en el que las células se infectan con SBV a un MOI de 0,0001-0,001.
31. El método de acuerdo con la cláusula 26, en el que las células se cultivan en un medio que comprende aproximadamente FCS 0 %.
- 10 32. El método de acuerdo con la cláusula 26, en el que las células se cultivan en un medio que comprende aproximadamente FCS 1-10 %.
33. El método de acuerdo con la cláusula 26, en el que las células se cultivan en un medio que comprende aproximadamente FCS 2-6 %.
- 15 34. El método de acuerdo con la cláusula 26, en el que las células se cultivan a una temperatura de 25-38 °C.
35. El método de acuerdo con la cláusula 26, en el que el SBV comprende:
- 20 - (a) un segmento de ARN pequeño (S) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 97,8 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:7,
- 25 - (b) un segmento de ARN medio (M) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2,
- 30 - (c) un segmento de ARN grande (L) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:3 o
- (d) combinaciones de los mismos.
36. El método de acuerdo con la cláusula 26, en el que el SBV comprende:
- 35 - (a) un segmento S de ARN, caracterizado por que el segmento de ARN S tiene una secuencia que tiene al menos el 97,8 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8,
- (b) un segmento de ARN M, caracterizado por que el segmento M de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5;
- 40 - (c) un segmento L de ARN, caracterizado por que el segmento L de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6, o
- (d) combinaciones de los mismos.
37. Un SBV, que comprende:
- 45 - (a) un segmento de ARN pequeño (S) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 97,8 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:7,
- 50 - (b) un segmento de ARN medio (M) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2,
- (c) un segmento de ARN grande (L) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:3 o
- (d) combinaciones de los mismos.
38. Un SBV, que comprende:
- 55 - (a) un segmento S de ARN, caracterizado por que el segmento S de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 97,8 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8,
- 60 - (b) un segmento M de ARN, caracterizado por que el segmento M de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5;
- (c) un segmento L de ARN, caracterizado por que el segmento L de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6, o
- (d) combinaciones de los mismos.
39. Una composición química que se puede obtener por el método de acuerdo con la cláusula 26.
- 65

40. La composición de acuerdo con la cláusula 39, en la que la composición es una composición inmunogénica.
41. La composición de acuerdo con la cláusula 39, en la que la composición es una vacuna.
- 5 42. Un método para generar una respuesta inmunitaria al SBV en un animal, que comprende administrar a dicho animal la composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1.
- 10 43. Un método de tratamiento o prevención de la infección por SBV en un animal en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1.
- 15 44. Un método de tratamiento o prevención de la viremia o las malformaciones inducidas por el SBV, que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1.
- 20 45. Un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el SBV en una manada de animales, que comprende la etapa de administrar la composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1 a tales animales en necesidad del mismo.
- 25 46. Un método para prevenir o reducir la viremia o las malformaciones inducidas por el SBV en una manada de animales, que comprende la etapa de administrar la composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1 a dichos animales en necesidad del mismo.
- 30 47. Un método para prevenir o reducir la transmisión del SBV en una manada de animales, que comprende la etapa de administrar la composición inmunogénica de acuerdo con la cláusula 1 a tales animales en necesidad del mismo.
- 35 48. El método de acuerdo con la cláusula 42, en el que la composición inmunogénica se administra en una sola dosis o en dos dosis.
- 40 49. El método de acuerdo con la cláusula 43, en el que la composición inmunogénica se administra en una sola dosis o en dos dosis.
- 45 50. El método de acuerdo con la cláusula 44, en el que la composición inmunogénica se administra en una sola dosis o en dos dosis.
51. El método de acuerdo con la cláusula 45, en el que la composición inmunogénica se administra en una sola dosis o en dos dosis.
52. El método de acuerdo con la cláusula 46, en el que la composición inmunogénica se administra en una sola dosis o en dos dosis.
53. El método de acuerdo con la cláusula 47, en el que la composición inmunogénica se administra en una sola dosis o en dos dosis.

REFERENCIAS:

- 50 1. B. Hoffmann ., M. Scheuch, D. Höper, R. Jungblut, M. Holsteg, H. Schirrmeier, M. Eschbaumer, K. V. Goller, K. Wernike, M. Fischer, A. Breithaupt, T.C. Mettenleiter, M. Beer, Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 469-472 (2012).
- 55 2. M.-M. Gariglinany et al., Schmallerberg virus in calf born at term with porencephaly, Belgium. *Emerg. Infect. Dis.* 18 (2012), doi: 10.3201/eid1806.120104.
- 60 3. M. D. Bowen et al., A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. *Virology.* 291, 185-190 (2001).
- 65 4. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz, Eds., *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* (Elsevier, San Diego, USA, 2011), pp 725-731.
5. R. M. Kinney, C. H. Calisher, Antigenic relationships among Simbu serogroup (Bunyaviridae) viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 1307-1318 (1981).
6. M. F. Saeed, L. Li, H. Wang, S. C. Weaver, A. D. Barrett, Phylogeny of the Simbu serogroup of the genus *Bunyavirus.* *J. Gen. Virol.* 82, 2173-2181 (2001).

7. Bilk S, Schulze C, Fischer M, Beer M, Hlinak A, Hoffmann B. Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Veterinary microbiology* 2012 Mar 30.

5 8. Kortekaas J, Antonis AF, Kant J, Vloet RP, Vogel A, Oreshkova N, et al. Efficacy of three candidate Rift Valley fever vaccines in sheep. *Vaccine* 2012 May 14;30(23):3423-9.

9. Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Goto Y, Satoda K, et al. Development of inactivated vaccine for Akabane disease. *National Institute of Animal Health quarterly* 1978 Winter; 18(3-4):97-108.

10 10. Kurogi H, Inaba Y, Akashi H, Takahashi E, Sato K, Satoda K, et al. Immune response of various animals to Akabane disease live virus vaccine. *National Institute of Animal Health quarterly* 1979 Summer; 19(1-2):23-31.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH

<120> Vacuna contra el virus de Schmallenberg (SBV), métodos de producción y sus usos

20 <130> P01-2825

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

25

<210> 1

<211> 839

<212> ADN

<213> virus de *Schmallenberg*

30

<400> 1

```

    agtagtgagc tccactatta actacagaaa tatgtcaagc caattcattt ttgaagatgt      60
    accacaacgg aatgcagcta catttaaccc ggaggtcggg tatgtggcat ttattggtaa      120
    gtatgggcaa caactcaact tcggtgttgc tagagtcttc ttcctcaacc agaagaaggc      180
    caagatggtc ctacataaga cggcacaacc aagtgtcgat cttacttttg gtgggggtcaa      240
    atttacagtg gttaataacc attttcccca atatgtctca aatcctgtgc cagacaatgc      300
    cattacactt cacaggatgt caggatatct agcacgttgg attgctgata catgcaaggc      360
    tagtgtcctc aaactagctg aagctagtgc tcagattgtc atgccccttg ctgagggttaa      420
    gggatgcacc tgggccgatg gttatacaat gtatcttggg tttgcacctg gggccgaaat      480
    gttccttgat gcttttgaact tctatccact agttattgaa atgcataggg tcctcaagga      540
    caatatggat gtaaatttta tgaaaaaagt cctccgcaa cgctatggaa caatgactgc      600
    tgaagaatgg atgactcaga aaataacaga aataaaagct gcttttaatt ctggtggaca      660
    gcttgcctgg gccaaatctg gattctctcc tgctgctaga accttcttgc agcaattcgg      720
    tatcaacatc taaacctctt catcacagat cttcaatttc cgtgcaatat gtctatgtat      780
    tgcacaccat tatactgcaa ggcttctgtt aagatagtta ataagtggag aacactact      839
    
```

35 <210> 2

<211> 4373

<212> ADN

<213> virus de *Schmallenberg*

ES 2 617 351 T3

<400> 2

agtagtgaac	taccacaatc	aaaatgcttc	tcaacattgt	cttgatatct	aacttagcct	60
gtttagcttt	tgcaactcca	cttaaggaag	gcaactagagg	gtctaggtgc	ttcctgaatg	120
gcgaactggt	taaaactggt	aacacatcaa	aggtcgtttc	agaatgctgt	gtgaaagacg	180
acatatctat	cattaaatca	aatgctgaac	attataaatc	aggagatcgg	ttggctgctg	240
taataaaata	ttatcgttta	tatcaggtga	aggattggca	ttcttgcaat	ccaatttatg	300

ES 2 617 351 T3

atgaccacgg ttcctttatg atattagata tagataatac tggcacatta atccctaaaa 360
 tgcatacatg cagagttgaa tgcgaaatag cactgaataa agatactggc gaagttatat 420
 tgaattcata tcgaattaac cactaccgaa tctcgggcac aatgcatgta tcaggttggg 480
 ttaaaaacaa aattgagatt cctttggaaa acacatgcga atccattgag gtaacatgtg 540
 gattaaaaac acttaatttt catgcatggt tccataccca taagtcatgc acccgctatt 600
 ttaaaggatc aatcctgccg gaattgatga tcgaatcatt ttgtacgaat cttgaattaa 660
 tactgctagt aactttcata ttagttgggt ctgtcatgat gatgatattg acgaaaacat 720
 atatagtata tgtgttcatt cctatatattt atccatttgt gaaattatat gcttatatgt 780
 acaacaaata ttttaaattg tgtaaaaatt gcctgttagc agtacatccc tttacaaatt 840
 gcccatcgac atgcatctgt ggaatgattt aactaccac tgaatcactc aaattgcatc 900
 gcatgtgtaa caattgttct ggctataaag cattgocgaa aacaaggaaa ttgtgtaaaa 960
 gtaaaatata caatatagtg ctatgtgtga taacatcact gatatttttc tcatttatca 1020
 cacctataatc gagtcaatgt atcgatatag aaaaactgcc agacgagtat attacatgta 1080
 aaagagagct agctaataatc aaaagcttga caattgatga cacatatagc tttatatatt 1140
 cctgtacatg cataattgtg ttaatattac ttaaaaaggc agcaaagtat atcttgtact 1200
 gcaactgcag cttttgtggg atggtacatg aacgacgtgg attgaagata atggacaact 1260
 ttacaaacaa gtgcctaagt tgtgtatgcg cagaaaacaa gggcttaaca attcacagag 1320
 cctctgagaa atgtctgttc aaatttgaat caagttataa taggaccggg ttgataatct 1380
 ttatgcttct gttagtccca acaattgtaa tgacgcaaga aactagtatt aactgcaaaa 1440
 acattcaatc aactcagctt acaatagagc acctgagtaa gtgcatggca ttttatcaaa 1500
 ataaaacaag ctcaccagtt gtaatcaatg aaataatttc agatgcttca gtagacgaac 1560
 aagaattaat aaaaagttta aacttgaact gtaatgtcat agataggttt atttccgaat 1620
 ctagtgttat tgagactcaa gtttattatg agtatataaa atcacagttg tgccctctcc 1680
 aagtgcata tattttcact atcaattcag caagtaacat acaatggaaa gcactggccc 1740
 gaagtttcac cttaggagtg tgcaatacga atcctcataa acatatatgt agatgcttgg 1800
 agtctatgca aatgtgcaca tcaaccaaga cagaccacgc tagggaaatg tcaatatatt 1860
 atgatggtca tccagatcgc tttgagcatg acatgaaaat aatattgaat ataatgagat 1920
 atatagtccc tggattaggt cgagtcttgc ttgatcaaat caaacaacaa aaagactacc 1980
 aagctttacg ccacatacaa ggtaagcttt ctccctaaatc gcagtcaaat ttacaactta 2040
 aaggatttct ggaatttgtt gattttatcc ttgggtgcaaa cgtgacaata gaaaaaacc 2100
 ctcaaacatt aactacatta tctttgataa aaggagccca cagaaacttg gatcaaaaag 2160

ES 2 617 351 T3

atccaggtcc aacaccaata ctggtatgca aatcaccaca aaaagtggta tgctactcac 2220
cacgtggtgt cacacaacca ggagattata tatcatgcaa atctaagatg tataagtggc 2280
catctttagg ggtatacaaa cataatagag accagcaaca agcctgcagc agtgacacac 2340
attgcctaga gatgtttgaa ccagcagaaa gaacaataac tacaaaaata tgcaaagtaa 2400
gtgatatgac ttattcagaa tcgccatata gtactggaat accatcatgc aacgtgaaga 2460
gatttgatc atgtaatgta aggggtcatc aatggcaaat tgcagaatgc tcaaattggct 2520
tattttacta tgtttcagct aaagcccatt cgtaaaactaa cgatataaca ctgtactggt 2580
tatcagcaaa ttgcctggac ttgcgttatg cattcagatc cagtagttgt tcagatatag 2640
tatgggatac aagttatcga aataaattaa cacctaaatc tattaatcat ccagatattg 2700
aaaactacat agcagcgctt cagtcagata ttgcaaatga tttaactatg cactacttta 2760
aaccattaaa aaaccttcca gcaataattc ctcaatacaa aacaatgaca ttgaatgggg 2820
acaaggtatc aaatggtatt agaaatagtt atatcgagtc gcacatccct gcaattaatg 2880
gtttatcagc agggattaat attgccatgc caaatggaga aagcctcttt tccattatta 2940
tctatgtcag aagagtaata aataaagcat cgtatcgatt tctatatgaa acaggacca 3000
caattggaat aaatgccaaag cacgaagagg tatgtaccgg gaagtgccca agcccaatac 3060
cacatcaaga tggttgggtc acattctcaa aggaaagatc aagtaattgg ggctgtgaag 3120
aatggggttg cttggcaata aatgatggtt gtttatatgg gtcatgtcaa gacataataa 3180
ggcctgaata taagatatac aagaagtcta gtattgaaca aaaggatgtt gaagtttgta 3240
taaccatggc ccatgaatca ttctgcagta ccgttgatgt tctccaacct ttaattagcg 3300
acaggataca attagatatc caaacgattc aaatggactc tatgccaaat ataattgcag 3360
tcaagaatgg gaaagtttat gttggagata tcaatgactt aggttcgaca gcaaagaaat 3420
gtggctcagt ccaattatat tctgaagga tcaattggatc ggaacccca aaatttgatt 3480
atgtttgcca tgcattcaat cgtaaagatg tcatccttcg aagatgcttt gataactcat 3540
atcagtottg tcttctcttg gaacaagata atacattaac tattgcttct accagtcata 3600
tggaagtgca taaaaaagtt tcaagcgtgg gtacaatcaa ttataaaatt atgtagggg 3660
atthtgacta caatgcatat tcaacacaag caacagtcac aatagatgag atcaggtgtg 3720
gtggttgta tggctgcctt gaaggaatgg cttgcgcact caaattgagt accaatacca 3780
tcgggagttg ttcaataaaa agtaactgcg atacatacat taaaataata gcagtcgatc 3840
cgatgcagag cgagtattcc attaagttaa actgccact agcaacagag acagtttcag 3900
taagtgtgtg ctcagcttct gcttacacaa aaccttcaat atctaaaaat caaccaaaaa 3960
ttgttttgaa ttcottagat gaaacatctt acatcgagca acatgataaa aagtgttcta 4020
catggctttg cagagtttat aaagaagga tttagcgtaat atttcagcct ctatttgga 4080

ES 2 617 351 T3

acctatcttt ctattggaga ctgacaatat atataataat ctctttgatt atgctaattc 4140
 tgtttctata catattaata ccaactgtgca aacggctaaa aggtttattg gaatacaatg 4200
 agagaatata ccaaatggaa aataaattta agtgataagc cttataacaa tgagcaatta 4260
 taaatgaata aataaaaaaca ataaaagata aacaaataac aacatatata tgtgggttaca 4320
 catatatatg taattattca gctgagaagt ttttcatgtg gtagaacact act 4373

<210> 3
 <211> 6882
 <212> ADN
 <213> virus de *Schmallenberg*

5

<400> 3

agtagtgtac ccctaattac aatcactatg gagacataca agattaacat ttttagagat 60
 aggatcaacc agtgtcgaag tgctgaagaa gccaaagaca ttggtgctga tcttctcatg 120
 gctagacatg actactttgg tagagaggta tgttattacc tggatatcga attccggcag 180
 gatgttccag cttacgacat acttcttgaa tttctgccag ctggcactgc tttcaacatt 240
 cgcaattgta caccagacaa ttttatcatt cacaatggca agctttatat cattgactat 300
 aaagatcaa ctgatcatgc atatggtcaa aaaacttatg aaaagtacac ccagatcttt 360
 ggagacgcat tgtcagaatt gccgtttgat tttgaagttg tgatcatccg tgctgaccct 420
 ctgcgagata ctatccatgt taattcaaat caattcttgg aaatatttgg gccgctcaac 480
 ataaaccttg attttacttg gttctttaat ttgcatccc tgatatatga gaaatataag 540
 gatgacgaca gattcctaga aattgtgaat caagggtgaat ttacgatgac tggaccctgg 600
 attgatgagg ataccccgga gctctattca caccctgtct ttttgggaatt ctatgattct 660
 ttagatgaga tggctaaact gacattccat gagtctatga catttgatgc aactcgcggt 720
 gagaaatgga atcaaaatct acaaaagggt ataaatagat atggcaatga ttataacatt 780
 tttgtgaaag aggccgctgc aggaatcttt agatgtgaag ggaactacc aaaaccaa 840
 catgatgaaa tcacaatcgg ttggaatcaa atggttcaaa gagtgagtac tgagagaaac 900
 ctgactcaag atgtcagcaa gcaaaaacca tctattcatt tcatatgggg tcaacctgac 960
 gaaacatcaa atgcgacaac accaaaacta atcaagattg caaaagcact ccaaaatatt 1020
 tctggcgagt ctacatatat aagcgcattc agagcattgg gtatgcttat ggacttttct 1080
 gagaacacag ctttatatga agcacacact agcaaaactaa aaagtatggc aagacagaca 1140
 tcgaaaagaa ttgatactaa actggaacca atcaaaaatag gcacggcgac aatttattgg 1200
 gaacagcagt ttaaactgga tactgaaata atgaatacaa aagacaaatc acatttgcta 1260
 aaagattttc ttggcatagg gggtcacgtg caattttcaa aaaagaccat tgacgatttg 1320
 gatactgaca aacctactat attagatttc aacaaaaagg aagtcattga tttttgcaa 1380

10

ES 2 617 351 T3

ttccagtatg aaaatgtaaa gaaaatacta tccggagata ataatctaga gcgtatagga 1440
 tgttatntag aagaatatgg tgcaaatatt gcatcatggt caaaggatac atgggatcag 1500
 attaaccaga tagggaagtc aaattactgg gcttgtatta aagatttttc agtcttgatg 1560
 aaaaatatgt tggcagtttc tcaatataat aggcacaata cttttcgtgt agtgtggtgt 1620
 gcaacaata atctgtttg gtttgaatg ccttctctg atattaaagc aaagcgatcc 1680
 acacttgttt acttcttagc tgtggtgcat tctactctc agaatgtgat gcaccaoggt 1740
 gcattgcatg cgacatttaa aactggttca aaatacctta gtatctctaa aggaatgcgt 1800
 ttagataaag aacgatgtca acgcatagtt agttcaccgg gactttttat gttgactaca 1860
 ttgatgtttg caggagacaa tccgacactc aatttgactg atgtcatgaa ttttacattc 1920
 cacacttccc tgtctataac caaagctatg ctgtcattga cagaaccatc aagatatatg 1980
 ataatgaatt cattagccat atccagtcac gttagagatt atatagcaga aaaatttggc 2040
 ccttatacaa agaccagctt ctctgtagta atggcaaact tgattaaaag gggatggtat 2100
 atggcatata atcaaagaga taaagtagac atgaggaata tctgcctaac agattatgaa 2160
 ataactcaaa aaggtgtgag agataacaga gacctatcat caatctggtt tgaaggctat 2220
 gtatcaactaa aagaatatat taaccaata tatctacat tttacttcaa ttcaaaaggt 2280
 ttgcatgaaa agcatcatgt tatgatagat ctggctaaga caatcttaga tatagaaagg 2340
 gaccagagat taaatatccc aggaatatgg tctacaacac ctagaaaaca aactgcaaat 2400
 ttaaataata ctatctatgc agttgcaaaa aatctaataa tggacactgc tagacataat 2460
 tatattagat cacggataga aaacacaaac aacttaataa gatcgatatg cactatttct 2520
 acattcacca gctctaaatc atgtattaaa gtaggcgact ttgagaaaga aaaaagctca 2580
 gcaacaaaaa aggctgcaga ttgcatgtca aaagagataa agaagtatac aattgcaaac 2640
 ccagaatttg ttgatgaaga gttactaaat gcaactataa gacattcacg ctatgaagac 2700
 ttaaaaaaag caatccogaa ttatattgac attatgtcaa ctaaagtatt tgattctctg 2760
 taccagaaaa taaaaaggaa ggagatagat gataaaacca ctgtgtatca tatactctct 2820
 gctatgaaga atcacacaga ttttaagttt acattcttta acaaaggcca aaaaacagca 2880
 aaggataggg aaatattcgt aggcgaattt gaggcaaaaa tgtgcttgta tttagtggag 2940
 aggatatcta aagaacgctg taagttgaat ccagatgaga tgattagtga accaggcgat 3000
 tctaaattga aaaaattaga agagcttgca gagtctgaaa tacgattcac agcagcaact 3060
 atgaaacaga tcaagaacg ctatntagca gaaatgggag aagcaagcca tatgatcgca 3120
 tataaacac atctgttaa gattgaaatc aatgcagaca tgtcaaatg gagtgcccaa 3180
 gatgttttat tcaaatattt ctggttggtt gcattagatc ccgcacttta tctgcaagaa 3240

ES 2 617 351 T3

aaagaaagga tattgtactt cctatgcaat tatatgcaaa aaaagctaat tctgcctgat 3300
 gaaatgctct gtagcatcct tgaccaacgt atcaaacatg aggatgatat aatatatgaa 3360
 atgaccaatg gcttatcgca aaattgggtc aatattaaac ggaactggct gcaggggaat 3420
 ctcaattaca caagtagcta cctacattca tgttctatga atgtttataa gcatattcta 3480
 aagagagcag ccactttact agaaggggaa gttttagtca attctatggt tcattctgat 3540
 gacaatcaca cttcaatagt gatgatccaa gataaattag atgatgatat tgttattgaa 3600
 tttctgcaa aactatttga aaaaatatgt ctaacttttg gaaatcaagc aaatatgaag 3660
 aagacatata taacaaatth cataaaggag ttcgtttcac tttttaatat ttatggtgag 3720
 ccattttctg tttatggtcg ctttattttg acatctgttg gcgattgtgc ttttcttgga 3780
 ccatatgagg atgttgccag taggttgtct gcaacgcaga cagcaattaa gcatggagca 3840
 cctccatcac ttgcatggac tgctattgca ttaactcagt ggataacaca tagcacatat 3900
 aacatgcttc caggtcaaat caatgatcct acttcatcct tacctagtca tgatagattt 3960
 gagctgccta tagaattgtg tggcttaata aattcagaat taccactat agctatagca 4020
 ggtttgaag cagataatct aagttattta gttaggttat caaaaagaat gtcccctata 4080
 catctttgcc gtgaaccaat ccagcatcaa tatgagaata tacatacatg ggatataagt 4140
 aaactgacac aatgtgatat tttcagactt aagcttttaa gatacatgac gttagactca 4200
 actatgtcat ctgatgatgg aatgggogaa actagtgaaa tgagatctag gtctcttctg 4260
 acaccaagaa aattcactac tgcaagttcg ttatctagat tgcatcata tgctgattat 4320
 caaaaaacaa tacaagacca acagaaaatt gaagaattat ttgaatattt tatagccaac 4380
 cctcaactat tggttacaaa aggtgagact tgtgaagagt tctgtatgtc tgtattgttc 4440
 agatacaaca tgcgtaaatt taaagaatca ttgtctatth aaaaccagc tcagctcttc 4500
 atagaacaag tattgtttgc aaataaacca atgatagact atacaagtat tcatgatagg 4560
 ttgtttggta tacaagatga cccaaatata aatgatgcta catgtattat tggcaagaag 4620
 acttttgttg aaacatatca gcaataaaaa attgatgtag aaaaatttac acttgatgta 4680
 gaggatataa agacgatata tagcttctgt ataatgaacg accctatatt agttgcttgt 4740
 gcaacaact tghtaatttc aatacagga gtggagatgc aacgattggg tatgacatgc 4800
 tgttatatgc cggagattaa gagccttaa gtaatttath atagtctgc tctcgtatta 4860
 cgtgcttatg taacagataa ctatgagcaa aaagggatgg agccagatga aatgoggaga 4920
 gatatatatc atttagaaga atttatagag aagacaaaat tgaggacaaa tatgcaaggg 4980
 agaattgcaa ataataaat taagttaatg aagcgagatt tgaaatttga agtgcaggaa 5040
 ttgactaaat tctatcagat ctgttatgaa tatgtgaaat caacagaaca caaaattaa 5100
 atattcatcc ttccaaaaaa ggcttacct cccattgatt tctgctcatt agtaacaggt 5160

ES 2 617 351 T3

aatctgatat cagacaacaa atggatgggtt gttcactatt taaaacaaat aactgtccca 5220
gcaaagaagc cacaaatagc cacatctata gatctggaaa tacaatagc ctacgaatgt 5280
ttcaggctaa ttgcacattt tgctgatatg ttctaaatg atgactccaa aaaagcttat 5340
attaatgcaa ttattaacac atatacatc aaggatgttc aagtatccag tctctacaag 5400
aaaatcaaaa attcgagact acgttcaaaa attataccat tattatatca cctgggcgat 5460
ttgcaacaaa tagacgttga cagatttgat gcagaaaaag cagaagagca gatcacatgg 5520
aataactggc aaacatctcg agaatttact actggtccaa ttgatctatc aatcaaaggt 5580
tatggacggt caataaggat cgtaggtgag gacaacaagc ttacagctgc agaaatgcaa 5640
ttgtcaagag tgagaagtga tatagtatca aggcattggac aggccttatt gaacaaacct 5700
catgggctaa aattagagaa aatggaacca gtgactgatc taaatcctaa attatggtat 5760
attgcatacc aattgcgtga gaaaaagcgg tatcactatg gggctcttag tacatcttat 5820
atagaagagc ataactcaag gatagaagca tctcggatac gtaagactaa taaatggata 5880
ccagtttgcc ctattgctat atcaaaaacaa tcatctgatg gaaagcctag tcttgcaaaa 5940
atccctatgt taaatattgg ggagattaaa tttacaaaac tacagattgc agtagatgat 6000
catgcaatga ttaggaaagc cccatttagt aagatggtgt tctttgatgg cccaccata 6060
cagagcggtg gcattgacat tggaaagctt atgaagaacc aaaatattct caatttgagg 6120
ttagataata tacagagtat aacattatta gatttgtgcc gcataatttc atgccgaggg 6180
tctaaagtgg atcaagatgc atttgaattc ttatctgatg aacctttgga tgaagatgtt 6240
attgatgaat tagatagctc acctgcatta gtggtatctt acacaaagaa atcaacaaa 6300
tccaatagtt tcaaaaatgt tatagttaga gcattgataa gagaatgtga tatatttgaa 6360
gatataatgg acataacaga cgatggattc acatctgata gcaatctaga ggtgtagaa 6420
aacttaacat ggattttaaa tatgctcgca acaaatcagt ggtctacaga actgtagca 6480
tgcatacaca tgtgtttata tcgcaatgag atggatcata tctatcacia ttttcaagtt 6540
ccagaaatat ttgtcgacaa tccaatctca ttaaatgtaa agtgggatga agtaattatg 6600
ttcttaaaca tactgcgaga cagagattac aaatttgagc catgggtgtc tatactgaat 6660
cattccttaa ctaaagctat agagtatgct tacaaaaaga tggaaagagga gaggaagcag 6720
aaatcaacag gcatcaacaa attcttaaag ggtaaaaaaa tgggtggcag atcaaagttt 6780
gatttccagt agcttgatct taaataatac ataatctttg ccccaaatct gtattatata 6840
aataattcta aagtagtttc atgtaattag gggcacacta ct 6882

<210> 4
<211> 839
<212> ARN
<213> virus de *Schmallenberg*

5

<400> 4

ES 2 617 351 T3

aguaguguuc uccacuuauu aacuaucuuu acagaagccu ugcaguauaa uggugugcaa 60
 uacaauagaca uauugcacgg aaauugaaga ucugugauga agagguuuag auguugauac 120
 cgaaugcug caagaagguu cuagcagcag gagagaaucc agauuuggcc caggcaagcu 180
 guccaacaga auuaaaagca gcuuuuuuu cuuuuuuuu cugagucauc cauucucag 240
 cagucuuugu uccauagcgu uggcggagga cuuuuuucau aaaauuuaca uccauuuugu 300
 ccuugaggac ccuugcauu ucauaacua guggauagaa gucaaaagca ucaaggaaca 360
 uuucggcccc aggugcaau ccaagauaca uuguuaaacc aucggcccag gugcauccu 420
 uaaccucagc aaggggcaug acaaucugag cacuagcuuc agcuaguuug aggacacuag 480
 ccuugcaugu aucagcaauc caacgugcua gauauccuga cauccuguga aguguaaugg 540
 cauugucugg cacaggauuu gagacauuu ggggaaaug guuauaacc acuguaaaau 600
 ugaccccacc aaaaguaaga ucgacacuug guugugccgu cuuauguagg accaucuugg 660
 ccuucucug guugaggaag aagacucuag caacaccgaa guugaguugu ugcccuaacu 720
 uaccauuaa ugccacauac cggaccuccg gguuaaauug agcugcauuc cguuguggua 780
 caucuuaaa aaugaauugg cuugacauau uucuguagu aauaguggag cucacuacu 839

<210> 5
 <211> 4373
 <212> ARN
 <213> virus de *Schmallenberg*

5

<400> 5

aguaguguuc uaccacauga aaaacuucuc agcugaauaa uuacauauau auguguaacc 60
 acauauauau guuguuuuuu guuuauuuu uauuguuuuu auuuauucau uuuaauugc 120
 ucauuguuuau aaggcuuau acuuuuuuu auuuuccauu ugguaauuuc ucucuuugua 180
 uuccaauaaa ccuuuuagcc guuugcacag ugguauuuuu auguaauagaa acagaauuag 240
 cauaaucaaa gagauuuuuu uauauuuugu cagucuccaa uagaaagaua gguugccaaa 300
 uagaggcuga aaauuucgc uauuccuuc uuuuuuuuu cugcaaagcc auguagaaca 360
 cuuuuuuauca uguugcucga uguaagaugu uucaucuaag gaauucaaaa cauuuuuugg 420
 uugauuuuuu gauauugaag guuuugugua agcagaagcu gagcacacac uuacugaaac 480
 ugucucuguu gcuagugggc aguuuuuuu aauggaauac ucgcucugca ucggauccag 540
 ugcuauuuuu uuaaanguaug uaucgcaguu acuuuuuuu gaacaacucc cgaugguauu 600
 gguacucaau uugagugcgc aagccauucc uucagggcag ccuaaacaac caccacaccu 660
 gaucucaucu auugugacug uugcuugugu ugaauugca uuguagucaa aaucuccuaa 720
 cauaauuuu uauuugaauug uaccacgcu ugaaacuuuu uuaugcucu ccauugacu 780

10

ES 2 617 351 T3

gguagaagca	auaguuauug	uauuauucug	uuccaagaga	agacaagacu	gauaugaguu	840
aucaaagcau	cuucgaagga	ugacaucuuu	acgauugaau	gcauggcaaa	cauaaucaaa	900
uuuugggguu	cccgauccaa	ugaucccuuc	agaauuaau	uggacugagc	cacauuucuu	960
ugcugucgaa	ccuaagucan	ugauaucucc	aacauaaaac	uucccauucc	ugacugcaau	1020
uauuuuuggc	auagagucca	uuugaaucgu	uuggauaucu	aauuuaucc	ugucgcuaau	1080
uaaagguugg	agaacaucaa	cgguacugca	gaaugauuca	ugggccaugg	uuauacaaac	1140
uucacaaucc	uuuuguucaa	uacuagacuu	cuuguauauc	uuauauucag	gccuuuuuu	1200
gucuuagacu	gacccauaua	aacaaccauc	uuuuauugcc	aagcaacccc	auucuuacaa	1260
gccccauua	cuugaucuuu	ccuuugagaa	ugugacccaa	ccaucuuugau	gugguauugg	1320
gcuugggcac	uucccgguac	auaccucuuu	gugcuuggca	uuuauuccaa	uugugggucc	1380
uguuucanau	agaaaucgau	acgaugcuuu	uuuuuuuacu	cuucugacau	agauaaaau	1440
ggaaaagagg	cuuucuccau	uuggcauggc	aaauuuauuc	ccugcugaua	aaccuuuuuu	1500
ugcaggggag	ugcgacucga	uauaacuauu	ucuaauacca	uuugauaccu	uguccccauu	1560
caaugucauu	guuuuguaau	gaggaauuu	ugcuggaagg	uuuuuuuau	guuuuuuau	1620
gugcauaguu	aaaucauuug	caauaucuga	cugaagcgcu	gcuauquagu	uuucauuuuc	1680
uggaugauua	auagauuuag	guguaauuu	auuucgauaa	cuuguaucuu	auacuauuuc	1740
ugaacaacua	cuggaucuga	augcauaacg	caaguccagg	cauuuugcug	auaaacagua	1800
caguguuua	ucguuaguuu	ucgaaugggc	uuuagcugaa	acauaguaaa	auaagccauu	1860
ugagcauuuc	gcaauuugcc	auugaugacc	ccuuacauua	caugauccaa	aucucuucac	1920
guugcaugau	gguauuccag	uacuauaugg	cgauucugaa	uaagucanau	cacuuacuuu	1980
gcuuuuuuu	guaguuauug	uucuuucugc	ugguucaaac	aucucuaggg	aauguguguc	2040
acugcugcag	gcuuguugcu	ggucucuuuu	auguuugua	accccuaaa	augggccuuu	2100
auacaucua	gauuugcaug	auauauauuc	uccugggugu	gugacaccac	guggugagua	2160
gcuuaccacu	uuuuguggug	auuugcauac	caguauuggu	guuggaccug	gaucuuuuug	2220
auccaaguuu	cugugggcuc	cuuuuaucaa	agauaaugua	guuaauuuu	gagggguuuu	2280
uucuuuugc	acguuugcac	caaggauaaa	aucaacaaau	uccagaaauc	cuuuuaguu	2340
uaauuuugac	ugcgauuuag	gagaaagcuu	accuuugaug	uggcguaaag	cuugguaguc	2400
uuuuguuugu	uugauuuugau	caagcaagac	ucgaccuaau	ccagggacua	uauaucucau	2460
uauuuucaau	auuuuuuua	ugucaugcuc	aaagcgauuc	ggauagccau	cauuuuuuu	2520
ugacuuuucc	cuagcguggu	cugucuuuggu	ugaugugcac	auuugcauag	acuccaagca	2580
ucuaacauua	uguuuuagag	gauucguuuu	gcacacuccu	aaggugaaac	uucgggccag	2640

ES 2 617 351 T3

ugcuuuccau uguauguuac uugcugaauu gauagugaaa auaucaugca cuuggagagg 2700
 gcacaacugu gauuuuauau acucauaaua aacuugaguc ucaauaacac uagauucgga 2760
 aauaaaccua ucuaugacau uacaguucua guuuaaacuu uuuauuaauu cuuguucguc 2820
 uacugaagca ucugaaauua uuucauugau uacaacuggu gagcuuguuu uauuuugaua 2880
 aaaugccaug cacuuacuca ggugcucuau uguaagcuga guugauugaa uguuuuugca 2940
 guuaauacua guuuucugcg ucauuacaau uguugggacu aacagaagca uaaagauuau 3000
 caaccgguc cuauuuaaac uugauucaa uuugaacaga cauucucag aggcucugug 3060
 aauguuuag ccuuguuuu cugcgcauac acaacuagg cacuuguuug uaaaguuguc 3120
 cauuaucuu acuccaguc guucauguac cauaccaca aagcugcagu ugcaguacaa 3180
 gauauacuuu gcugccuuuu uaaguaauu uaacacaauu augcauguac aggaauauu 3240
 aaagcuauu gugucauaa uugucaagcu uuugauuuu gcuagcucuc uuuuacaugu 3300
 aauauacucg ucuggcaguu uuucuauauc gauacauuga cucgauauag gugugauaaa 3360
 ugagaaaaau aucagugaug uuaucaaca uagcacuaa uuggauuuu uacuuuuaca 3420
 cauuuuccuu guuuucggca augcuuuua gccagaaca uuguuacaca ugcgaugcaa 3480
 uuugagugau ucagugguag uguaaaucuu uccacagaug caugucgag ggcauuugu 3540
 aaagggauu acugcuaaca ggcauuuuu acacaauuu aauuuuuu uguacauua 3600
 agcauuaau uucacaaaug gauaaaauu aggaaugaac acauauacua uauauguuu 3660
 cgucaauauc aucaucauga cagaccacac uauuauuuga guuacuagca guauuaauuc 3720
 aagauucgua caaaauguu cgaucauaa uuccggcagg auugaucuu uaaaauagcg 3780
 ggugcaugac uuauugguau ggaaacaugc augaaaauu aguguuuuu auccacaugu 3840
 uaccucaaug gauucgcaug uguuuuccaa aggaaucuca auuuuguuuu uaaaccaacc 3900
 ugauacaugc auugugcccg agauucgguu gugguuauu cgauaugaau ucaauuaaac 3960
 uucgccagua ucuuuuauca gugcuauuuc gcauucacu cugcaugauu gcauuuuagg 4020
 gauuaaugug ccaguauuau cuauaucuaa uaucuaaaag gaaccguggu caucauaaa 4080
 uggauugcaa gaugccaau ccuucaccug auuaaaacga uauuuuuu uacagcagc 4140
 caaccgaucu ccugauuuau aauguucagc auuugauuuu augauagaua ugucgucuuu 4200
 cacacagcau ucugaaacga ccuuugaugu guuaacaguu uuaaccaguu cgccauucag 4260
 gaagcaccua gaccucuaug ugccuuccuu aagugggagu gcaaaagcua aacaggcuaa 4320
 guuagauauc aagacaaugu ugagaagcau uuugauugug guaguucacu acu 4373

<210> 6
 <211> 6882
 <212> ARN
 <213> virus de *Schmallenberg*

5

<400> 6

ES 2 617 351 T3

aguagugugc ccuaauuac augaaacuac uuuagaauua uuuauuaau acagauuugg 60
 ggcaaagauu auguauuaau uaagaucaag cuacuggaaa ucaaacuung aucugccacc 120
 cauuuuuuua ccuuuaaga auuuguugau gccuguugau uucugcuucc ucuccucuuc 180
 caucuuuuug uaagcauacu cuauagcuuu aguaaaggaa ugauucagua uagacaccca 240
 uggcucaaa uuguauucuc ugucucgcag uauguuuaag aacauaaua cuucauccca 300
 cuuuacauuu aaugagauug gauugucgac aaauuuucu ggaacuugaa aaugugaua 360
 gauaugaucc aucucauugc gauauaaaca cauguguugc caugcuaaca guucuguaga 420
 ccacugauuu guugcgagca uuuuuuuuu ccauguuuag uuuucuaaca ccucuagauu 480
 gcuaucagau gugaauccau cgucuguuuu guccauuaa ucuucaaaua uaucacauuc 540
 ucuuaucuuu gcucuaacua uaacuuuuuu gaaacuauug gauuugguug auuuuuuuu 600
 guaagauacc acuaaugcag gugagcuauc uauuucuaa auaacuucuu cauccaaagg 660
 uucaucagau aagaauucaa augcaucuug auccacuuaa gaccucggc augaaaauu 720
 gcggcacaaa ucuaauaauug uuauacucug uauuuuucu aaccucaaau ugagaauuu 780
 uugguucuu auaagcuuc caaugucaau gccaccgcuc uguauuggug ggccaucaaa 840
 gaacaccauc uuacuaaaug gggcuuuuccu aaucuuugca ugaucaucua cugcaaucug 900
 uaguuuugua auuuuaaucu ccccauuuu uuacauaggg auuuuugca gacuaggcuu 960
 uccaucagau gauuguuuug auauagcaau agggcaaacu gguauccauu uauuagucuu 1020
 acguauccga gaugcuucua uccuugaguu augcucuucu auauaagau uacuaaagac 1080
 cccauaguga uaccgcuuuu ucucacgcaa uugguauugca auauaccua auuuaggauu 1140
 uagaucaguc acugguucca uuuucucuaa uuuuagccca ugagguuuu ucaauaaagc 1200
 cuguccaugc cuugauacua uaucacuucu cacucuugac aaugcauuu cugcagcugu 1260
 aagcuuguug uccucaccua cgauccuuau ugaccgucca uaaccuuuga uugauagauc 1320
 aauggacca guaguauuuu cucgagaugu uugccaguua uuccauguga ucugcucuuc 1380
 ugcuuuuucu gcaucaaauc ugucaacguc uauuuuguugc aaucgcccc ggugauaua 1440
 uaaugguaa auuuuugaac guagucugc auuuuugau uucuuuuga gacuggauac 1500
 uugaacaucc uuguauuuu auguguuaa auuugcaua auauaagcuu uuuuggaguc 1560
 aucauuuagg aacauaucag caaaaugugc auuugccug aaacauucgu aggcuauuug 1620
 uauuuccaga ucuaugaug uggcuuuuug ugccuucuuu gcugggacag uuuuuuuuu 1680
 uaaauguga acaaccaucc auuuguugc ugauaucaga uuaccuuaa cuaaugagca 1740
 gaaaucaaug ggaguguaag ccuuuuuugg aaggauuuu auuuuuuuu uguguucugu 1800
 ugauuucaca uauucuaaac agaucugaua gaauuuuguc aaucucgca cuucauuuu 1860

ES 2 617 351 T3

caaaucucgc uucauuuacu uaauuucauu auuugcaauu cucccuugca uauuuguccu 1920
 cauuuuuguc uucucuauaa auucuuucuaa augauauaua ucucuccgca uuucaucugg 1980
 cuccauuccu uuuugcucan aguuuucugu uacauaagca cguaaucga gagcaggacu 2040
 augauaaau acuuuaaggc ucuuaaucuc cggcauauaa cagcauguca uacccaucg 2100
 uugcaucucc acucccugua uugaaauuaa caaguuguuu gcacaagcaa cuaauauagg 2160
 gucguucauu auacagaagc uauauaucgu cuuuauaucc ucuacaucaa guguaaaauu 2220
 uucuaucauca auuuuuuuuu gcugauaugu uucaacaaaa gucuucucugc caauauaca 2280
 uguagcauca uuuauuuuug ggucucucug uauaccaaac aaccuaucau gaauucuggu 2340
 auagucuauc auugguuuuu uugcaacaaa uacuuguucu augaagagcu gagcuggguu 2400
 uugaauagac aaugauucuu uaaauuuacg acuguuguau cugaacaaa cagacauaca 2460
 gaacucuuca caagucucac cuuuuguaac caauaguuga ggguuuggcua uaaaauauuc 2520
 aaauaaucuu ucauuuuucu guuggucucug uauuguuuuu ugauaaucag cauangaug 2580
 caaucuagau aacgaacuug caguagugaa uuuucuuuggu gucagaagag accuagaucu 2640
 cauuucacua guuucgcca uuccaucauc agaugacaua guugagucua acgucaugua 2700
 ucuuaaaagc uuaagucuga aaauaucaca uuugucagau uuacuuauau cccauguaug 2760
 uauauucuca uauugaugcu ggauugguuc acggcaaaaga uguauagggg acauucuuuu 2820
 ugauaaccua acuaaaauac uuagauuauc ugcuuccaaa ccugcuauag cuauaguggg 2880
 uaaauucugaa uuuauuaagc cacacaauuc uauaggcagc ucaaaucuau caugacuagg 2940
 uaaagaugaa guaggaucau ugauuuugacc uggagcaug uuauaugugc uauguguuuu 3000
 ccacugaguu aaugcaauag caguccaugc aagugaugga ggugcuccau gcuuaauugc 3060
 ugucugcguu gcagacaacc uacuggcaac auccuauau gguccaagaa aagcacauc 3120
 gccaacagau gucaaaauaa agcgaccuaa aacagaaaau ggcucaccau aaauuuuaa 3180
 aagugaaacg aacuccuuua ugaaauuugu uauauauguc uucuucauau uugcuugauu 3240
 uccaaaaguu agacauuuuu uuucaaaauag uuuugcagaa aaucuaauaa caauaucuc 3300
 aucuaauuuu ucuuggauca ucacuaauga agugugaauug ucaucagaau gaaccuaga 3360
 auugacuaaa acuuccccuu cuaguuuagu ggcugcucuc uuuagaauau ccuuauaaac 3420
 auucauagaa caugaauua gguagcuacu uguguaauug agauuccccu gcagccaguu 3480
 ccguuuuaa uugaccuau uuugcgauaa gccauugguc auucauaua uuauaucuc 3540
 cucauguuuug auacguuggu caaggauucu acagagcauu ucaucaggca gaauuagcuu 3600
 uuuuuugcaua uaaugcaua ggaaguaca uauccuuucu uuuucuuugca gaaaaagugc 3660
 gggaucauu gcaacaacc agaaauuuu gaauaaaaca ucuugggcac uccuuuuuga 3720

ES 2 617 351 T3

caugucugca uugauuucaa ucuuaacaga augugguuuu uaugcgauca uauggcuugc 3780
 uuucuccdauu ucugcuaaaau agcguucuuu gaucuguuuc auaguugcug cugugaaucg 3840
 uauuucagac ucugcaagcu cuucuaauuu uuucuaauua gaucgcccug guucacuaau 3900
 caucucaucu ggauucaacu uacagcguuc uuuagauauc cucuccacua aaucacagca 3960
 cauuuuugcc ucaaaauccg cuacgaaauu uucccuauc uuugcuguuu uuuggccuuu 4020
 guuaaagaau guaaacuuaa aaucugugug auucuucaua gcagagagua uaugauacac 4080
 aguggguuuu ucaucuaucu ccuuccuuuu uauuuucugg uacagagaau caaaucuuu 4140
 aguugacaua augucaauau aaucgggguu ugcuuuuuuu aagucuucuu agcguugaug 4200
 ucuuauaguu gcuuuagua acucuucauc aacaaauucu ggguuugcaa uuguauacuu 4260
 cuuuauucuu uuugacaugc aaucugcagc cuuuuuuguu gcugagcuuu uuucuuucuc 4320
 aaagucgccu acuuuaauac augauuuaga gcugugaaau guagaaauag ugcauucga 4380
 ucuaauuaag uuguuugugu uuucuaucgg ugaucauaa uaauuuguc uagcaguguc 4440
 cauuuuuaga uuuuuugcaa cugcauagau aguuauuuu aaauuugcag uuuguuuucu 4500
 agguuguugua gaccuuauuc cugggaaauu uaauucucugg ucccuuuua uaucuaagau 4560
 ugucuuagcc agaucuauc uaaucgugc cuuuucaugc aaaccuuuug aaugaagua 4620
 aaauugguaga uauuuuuggu uaauuuuuc uuuuagugau acauagccuu caaacagau 4680
 ugaugauagg ucucuguuuu cucucacacc uuuuuuguu auuucauaa cuguuaggca 4740
 gauauuccuc augucuaucu uaucucuuug auuuauugcc auuuuacuc cccuuuuuu 4800
 caaguugcc auuacuacag agaagcuggu cuuuuuuuuu gggccaaau uuucugcuau 4860
 auuauucua acaugacugg auauugcuua ugaauucauu aucauuuuc uugaugguuc 4920
 ugucuuagac agcauagcuu ugguuuuaga cagggaugug uggaauuaa aaucuaugac 4980
 aucagucuaa uugagugucg gauugucucc ugcaaacuc aauguaguc acuuuuuag 5040
 ucccggugaa cuuacuauuc guugacaucg uuuuuuuuc aaacgcuuu cuuuagagau 5100
 acuaagguau uuugaaccag uuuuuuuuuu cgcaugcauu gcaccguggu gcaucacuu 5160
 cugaggagua gaauucaaca cagcuuagaa guaaacaagu guggaucgcu uugcuuuuu 5220
 aucagaagaa ggcauuucaa acccaaacag auuuuuuuuu gcacaacaca cuacacgaa 5280
 aguauuguc cuuuuuuuuu gagaaucgc caacuuuuuu uucaucaaga cugaaaauc 5340
 uuuaaucaa gccaguuuu uugacuuccc uaucugguua aucugauccc auguauccuu 5400
 ugaacauagau gcauuuuuu caccuuuuuu uuuuuuuuuu cauccuuuac gcucuaaguu 5460
 auuauucucc gauuaguuuu ucuuuuacuu uucauucugg auuuugcaaa aucaaugac 5520
 uuuuuuuuuu uugaaucua auuuuuuuuu uuugucagua uccaaucgu caaugguuu 5580
 uuuuuuuuuu ugcaugucac cccuuuugcc aagaaauuc uuuuuuuuuu guuuuuuuuu 5640

ES 2 617 351 T3

uuuuguauuc auuauuucag uauccaguuu aaacugcugu ucccauauaa uugucgccgu 5700
 gccuauuuug auugguucca guuuaguauc aaauuuuuu gaugucuguc uugccauacu 5760
 uuuuaguuuug cuagugugug cuucauauaa agcuguguuc ucagaaaagu ccuaaagcau 5820
 acccaaugcu cugaaugcgc uuauauaugu agacucgcc aaaaauuuuu ggagugcuuu 5880
 ugcaaucuug auuaguuuug guguugucgc auuugauguu ucgucagguu gaccccauau 5940
 gaaaugaaua gaugguuuuu gcuugcugac aucuugaguc agguuucucu caguacucac 6000
 ucuuugaacc auuugauucc aaccgauugu gauuucauca ugauuugguu uuggguaguu 6060
 cccuucacau cuaaagauuc cugcagcggc cucuuucaca aaaauguuau aaucaugcc 6120
 auaucuauuu auaacuuuuu guagauuuug auuccauuuu ucaccgcgag uugcauauaa 6180
 ugucauagac ucauggaauug ucaguuuagc caucucaucu aaagaaucau agaauuccaa 6240
 aaagacaggg ugugaauaga gcuccggggg auccucauca auccaggguc cagucaucgu 6300
 aaauucaccu ugauucacaa uuucuaggaa ucugucguca uccuuauauu ucucauauau 6360
 cagggauucgc aaauuaaaga accaaguaua aucaagguuu auguugagcg gcccaauau 6420
 uucaagaau ugauuuugaau uaacauggau aguauucgc agagggucag cacggaugau 6480
 cacaacuua aaaucaaacg gcaauucuga caaugcgucu ccaagaucu ggguguacuu 6540
 uucauaaguu uuuugaccu augcaugauc aguugauacu uuauagucaa ugauauaaag 6600
 cuugccauug ugaaugauaa aaauugucgg uguacaauug cgaauuguu aagcagugcc 6660
 agcuggcaga aaaucaagaa guaugucgua agcuggaaca uccugccgga auucgauauc 6720
 cagguaauaa cauaccucuc uaccaaagua gucaugucua gccaugagaa gaucagcaac 6780
 aaugucuug gcuucucag cacuucgaca cugguugauc cuaucucuaa aauguuuuu 6840
 cuuguauguc uccauaguga uuguauuag gguuacacua cu 6882

<210> 7
 <211> 839
 <212> ADN
 <213> virus de *Schmallenberg*

 <400> 7

5

ES 2 617 351 T3

agtagtgaac tccactatta actacagaaa tatgtcaagc caattcattt ttgaagatgt 60
 accacaacgg aatgcagcta catttaaccc ggaggctcggg tatgtggcat ttattggtaa 120
 gtatgggcaa caactcaact tcggtgttgc tagagtcttc ttctcaacc agaagaaggc 180
 caagatggtc ctacataaga cggcacaacc aagtgtcgat cttacttttg gtgggggtcaa 240
 atttacagtg gttaataacc attttcccca atatgtctca aatcctgtgc cagacaatgc 300
 cattacactt cacaggatgt caggatatct agcacgttgg attgctgata catgcaaggc 360
 tagtgcctc aaactagctg aagctagtgc tcagattgtc atgccccttg ctgagggtaa 420

 gggatgcacc tgggccgatg gttatacaat gtatcttga tttgcacctg gggccgaaat 480
 gttccttgat gcttttgaact tctatccact agttattgaa atgcataggg tctcaagga 540
 caatatggat gtaaatttta tgaaaaagt cctccgcaa cgctatggaa caatgactgc 600
 tgaagaatgg atgactcaga aaataacaga aataaaagct gcttttaatt ctgttgaca 660
 gcttgcctgg gccaaatctg gattctctcc tgctgctaga accttctgc agcaattcgg 720
 tatcaacatc taaacctctt catcacagat cttcaatttc cgtgcaatat gtctatgtat 780
 tgcacacat tatactgcaa ggcttctggt aagatagtta ataagtggag aacactact 839

<210> 8
 <211> 839
 <212> ARN
 <213> virus de *Schmallenberg*

5

<400> 8

aguaguguuc uccacuuaau aacuaucuua acagaagccu ugcaguauaa uggugugcaa 60
 uacauagaca uauugcacgg aaauugaaga ucugugauga agagguuuag auguugauac 120
 cgaaauugcug caagaagguu cuagcagcag gagagaaucc agauuuggcc caggcaagcu 180
 guccaacaga auuaaaagca gcuuuuuuuu cuguuuuuuu cugagucauc cauucuucag 240
 cagucauugu uccauagcgu uggcgggagga cuuuuuucau aaaauuuaca uccauauugu 300
 ccuugaggac ccuaugcau ucaauaacua guggauagaa gucaaaagca ucaaggaaca 360
 uuucggcccc aggugcaau ccaagauaca uuguauaacc aucggcccag gugcaucccu 420
 uaaccucagc aaggggcaug acaaucugag cacuagcuuc agcuaguug aggacacuag 480
 ccuugcaugu aucagcaauc caacgugcua gauauccuga cauccuguga aguguaaugg 540
 cauugucugg cacaggauuu gagacauuu ggggaaaug guuauuaacc acuguaaaau 600
 ugaccccacc aaaaguaaga ucgacacuug guugugccgu cuuauaguag accaucuugg 660
 ccuucuucug guugaggaag aagacucuag caacaccgaa guugaguugu ugcccacuac 720
 uaccauuaaa ugccacauac ccgaccuccg gguuaaaugu agcugcauuc cguuguggua 780
 caucuuaaaa aaugaauugg cuugacauau uucuguagu aauaguggag uucacuacu 839

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica, que comprende el virus de Schmallerberg (SBV) inactivado.
- 5 2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el SBV comprende:
 - (a) un segmento de ARN pequeño (S) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 97,8 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:7,
 - 10 - (b) un segmento de ARN medio (M) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:2,
 - (c) un segmento de ARN grande (L) que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:3 o
 - 15 - (d) combinaciones de los mismos.
3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho SBV comprende:
 - 20 - (a) un segmento S de ARN, caracterizado por que el segmento S de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 97,8 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO:8,
 - (b) un segmento M de ARN, caracterizado por que el segmento M de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 82,2 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5;
 - 25 - (c) un segmento L de ARN, caracterizado por que el segmento L de ARN tiene una secuencia que tiene al menos el 93 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6, o
 - (d) combinaciones de los mismos.
4. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el SBV está inactivado por tratamiento térmico o con un agente inactivador de virus.
- 30 5. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el agente inactivador de virus es un compuesto de aziridina.
6. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el compuesto de aziridina es etilenimina binaria (BEI).
- 35 7. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una cantidad de SBV que es equivalente a una titulación de virus de por lo menos aproximadamente 10^5 TCID₅₀/ml por dosis o en la que el SBV tiene un título pre-inactivación de por lo menos aproximadamente 10^6 partículas de SBV por mililitro.
- 40 8. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene además uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables o que contiene además hidróxido de aluminio, saponina o combinaciones de los mismos.
- 45 9. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste en disolventes, medios de dispersión, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la adsorción.
- 50 10. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso como un medicamento.
11. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso como una vacuna.
12. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en un método para generar una respuesta inmunitaria al SBV en un animal, en el que la composición inmunogénica se debe administrar a dicho animal.
- 55 13. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en un método de
 - 60 - tratamiento o prevención de la infección por SBV en un animal o
 - tratamiento o prevención de la viremia o las malformaciones inducidas por el SBV,
 en el que a dicho animal se le debe administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición inmunogénica.

65

14. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en un método para

- inducir una respuesta inmunitaria contra el SBV en una manada de animales o
- prevenir o reducir la viremia o las malformaciones inducidas por el SBV en una manada de animales, o
- 5 – prevenir o reducir la transmisión del SBV en una manada de animales,

en la que dicha composición inmunogénica se debe administrar a los animales en necesidad del mismo.

10 15. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en la que la composición inmunogénica se debe administrar en una sola dosis o en dos dosis.