

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 948**

51 Int. Cl.:

C12N 15/861 (2006.01)

C12N 15/33 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2013 PCT/KR2013/004784**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13180501**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2013 E 13796479 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2871240**

54 Título: **Adenovirus recombinante para expresar simultáneamente interferón alfa de cerdo e interferón gamma de cerdo**

30 Prioridad:

31.05.2012 KR 20120058410

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

10.04.2018

73 Titular/es:

**REPUBLIC OF KOREA (MANAGEMENT:
MINISTRY OF AGRICULTURE, FOOD AND RURAL
AFFAIRS, ANIMAL AND PLANT QUARANTINE
AGENCY) (100.0%)
175, Anyang-ro Manan-gu
Anyang-si, Gyeonggi-do 430-757, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SU MI;
PARK, JONG HYEON;
LEE, KWANG NYEONG;
KO, YOUNG JOON;
LEE, HYANG SIM;
SHIN, YEUN KYUNG y
KIM, BYOUNG HAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 662 948 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

Adenovirus recombinante para expresar simultáneamente interferón alfa de cerdo e interferón gamma de cerdo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un virus recombinante que presenta un efecto inhibitor frente al virus de la fiebre aftosa, y más particularmente, a un adenovirus recombinante que tiene insertado en el mismo el gen 2A de la fiebre aftosa que permite que se expresen conjuntamente el interferón alfa y el interferón gamma porcino para así ser aplicados (inoculados o administrados) al mismo tiempo, aumentando de ese modo los efectos inhibitorios frente al virus de la fiebre aftosa.

Técnica anterior

15 La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad vesicular viral que afecta a animales artiodáctilos y se caracteriza por rápida replicación y propagación. Esta enfermedad está clasificada como una enfermedad de la lista "A" por la "Office International des Epizooties" (OIE) debido a su impacto económico, y actúa como un factor muy importante en el comercio de ganado entre países. Es un virus de ARN ambisentido de cadena sencilla que pertenece al género *Aphthovirus* de la familia *Picornaviridae*, y se clasifica en siete serotipos diferentes (A, O, C, Asia1, SAT 1, SAT2 y SAT3).

25 Aproximadamente 7 días después de la vacunación de emergencia de cerdos frente al brote de fiebre aftosa, se producen anticuerpos frente al virus de la fiebre aftosa (J. S. Salt y col., 1998, *Vaccine* 16:746-754). Sin embargo, en el caso de los cerdos, la producción de anticuerpos por vacunación es tardía, y la cantidad de virus soltada es mucho mayor que la cantidad de virus del ganado. Además, los cerdos sueltan el virus dentro del órgano respiratorio a las 24 horas después de la infección, y por esta razón, el riesgo de propagación del virus se incrementa más antes de la producción de anticuerpos después de la vacunación.

30 Por tanto, se han propuesto inhibitorios del virus de la fiebre aftosa. Particularmente, se publicó que la aplicación de interferones tipo I incluyendo interferón alfa por medio de un adenovirus recombinante como sistema de administración proporciona protección eficaz frente al virus de la fiebre aftosa (Chinsangaram, J. y col., 2001, *Journal of Virology* 75:5.498-5.503), y desde entonces se probó que la aplicación de un adenovirus recombinante que expresa interferón gamma en combinación con un adenovirus que expresa interferón alfa presenta efectos inhibitorios aumentados frente al virus de la fiebre aftosa (Maraes MP y col., 2007, *Journal of Virology* 81:7.124-7.135). El interferón alfa es el inhibitor directo de virus mejor conocido, y el interferón gamma presenta efectos inhibitorios directos e indirectos frente al virus induciendo la secreción de citoquinas en linfocitos T auxiliares y linfocitos citolíticos naturales. A pesar del hecho de que el uso del interferón alfa en combinación con el interferón gamma tiene la ventaja de inducir diversas inmunidades, el uso de interferón alfa en combinación simple con interferón gamma tiene una desventaja de baja eficacia inhibitoria, debido a que el efecto antiviral del interferón gamma es relativamente inferior al del interferón alfa.

45 Mientras tanto, la secuencia de 2A del virus de la fiebre aftosa es una parte del gen del virus de la fiebre aftosa que se auto-escinde, y cuando se inserta en un gen, se auto-escinde después de la transcripción del gen para permitir la expresión de dos proteínas. Se publicó que la secuencia de 2A tiene un pequeño tamaño génico en comparación con la secuencia de IRES (sitio interno de entrada en el ribosoma) que tiene una función similar y que la eficacia con la que el gen se escinde en dos proteínas es aproximadamente 9 veces mayor que la de la secuencia de IRES (SH Ha y col., 2010, *Plant biotech.*, 8:928-938).

Descripción

50

Problema técnico

Por consiguiente, los presentes inventores han hecho esfuerzos para desarrollar un inhibitor capaz de inhibir más eficazmente virus en animales de una manera más rentable y conveniente usando un interferón que es adecuado para su uso en animales y que puede presentar un alto efecto inhibitor, y como resultado, han encontrado que, cuando la secuencia de 2A del virus de la fiebre aftosa se inserta de manera que el interferón alfa porcino y el interferón gamma porcino se expresan conjuntamente, se puede obtener el efecto de la aplicación de estos interferones a la vez, y por tanto se puede obtener el efecto de inhibir más eficazmente el virus de la fiebre aftosa, completando de ese modo la presente invención.

60

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un vector de adenovirus recombinante como se define en las reivindicaciones que sea capaz de expresar conjuntamente interferón alfa porcino e interferón gamma porcino.

Solución técnica

Para conseguir los anteriores objetivos, la presente invención proporciona un vector de adenovirus recombinante o plásmido como se define en las reivindicaciones que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, y que comprende el gen del interferón alfa porcino, el gen 2A del virus de la fiebre aftosa y el gen del interferón gamma porcino, que están colocados en ese orden.

Efectos ventajosos

El vector de adenovirus recombinante según la presente invención puede expresar conjuntamente interferón alfa porcino e interferón gamma porcino para permitir que el interferón alfa porcino y el interferón gamma porcino se apliquen a la vez. Además, se puede usar de una manera más rentable y conveniente en comparación con cuando estos interferones se usan solos o en una mezcla. También, pueden proporcionar el efecto de inhibir más eficazmente el virus de la fiebre aftosa a un alto nivel.

Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra una estrategia de diseño para la producción de un adenovirus recombinante que expresa conjuntamente interferón alfa porcino e interferón gamma porcino.

La Figura 2 es un conjunto de imágenes que muestran los resultados del análisis por transferencia Western realizado para examinar las expresiones del interferón alfa porcino y el interferón gamma porcino en un adenovirus recombinante.

La Figura 3 es una gráfica que muestra la inhibición del virus de la fiebre aftosa en función del título de un adenovirus recombinante.

La Figura 4 es una gráfica que muestra que un adenovirus recombinante que expresa conjuntamente interferón alfa porcino e interferón gamma porcino presenta un efector inhibitorio aumentado frente al virus de la fiebre aftosa en ratones en comparación con los adenovirus recombinantes que expresan interferón alfa porcino e interferón gamma porcino, respectivamente.

Mejor modo

La presente invención proporciona un vector de adenovirus recombinante como se define en las reivindicaciones que se diseña insertando los genes de interferón alfa porcino e interferón gamma porcino en un gen sencillo e insertando la secuencia de 2A del virus de la fiebre aftosa entre los genes de interferón para así expresar conjuntamente los dos interferones.

La presente invención también proporciona un vector de expresión de proteína diseñado por la inserción de los genes de interferón alfa porcino e interferón gamma porcino en un gen sencillo y la inserción de la secuencia de 2A del virus de la fiebre aftosa entre los genes de interferón para expresar conjuntamente los dos interferones. El vector de expresión de proteína es un plásmido como se define en las reivindicaciones. El vector de adenovirus recombinante o plásmido según la presente invención expresa conjuntamente el interferón alfa porcino y el interferón gamma porcino y, por tanto, se puede usar de una manera más rentable y conveniente en comparación con cuando estos interferones se usan solos o en una mezcla. Además, puede inhibir más eficazmente el virus de la fiebre aftosa.

La presente invención también proporciona un inhibidor del virus de la fiebre aftosa que comprende el anterior vector de adenovirus recombinante o plásmido. El vector de adenovirus recombinante según la presente invención presenta un efecto significativamente alto sobre la inhibición del virus de la fiebre aftosa en comparación con los virus recombinantes que expresan el interferón alfa y el interferón gamma, respectivamente, al mismo título. Por tanto, el vector de adenovirus recombinante según la presente invención puede presentar dos efectos y proporcionar un alto efecto a un bajo título y, por tanto, se puede usar como un novedoso inhibidor del virus de la fiebre aftosa con eficacia incrementada. Además, el vector de adenovirus recombinante según la presente invención se puede usar a un título correspondiente a la mitad del título al que se usan los vectores de adenovirus recombinante que expresan el interferón alfa y el interferón gamma, respectivamente. Por tanto, es dos veces más rentable, se usa convenientemente, y puede reducir los efectos secundarios que se puedan causar por vacunación a alto título. Además, se anticipa que el vector de adenovirus recombinante según la presente invención se puede usar para diversas enfermedades antivíricas, debido a que los interferones tienen un amplio espectro de actividad antivírica.

Modo para la invención

Más adelante, la presente invención se describirá a más detalle en referencia a los ejemplos. Sin embargo, hay que entender que estos ejemplos son únicamente con propósitos ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1: Construcción del adenovirus recombinante

Se insertaron las secuencias del gen de interferón alfa porcino e interferón gamma porcino en dirección 3' de un promotor de CMV, y se insertó el gen 2A del virus de la fiebre aftosa entre los dos genes de interferón de manera que los dos genes de interferón se expresarían conjuntamente. Este diseño se muestra en la Figura 1.

Más específicamente, el gen del interferón alfa porcino era el interferón alfa porcino 1 que tenía una secuencia expuesta en el N.º de acceso Genbank NM_214393, y el gen del interferón gamma porcino tenía una secuencia expuesta en el N.º de acceso Genbank AY293733. La secuencia de 2A del virus de la fiebre aftosa que tenía una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 (CAGCTGTTGAACTTTGACCTGCTCAAGTTGGCAGGAGACGTCGAGCCCAACCCTGGGCC) se insertó entre los dos genes de interferón porcino, y la estructura resultante que tenía una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 se sintetizó por Bioneer Corp. En el presente documento, se introdujo un sitio de la enzima de restricción NheI en el extremo 5' de la secuencia génica sintetizada, y se introdujo un sitio de la enzima de restricción XbaI en el extremo 3', de manera que la secuencia génica se podría clonar. También, se separó el codón de parada de la región del interferón alfa, y se introduce un codón de parada en el extremo 3' del interferón gamma. Además, para la expresión proteica eficaz de las regiones del gen de interferón en cerdos, se realizó la evaluación del uso del codón.

Secuencia génica para la expresión conjunta del interferón alfa porcino y el interferón gamma porcino (incluyendo las secuencias de la enzima de restricción NheI y XbaI en ambos extremos; SEQ ID NO: 2)

```

ATTGCTCTCTGGGCTGTGATCTGCCACAGACCCACAGCCTGGCTCACACCCGGGCCCTG
CGGCTCCTGGCACAGATGCGGAGAATATCCCCGTTTTCTGTCTGGACCACCGAAGGGAC
TTCGGATCCCCTCATGAGGCTTCGGGGGCAACCAGGTACAGAAGGCTCAGGCCATGGCT
CTGGTGCATGAGATGCTCCAGCAGACCTTCAGCTCTCAGCACAGAGGGCTCGGCTGCG

GCCTGGAATGAGAGCCTCCTGCACCAGTTCTGCACTGGACTGGATCAGCAGCTGCGCGAT
CTGGAAGCCTGCGTCATGCAGGAAGCAGGGCTGGAAGGGACCCCCTGTTGGAGGAAGAC
TCCATCCTGGCTGTGCGGAAGTACTCCACAGGCTCACCTCTATCTGCAAGAGAAGTCC
TACAGCCCCTGTGCCTGGGAGATCGTCAGGGCCGAGGTGATGCGCTCGTTCTTCCAGC
AGAAACCTGCAGGATAGACTTCGCAAGAAGGAGCAGCTGTTGAACTTTGACCTGCTCAAG
TTGGCAGGAGACGTCGAGCCCAACCCTGGGCCCATGAGCTACACAATTATTTCTTAGCC
TTTCAGCTTTGCGTGACTTTGTGTTTCTCCGGCTTACTGCCAGGGCCCTTTTTTAAG
GAGATCACGATCCTAAAGGACTATTTTAACGCAAGTACCTCAGATGTCCCTAACGGTGGC
CCTCTTTCTTAGAAATTTGAAGAATTGGAAGAGGAGAGTGACAAGAAAATCATCCAG
AGCCAGATCGTTTCTTCTACTTTAAATTCTTTGAGATCTTCAAAGACAACCAGGCCATT
CAAAGGAGTATGGACGTGATTAAGCAAGACATGTTTCAGCGCTTCTTAACGGTAGCTCT
GGCAAACCTGAATGACTTCGAGAAGCTGATTAATAATCCCGTTGATAATCTGCAGATCCAG
CGCAAAGCGATCAGCGAACTCATCAAGGTGATGAATGATCTGTCAACCAGTTCTAACCTA
AGGAAGCGGAAGCGAAGTCAGACAATGTTCCAGGGCCAGAGAGCATCAAATAATCTAGA
    
```

Para construir un adenovirus recombinante, los genes se clonaron en un vector pShuttle (Clontech) por los sitios de la enzima de restricción NheI y XbaI, seguido de secuenciación. Luego, los sitios de la enzima de restricción PI-Sce I y I-Ceu pocas veces presentes en el plásmido vector pShuttle clonado se digirieron con PI-Sce I y I-Ceu, y el fragmento diana linearizado se ligó con el ADN viral Adeno-X (pretratado con PI-Sce y I-Ceu). A continuación, la estructura resultante se trató con la enzima de restricción Swa I para separar el ADN de adenovirus auto-ligado o no recombinante sin genes insertados. Luego, se realizaron la transformación y la preparación génica para seleccionar un plásmido recombinante (el gen a expresar se recombinó con el ADN del adenovirus). El gen confirmado se sometió a linearización mediante el tratamiento con la enzima Pac I y, a continuación, se sometió a transfección en células 293A. Cuando las células mostraron un efecto citopático (ECP) del 80 % o más, se recogió el adenovirus recombinante. El adenovirus producido se purificó usando Mini Kit de Purificación de Adenovirus Virabind (Cellbiolabs) y, a continuación, se midió su título (TCID₅₀) y se almacenó.

Ejemplo 2: Análisis de la expresión del interferón alfa porcino o el interferón gamma porcino

Para examinar si el interferón alfa porcino y el interferón gamma porcino en el adenovirus recombinante se expresan o no, se usó el análisis por transferencia Western.

5 Un día antes del análisis por transferencia Western, se sembraron en placa células IBRS-2 (células del hígado porcinas) sobre un matraz de 75 cm². Al día siguiente, cuando las células alcanzaron una confluencia del 90 %, se inoculó aproximadamente 1x10⁸ TCID del adenovirus diluido en un medio fresco en las células. A las 48 horas después de la inoculación, se recogió el medio, se concentró a través de filtro de ultracentrífuga Amicon (Millipore) y, a continuación, se sometió a transferencia Western. Para la comparación de la expresión proteica, se ensayaron el adenovirus que expresa interferón alfa porcino (Ad-IFN- α porcino), el adenovirus que expresa interferón gamma porcino (Ad-IFN- γ porcino), y el adenovirus que expresa conjuntamente interferón alfa porcino e interferón gamma porcino (Ad-IFN- $\alpha\gamma$ porcino). Para el análisis del interferón alfa porcino se usó una dilución 1:500 de anticuerpo monoclonal K9 anti-IFN alfa (Thermoscientific), y para el análisis del interferón gamma porcino, se usó una dilución 1:500 de anticuerpo anti-IFN gamma porcino (Thermoscientific). El reactivo de detección por transferencia Western ECLTM prime (GE healthcare life science) se usó para la detección, y se usó el sistema Imagequant LAS 4000 (GE healthcare) para obtener imágenes. Las imágenes se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 3: Cuantificación del interferón alfa o gamma porcino y análisis proteico por ELISA

Las expresiones del interferón alfa y gamma porcino en el adenovirus recombinante preparado se cuantificaron usando un kit de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) de IFN- α porcino (Uscn life science Inc.) y un kit de ELISA de IFN- γ (Thermoscientific). Los resultados de la cuantificación se muestran en la siguiente Tabla 1.

Tabla1

Título (TCID ₅₀) del adenovirus infectado	Ad-IFN α	Ad-IFN γ	Ad-IFN $\alpha\gamma$
ELISA de interferón alfa porcino (pg/ml)			
1x10 ⁴	309,8 \pm 9,0	-	288,9 \pm 19,2
1x10 ³	154,3 \pm 20,5	-	59,8 \pm 21,8
ELISA de interferón gamma porcino (pg/ml)			
1x10 ⁴	-	78,2 \pm 0,4	167,8 \pm 35,7
1x10 ³	-	65,8 \pm 5,4	65,8 \pm 0,4

Como se ve en la anterior Tabla 1, el nivel de expresión de la proteína en Ad-IFN $\alpha\gamma$ porcino a un título de 1x10⁴ era igual a la expresión de la proteína en Ad-IFN- α porcino o Ad-IFN- γ porcino. También, en Ad-IFN $\alpha\gamma$ porcino, se expresaron tanto el interferón alfa como el interferón gamma, como se esperaba.

Ejemplo 4: Evaluación (análisis *in vitro*) del grado de inhibición del virus de la fiebre aftosa en función del título del adenovirus recombinante

35 El grado de inhibición del virus de la fiebre aftosa se evaluó en función del título del adenovirus recombinante. Específicamente, se sembraron en placa células IBRS-2 (células del riñón porcinas) sobre un matraz de 75 cm², y al día siguiente, cuando las células alcanzaron una confluencia del 90 %, se diluyó 1:10 el adenovirus recombinante a cada título y se inoculó en las células. Al día siguiente, el sobrenadante se separó, y se inoculó 600 TCID₅₀ del virus de la fiebre aftosa en las células. A 1 hora después de la inoculación, se reemplazó el medio. A las 48 horas después de la inoculación del virus de la fiebre aftosa, se recogió el sobrenadante, y se midió el número de copia del virus de la fiebre aftosa mediante RT-PCR en tiempo real. La RT-PCR en tiempo real se realizó usando el cebador sentido 5'-GGAACYGGGTTTTAYAAACCTGTRAT-3' (SEQ ID NO: 3) y el cebador antisentido 5'-CCTCTCCTTTGCACGCCGTGGGA-3' (SEQ ID NO: 4), el cual se dirige a la porción 3D del virus de la fiebre aftosa, sonda 5'-FAM-CCCADCAGCAGGTAAAGYGATCTGTA-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 5), y el sistema de PCR en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) (Su-Mi Kim y col., "Multiple shRNAs driven by U6 and CMV promoter enhances efficiency of antiviral effects against foot-and-mouth disease virus", 2010, *Antiviral Research* 87:307-317). Los resultados de la medición se muestran en la Figura 3.

Como se ve en la Figura 3, Ad-IFN $\alpha\gamma$ porcino presentó excelentes efectos inhibidores frente al virus de la fiebre aftosa en comparación con Ad-IFN- γ porcino a todos los valores de título, y presentaron excelentes efectos inhibidores frente al virus de la fiebre aftosa en comparación con Ad-IFN- α porcino a un TCID₅₀ de 1.000 o menos. Particularmente, a un TCID₅₀ de 100, Ad-IFN $\alpha\gamma$ porcino presentó efectos significativamente excelentes sobre la inhibición del virus de la fiebre aftosa en comparación con Ad-IFN- α y Ad-IFN- γ porcino.

Ejemplo 5: Evaluación (análisis *in vivo*) de los efectos del adenovirus recombinante sobre la inhibición del virus de la fiebre aftosa

En este Ejemplo, se prepararon un total de 59 ratones ICR (6 días de vida, 15 o 14 (Ad-nulo control) ratones por

grupo), y cada ratón se inoculó con 2×10^7 TCID₅₀ de adenovirus. A las 24 horas después de la inoculación, cada ratón se inoculó con 250 LD₅₀ de virus de la fiebre aftosa, y después de 7 días, se observó la tasa de supervivencia de los ratones. Los resultados de la observación se muestran en la Figura 4.

- 5 Como se ve en la Figura 4, el día 3, el grupo de ratón inoculado con Ad-IFN γ porcino mostró una tasa de supervivencia del 80 %, la cual es mayor que la del grupo inoculado con Ad-IFN α porcino (tasa de supervivencia al 60 %) o Ad-IFN- γ porcino (tasa de supervivencia al 33 %). A los 7 días después de la inoculación, el grupo inoculado con Ad-IFN γ porcino mostró una tasa de supervivencia de aproximadamente 40 %, mientras que el grupo inoculado con Ad-IFN- α porcino o Ad-IFN- γ porcino mostró una tasa de supervivencia de aproximadamente 20 %. Por tanto, este experimento sobre los ratones demostró que la inoculación con Ad-IFN γ porcino que es un producto según la presente invención muestra mejores efectos sobre la inhibición del virus de la fiebre aftosa en comparación con la inoculación de cada interferón al mismo título.

Ensayo listado de secuencia

- 15 SEQ ID NO. 1: secuencia de 2A del virus de la fiebre aftosa
 SEQ ID NO. 2: secuencia génica para la expresión conjunta del interferón alfa porcino y el interferón gamma porcino (incluyendo las secuencias de la enzima de restricción NheI y XbaI a ambos extremos)
 SEQ ID NO. 3: secuencia del cebador sentido usado en RT-PCR
 20 SEQ ID NO. 4: secuencia del cebador antisentido usado en RT-PCR
 SEQ ID NO. 5: secuencia de la sonda usada en RT-PCR.

<110> REPUBLIC OF KOREA (Management: Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency)

- 25 <120> Adenovirus recombinante que expresa simultáneamente interferón alfa porcino e interferón gamma porcino

<130> YPD201205-0006

- 30 <160>5

<170> KopatentIn 2.0

- <210> 1
 35 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- <220>
 40 <223> secuencia de 2A del virus de la fiebre aftosa

<400> 1

cagctgttga actttgacct gctcaagttg gcaggagacg tcgagcccaa ccttgggccc 60

60

- 45 <210>2
 <211> 1080
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- 50 <220>
 <223> secuencia sintética que incluye el interferón alfa porcino, el interferón gamma porcino y la secuencia de 2A del virus de la fiebre aftosa

- 55 <400> 2

ES 2 662 948 T3

atttgcctctc tgggctgtga tctgccacag acccacagcc tggctcacac ccgggcccctg	60
cggctcctgg cacagatgcg gagaatatcc ccgttttctt gtctggacca ccgaagggac	120
ttcggatccc ctcatgaggc tttcgggggc aaccaggctac agaaggctca ggccatggct	180
ctggtgcatg agatgctcca gcagaccttt cagctcttca gcacagaggg ctcggtgctg	240
gcctggaatg agagcctcct gcaccagttc tgcactggac tggatcagca gctgcgcat	300
ctggaagcct gcgtcatgca ggaagcaggg ctggaaggga cccccctgtt ggaggaagac	360
tccatcctgg ctgtcggaa gtacttcac aggctcacc tctatctgca agagaagtcc	420
tacagcccct gtgcctggga gatcgtcagg gccgagggtga tgcgctcgtt ctcttccagc	480
agaaacctgc aggalagact tcgcaagaag gaggcagctgt tgaactttga cctgctcaag	540
ttggcaggag acgtcgagcc caaccctggg cccatgagct acacaactta tttcttagcc	600
tttcagcttt gcgtgacttt gtgtttctcc ggctcttact gccaggcgcc cttttttaag	660
gagatcacga tcctaaagga ctattttaac gcaagtaact cagatgtccc taacggtggc	720
cctcttttct tagaaatfff gaagaattgg aaagaggaga gtgacaagaa aatcatccag	780
agccagatcg tttccttcta ctttaaatc tttgagatct tcaaagaca ccaggccatt	840
caaaggagta tggacgtgat taagcaagac atgtttcagc gcttccitaa cggtagctct	900
ggcaaaactga atgacttcga gaagctgatt aaaatcccgg ttgataatct gcagatccag	960
cgcaaaagcga tcagcgaact catcaagggt atgaatgatc tgtcaccacg ttctaaccta	1020
aggaagcgga agcgaagtca gacaatgttc cagggccaga gagcatcaaa ataatctaga	1080

5 <210>3
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador sentido

<400> 3
 ggaacygggt ttayaaacc tgtrat 26

15 <210>4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador antisentido

<400> 4
 cctctccttt gcacgccgtg gga 23

25 <210>5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> secuencia sonda

<400> 5

ES 2 662 948 T3

cccadcgag gtaaagyat ctgta 25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de adenovirus recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos que consiste en el gen del interferón alfa porcino, el gen de 2A del virus de la fiebre aftosa y el gen del interferón gamma porcino, los cuales están colocados en ese orden,
en el que la secuencia de nucleótidos es la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2,
en el que el gen 2A del virus de la fiebre aftosa tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 en la secuencia de nucleótidos en SEQ ID NO: 2.
- 10 2. El vector del adenovirus recombinante de la reivindicación 1, que inhibe el virus de la fiebre aftosa.
3. El vector del adenovirus recombinante de la reivindicación 1, que expresa conjuntamente los genes del interferón alfa porcino y del interferón gamma porcino.
- 15 4. Un plásmido que tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos del gen del interferón alfa porcino, el gen 2A del virus de la fiebre aftosa y el gen del interferón gamma porcino, los cuales están colocados en ese orden,
en el que la secuencia de nucleótidos es la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2,
en el que el gen 2A del virus de la fiebre aftosa tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 en la secuencia de nucleótidos en SEQ ID NO: 2.
- 20 5. El plásmido de la reivindicación 4, el cual expresa conjuntamente los genes del interferón alfa porcino y del interferón gamma porcino.
- 25 6. El plásmido de la reivindicación 4, el cual inhibe el virus de la fiebre aftosa.
7. Un inhibidor para inhibir el virus de la fiebre aftosa, comprendiendo o bien un vector de adenovirus recombinante expuesto en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un plásmido expuesto en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
- 30

Fig. 1

11 11

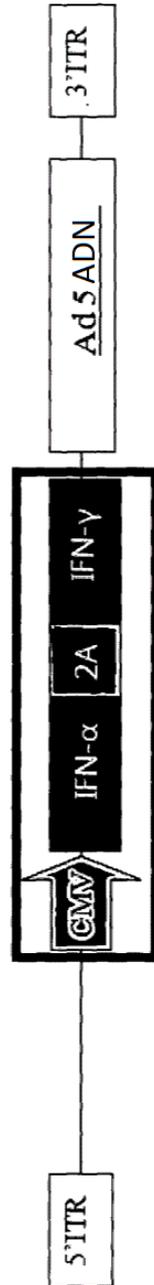
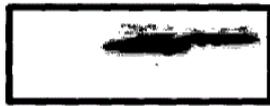


Fig. 2

Anti-IFN α (20KDa)

Simulado 1 2



Anti-IFN γ (20KDa)

Simulado 3 Simulado 2



Simulado: célula IBRS-2

1: Ad-IFN α

2: Ad-IFN γ

3: Ad-IFN γ

Fig. 3

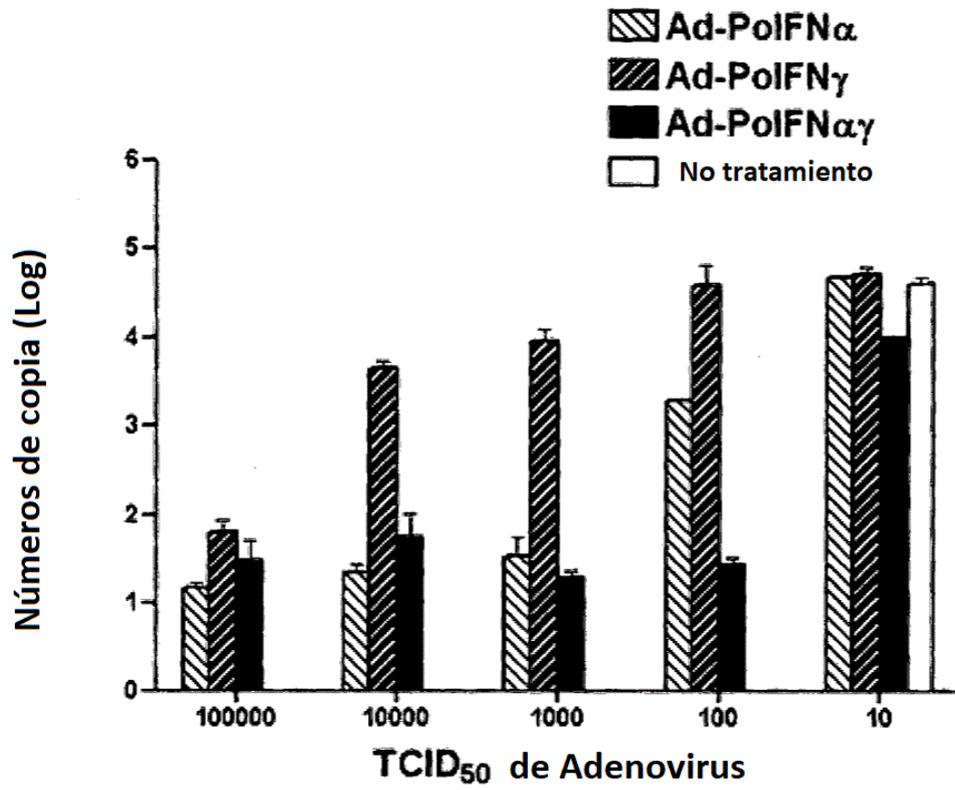


Fig. 4

