

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/131134 A1

(43) Fecha de publicación internacional
4 de octubre de 2012 (04.10.2012) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/11 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2012/070198

(22) Fecha de presentación internacional:
23 de marzo de 2012 (23.03.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201130445 25 de marzo de 2011 (25.03.2011) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **FUNDACIÓ CENTRE DE RECERCA EN SANITAT ANIMAL (CRESA)** [ES/ES]; Campus de la UAB, Edificio CReSA, s/n, E-08193 Bellaterra (Barcelona) (ES). **INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)** [ES/ES]; Carretera de La Coruña, km. 7,5, E-28040 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **SÁIZ ZALABARDO, Margarita** [ES/ES]; Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), C/ Nicolas Cabrera, 1, UAM Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **SOBRINO CASTELLÓ, Francisco** [ES/ES]; Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), C/ Nicolas Cabrera, 1, UAM Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **BORREGO RIVERO, Belén** [ES/ES]; Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña, km. 7,5, E-28040 Madrid (ES). **RODRÍGUEZ PULIDO, Miguel Ramón** [ES/ES]; Fundació Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Campus de la UAB, Edificio CReSA, s/n, E-08193 Bellaterra (Barcelona) (ES). **SÁIZ CALAHORRA, Juan**

Carlos [ES/ES]; Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña, km. 7,5, E-28040 Madrid (ES). **MARTÍN ACEBES, Miguel Ángel** [ES/ES]; Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña, km. 7,5, E-28040 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: USE OF A NON-CODING REGION OF THE GENOME OF THE FOOT-AND-MOUTH VIRUS FOR THE PURPOSE OF PRODUCING AN ANTIVIRAL DRUG

(54) Título : USO DE UNA REGIÓN NO CODIFICANTE DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA PARA LA ELABORACIÓN DE UN MEDICAMENTO ANTIVIRAL

(57) Abstract: The present invention relates to the use of RNAs that correspond to highly structured domains of the non-coding regions of the genome of the foot-and-mouth virus (FMV) and to the use of sequences that comprise said RNAs for the production of a pharmaceutical composition for the prophylaxis and/or the treatment of diseases caused by interferon-sensitive viruses. The invention also relates to the pharmaceutical composition that comprises the non-coding regions of the invention and that furthermore comprises at least one pharmaceutically acceptable excipient and/or vehicle, and also to the use of said pharmaceutical composition.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso de RNAs correspondientes a dominios altamente estructurados de las regiones no codificantes del genoma del virus de la fiebre aftosa (VFA) y al uso de secuencias que los comprenden para la elaboración de una composición farmacéutica para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades causadas por virus sensibles a interferón. La invención se refiere también a la composición farmacéutica que comprende las regiones no codificantes de la invención y que además comprende al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptables, así como también al uso de dicha composición farmacéutica.



WO 2012/131134 A1

Uso de una región no codificante del genoma del virus de la fiebre aftosa para la elaboración de un medicamento antiviral

5 La presente invención se refiere al uso de una región no codificante del genoma del virus de la fiebre aftosa para la elaboración de una composición farmacéutica para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades causadas por virus sensibles a interferón.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa frente a la invasión de patógenos basada en diversos mecanismos y rutas de señalización. En el caso de una infección viral, uno de los mecanismos de la respuesta inmune innata es la producción de interferón (IFN) de tipo I (IFN- α e IFN- β , o también denominado IFN- α/β) que tiene efecto antiviral, antiproliferativo y presenta actividad inmunomoduladora. La producción de IFN de tipo I se produce tras la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS, "*pathogen associated molecular patterns*") presentes en los productos virales que se generan en una infección vírica. Entre los PAMPS se incluyen tanto ácido ribonucleico (RNA) de cadena simple como RNA de doble cadena. Sin embargo, se han descrito virus sensibles a interferón que consiguen evadir este sistema de defensa. Entre los virus sensibles a interferón se encuentran el virus de la fiebre aftosa, el virus de la estomatitis vesicular y el virus del Nilo Occidental (Randall RE *et al.* 2008. J Gen Virol 89:1-47).

25

El virus de la fiebre aftosa (VFA, "*foot and mouth disease virus*", FMDV,) es un miembro de la familia *Picornaviridae* que es el causante de la fiebre aftosa (glosopeda) que afecta a mamíferos ungulados artiodáctilos, entre ellos rumiantes y cerdos. El VFA es un virus de RNA de cadena simple de aproximadamente 8,5 kilobases (Kb) de longitud que en sus extremos terminales contiene regiones no codificantes (NCR, "*non-coding regions*") que contienen dominios altamente estructurados formando un RNA de doble

30

cadena. Las NCRs del VFA contienen estructuras específicas que participan en el control de la replicación y la traducción del genoma viral. Entre las regiones no codificantes se sitúan los denominados fragmento S, IRES (*“internal ribosome entry site”*) y 3’NCR (Witwer CS *et al.* 2001. Nucleic Acid Res 29:5079-5089; Escarmis CM *et al.* 1992. Virus Res 26:113-125; Belsham GJ *et al.* 2009. Virus Res 139:183-192).

Se ha demostrado que VFA es sensible a IFN- α , IFN- β e IFN- γ pero es capaz de desarrollar mecanismos para evadir la respuesta inmune. La proteasa Lpro es la primera proteína viral que se traduce y bloquea la respuesta innata inmune del hospedador, entre las que se incluye la respuesta mediada por INF. Lpro es capaz de inhibir la inducción del RNA mensajero (RNAm) de IFN- β y la expresión de los genes que estimulan IFN- α/β . Este hecho representa un problema para el control de la enfermedad de la fiebre aftosa.

La fiebre aftosa es una enfermedad que constituye un grave problema en el sector de la ganadería. Es una enfermedad altamente contagiosa que se propaga a través de animales infectados, equipos ganaderos, ropa o incluso calzado portador del VFA. Se controla en la actualidad mediante vacunación y medidas preventivas pero una vez contagiados los animales implica su sacrificio y por lo tanto deriva en grandes pérdidas económicas en el sector.

En relación a la vacunación frente al VFA, la inmunidad adaptativa aparece varios días después de la vacunación de los animales, siendo de aproximadamente una semana en el caso de la vacunación tradicional. Esto supone un problema al poder quedar expuestos dichos animales al virus durante el período ventana y ser susceptibles de infección durante ese tiempo. Se han realizado esfuerzos para cubrir esa ventana de susceptibilidad mediante el uso de adenovirus recombinantes defectivos en replicación que expresan IFN- α pero dicha estrategia, además de implicar el uso de un vector viral, no llega a cubrir la ventana de susceptibilidad al VFA en su totalidad ya que se protege de esta manera a cerdos inoculados desde 24 horas

postinfección y la protección dura entre 3 y 5 días. Se hace necesaria por lo tanto, una herramienta que cubra la ventana de susceptibilidad frente al virus de la fiebre aftosa previa al desarrollo de una inmunidad adaptativa efectiva en la que los animales infectados son susceptibles a la infección.

5

El virus de la estomatitis vesicular (VEV, "*vesicular stomatitis virus*", VSV) es un virus perteneciente a la familia *Rhabdoviridae* que produce una enfermedad vesicular aguda en bovinos, caballos, ciervos y cerdos. Se ha encontrado evidencia serológica de que infecta otros muchos animales y ocasionalmente infecta también humanos. Hay dos especies principales, denominadas New Jersey e Indiana. Se transmite por picadura de insectos vectores, principalmente las moscas de la arena (*Lutzomya sp.*), moscas negras (familia *Simuliidae*) e insectos del género *Culicoides*. Su genoma está formado por 11-12 Kb de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. El VEV también es capaz de evitar la respuesta inmune del hospedador. En el caso de VEV la infección induce el bloqueo general de la expresión génica en la célula hospedadora, que afecta a la producción de IFN y otras moléculas antivirales. Actualmente el control de la enfermedad se realiza utilizando medidas de restricción de movimiento de animales infectados, cuarentena, control de los insectos vectores y vacunación con virus inactivado. Una alternativa capaz de activar una respuesta inmune innata eficaz frente al virus sería de gran utilidad para el control de esta enfermedad.

El virus del Nilo Occidental (VNO, "*West Nile Virus*", WNV), un virus transmitido principalmente por mosquitos y cuyo hospedador natural son las aves, está clasificado dentro de la familia *Flaviviridae*, junto a otros importantes patógenos animales como el virus de la peste porcina clásica, y humanos como el virus de la hepatitis C, el virus dengue, el virus de la fiebre amarilla (Blitvich BJ 2008. *Anim Health Res Rev* 9:71-86). El VNO es un virus con envoltura lipídica, cuyos viriones poseen simetría icosaédrica y un diámetro aproximado de 50 nm. Como material genético, el VNO cuenta con una única molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de unos 11.000 nucleótidos de longitud. El

VNO también es capaz de evitar la respuesta inmune del hospedador. El VNO es un claro ejemplo de zoonosis re-emergente, que actualmente constituye un grave problema para la sanidad humana y animal dado que origina meningoencefalitis mortales en humanos, équidos y aves, en las que en general produce infecciones subclínicas, pero en las que ocasionalmente llega a causar una elevada mortalidad (Granwehr BP *et al.* 2004. Lancet Infect Dis 4:547-556). En los últimos años, el número y la gravedad de los casos en humanos y caballos han aumentado considerablemente. En la actualidad como herramientas para el control de la misma únicamente se dispone de una vacuna comercial para équidos basada en el uso de virus inactivado y en el caso de humanos, terapias basadas en la administración de interferón (IFN) o de anticuerpos de forma pasiva (Ng *et al.* 2003. Dev Biol 114:221-227; Davis *et al.* 2006. Ann Neurol 60:286-300) que no son suficientes para el control de la enfermedad, por lo que se hace necesario una alternativa eficaz para la profilaxis y/o el tratamiento de la enfermedad del Nilo Occidental.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al uso de una región no codificante del genoma del virus de la fiebre aftosa para la elaboración de una composición farmacéutica para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades causadas por virus sensibles a interferón.

Con el fin de evaluar el potencial antiviral de las regiones no codificantes del genoma del virus de la fiebre aftosa (VFA), en la presente invención se procedió a generar mediante transcripción *in vitro* RNAs sintéticos no codificantes análogos de dichas regiones, los ncRNAs de la invención.

Los virus sensibles a interferón para los que se ha demostrado que son sensibles a la respuesta inmune innata inducida por los ncRNAs de la presente invención son virus de las familias *Picornaviridae*, *Rhabdoviridae* y *Flaviviridae*. Dentro de la familia *Picornaviridae* se eligió al virus de la fiebre aftosa, en la

familia *Rhabdoviridae* se eligió el virus de la estomatitis vesicular, mientras que de la familia *Flaviviridae* se eligió el virus del Nilo Occidental como los más representativos de dichas familias para la realización de los ensayos que demuestran la actividad de los ncRNAs de la invención.

5

Con los ncRNAs utilizados en la invención, se realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* en los que se detectó la producción de RNA mensajero (RNAm) de IFN- α o IFN- β y respuesta antiviral. Además también se realizaron ensayos de supervivencia frente a desafío viral en un modelo de ratón lactante. En los
10 ensayos se comparó el efecto con un conocido estimulador de interferón, el poly I:C (Richmond JY *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 1969. 64: 81-86) y se demostró que la actividad estimulante de la respuesta inmune innata de los ncRNAs de la invención es superior a este control.

15 Los resultados obtenidos con los ncRNAs de la invención muestran que estos ncRNAs estimulan la producción de IFN en células transfectadas. Además, los niveles de inducción del RNAm de IFN correlacionan con actividad antiviral frente al virus de la estomatitis vesicular (VEV). En estudios de desafío viral, los ncRNAs de la invención protegen frente al virus de la fiebre aftosa así como
20 frente al virus del Nilo Occidental, siendo la secuencia IRES del VFA la que mejor protección ofrece en ambos casos mientras que las regiones S y 3'NCR de dicho virus ofrecen una menor protección. Por otra parte, la producción de IFN ocurre en las primeras horas tras la transfección y la actividad antiviral frente al VEV es detectable a las 12 horas post infección, lo que convierte a los
25 ncRNAs de la invención en una herramienta eficaz para el tratamiento de enfermedades causadas por los virus sensibles a IFN ya que los ncRNAs de la invención activan la respuesta inmune innata de manera rápida. Los resultados obtenidos en la presente invención muestran el potencial uso de los ncRNAs de la invención para la elaboración de un medicamento antiviral frente a virus
30 sensibles a IFN. Los ncRNAs de la invención pueden ser de gran utilidad en combinación con vacunas frente a las enfermedades causadas por virus sensibles a IFN para cubrir su ventana de susceptibilidad.

Por todo lo aquí descrito, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de una región no codificante del genoma del virus de la fiebre aftosa para la elaboración de una composición farmacéutica.

5

En la presente invención se entiende como "región no codificante" (NCR, "*non-coding region*", "*untranslated region*" o UTR) aquella región del genoma del virus de la fiebre aftosa situada en sus extremos terminales (5' y 3') que contiene dominios altamente estructurados formando un RNA de doble cadena y que no codifica para ninguna proteína. Entre las regiones no codificantes se sitúan los denominados fragmento S, IRES ("*internal ribosome entry site*") en el extremo 5', en la denominada 5'NCR y en el extremo 3' se sitúa la región 3'NCR.

10

En la presente invención se utilizan RNAs obtenidos mediante transcripción *in vitro* de las regiones S e IRES de la 5'NCR y a la región 3'NCR de virus de la fiebre aftosa. En adelante nos referiremos a las regiones S e IRES del extremo 5' y a la región 3'NCR del VFA como a las "NCRs de la invención" o "regiones no codificantes de la invención", mientras que nos referiremos a los RNAs obtenidos mediante transcripción *in vitro* de dichas regiones como a los "ncRNAs de la invención" (RNAs no codificantes de la invención).

20

El término "composición farmacéutica" en esta memoria hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades. En el contexto de la presente invención se refiere a una composición que comprenda al menos los ncRNAs o las NCRs de la invención. La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse tanto sola como en combinación con otras composiciones farmacéuticas, entre ellas vacunas y antivirales. La combinación de dicha composición farmacéutica con vacunas o antivirales podría hacer más efectiva la respuesta inmune que generan, actuando así como adyuvante. El término composición farmacéutica y medicamento se utilizan en esa invención de manera indistinta.

25

30

En el contexto de la presente invención el término “vacuna” se refiere a una preparación antigénica empleada para provocar una respuesta del sistema inmune a la enfermedad causada por un virus. Es un preparado de antígenos que, una vez dentro del organismo, provoca la respuesta del sistema inmunitario mediante la producción de anticuerpos, y genera memoria
5 inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria.

En la presente invención el término “antiviral” se refiere a cualquier sustancia que no permita la replicación, ensamblaje o liberación de virus, como por
10 ejemplo interferón, ribavirina, etc.

Los ncRNAs de la invención han demostrado ser capaces de inducir actividad antiviral frente a virus sensibles a INF, como son el VFA, el VEV, y el VNO.

15 Por dicho motivo, un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de una región no codificante del genoma del virus de la fiebre aftosa para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades causadas por virus sensibles a interferón.

20 “Tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como al profiláctico o medidas preventivas. Aquellas necesarias de tratamiento incluyen las ya asociadas con alteraciones así como en aquellas en las que se previene la alteración. Una “alteración” es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con la composición de la invención, tal y como se describe en el
25 presente documento.

Se entiende por “virus sensible a interferón” aquél virus cuya replicación se ve afectada o interrumpida por el interferón secretado por las células del
30 hospedador.

El interferón es una citoquina secretada por diversas células, entre ellas las células del sistema inmune, que tiene efecto antiviral. De los grupos de

interferones, son el alfa y el beta los que se inducen generalmente en respuesta a infección viral, por dicho motivo en la presente invención “interferón” se refiere a IFN- α o IFN- β .

- 5 El virus de la fiebre aftosa (VFA, “*foot and mouth disease virus*”, FMDV) es el virus causante de la fiebre aftosa. Pertenece a la familia *Picornaviridae* (género *Aphthovirus*) y su genoma es un RNA de cadena simple. Se han descrito siete serotipos distintos con múltiples subtipos y variantes, el serotipo O, A, C, Asia1, SAT1, SAT2 y SAT3. Los aislados utilizados en la presente invención son el
- 10 O1K, perteneciente al serotipo O (el genoma de aislados de linaje O1, O1c y O1K se encuentra recogido en los números de acceso de Genbank D10138 y X00871) y el aislado C-S8c1 de serotipo C (genoma en número de acceso de Genbank AJ133357). La longitud de las regiones NCRs en los distintos aislados varía y la homología es de un 80% para la región S, un 85% para la
- 15 región 5’NCR que comprende IRES además de fragmentos de otras regiones y de un 82% para la región 3’NCR, por lo que las regiones no codificantes del VFA presentarían al menos un 80% de homología entre los diferentes serotipos (Carrillo *et al.* 2005. *J Virol* 79:6487-6504).
- 20 Los ncRNAs utilizados en la invención corresponden a las regiones S e IRES del extremo 5’ y a la región 3’NCR. Los ncRNAs utilizados en la invención constituyen un material no infeccioso de fácil producción y manipulación biotecnológica. Los resultados obtenidos con los ncRNAs utilizados en la presente invención demuestran el potencial uso de regiones no codificantes del
- 25 VFA para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades causadas por virus sensibles a interferón.

En la región no codificante del extremo 5’ (5’NCR) del genoma del VFA se encuentra el fragmento S. El fragmento S abarca 366 nucleótidos 5’-terminales

30 del RNA y se predice su plegamiento en una estructura secundaria tipo horquilla (“*hairpin*”) largo y estable (comprendido en la secuencia de acceso en GenBank X00871). Al fragmento S le sigue una región poli C (“*heteropolymetric*

poli C tract", Cn), varios pseudonudos (*pseudoknots*, Pk), el elemento de replicación *cre* ("*cis-acting replication element*") y el sitio de entrada interna de ribosomas (IRES, "*internal ribosome entry site*") (Fig. 1). El IRES es una región de 454 nucleótidos estructurada en múltiples dominios que media la traducción cap-independiente del genoma viral (comprendida en la secuencia de acceso en GenBank D10138). Por otra parte, en el extremo 3' del genoma viral también se sitúa una región no codificante denominada 3'NCR. La 3'NCR incluye 90 nucleótidos desde el codón de terminación de la fase de lectura abierta del RNA viral y una cola de poli A de longitud variable, donde dicha longitud aumenta con el curso de la infección (los 90 nucleótidos sin la cola poli A están comprendidos en la secuencia de acceso en GenBank X00871). El 3'NCR del VFA se ha visto que ejerce efecto activador de la traducción dependiente de IRES y que es capaz de interactuar con las regiones IRES y S localizadas en el extremo 5' mediante interacciones directas RNA-RNA.

En la presente invención se han generado mediante transcripción *in vitro* análogos de las NCRs del VFA. Debido a las estrategias conocidas por cualquier experto en la materia que se derivan de los métodos biotecnológicos utilizados en dicha transcripción *in vitro* (como por ejemplo el uso de un DNA complementario insertado en el plásmido utilizado en la transcripción, el clonaje y el uso de enzimas de restricción), los ncRNAs de la invención contienen en sus extremos terminales nucleótidos extra. Los ncRNAs de la invención son regiones no codificantes que son análogos funcionales de las NCRs de la invención.

El término "análogo" se refiere a una región de igual función pero de diferente secuencia. En la presente invención se refiere a que los ncRNAs tienen la misma función que las regiones NCRs, comprenden la secuencia del NCR pero contienen más nucleótidos provenientes de la estrategia biotecnológica utilizada para su síntesis.

Los nucleótidos “extra” a los que se refiere la presente invención son los ribonucleótidos no presentes en las NCRs del VFA pero que son fruto de las estrategias biotecnológicas utilizadas en la presente invención para la generación de los ncRNAs. Estos nucleótidos extra se pueden incorporar a las NCRs del VFA por el uso, por ejemplo, de una RNA polimerasa, por ser nucleótidos presentes en el plásmido en el que está clonado el DNA complementario utilizado para la transcripción *in vitro* o por introducirse en la secuencia para generar dianas de restricción para favorecer las estrategias biotecnológicas.

10

Una “diana de restricción” (o sitio de restricción) es una secuencia reconocida por una enzima de restricción, es decir, se refiere a un sitio o lugar que reconoce una endonucleasa que es capaz de cortar los enlaces fosfodiéster de la cadena de nucleótidos generando un corte en la cadena del ácido desoxirribonucleico (ADN). En la presente invención se refiere a una secuencia reconocida por una enzima de restricción que es capaz de cortar los enlaces fosfodiéster del DNA complementario utilizado para la transcripción *in vitro*. Por ejemplo secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *Stu I* y *EcoRV*.

20 El ncRNA de la región 3’NCR del VFA (SEQ ID NO: 1) contiene 188 ribonucleótidos de los cuales los 15 primeros y los 16 últimos corresponden a nucleótidos no presentes en la 3’NCR del VFA y que son fruto de las estrategias biotecnológicas utilizadas para su generación. Además contiene tres ribonucleótidos adicionales que se han introducido para generar sitios de restricción que permiten su manipulación biotecnológica y que no afectan a la estructura secundaria que se genera en el 3’NCR y por lo tanto a su función. Es el caso del uracilo de la posición 36 que deriva de una timina en el clon de DNA molde que genera una diana de restricción para la enzima *Stu I* (AGGCCT) y el caso de la guanina de la posición 108 y del uracilo de la posición 110, derivados de una guanina y una timina en el clon molde que generan una diana de restricción para *EcoRV* (GATATC). De modo que la región 3’NCR del VFA a la que se refiere la presente invención se considera como la región

30

comprendida entre el nucleótido 23 y el 114 descritos en la SEQ ID NO: 1 (donde dichos nucleótidos están también incluidos) en la que no están presentes los nucleótidos 36, 108 y 110. Por otra parte, el ncRNA de la región S del VFA (SEQ ID NO: 2) contiene 404 ribonucleótidos de los cuales los 20 primeros y los 18 últimos corresponden a nucleótidos no presentes en la secuencia S del VFA y que son fruto de las estrategias biotecnológicas utilizadas para su generación. De modo que la región S del virus de la fiebre aftosa a la que se refiere la presente invención es la secuencia comprendida entre (e inclusive) el nucleótido 21 y el 386 descritos en la SEQ ID NO: 2. En el caso del ncRNA de la región IRES del VFA (SEQ ID NO: 3), éste contiene 476 ribonucleótidos de los cuales los 14 primeros y los 8 últimos corresponden a nucleótidos no presentes en el IRES del VFA y que son fruto de las estrategias biotecnológicas utilizadas para su generación. De modo que la región IRES del virus de la fiebre aftosa a la que se refiere la presente invención es la secuencia comprendida entre (e inclusive) el nucleótido 15 y el 468 descritos en la SEQ ID NO: 3.

En la presente invención el término "región", "secuencia" o "secuencia nucleotídica" se utilizan indistintamente en la memoria.

Por lo expuesto anteriormente, una realización preferida del primer y segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de una región no codificante del genoma del VFA donde dicha región no codificante está comprendida en la secuencia nucleotídica que se selecciona de la lista que comprende: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o cualquiera de sus combinaciones. Donde la SEQ ID NO: 1 comprende la región 3'NCR del VFA, la SEQ ID NO: 2 comprende la región o fragmento S del VFA, la SEQ ID NO: 3 comprende la región IRES del VFA.

Una realización más preferida se refiere al uso donde la secuencia es SEQ ID NO: 1.

Otra realización más preferida se refiere al uso donde la secuencia es SEQ ID NO: 2.

5 Otra realización más preferida se refiere al uso donde la secuencia es SEQ ID NO: 3.

La presente invención también se refiere al uso de otras NCRs o ncRNAs de otros aislados de virus. Por este motivo y por lo expuesto anteriormente, la presente invención también se refiere al uso de las regiones no codificantes de la invención y a los ncRNAs de la invención donde la región no codificante se refiere a una región con una homología de al menos un 80% con dicha región.

La presente invención también se refiere a las NCR o a las ncRNAs de la invención que por estrategias biotecnológicas conocidas por cualquier experto en la materia tienen modificada su secuencia, por ejemplo por la generación dianas de restricción, pero donde dichas modificaciones no afectan significativamente a la estructura secundaria del RNA.

Es conocido por cualquier experto en la materia que los virus cuyo genoma es un RNA de cadena simple son más sensibles a IFN que los virus con DNA. Se han descrito diversos virus que son sensibles a interferón, entre ellos se incluyen miembros de las familias *Picornaviridae*, *Flaviviridae* y *Rhabdoviridae*, por ejemplo el virus de la fiebre aftosa, el virus de la fiebre del Nilo Occidental y el virus de la estomatitis vesicular. A pesar de presentar sensibilidad a INF, muchos virus son capaces de desarrollar mecanismos para evitar esta respuesta inmune innata, como sucede en el caso del VFA, del VEV y del VNO (Randall R E *et al.* J Gen Virol 2008. 89:1-47). La presente invención demuestra que el uso de los ncRNAs de la invención es útil como antiviral incluso en virus que presentan dichos mecanismos de evasión.

30

Por lo aquí descrito, una realización aún más preferida se refiere al uso donde el virus sensible a interferón es un virus RNA de cadena simple.

Preferiblemente, el virus es un virus de la familia *Picornaviridae*, más preferiblemente el virus de la fiebre aftosa. Preferiblemente también el virus es un virus de la familia *Rhabdoviridae*, más preferiblemente se refiere al virus de la estomatitis vesicular. Y también preferiblemente el virus es un virus de la familia *Flaviviridae*, donde dicho virus es preferiblemente el virus del Nilo Occidental.

Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al uso donde dichas enfermedades son enfermedades en animales mamíferos no humanos. Preferiblemente animales ungulados, más preferiblemente de la familia *Suidae* (por ejemplo del género *Sus*, por ejemplo *S. scrofa*), de la familia *Bovidae* o de la familia *Equidae*. También la presente invención se refiere al uso en aves, preferentemente de las familias de aves que se seleccionan de la lista que comprende: *Phasianidae*, *Corvidae*, *Paseridae*, *Fringillidae* y *Turdidae* (pertenecientes a los ordenes Paseriformes y Galliformes), así como de las familias *Accipitridae* y *Strigidae*, entre otras.

Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al uso donde dichas enfermedades son enfermedades en humanos. Las enfermedades pueden ser enfermedades zoonóticas.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica del primer o segundo aspectos de la invención que además comprende al menos un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptables.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la composición farmacéutica que comprende la NCR o el ncRNA de la invención, la estabiliza o ayuda en su preparación en el sentido de darle una consistencia, forma, sabor o cualquier otra característica funcional específica. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento

como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

Un “vehículo farmacológicamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención y cuya función es facilitar la incorporación del fármaco así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. El término “farmacológicamente aceptable” se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

Por lo aquí descrito, una realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que además comprende al menos otro principio activo.

Como se emplea aquí, el término “principio activo” (“sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo”) significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

La composición farmacéutica o medicamento proporcionado por esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. Por dicho motivo, una realización preferida por este aspecto de la invención se refiere a la composición farmacéutica donde dicha composición farmacéutica se presenta en una forma adaptada a la administración por vía oral, parenteral o intradérmica.

La presente invención también se refiere al uso de la composición farmacéutica del tercer aspecto de la invención para la elaboración de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades causadas por virus sensibles a interferón.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Motivos estructurales en las NCRs del genoma de VFA.
Representación esquemática de los motivos en las 5' y 3' NCRs del VFA. NCR, región no codificante; S, fragmento S; IRES, "ribosome entry site"; VPg, "genome linked viral protein"; Cn, región poli C; Pk, región de "pseudoknots"; cre, el elemento de replicación en *cis* ("cis-acting replication element"); Lpro, proteasa "leader"; 3Dpol, polimerasa 3D; SL1, "stem-loop 1"; SL2, "stem-loop 2"; 3'NCR, 3' "non coding region"; Δ An, transcrito 3'NCR al que se ha eliminado la cola poli A.

Fig. 2. Inducción de IFN- β en células porcinas. Muestra la producción de IFN- β por los ncRNAs de la invención del VFA en células porcinas. Células SK-6 se transfectaron con 20 $\mu\text{g/ml}$ de los transcritos NCR o con 10 $\mu\text{g/ml}$ del control poly I:C o el control negativo tRNA (RNA transferente). Los niveles de inducción del RNAm de IFN- β en células transfectadas respecto a las células transfectadas con tampón fosfato salino (PBS) a los tiempos indicados se determinaron mediante RT-qPCR (RT-PCR cuantitativa) normalizada respecto a GAPDH. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media de tres experimentos independientes realizados en triplicado. IFN- β , RNA mensajero del IFN- β porcino; T, tiempo; h, horas.

Fig. 3. Análisis de la contribución de las secuencias de la 3'NCR de VFA en la inducción de IFN- β . Muestra la producción de IFN- β por la región 3'NCR de VFA y fragmentos de la misma en células porcinas. RNAs correspondientes al SL1, SL2, 3'NCR ΔA_n así como 3'NCR RNAs (20 $\mu\text{g/ml}$) tratados o no con CIP y poly I:C (10 $\mu\text{g/ml}$) se transfectaron en células SK-6. Los niveles de inducción del RNAm de IFN- β en células transfectadas respecto a las células transfectadas con PBS a los tiempos indicados se determinaron mediante RT-qPCR normalizada respecto a GAPDH. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media entre triplicados. IFN- β , RNA mensajero del IFN- β porcino; T, tiempo; h, horas; SL1, "stem-loop 1"; SL2, "stem-loop 2"; 3'NCR, 3' "non coding region"; ΔA_n , transcrito 3'NCR en el que se ha eliminado la cola poli A; 3'NCR+CIP, 3'NCR que ha sido tratado con fosfatasas.

Fig. 4. Inducción de un estado antiviral en células transfectadas con los NCR RNAs. Muestra el efecto antiviral frente al virus de la estomatitis vesicular en células porcinas. Tras 24 h de transfección con 40 $\mu\text{g/ml}$ de los transcritos correspondientes a las NCRs de VFA, o 10 $\mu\text{g/ml}$ de tRNA, células SK-6 fueron infectadas con VEV (multiplicidad de infección (MOI)= 1). Los sobrenadantes de las células infectadas se recogieron a 12 y 24 h postinfección y los títulos virales se determinaron en células IBRS-2. Las barras indican los valores medios de dos experimentos independientes realizados por triplicado más las

desviaciones estándar. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y test de Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). T, tiempo post infección; h, horas; log₁₀pfu/ml, titulación viral medida en log₁₀ de las unidades formadoras de placas (ufp, “plaque forming unit”, pfu) por mililitro; mock, control de
5 transfeción.

Fig. 5. Las NCRs de VFA inducen la respuesta innata en ratón lactante. Muestra la producción de IFN- β por los ncRNAs de la invención en ratones lactantes. Grupos de 4 a 5 ratones lactantes Swiss fueron inoculados
10 intraperitonealmente (i.p.) con 100 μ g de transcritos 3'NCR, S, IRES o poly I:C. Los niveles de IFN- α (A) e IFN- β (B) en “pools” de suero extraído a distintos tiempos postinoculación para cada RNA fueron determinados por ELISA. Los valores promedio de IFN- α e IFN- β para “pools” de suero a 0 h postinoculación fueron de 25 y 6 pg/ml, respectivamente.

15

Figura 6. Efecto de la inoculación de los ncRNAs en la supervivencia de los ratones inoculados con el VNO. Se muestran los datos correspondientes a cada grupo y las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia analizadas mediante el log rank test usando GraphPad Prism 5.01 (GraphPad software,
20 San Diego, CA, USA).

Figura 7. Niveles de IFN- α en sueros de ratones inoculados con los ncRNAs. El análisis se realizó mediante ELISA a partir de “pools” de sueros tomados a 4, 8 o 24 h tras la inoculación de los RNAs; t, tiempo; h, horas.

25

Figura 8. Niveles de anticuerpos específicos totales frente al VFA inducidos tras las distintas pautas de vacunación. Se determinó el nivel de anticuerpos por ELISA y se muestran las medias correspondientes a cada grupo a los distintos tiempos post-vacunación indicados. El título se expresó
30 como el log₁₀ de la última dilución cuya lectura de DO fue superior a 2 veces el valor del suero pre-inmune a la mínima dilución ensayada (1/20); t, tiempo; d, días; sem, semanas.

Figura 9. Niveles y cinética de anticuerpos neutralizantes frente al VFA tras las distintas pautas de vacunación. Se muestra el número de animales de cada grupo en los que se detectaron niveles significativos de anticuerpos neutralizantes. La gráfica representa los niveles promedio en cada grupo a distintos tiempos post-vacunación expresados como PRN70; t, tiempo; d, días; sem, semanas. +RNA pre: Inoculados con 200 µg de RNA IRES + lipofectina y 24 h más tarde inoculados con la vacuna; +RNA t=0: Co-inoculados con la vacuna y con 200 µg de RNA IRES + lipofectina; +RNA post: Inoculados con la vacuna y 24 h más tarde inoculados con 200 µg de RNA IRES + lipofectina.

Figura 10. Perfil y niveles de isotipos de anticuerpos frente al VFA inducidos tras la vacunación. en los grupos que recibieron sólo la vacuna (sólo vacuna) o vacuna co-inoculada con el IRES (vacuna + RNA t=0). Los sueros de los animales, tomados 9 semanas tras la vacunación, se analizaron individualmente mediante ELISA usando un panel de anticuerpos de isotipado de inmunoglobulinas de ratón. Se muestran los resultados de cada grupo: A: grupos que recibieron sólo la vacuna (sólo vacuna); B: grupos que recibieron la vacuna co-inoculada con el IRES (vacuna + RNA t=0); C: correspondientes a sueros de controles negativo (NEG) y positivo (POS). M, G1, G2A, G2B, G3, A y K+L, se corresponden con diferentes isotipos de anticuerpos frente a VFA.

EJEMPLOS ILUSTRATIVOS DE LA INVENCION

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1: Las NCRs del genoma de VFA contienen PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) que activan la señalización de la respuesta innata.

5 Se analizó inicialmente la capacidad de inducir la expresión de IFN- β en células porcinas de elementos altamente estructurados de las regiones 5' y 3'NCRs del RNA de VFA. Se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* RNAs correspondientes a las 5'y 3'NCRs y al fragmento S e IRES del virus de la fiebre aftosa (Fig. 1). Los ncRNAs del VFA se utilizaron para transfectar células

10 SK-6 (células porcinas de riñón) (Fig. 2). La inducción de expresión del RNAm de IFN- β se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real a tres tiempos distintos (Fig. 2) utilizando el cebador sentido que se muestra en la SEQ ID NO: 4 y el cebador antisentido que se muestra en la SEQ ID NO: 5. Se observaron diferencias destacables entre los distintos RNAs. A los tres tiempos el 3'NCR

15 fue el inductor transcripcional de IFN- β más potente de todos, alcanzando niveles de casi 200 veces por encima de las células control de transfección a 9 h postransfección. El fragmento S indujo niveles 10 veces superiores al control seguido de la 5'NCR completa. Para el transcrito correspondiente al IRES se detectaron inducciones de 4.5 veces, ligeramente superiores al poly I:C. Estos

20 resultados sugieren que las estructuras presentes en la 3'NCR son reconocidas más eficientemente que las de la 5'NCR por los sensores virales presentes en células porcinas y que el fragmento S es el principal elemento inductor en la 5'NCR en estas células.

25 **EJEMPLO 2: Análisis de las características del 3'NCR del VFA relevantes para la inducción de IFN- β .**

La contribución de las distintas estructuras presentes en la 3'NCR y del poli A del VFA a la inducción del RNAm de IFN- β se analizó mediante transfección en

30 células SK-6 de los transcritos correspondientes (Fig. 1 y 3). Ninguno de los dos "stem-loops" presentes en la 3'NCR, SL1 (SEQ ID NO: 6) y SL2 (SEQ ID NO: 7) fueron capaces de inducir niveles detectables de IFN- β , siendo

mínimamente activos (Fig. 3). Sin embargo, la 3'NCR con la cola de poli A eliminada (3'NCR Δ An, SEQ ID NO: 8) todavía fue un potente activador, reduciéndose sólo entre 2-10 veces según el tiempo post-transfección analizado (Fig. 3). Los niveles de activación detectados no correlacionaron con el tamaño o la molaridad de los RNAs transfectados. El papel en inducción del extremo 5'-trifosfato en el RNA se analizó mediante tratamiento con fosfatasa alcalina (CIP). El efecto de este tratamiento redujo considerablemente los niveles de inducción a 9h posttransfección, aunque todavía se detectaron inducciones de 20 veces respecto a células control.

10

EJEMPLO 3: Los elementos "PAMP" del genoma de VFA estimulan la inmunidad innata y respuesta antiviral en células porcinas

Para determinar si la inducción de RNAm de IFN- β observada en células SK-6 transfectadas con los elementos S, IRES y 3'NCR del VFA se correspondía con la activación de un estado anti-viral en las células, se analizó la actividad antiviral en los sobrenadantes de transfección, incubando con ellos células IBRS-2 (células porcinas de riñón) (Tabla 1). Tras 24 horas, las células se infectaron con el VEV. En todos los casos se detectó actividad antiviral (Tabla 1), excepto en los controles (células transfectadas con poly I:C o tRNA, donde el resultado fue el mismo para ambos casos), y los niveles de inhibición de infección de VEV correlacionaban bien con los niveles de RNAm de IFN- β inducidos por cada RNA. El tratamiento de los sobrenadantes de transfección con anticuerpos monoclonales específicos bloqueantes de IFN- α , - β confirmó que la actividad antiviral observada está mediada principalmente por IFNs.

25

30

Tabla 1. Actividad antiviral en células porcinas transfectadas^a

RNA	Actividad antiviral			
	Sobrenadante sin tratar	Anticuerpo monoclonal anti-IFN- α	Anticuerpo monoclonal anti-IFN- β	Anticuerpo monoclonal anti-IFN- α + β
VFA 3'NCR	27	<2	6	<2
VFA S	13	-	3.8	-
VFA IRES	9	-	-	-
Poly I:C o tRNA	<2	NA	NA	NA

^a Las células SK-6 se transfectaron durante 24 h con 40 μ g/ml de los ncRNAs, o 10 μ g/ml de poly I:C o tRNA. La actividad antiviral se expresa como el recíproco de la dilución más alta de los sobrenadante de células SK-6 transfectadas necesaria para reducir el número de placas de VEV sobre células IBRS-2 en un 50%. Los datos son la media de duplicados de tres experimentos de transfección independientes. En algunos casos, los sobrenadantes fueron incubados previamente durante 1 h a 37 °C con 1 μ g/ml de anticuerpos monoclonales neutralizantes frente a IFN- α , - β o ambos, respectivamente. -, no determinado. NA, no aplicable.

- 5 Por otro lado se estudió la actividad antiviral inducida sobre las propias células SK-6 transfectadas con los distintos RNAs, infectándolas con VEV a una MOI de 1. A 12 y 24 h post infección, se recogieron sobrenadantes y se determinó el título viral mediante un plaqueo sobre células IBRS-2 (en la Fig. 4 se muestran los resultados a las 12 y 24 horas post infección). En las células tratadas con
- 10 los RNAs el rendimiento viral se había reducido en 3 log respecto al observado en las células transfectadas control (con tRNA- o con PBS, "mock"). A 12 h post infección los títulos de VEV mostraban diferencias de 5.5 veces (aunque no significativas) entre las células tratadas con el elemento 3'NCR respecto a las demás, mientras que a las 24 horas los títulos virales fueron más similares.

15

Estos resultados sugieren que todos los elementos NCR RNAs utilizados, aún induciendo la transcripción de IFN- β a distintos niveles, son capaces de

alcanzar el nivel umbral de inducción necesario para desencadenar en las células porcinas transfectadas una respuesta anti-viral efectiva, tanto autocrina como paracrina.

5 **EJEMPLO 4: La inoculación de los elementos “PAMP” del genoma de VFA induce una respuesta inmune innata en ratones lactantes**

Para determinar si los elementos “PAMP” del genoma de VFA eran capaces de inducir una respuesta antiviral *in vivo*, los transcritos correspondientes a las
10 regiones S, IRES y 3’NCR del VFA se inocularon por vía intraperitoneal a camadas de ratones Swiss de 5-7 días de edad. Como control se inoculó poly I:C, un compuesto sintético para el que ya se había descrito un efecto en la inducción de respuesta inmune.

15 Los niveles de IFN- α e IFN- β en muestras de suero recogidas a 4, 8, 24 y 48 horas post-inoculación para cada grupo de ncRNA se analizaron por ELISA (Fig. 5 A y 5 B). Todos los elementos ensayados resultaron ser potentes inductores de IFN- α/β en ratón lactante, incluso aquellos que en células porcinas en cultivo habían inducido unos niveles bajos de expresión de RNAm
20 de IFN- β .

Los picos de IFN- α en suero se detectaron a las 8 h tras la inoculación de los elementos 3’NCR e IRES, mientras que para el S los niveles de IFN- α se mantenían altos durante más tiempo, con un máximo a las 24 h post-
25 inoculación (Fig. 5 A). Comparando los niveles de IFN- α a 8 h post-inoculación, los elementos RNA del genoma de VFA indujeron entre 15 y 40 veces más que el poly I:C, mientras que a las 24 h post-inoculación, los niveles inducidos por S fueron 90 veces superiores a los inducidos por el poly I:C. Este patrón se repitió en la cinética de IFN- β (Fig. 5 B).

30

La relevancia biológica de estos niveles de IFN- α/β detectados por ELISA en suero se comprobó mediante un ensayo de inhibición de la infectividad de VEV

en células L-929 (Tabla 2), observándose una buena correlación entre los dos ensayos, tanto en los niveles como la cinética.

Tabla 2. Actividad antiviral en el suero de los ratones lactantes transfectados^a

RNA	h postinoculación			
	4	8	24	48
S	2	128	162	< 2
IRES	64	128	8	< 2
3'NCR	< 2	32	< 2	NR
Poly I:C	8	8	< 2	< 2

^a Grupos de 4-5 ratones fueron inoculados con 100 µg de ncRNAs de VFA o poly I:C. Los sueros se recogieron y mezclaron, a los tiempos postinoculación indicados, para cada RNA. La actividad antiviral se expresa como el recíproco de la dilución más alta de suero capaz de suprimir el efecto citopático inducido por VEV en células L-929 en el 50% de los pocillos. No se detectó actividad antiviral en los pools de suero recogidos a 0 h postinoculación (< 2). NR, no realizado.

5 En conjunto estos resultados indican que los transcritos de RNA correspondientes a los elementos estructurales presentes en las NCRs de los extremos 3' y 5' del genoma de VFA pueden estimular una respuesta inmune innata e inducir un estado antiviral *in vivo*.

10 **EJEMPLO 5: Supervivencia frente al desafío con VFA o con VNO.**

Para determinar cuál de los ncRNAs del VFA es el que mayor protección induce frente a desafío viral con VFA o con VNO, se procedió a realizar ensayos de protección en ratón lactante basados en la inoculación intraperitoneal (i.p.), e intracraneal (i.c.) e i.p. en el caso del VNO, de los
 15 ncRNAs y posterior infección con distintas dosis infectivas de los virus (VFA o VNO) que originan la muerte de los ratones a dosis y tiempos establecidos previamente. El efecto protector de la inoculación con los ncRNAs se establece por comparación con el grupo control de animales inoculados con tampón

fosfato salino (PBS). En el caso del VNO también se incluyeron grupos control que fueron inoculados con PBS y desafiados con las mismas cantidades de virus que habían sido previamente incubadas (dilución 1:1) durante 1 hora a temperatura ambiente con una mezcla de sueros de ratones supervivientes a la infección cuya capacidad protectora frente a la infección con el VNO era conocida (Alonso-Padilla *et al.* 2011 *Vaccine* 29:1830-1835), y grupos sin tratar que fueron inoculados i.c. con PBS como control de buena manipulación.

5.1. Efecto protector de los ncRNAs de VFA frente a infección con VFA

Los resultados de supervivencia frente a las distintas diluciones ensayadas se muestran en la Tabla 3. Brevemente, el efecto protector de los distintos ncRNAs en comparación con el del poly I:C fue gradual. El efecto del 3'NCR y el poly I:C fue similar. De 8×10^3 pfu (dilución 10^{-3}) en adelante el poly I:C fue mejor; por debajo de esa dosis (10^{-4} en adelante) fueron equivalentes en protección. La inoculación del RNA S indujo un mayor efecto protector, con el 50% de los animales vivos hasta el día 11 post infección (p.i.) de la dilución 10^{-2} , igual que el poly I:C. Sin embargo, a dosis superiores de virus el RNA S protegió al 50% de los animales incluso frente a preparación de virus sin diluir (8×10^6 pfu), mientras que el poly I:C dejó de proteger a la dilución 10^{-1} . Los mejores resultados de protección se obtuvieron al inocular el IRES, con protección total (100%) frente a VFA hasta la dilución 10^{-2} y del 90% a dosis superiores hasta virus sin diluir, indicando que incluso con dosis de virus muy superiores a los niveles fisiológicos, el VFA sólo es capaz de matar a un 10% de los animales inoculados con este RNA. Ningún animal del grupo control sobrevivió a partir del día 1 p.i. con la dilución 10^{-2} . Es interesante el efecto "meseta" observado para los RNAs con mayor capacidad de protección (S e IRES). Con estos RNAs parece establecerse una barrera antiviral que la infectividad del virus es incapaz de superar, alrededor del 50% para el S y del 10% para el IRES.

30

Los valores de LD_{50} (dosis letal-50/ml) que se muestran en la Tabla 3 corresponden a la dilución de la preparación viral utilizada necesaria para

matar al 50% de los animales inoculados en cada caso. Para el S e IRES, al no existir una dilución a la que el virus mate un porcentaje de animales $> 50\%$ sólo se indica que es $< 10^0$.

- 5 Tabla 3. Supervivencia de ratones lactantes inoculados con los ncRNAs a 11 días postinfección con el VFA.

RNA inoculado	Dilución de virus	supervivientes/inoculados	Porcentaje de supervivencia	LD ₅₀ /ml ^b
S	0	(5/10)	50	$< 10^0$
	-1	(4/8)	50	
	-2	(7/12)	58	
	-3	(10/11)	90	
	-4	(12/12)	100	
	-5	(11/11)	100	
IRES	0	(9/10)	90	$< 10^0$
	-1	(7/8)	87,5	
	-2	(10/10)	100	
	-3	(10/10)	100	
	-4	(10/10)	100	
	-5	(9/9)	100	
3'NCR	-1	(0/8)	0	9×10^{-3}
	-2	(1/10)	10	
	-3	(6/11)	54	
	-4	(5/5)	100	
	-5	(4/4)	100	
Poly I:C	0	(1/10)	10	7×10^{-2}
	-1	(0/10)	0	
	-2	(7/11)	64	
	-3	(7/8)	87,5	
	-4	(12/12)	100	
	-5	(8/8)	100	
PBS	-2	(0/9)	0	5×10^{-5}
	-3	(1/24)	4	
	-4	(7/25)	28	
	-5	(18/27)	67	

26

	-6	(9/9)	100
PBS+LP*	-4	(0/6)	0

* Lipofectina; LD, dosis letal. -1, dilución 10^{-1} . -2, dilución 10^{-2} . -3, dilución 10^{-3} . -4, dilución 10^{-4} . -5, dilución 10^{-5} .

5.2. Efecto dosis

5 Se realizó un experimento de inoculación con dosis inferiores a la utilizada habitualmente (100 μ g) con el ncRNA que mostró una mayor capacidad de protección, el IRES utilizando una dosis elevada de virus. Los animales se inocularon intraperitonealmente, como se describe anteriormente, con el RNA y 24 h después con la dilución 10^{-2} , equivalente a 8×10^4 ufp (unidades formadoras de placa) de VFA. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Efectivamente, se observó un efecto dosis en la protección, con un descenso muy leve (90%) con 50 μ g de RNA y mayor, un 10% con 1 μ g. Este resultado confirma la especificidad de la protección observada con los ncRNAs y la idoneidad de la dosis de 100 μ g utilizada en los ensayos.

15

Tabla 4. Supervivencia de ratones lactantes inoculados con distintas dosis de IRES del VFA a día 11 postinfección con VFA

Dosis IRES	supervivientes/inoculados	Porcentaje de supervivencia
50 μ g	(9/10)	90
10 μ g	(3/10)	30
5 μ g	(4/10)	40
1 μ g	(1/10)	10

5.3. Cinética de protección

20 Para valorar la ventana de tiempo que abarca la protección mediada por los ncRNAs con respecto al momento de infección, se inocularon las diluciones 10^{-2} y 10^{-4} de VFA en camadas de lactantes que habían sido inoculados previamente con el IRES (intraperitonealmente, 100 μ g) a distintos tiempos tras la inoculación del RNA. Los resultados se muestran en la Tabla 5. La
25 protección total frente a la infección con la dilución 10^{-4} de virus de la fiebre aftosa se mantuvo en todos los tiempos ensayados desde minutos tras la

inoculación hasta 72 h después. Para la dilución 10^{-2} la protección fue completa tras 8 h de la inoculación con el IRES y del 60% tras 4h. Sin embargo, de manera casi inmediata a la inoculación (5-10 min, correspondientes al tiempo 0) los niveles de protección fueron del 100%. Por otra parte, 48 h tras la inoculación del RNA la protección frente a la dilución 10^{-2} fue del 50% y a 72 h los animales fueron totalmente susceptibles a la infección.

Tabla 5. Número de supervivientes a día 10 postinfección / número de inoculados

Horas pre- inoculación RNA						
Desafío con virus	-72	-48	-24	-8	-4	0
Dil (-2)	0/8	4/8	6/7	10/10	6/10	9/9
Dil (-4)	8/8	8/8	7/7	10/10	9/9	10/10

10

5.4. Efecto de la lipofectina

El efecto de la lipofectina como agente vehiculante sobre la capacidad protectora de los ncRNAs fue analizado. Se estudió el nivel de protección inducido por el IRES con y sin lipofectina frente a las diluciones 10^{-2} y 10^{-4} del VFA (Tabla 6). El efecto protector del IRES se redujo en un 30% al ser inoculado sin lipofectina frente a la dilución 10^{-2} y en un 10% frente a la 10^{-4} (Tablas 1 y 4). Ningún animal inoculado con PBS + lipofectina sobrevivió a la infección con la dilución 10^{-2} del VFA. Estos resultados indican que la lipofectina *per se* no induce protección aunque sí potencia el efecto protector de los ncRNAs probablemente aumentando su estabilidad y/o acceso a las células diana.

20

25

5 Tabla 6. Supervivencia tras infección con el VFA a las 24 h postinoculación del IRES del VFA con/sin lipofectina (LP)

Inóculo	Dilución virus	Número inicial de animales	Supervivientes						% final
			Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	
IRES (+ LP)	-2	9	9	9	9	9	9	9	100
IRES (- LP)	-2	10	9	8	8	7	7	7	70
	-4	10	10	9	9	9	9	9	90
PBS (+ LP)	-2	7	1	0	0	0	0	0	0

5.5. Efecto protector frente a la infección con el virus del Nilo Occidental

Los ensayos de supervivencia frente al VNO confirman los obtenidos frente al VFA, de modo que se obtuvo una mayor protección con la región IRES del VFA que con la región S del VFA, la cual también fue mayor que la obtenida con el RNA control (poly I:C).

Los resultados de supervivencia 15 días post infección frente a las distintas diluciones ensayadas se muestran en la Tabla 7. Brevemente, el efecto protector de los distintos ncRNAs (IRES y S) inoculados 24 horas antes de la infección vírica fue igual o mejor que el del control (poly I:C) en todas las condiciones de infección ensayadas (10 ufp/ratón por vía i.c. y 100 ufp/ratón tanto por vía i.c. como i.p.). El IRES confirió una protección muy elevada, que llegó a ser completa (100%, 100% y 46.2%). Por su parte, los porcentajes de supervivencia de la región S fueron también muy notables (100%, 96% y 12.5%) en comparación con los obtenidos con poly I:C (100%, 33.3% y 0%). Las supervivencias obtenidas con los ncRNAs de la invención fueron similares a los obtenidos cuando el virus fue neutralizado con sueros murinos, cuya

capacidad protectora era conocida, previamente a su inoculación (100%, 100% y 77%). Los porcentajes de supervivencia de los grupos control inoculados con PBS fueron del 12.5%, 40% y 0%, respectivamente.

- 5 Tabla 7. Supervivencia de ratones lactantes inoculados con los ncRNAs a 15 días postinfección intracraneal (i.c.) o intraperitoneal (i.p.) con el VNO.

RNA inoculado	Dosis virus (ufp/ratón)	Vía inoculación (i.p/i.c.)	Supervivientes/ Inoculados	Porcentaje de supervivencia	$P \leq$ (Chi ²)
IRES	10	i.c	15/15	100	0.0001
	100	i.p	12/12	100	0.0010
	100	i.c	5/13	46.2	0.0266
S	10	i.c	11/11	100	0.0002
	100	i.p	16/17	94.1	0.0010
	100	i.c	2/14	12.5	ns
Poly I:C	10	i.c	12/12	100	0.0001
	100	i.p	4/12	33.3	ns
	100	i.c	0/17	0	ns
PBS	10	i.c	1/7	12.5	
	100	i.p	6/15	40	
	100	i.c	0/10	0	
Suero	10	i.c	13/13	100	0.0001
	100	i.p	11/11	100	0.0010
	100	i.c	10/13	77	0.0002

Ns, no significativo

- 10 **EJEMPLO 6: La inoculación de los ncRNAs en ratón adulto incrementa significativamente la supervivencia frente a la infección con el VNO**

Grupos de ratones Swiss fueron inoculados vía intraperitoneal (i.p.) con PBS (n=48), polyI:C (n=12), o 200 µg de RNA S (n=24) o IRES (n=24). El inóculo de RNA fue emulsionado con 40 µg de lipofectina en PBS en un volumen final de 200 µl. 24h después los ratones fueron infectados vía i.p. con 10⁵ufp de VNO.

La supervivencia se monitorizó diariamente hasta el día 15 postinfección. Los resultados se muestran en la figura 6, y en la tabla 8.

5 Tabla 8. Supervivencia de ratones frente a la infección con el VNO tras la inoculación con ncRNAs.

Inóculo	Supervivientes/inoculados	Supervivencia (%)	P \leq (Chi ²)
PBS	13/48	27	
IRES	10/24	41.7	0,0457
S	20/24	83.4	<0,0001
Poly I:C	8/12	66.7	0,0135

Mientras que la supervivencia final en el grupo de animales inoculados con PBS fue del 27%, los porcentajes fueron significativamente superiores en los grupos de ratones inoculados con RNA. El mayor nivel de supervivencia (83,4%) se observó en el grupo de animales inoculados con el RNA S. Estos resultados apoyan la capacidad antiviral de los ncRNAs frente al VNO en ratón adulto, como se observó anteriormente con ratones lactantes.

15 **EJEMPLO 7. Detección de IFN- α en sueros de ratones adultos inoculados con los ncRNAs**

Se inocularon grupos de 4 ratones adultos Swiss con 200 μ g de RNA (IRES, S o polyI:C) con lipofectina vía i.p., como se describe anteriormente. Tras 4, 8 o 24 h después de la inoculación se tomaron muestras de suero, agrupándose en "pools" las correspondientes a los 4 animales de cada grupo. Mediante ELISA (kit de PBL InterferonSource) se determinaron los niveles de IFN- α en los "pools" de sueros de cada grupo a los 3 tiempos analizados. Los resultados se muestran en la figura 7. Se observó un aumento en los niveles de IFN- α a las 8

h post-inoculación en el caso de los grupos inoculados con los ncRNAs S o IRES. El RNA que indujo mayores niveles de IFN- α fue el IRES.

5 **EJEMPLO 8. Ensayo de los ncRNAs como adyuvantes vacunales frente a VFA**

La vacuna consistió en un virus inactivado químicamente por tratamiento con BEI ("*binary ethylenimine*"), según se describe en (Bahnmann HG. 1975. Arch
10 *Virol* 47: 47-56), en una dosis equivalente a 2×10^5 pfu de VFA (aislado C-S8c1)
El virus inactivado se emulsionó en proporción 1:1 con Montanide ISA50, de Seppic. Se inoculó i.p. como se ha descrito previamente (Borrego B *et al.* 2006. *Vaccine* 24:3889-3899).

15 Se comparó la respuesta inmunológica específica frente a VFA de cuatro grupos de animales:

- a) Inoculados sólo con la vacuna (n=3)
- b) Co-inoculados con la vacuna y con 200 μ g de RNA IRES + lipofectina.
Las inoculaciones se realizaron i.p. en distintos puntos de la cavidad
20 abdominal, derecha o izquierda según se inoculara RNA o "virus vacuna", separadas aproximadamente 2 cm (n=5).
- c) Inoculados con 200 μ g de RNA IRES + lipofectina y 24 h más tarde inoculados con la vacuna (n=5).
- d) Inoculados con la vacuna y 24 h más tarde inoculados con 200 μ g de
25 RNA IRES + lipofectina (n=5).

8.1. La inoculación del IRES aumenta el título de anticuerpos específicos totales frente al VFA inducidos tras la vacunación

Los títulos de anticuerpos totales frente al VFA en los distintos animales de
30 cada grupo se determinaron mediante ELISA de los sueros correspondientes tomados a días 5 y 12 o 3 y 8 semanas post-vacunación, respectivamente, obtenidos mediante sangrías de vena maxilar, inactivados y mantenidos a -20°

C hasta su uso. El ELISA utilizado sigue un protocolo de captura de virus C-S8c1 sin purificar con un suero de conejo anti-VFA de serotipo-C (suministrado por el Institute for Animal Health, Pirbright, UK), un suero comercial anti-ratón-HRP (BioRad) y TMB (Sigma) como sustrato. La reacción se detuvo con sulfúrico 3N tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, y lectura de absorbancia se realizó a 450nm. Todas las incubaciones se realizaron a 37° C durante 1 h, y entre cada paso tres lavados con PBS-Tween 20 0,05%. Los sueros se ensayaron (individualmente) en diluciones seriadas y se definió el título como el log₁₀ de la última dilución cuya lectura de densidad óptica (DO) fue superior a 2 veces el valor de un suero negativo (pre-inmune) a la mínima dilución ensayada (1/20). En la figura se representan las medias por grupo.

Los resultados se muestran en la figura 8. En los tres grupos inoculados con RNA el nivel de anticuerpos fue superior al del grupo al que se le administró exclusivamente la vacuna. A tiempos largos post-inmunización, el grupo al que se co-administró simultáneamente vacuna y RNA fue el que indujo mayor título de anticuerpos específicos contra el virus.

8.2. La inoculación del IRES aumenta el título y la duración de los anticuerpos neutralizantes frente al VFA inducidos tras la vacunación

Muestras de suero de los animales de los distintos grupos, tomadas a distintos días y semanas post-vacunación y procesadas de igual forma que en el apartado anterior, fueron analizadas en un ensayo de reducción de número de placas que revela la presencia de anticuerpos neutralizantes frente al virus y permite titularlos (Mateu MG et al. 1987. Virus Res 8:261-274). Se utilizaron células IBRS-2 y los títulos de neutralización se expresaron como PRN70, el recíproco de la máxima dilución de suero (log 10) que causó un 70% de reducción de número de placas. Los resultados se muestran en la figura 9. En la gráfica se representan los valores medios de cada grupo, excluyendo a los animales negativos. El mayor nivel de anticuerpos neutralizantes se observó, en todos los tiempos analizados, en el grupo al que se co-inoculó vacuna y RNA. Merece la pena destacar que tras 8 semanas después de la vacunación, ninguno de los animales inoculados sólo con la vacuna mantenía niveles

detectables de anticuerpos neutralizantes de la infectividad, mientras que los otros tres grupos, en los que se había administrado el RNA IRES, un alto porcentaje de animales (ver tabla 9) mantenían todavía niveles elevados.

- 5 Tabla 9. Número de animales que presentan niveles detectables de anticuerpos neutralizantes frente a VFA, tras la inoculación con RNA IRES a diferentes tiempos con respecto a la vacuna.

Inóculo	Días 5-8	Día 12	Semana 3	Semana 8
Sólo vacuna	3/3	2/3	1/3	0/3
Inoculados con RNA IRES + lipofectina 24h antes de la vacuna (+RNA pre)	5/5	5/5	4/5	3/5
Co-inoculados con vacuna y IRES + lipofectina a la vez (+RNA t=0)	5/5	5/5	4/5	4/5
Inoculados con RNA IRES + lipofectina 24h después de la vacuna (+RNA post)	5/5	5/5	3/5	4/5

10 **8.3. La inoculación del IRES aumenta la diversidad de los isotipos de anticuerpos frente al VFA inducidos tras la vacunación**

Se determinó la diversidad de isotipos de los anticuerpos inducidos, transcurridas 9 semanas tras la vacunación, en los animales correspondientes al grupo de sólo vacunados y al de co-inoculados con vacuna + RNA. Para ello, los sueros se analizaron en dos diluciones distintas (escogidas en función de los resultados del ELISA descrito anteriormente) mediante un ELISA de captura

15

de virus C-S8c1 sin purificar equivalente al descrito anteriormente, aunque en este caso la captura se realizó con un suero de un cerdo infectado experimentalmente con VFA de serotipo-C (CISA-INIA). La determinación de isotipos se realizó utilizando como anticuerpos primarios un panel de isotipado de inmunoglobulinas de ratón (BioRad), seguido de incubación con suero comercial anti-conejo conjugado con HRP, de BioRad (Borrego B *et al.* 2006. Vaccine 24:3889-3899). La figura 10 muestra los resultados en forma de DO correspondientes a la dilución 1/60 del suero de dos de los tres animales que sólo recibieron vacuna y de los cinco que fueron co-inoculados con vacuna y RNA. Se muestra la comparación con sueros negativos y positivos. Como se observa en la figura, el perfil de inmunoglobulinas en los animales del grupo co-inoculado fue mucho más diverso, similar al observado para un "pool" de sueros de ratones infectados experimentalmente (control positivo). En particular, se observó un aumento de IgG1 e IgG2A, aparición de IgG2B y en un animal, también de IgG3.

MATERIAL Y MÉTODOS EMPLEADOS

Células y virus.

Se han empleado las líneas celulares de riñón de cerdo IBRS-2, SK-6 y células Vero (epiteliales de riñón de mono) del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), Valdeolmos, España, y las células murinas L-929, del laboratorio del Dr. Alcamí, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España. Las células se crecieron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina/estreptomicina y glutamina.

Los virus empleados en los experimentos de infección fueron: el virus de la fiebre aftosa O1K, el virus de la estomatitis vesicular Indiana y el virus del Nilo Occidental cepa NY-99.

Preparación de los RNAs y transfecciones.

Los transcritos de RNA correspondientes al fragmento S, 3'NCR y sus derivados SL1 (3'NCR Δ SL2), SL2 (3'NCR Δ SL1) y Δ An (con la cola poli A eliminada) del genoma del VFA O1K (la secuencia del genoma del aislado O1K se considera recogida en los números de acceso de Genbank D10138 y X00871) se generaron por transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa de T3 a partir de plásmidos descritos previamente y linearizados con *Not* I (Serrano PM *et al.* 2006. J Gen Virol 87:3013-3022). El RNA correspondiente al IRES de VFA del aislado C-S8c1 se obtuvo de un clon derivado de pGEM (Ramos R *et al.* 1999. RNA 5:1374-1783) cedido por E. Martínez-Salas, tras linearizar con *Xho*I y transcribir *in vitro* con la RNA polimerasa de T7 (NEB). El RNA correspondiente al 5'NCR, incluyendo el fragmento S, el IRES y 212 nucleótidos de la secuencia codificante de Lpro se sintetizó con la RNA polimerasa de SP6, usando como molde el clon pO1K (Rodríguez-Pulido MF *et al.* 2009. 83(8):3475-3485) linearizado con *Accl*. Salvo que se indique lo contrario, todos los transcritos contienen un grupo trifosfato en el extremo 5' y los elementos 3'NCR del VFA y sus derivados llevan una cola de poli A de 58 nucleótidos.

Tras la transcripción, los RNAs se trataron con la DNasa RQ1 (1U/ μ g, Promega), se extrajeron con fenol/cloroformo y se precipitaron con etanol. Finalmente se resuspendieron en agua y se cuantificaron por espectrofotometría. La integridad y el tamaño del RNA se analizaron por electroforesis en geles desnaturalizantes 6% acrilamida, 7 M urea o geles de agarosa.

La eliminación de los grupos fosfato del extremo 5' en los transcritos del VFA 3'NCR se realizó incubando durante 90 minutos con 0.5 U/ μ g de fosfatasa alcalina (CIP, New England Biolabs). Después de este tratamiento, el RNA se extrajo 2 veces con fenol/cloroformo, se precipitó con etanol y se trató como se indica anteriormente. La integridad de estos transcritos se analizó por electroforesis en geles desnaturalizantes 6% acrilamida, 7 M urea. De esta

manera se generaron los ncRNAs de la invención SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

5 Antes de ser transfectados, los RNAs se calentaron durante 5 minutos a 92°C, se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se mantuvieron en hielo.

10 Las células SK-6 se transfectaron usando 20 µg/ml de cada uno de los ncRNAs con Lipofectina (Invitrogen) o con 10 µg/ml de poly I:C (Sigma) usando Lipofectamina (Invitrogen).

Análisis de la expresión de IFN-β.

15 A distintos tiempos post-transfección, las células se lisaron y el RNA total se extrajo y se cuantificó con los métodos conocidos por cualquier experto en la materia. La retro-transcripción (RT) se realizó empleando 500 ng de RNA total y la enzima Transcriptor RT (Roche). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa se realizó a partir de alícuotas de las reacciones de retrotranscripción (RT) (1/10) y los reactivos del kit "*LightCycler FastStart DNA*
20 *Master SYBR green I*" (Roche). Todas las reacciones se realizaron en triplicado. Los datos se analizaron mediante el método $\Delta\Delta Ct$ conocido por cualquier experto en la materia. En todos los ensayos la expresión del gen de IFN-β se normalizó respecto al gen de expresión constitutiva GAPDH, y se expresó como incremento respecto a las células transfectadas control.

25

Los oligonucleótidos usados para amplificar el RNAm del IFN-β porcino fueron las secuencias a las que se refieren SEQ ID NO: 4 (cebador sentido) y SEQ ID NO: 5 (cebador antisentido). Para GAPDH se usaron oligonucleótidos descritos previamente (García-Briones MM *et al.* 2004. *Virology* 322:264-75).

30

Bioensayo de IFN.

La actividad antiviral de los sobrenadantes de las células SK-6 transfectadas se determinó mediante un ensayo de inhibición de la infección de VEV sobre células IBRS-2. Brevemente, las células SK-6 se transfectaron durante 24 horas con 40 µg/ml de los transcritos NCR, o con 10 µg de poly I:C o tRNA (control negativo ya que el RNA transferente es un RNA endógeno y por lo tanto su transfección no debe inducir la respuesta innata ni la inducción de INF). Las células IBRS-2 se incubaron durante 24 horas con distintas diluciones de los sobrenadantes de transfección, se lavaron y se infectaron con 100 ufp de VEV. A 24 horas post-infección se contaron las placas. En algunos casos, los sobrenadantes de transfección se incubaron previamente durante 1 hora a 37°C con 1 µg de anticuerpos monoclonales neutralizantes específicos anti-IFN-α porcino (K9, de PBL InterferonSource) o anti-IFN-β descrito previamente (Overend C R *et al.* 2007. J Gen Virol 88:925-31). No se observó efecto inhibitorio sobre la infectividad de VEV para cantidades de anticuerpo monoclonal de hasta 10 µg. La actividad antiviral se expresó como la mayor dilución de sobrenadante requerida para reducir un 50% el número de placas.

Experimentos en ratón.

Camadas de ratones Swiss (de 3-7 días de edad) se inocularon intraperitonealmente con 100 µl conteniendo 100 µg de los transcritos del VFA 3'NCR (SEQ ID NO: 1), S (SEQ ID NO: 2), IRES (SEQ ID NO: 3) o poly I:C, en tampón PBS. Para los transcritos RNA, se añadieron 20 µg de lipofectina (Invitrogen). A 0, 4, 8, 24 y 48 horas postinoculación se recogieron muestras de suero, y las muestras de 4-5 animales para cada RNA se juntaron y se mantuvieron a -80°C hasta su uso. La cantidad de IFN-α e IFN-β en suero se determinó empleando kits de ELISA (PBL InterferonSource). Para analizar la actividad antiviral en estas muestras de suero, se realizó un ensayo de inhibición de efecto citopático (Rubinstein SPC *et al.* 1981. J Virol 37:755-758). Brevemente, monocapas de células L-929 sembradas en placas multipocillo M-96 se incubaron durante 24 horas con diluciones seriadas de los correspondientes sueros. Posteriormente se retiró el medio y se sustituyó por

medio fresco conteniendo 100 dosis infectivas-50 (TCID₅₀) de VEV. A las 72 horas se controló el efecto citopático por observación al microscopio. La actividad antiviral se expresó como la recíproca de la mayor dilución de suero que protege de citotoxicidad en el 50% de los pocillos.

5

El manejo de animales en este estudio ha seguido en todo momento las pautas de la Comunidad Europea 86/609/CEE. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de INIA (Permisos Número CBS 2008/016 para el VFA Y 2011/023 para el VNO).

10

Ensayos de supervivencia. Se inocularon grupos de ratones lactantes Swiss de aproximadamente una semana de edad por vía intraperitoneal (i.p) con cada RNA (ncRNA) que fueron posteriormente inoculados con distintas diluciones de virus: VFA (una camada de 8-12 animales por dilución) 24 h después por la misma vía, o VNO (una camada de 9-17 animales por dilución) 24 h después bien por vía i.p. o bien por vía intracraneal (i.c.) (se utilizaron ambas vías de administración en camadas distintas). El inóculo tenía un volumen final de 100 µl y contenía 100 µg del RNA a ensayar diluido en PBS y 20 µg de Lipofectina (Invitrogen). Brevemente, los RNAs sintetizados mediante transcripción *in vitro* fueron calentados a 92°C durante 5 min en agua. A continuación se añadió el PBS y se dejó renaturalizar a temperatura ambiente durante 10 min. Después se añadió la lipofectina y tras 15 min de incubación a temperatura ambiente la mezcla fue inyectada. La Lipofectina es un preparado de liposomas catiónicos comercial de uso rutinario en transfecciones de RNA de cadena sencilla. La metodología de inoculación de RNAs de VFA en ratones y cerdos ha sido desarrollada previamente. La preparación del inóculo de poly I:C se realiza igualmente con 100 µg del RNA diluido en PBS pero sin liposomas ya que se ha descrito su capacidad de inducir IFN en ratón adulto tras inoculación intraperitoneal como RNA desnudo. La infección con el virus se realizó 24 h después de la inoculación con los RNAs por dar los mejores resultados de protección en ensayos previos con el 3'NCR inoculado a 4, 8 y 24 h pre-infección. El volumen de inóculo de VFA fue de 100 µl diluido en PBS. Se

20
25
30

ensayaron las diluciones comprendidas entre 10^0 (sin diluir) y 10^{-5} de un sobrenadante de infección en cultivo celular con un título de 8×10^7 unidades formadoras de placa (pfu)/ml. En el caso del desafío con el VNO el volumen de inoculación fue de 10 o 100 μ l, dependiendo de si la inoculación fue i.c. o i.p.,
5 diluidos en PBS. El desafío se realizó con sobrenadante de infección en cultivo celular del VNO cepa NY-99 (10 o 100 ufp/ratón por vía i.c., y con 100 ufp/ratón por vía i.p) 24 h tras la inoculación de los RNAs.

En el ensayo de desafío frente al VNO, además del grupo control inoculado con
10 PBS y desafiado con virus (como es el caso del VFA) también se incluyeron grupos control que fueron inoculados con PBS y desafiados con las mismas cantidades de virus que habían sido previamente incubadas (dilución 1:1) durante 1 hora a temperatura ambiente con sueros inmunes de ratones cuya capacidad protectora frente a la infección con el VNO era conocida, y grupos
15 sin tratar que fueron inoculados i.c. con PBS como control de buena manipulación.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una región no codificante del genoma del virus de la fiebre aftosa para la elaboración de una composición farmacéutica
5
2. Uso de una región no codificante del genoma del virus de la fiebre aftosa para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades causadas por virus sensibles a interferón.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde dicha región no codificante está comprendida en la secuencia nucleotídica que se selecciona de la lista que comprende: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o cualquiera de sus combinaciones.
- 15 4. Uso según la reivindicación 3 donde la secuencia es SEQ ID NO: 1.
5. Uso según la reivindicación 3 donde la secuencia es SEQ ID NO: 2.
6. Uso según la reivindicación 3 donde la secuencia es SEQ ID NO: 3.
20
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 donde la región no codificante se refiere a un región con una homología de al menos un 80% con dicha región.
- 25 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 donde el virus sensible a interferón es un virus RNA de cadena simple.
9. Uso según la reivindicación 8 donde el virus es un virus de la familia *Picornaviridae*.
- 30 10. Uso según la reivindicación 9 donde el virus es el virus de la fiebre aftosa.

11. Uso según la reivindicación 8 donde el virus es un virus de la familia *Rhabdoviridae*.
- 5 12. Uso según la reivindicación 11 donde el virus es el virus de la estomatitis vesicular.
13. Uso según la reivindicación 8 donde el virus es un virus de la familia *Flaviviridae*.
- 10 14. Uso según la reivindicación 13 donde el virus es el virus del Nilo Occidental.
- 15 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14 donde dichas enfermedades son enfermedades en animales mamíferos no humanos.
16. Uso según la reivindicación 15 donde los animales pertenecen a la familia *Suidae*.
- 20 17. Uso según la reivindicación 15 donde los animales pertenecen a la familia *Bovidae*.
18. Uso según la reivindicación 15 donde los animales pertenecen a la familia *Equidae*.
- 25 19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 donde dichas enfermedades son enfermedades en aves.
- 30 20. Uso según la reivindicación 19 donde las aves se seleccionan de las familias de la lista que comprende: *Phasianidae*, *Corvidae*, *Paseridae*, *Fringillidae*, *Turdidae*, *Accipitridae* y *Strigidae*.

21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14 donde dichas enfermedades son enfermedades en humanos.
- 5 22. Composición farmacéutica que comprende la región no codificante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 que además comprende al menos un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptables.
- 10 23. Composición farmacéutica según la reivindicación 22 que además comprende al menos otro principio activo.
24. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23, donde dicha composición farmacéutica se presenta en una forma adaptada a la administración por vía oral, parenteral o intradérmica.
- 15 25. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades causadas por virus sensibles a interferón.

FIG. 1

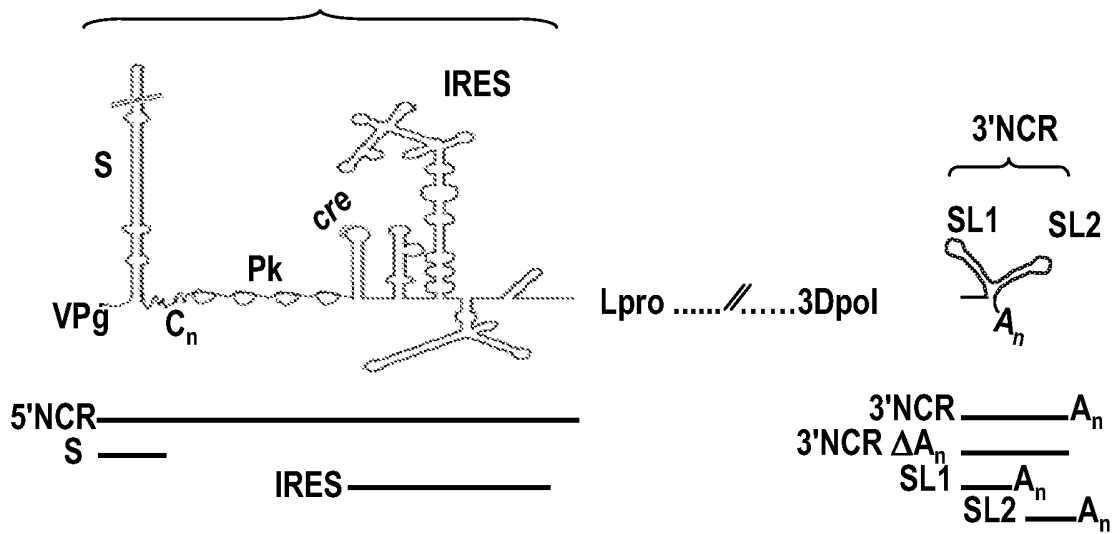


FIG. 2

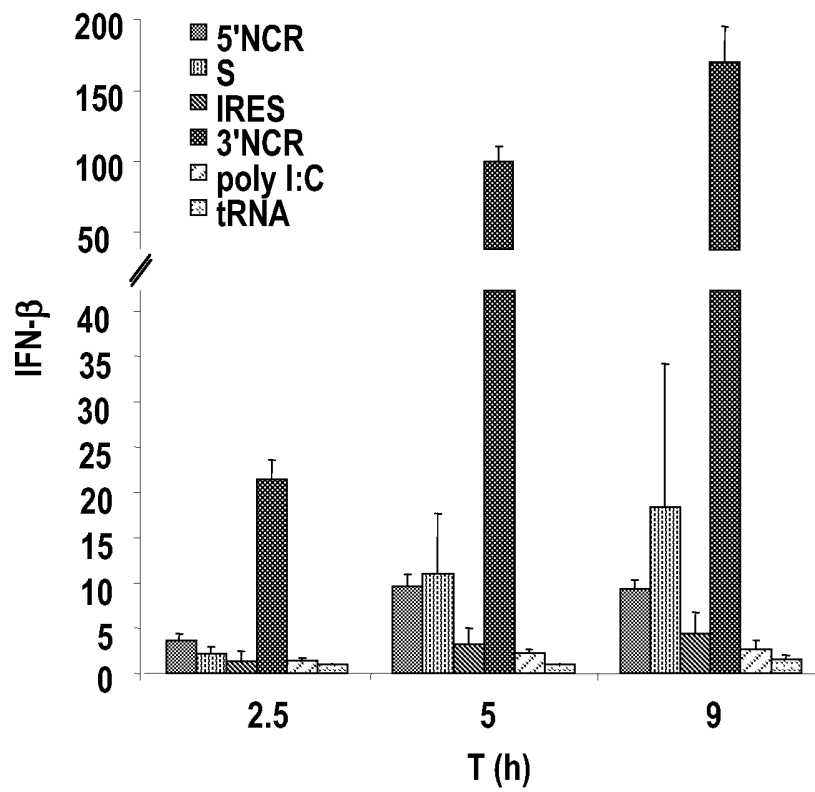


FIG. 3

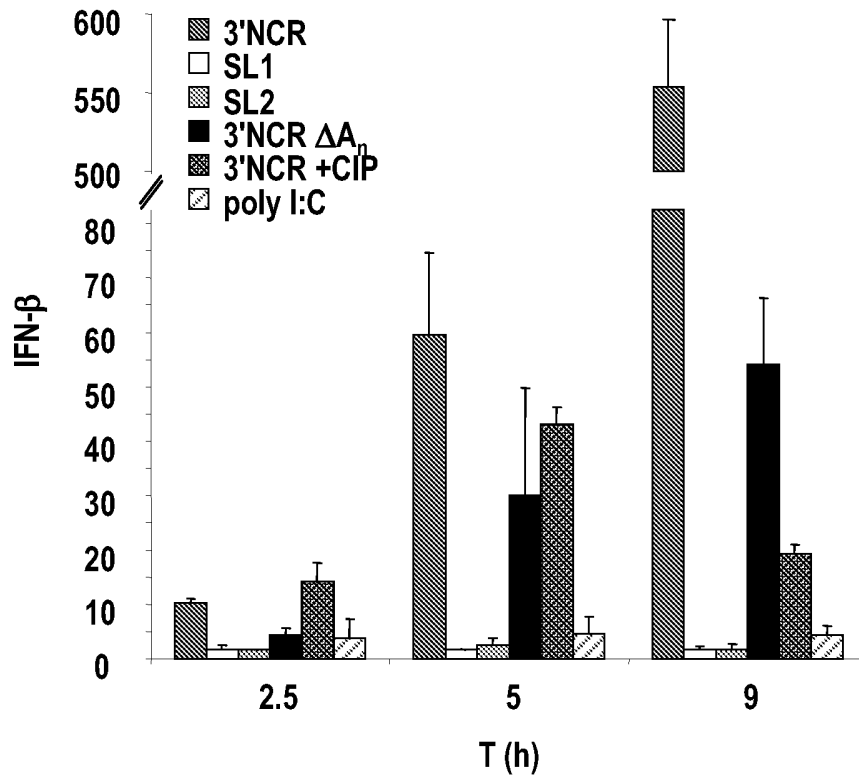


FIG. 4

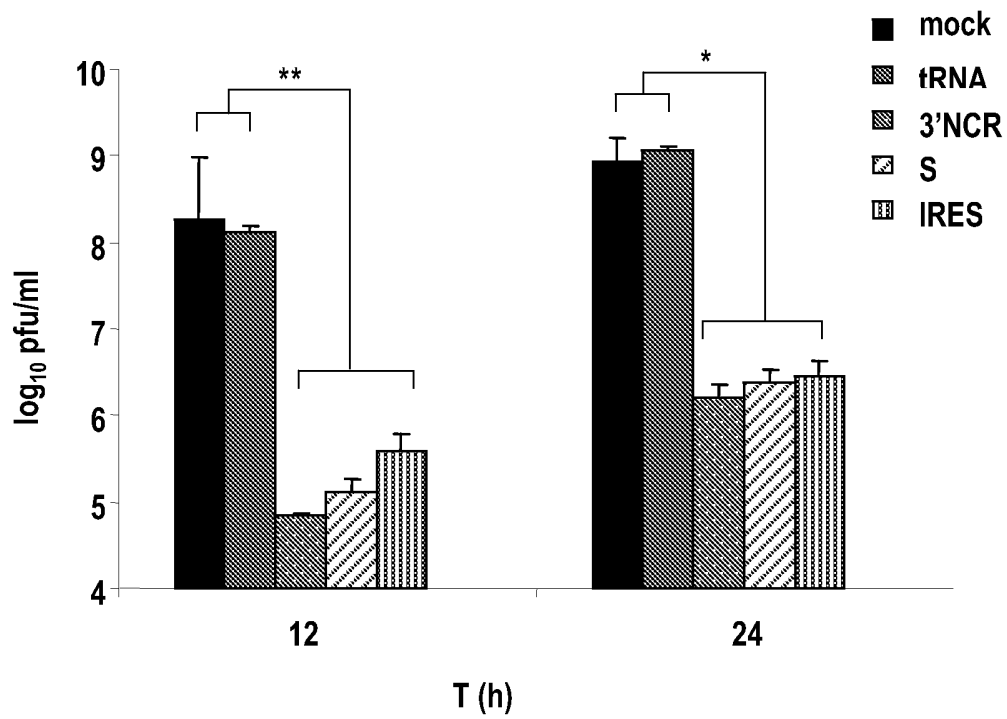


FIG. 5 A

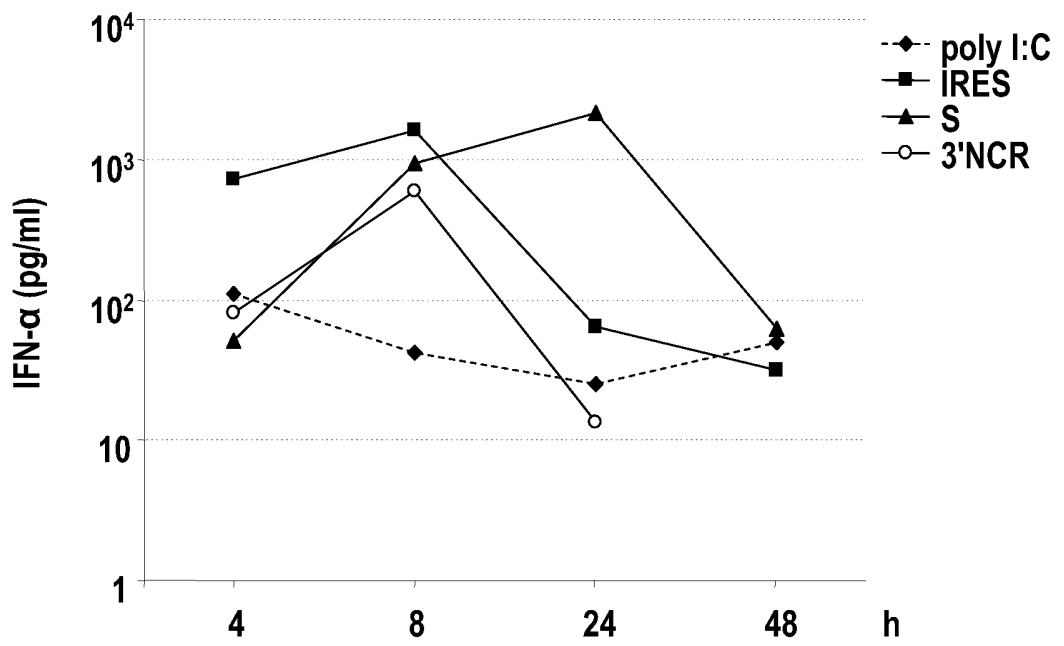


FIG. 5 B

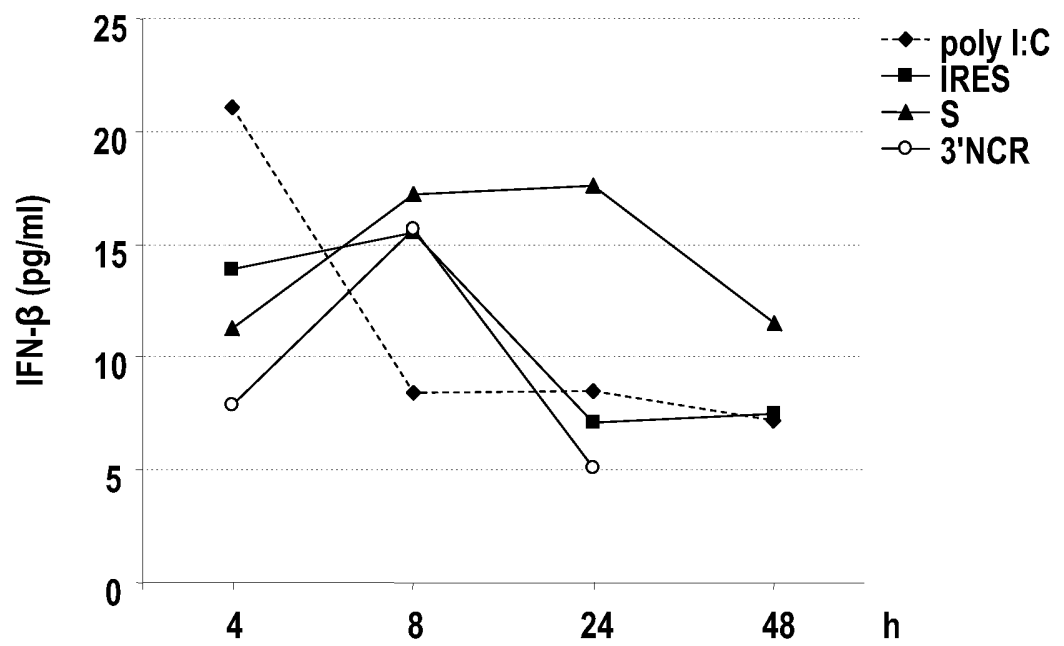


FIG. 6

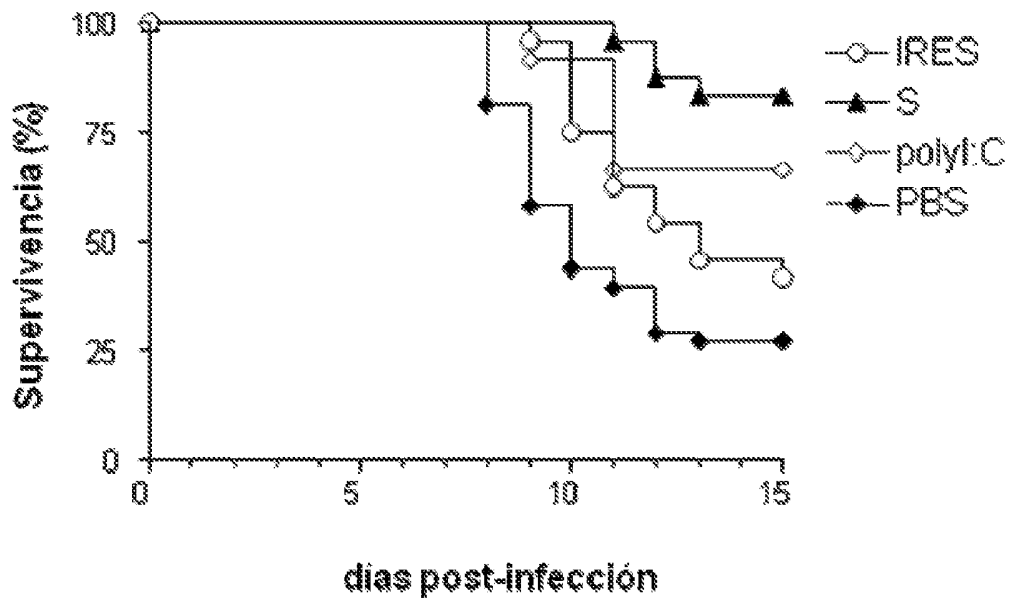


FIG. 7

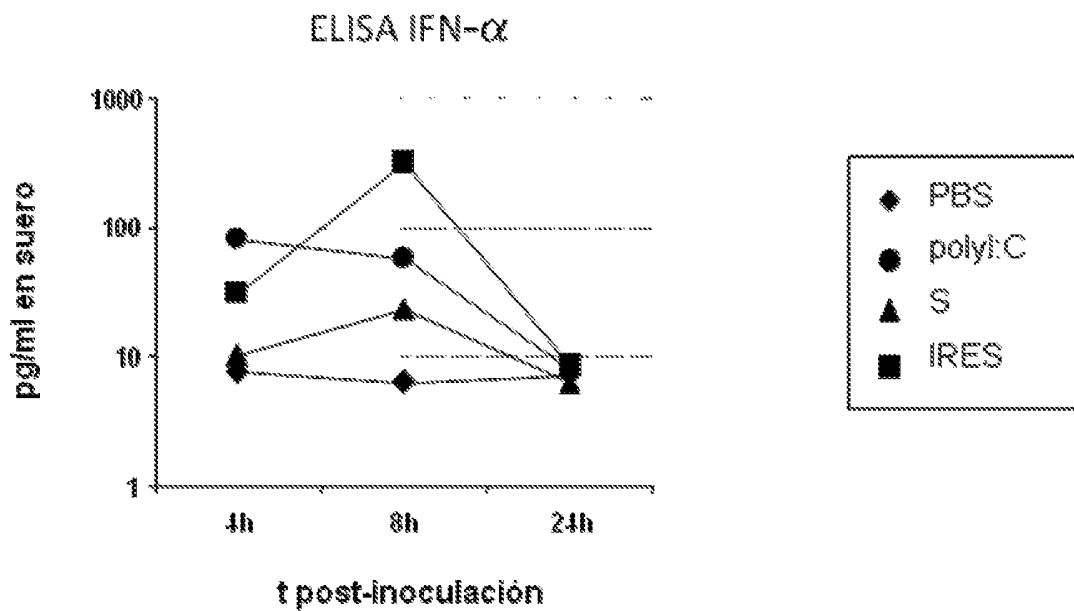


FIG. 8

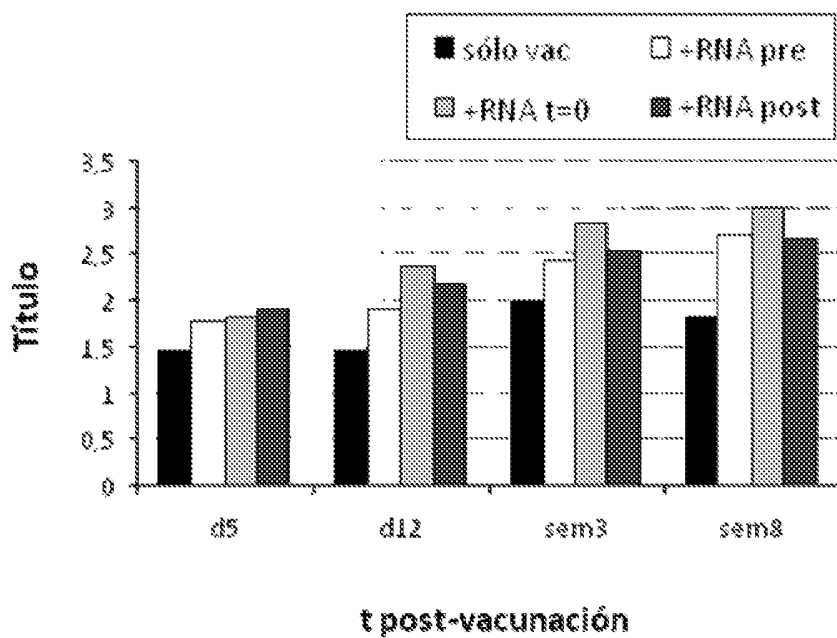


FIG. 9

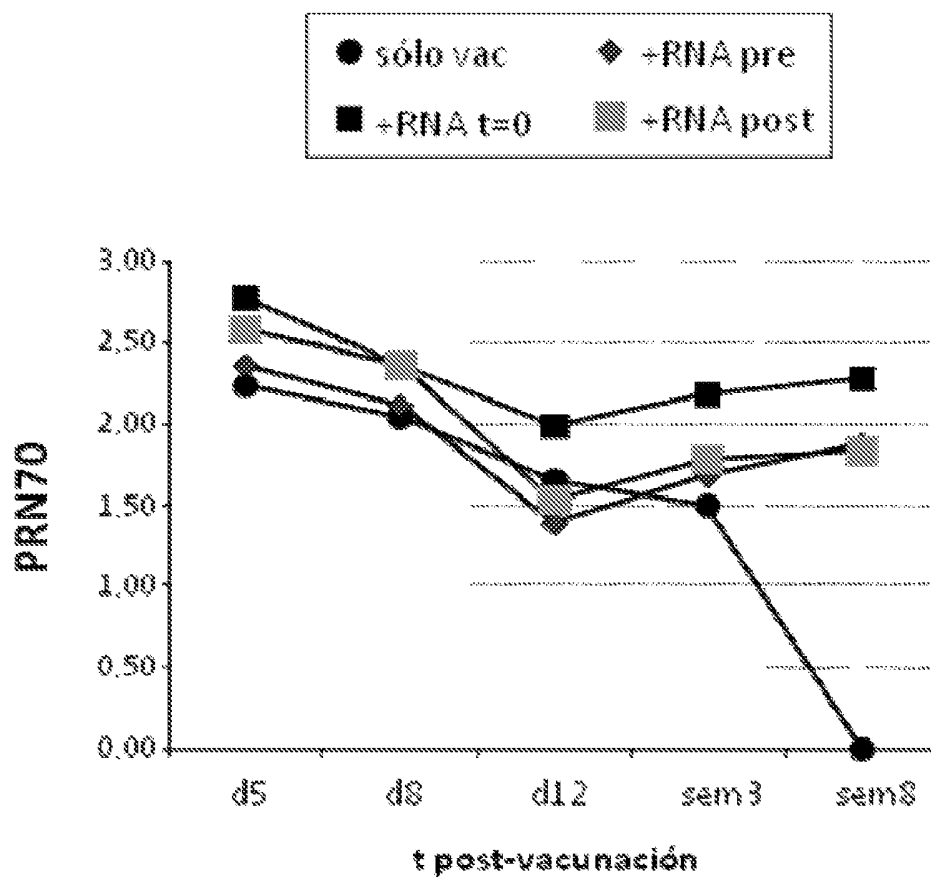


FIG. 10 A

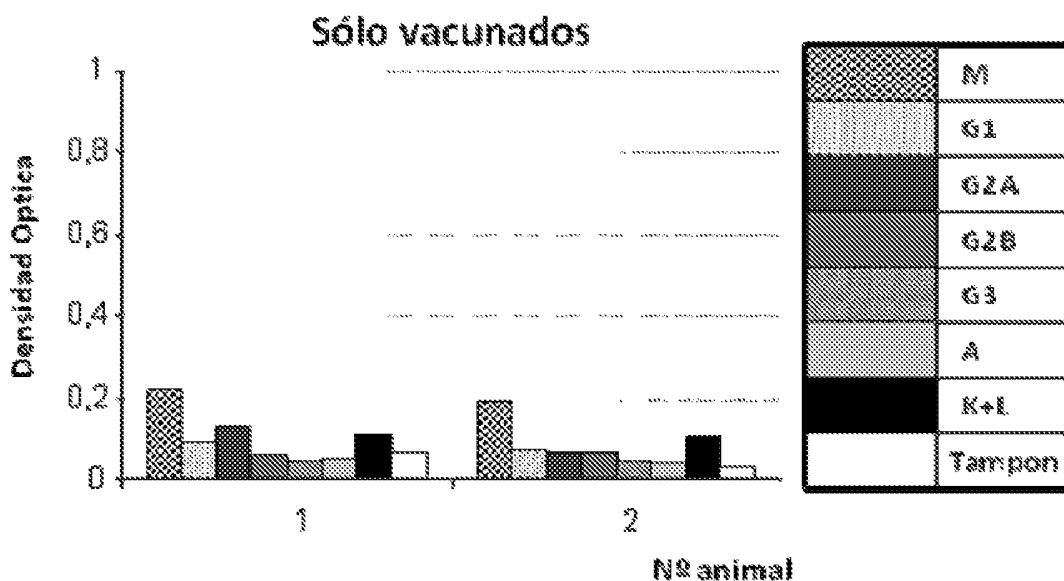


FIG. 10 B

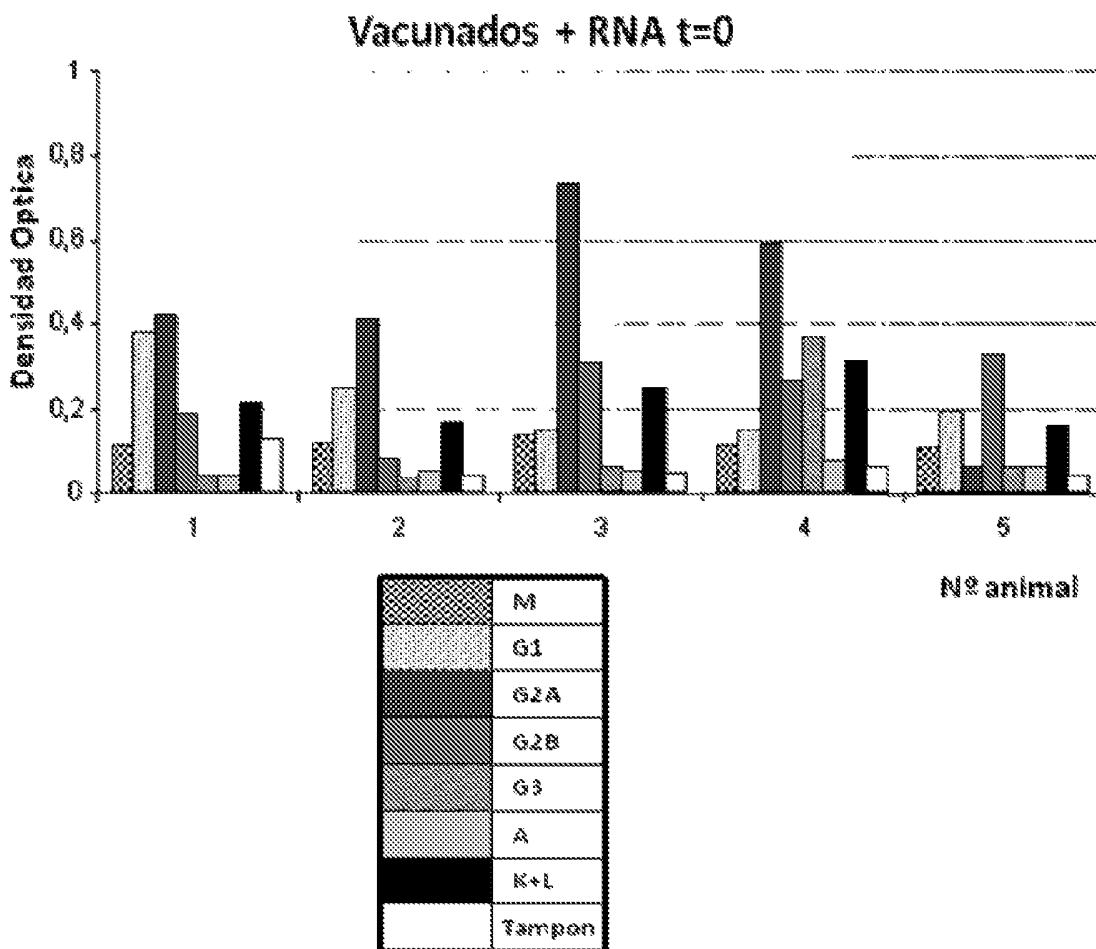
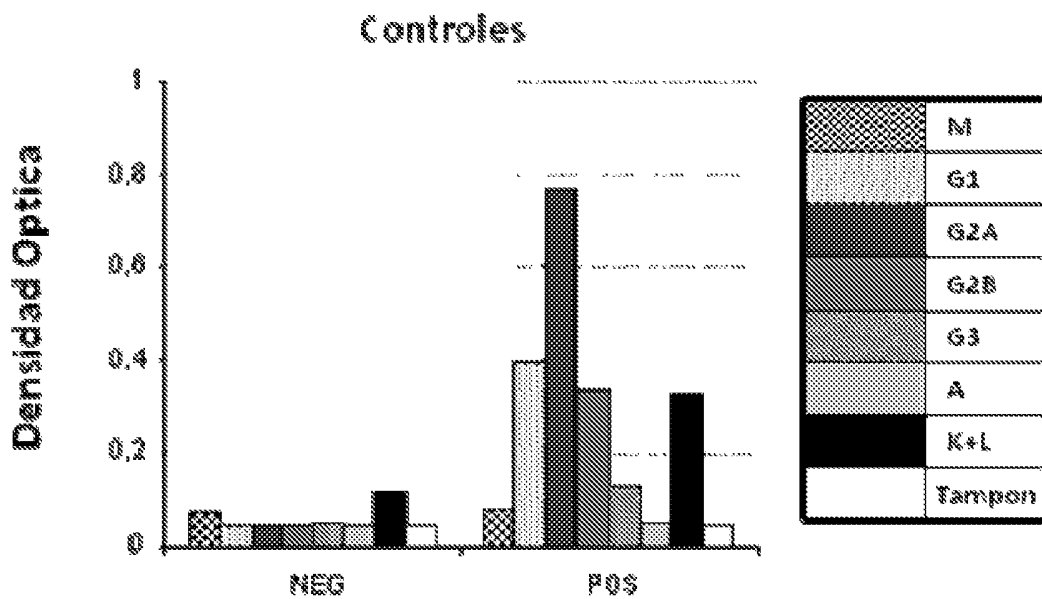


FIG. 10 C



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, XPESP, XPESP2, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, EMBLall

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	RODRÍGUEZ-PULIDO, M., BORREGO, B., SOBRINO, F., SÁIZ, M. RNA structural domains in noncoding regions of the foot-and-mouth disease virus genome trigger innate immunity in porcine cells and mice. Journal of Virology. July 2011, Vol. 85, N° 13, pages: 6492 - 6501. ISSN 1098-5514. <Doi:10.1128/JVI.00599-11>	1-12, 15-18, 21-25
P,A		13, 14, 19, 20
P,X	RODRÍGUEZ-PULIDO, M., SOBRINO, F., BORREGO, B., SÁIZ, M. Inoculation of newborn mice with non-coding regions of foot-and-mouth disease virus RNA can induce a rapid, solid and wide-range protection against viral infection. Antiviral Research. December 2011, Vol. 92, N° 3, pages: 500 - 504. ISSN 1872-9096. <Doi:10.1016/j.antiviral.2011.10.005>	1-10, 15-18, 21-25

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
21/06/2012

Date of mailing of the international search report
(28/06/2012)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
E. Relaño Reyes

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498504

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070198

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUTIÉRREZ, A., MARTÍNEZ-SALAS, E., PINTADO, B., SOBRINO, F. Specific inhibition of aphthovirus infection by RNAs transcribed from both the 5' and the 3' noncoding regions. Journal of Virology. November 1994, Vol. 68, N° 11, pages: 7426-7432. ISSN 0022-538X.	1-4, 6-10, 15-18, 21-25
A	BIGERIEGO, P. ROSAS, M. F., ZAMORA, E. et al. Heterotypic inhibition of foot-and-mouth disease virus infection by combinations of RNA transcripts corresponding to the 5' and 3' regions. Antiviral Research. December 1999, Vol. 44, N° 2, pages: 133 - 141. ISSN 0166-3542. <Doi:10.1016/S0166-3542(99)00057-1>	1-4, 6-10, 15-18, 21-25
A	ZHANG, Y., GUO, Y., LV, K. et al. Molecular cloning and functional characterization of porcine toll-like receptor 7 involved in recognition of single-stranded RNA virus/ssRNA. Molecular Immunology. February 2008, Vol. 45, N° 4, pages: 1184 - 1190. ISSN 0161-5890. <Doi:10.1016/j.molimm.2007.07.014>	1, 2, 8-10, 15-18, 21-25
A	ZHANG, Y.-L., GUO, Y.-J., LI, B., SUN, S.-H. Hepatitis C virus single-stranded RNA induces innate immunity via Toll-like receptor 7. Journal of Hepatology. July 2009, Vol. 51, N° 1, pages: 29 - 38. ISSN 0168-8278. <Doi:10.1016/j.jhep.2009.03.012>	1, 2, 8, 22-25
A	MEIER, A., ALTER, G., FRAHM, N. et al. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded toll-like receptor ligands. Journal of Virology. August 2007, Vol. 81, N° 15, pages: 8180-8191. ISSN 0022-538X. <Doi:10.1128/JVI.00421-07>	1, 2, 8, 22-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070198

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/11 (2006.01)

A61K31/7105 (2006.01)

A61P31/14 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070198

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, XPESP, XPESP2, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, EMBLall

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	RODRÍGUEZ-PULIDO, M., BORREGO, B., SOBRINO, F., SÁIZ, M. RNA structural domains in noncoding regions of the foot-and-mouth disease virus genome trigger innate immunity in porcine cells and mice. Journal of Virology. Julio 2011, Vol. 85, Nº 13, páginas: 6492 - 6501. ISSN 1098-5514. <Doi:10.1128/JVI.00599-11>	1-12, 15-18, 21-25
P,A		13, 14, 19, 20
P,X	RODRÍGUEZ-PULIDO, M., SOBRINO, F., BORREGO, B., SÁIZ, M. Inoculation of newborn mice with non-coding regions of foot-and-mouth disease virus RNA can induce a rapid, solid and wide-range protection against viral infection. Antiviral Research. Diciembre 2011, Vol. 92, Nº 3, páginas: 500 - 504. ISSN 1872-9096. <Doi:10.1016/j.antiviral.2011.10.005>	1-10, 15-18, 21-25

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
21/06/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
28 de junio de 2012 (28/06/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
E. Relaño Reyes

Nº de teléfono 91 3498504

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070198

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	GUTIÉRREZ, A., MARTÍNEZ-SALAS, E., PINTADO, B., SOBRINO, F. Specific inhibition of aphthovirus infection by RNAs transcribed from both the 5' and the 3' noncoding regions. Journal of Virology. Noviembre 1994, Vol. 68, Nº 11, páginas: 7426-7432. ISSN 0022-538X.	1-4, 6-10, 15-18, 21-25
A	BIGERIEGO, P. ROSAS, M. F., ZAMORA, E. et al. Heterotypic inhibition of foot-and-mouth disease virus infection by combinations of RNA transcripts corresponding to the 5' and 3' regions. Antiviral Research. Diciembre 1999, Vol. 44, Nº 2, páginas: 133 - 141. ISSN 0166-3542. <Doi:10.1016/S0166-3542(99)00057-1>	1-4, 6-10, 15-18, 21-25
A	ZHANG, Y., GUO, Y., LV, K. et al. Molecular cloning and functional characterization of porcine toll-like receptor 7 involved in recognition of single-stranded RNA virus/ssRNA. Molecular Immunology. Febrero 2008, Vol. 45, Nº 4, páginas: 1184 - 1190. ISSN 0161-5890. <Doi:10.1016/j.molimm.2007.07.014>	1, 2, 8-10, 15-18, 21-25
A	ZHANG, Y.-L., GUO, Y.-J., LI, B., SUN, S.-H. Hepatitis C virus single-stranded RNA induces innate immunity via Toll-like receptor 7. Journal of Hepatology. Julio 2009, Vol. 51, Nº 1, páginas: 29 - 38. ISSN 0168-8278. <Doi:10.1016/j.jhep.2009.03.012>	1, 2, 8, 22-25
A	MEIER, A., ALTER, G., FRAHM, N. et al. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded toll-like receptor ligands. Journal of Virology. Agosto 2007, Vol. 81, Nº 15, páginas: 8180-8191. ISSN 0022-538X. <Doi:10.1128/JVI.00421-07>	1, 2, 8, 22-25

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12N15/11 (2006.01)

A61K31/7105 (2006.01)

A61P31/14 (2006.01)