

(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 2009/144353 A1

(43) Fecha de publicación internacional
3 de diciembre de 2009 (03.12.2009)

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 7/00 (2006.01) C12N 7/08 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070187

(22) Fecha de presentación internacional:
27 de mayo de 2009 (27.05.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200801583 27 de mayo de 2008 (27.05.2008) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA** [ES/ES]; Ctra. de La Coruña, Km. 7,5, E-28040 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
DOMINGO SOLANS, Esteban [ES/ES]; CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CBMSO), C/ Nicolas Cabrera, 1, E-28049 Madrid (ES). **ESCAARMÍS HOMS, Cristina** [ES/ES]; CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CBMSO), C/ Nicolas Cabrera, 1, E-28049 Madrid (ES). **OJOSNEGROS MARTOS, Samuel** [ES/ES]; CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CBMSO), C/ Nicolas Cabrera, 1, E-28049 Madrid (ES). **GARCÍA ARRIAZA, Juan Francisco** [ES/ES]; CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA (CNB), C/ Darwin, 3, E-28049 Madrid (ES). **SANZ-RAMOS ROJO, Marta** [ES/ES]; CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CBMSO), C/ Nicolas Cabrera, 1, E-28049 Madrid (ES). **SEVILLA HIDALGO, Noemí** [ES/ES]; INSTITUTO NACIONAL

DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA), Ctra. de La Coruña, Km. 7,5, E-28040 Madrid (ES). **RODRÍGUEZ CALVO, Teresa** [ES/ES]; INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA), Ctra. de La Coruña, Km. 7,5, E-28040 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-Madrid 28010 (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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (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, SE, SI, SK, 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: ATTENUATED VACCINE FOR FOOT-AND-MOUTH DISEASE

(54) Título: VACUNA ATENUADA PARA LA FIEBRE AFTOSA

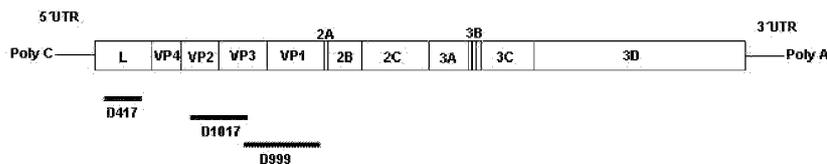


FIG. 5

(57) Abstract: The invention relates to an attenuated vaccine against foot-and-mouth disease, with viral variants of the foot-and-mouth disease virus, in which one of the variants includes the deleted genome in the region coding for protease L and another of the variants in the region of the structural proteins. Said variants can complement one another.

(57) Resumen: Vacuna atenuada frente a la fiebre aftosa, con variantes víricas del virus de la fiebre aftosa, en la que una de las variantes presenta el genoma delecionado en la región codificante para la proteasa L, y otra de las variantes en la región de las proteínas estructurales. Estas variantes son capaces de complementar entre sí.



WO 2009/144353 A1

VACUNA ATENUADA PARA LA FIEBRE AFTOSA.

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

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

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

30

El genoma de VFA consiste en una sola molécula de ARN de polaridad

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

Las vacunas frente a la FA actualmente en el mercado se obtienen a partir del crecimiento de virus en cultivos celulares de células BHK (Radlett y col., 1985. Dev. Biol. Standard, 60: 163; Telling, 1975. Industrial production of FMD vaccine using BHK suspension cells. Some comparative results relating in vitro assays and cattle potency. In Report of the research Group of the Standing technical Committee of the European Commission for the control of Foot-and-Mouth Disease, Brescia, Italy. Food and Agriculture Organization. Rome, 95). Este virus se inactiva químicamente con un compuesto de aziridinas, de manera más concreta etilen-amina binaria (BEI en sus siglas inglesas) (revisión en Brown, F., 2001, Vaccine, 20: 322-327). Las vacunas de virus inactivados, como es el caso de FA, deben llevar adyuvantes que confiera la inmunidad suficiente en los animales. El

adyuvante más utilizado para el ganado vacuno y ovino es hidróxido de aluminio, pero para el ganado porcino es preciso utilizar aceite mineral como adyuvante incompleto de Freund (Freund & Thompson, 1945, Science 101: 468). Por lo general, se preparan vacunas monovalentes, pero en los países en los que circula más de un tipo de virus, se pueden utilizar las vacunas polivalentes correspondientes.

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

- 10 1- el antígeno viral se debe producir en grandes cantidades porque cada dosis de vacuna necesita contener altos niveles de virus inactivado para ser efectivas;
- 2- la preparación del virus se debe inactivar de tal manera que no quede ninguna infectividad residual pero que al mismo tiempo mantenga la inmunogenicidad del virus;
- 15 3- un adyuvante se debe añadir a la vacuna para potenciar la respuesta de anticuerpos frente a las proteínas virales.

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

Estas vacunas tienen inconvenientes grandes:

- 1- el posible escape de virus durante la producción de grandes cantidades de virus virulento;
- 30 2- posibilidad de un brote debido a la incorrecta inactivación del virus virulento usado para la producción de la vacuna con lo que se puede

producir una infección que, aunque asintomática, de lugar a un brote;

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

- 5 Una manera de paliar estos inconvenientes sería el uso de virus atenuados que, aunque replicando, no provocan ningún tipo de enfermedad. Debido a la enorme variabilidad, ya comentada, de los virus ARN, no se ha elegido esta técnica como válida ya que puede resultar en la aparición de un revertiente de la atenuación y que se vuelva virulento,
- 10 con el consiguiente peligro para la aparición de un nuevo brote de FA. Sin embargo, este tipo de vacunas daría una inmunidad larga y duradera, sin necesidad de dosis de recuerdo, ya que mimetizaría lo que ocurre en una infección natural.
- 15 Existe la necesidad de encontrar un sistema que proporcione soluciones completas al problema de encontrar nuevas vacunas frente a la FA y que carezca de los inconvenientes que presentan las vacunas actuales, principalmente el posible escape de virus virulento de las plantas de producción o la posibilidad de la presencia de virus virulento residual en la
- 20 formulación de vacuna inactivada, lo que daría lugar a nuevos brotes de FA.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 25 La presente invención proporciona una vacuna que tiene dos barreras de seguridad frente a la vacuna convencional: primera, está altamente atenuada *in vivo*, lo que hace que en caso de que haya un escape durante la producción de la misma no suponga ningún tipo de riesgo como posible inicio de un brote; segunda, está compuesta por virus defectivos que
- 30 necesitan complementar para producir una infección productiva, y esto sólo sucede a muy alta multiplicidad de infección (MOI), lo que *in vivo* es

altamente improbable que suceda. En cualquier caso, si esta posibilidad se diera en el punto de inoculación, aunque se obtuviera el virus completo por recombinación o por complementación, el virus resultante sería la población C-S8p260, que está totalmente atenuada. Además, dicha vacuna, al ser un virus completo, es capaz de conferir una inmunidad que será más larga que la conferida por la actual vacuna y más específica y robusta que la conferida por las vacunas recombinantes. La razón para todo ello es que, al tratarse de un virus completo, expresará un amplio repertorio de epítomos T y B necesarios para la completa eliminación del virus.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

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

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

b) una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a la SEQ ID NO: 3,
para su uso como medicamento.

El término "homología", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre los aminoácidos de dos o más proteínas o secuencias aminoacídicas. Dos proteínas se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo o si tienen función y estructura similares. En el caso particular de las variantes víricas con deleciones en el genoma, aunque las variantes de la invención

se han obtenido a partir de un solo serotipo de VFA (*Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) strain C1-Santa Pau ó C-S8, perteneciente al serotipo C ó Aphthovirus C), a la que se hace referencia de aquí en adelante como VFA, es suficiente para permitir a un experto en la materia
5 obtener variantes con genomas delecionados en las mismas regiones para otras cepas que estén comprendidas dentro de la especie. Así, entre los distintos tipos de VFA, y sin limitarse a estos, se incluye:

- Virus de la fiebre aftosa - tipo A (=Aphthovirus A).
- 10 - Virus de la fiebre aftosa - tipo Asia 1 (=Aphthovirus Asia 1).
- Virus de la fiebre aftosa - tipo C (=Aphthovirus C).
- Virus de la fiebre aftosa - tipo O (=Aphthovirus O).
- Virus de la fiebre aftosa - tipo SAT 1 (=Aphthovirus SAT1).
- Virus de la fiebre aftosa - tipo SAT 2 (=Aphthovirus SAT2).
- 15 - Virus de la fiebre aftosa - tipo SAT 3 (=Aphthovirus SAT3).

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

Debido a la interrelación evolutiva de las cepas de VFA, las cepas de VFA
30 putativas son identificables por su homología al nivel de genoma o de los polipéptidos codificados por el mismo. Generalmente, las cepas de VFA

5 tienen una identidad mayor de 80%, preferiblemente una identidad mayor de 90 %, y aún más preferiblemente una identidad mayor de 95%, y aún más preferiblemente una identidad mayor de 99% al nivel de las secuencias aminoacídicas. Los métodos para determinar la homología y porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos se puede determinar directamente y puede compararse con las secuencias que se proporcionan en esta memoria. Por ejemplo también, la secuencia de nucleótidos del material genómico del VFA putativo se puede determinar
10 (usualmente por la vía de un compuesto intermedio de cDNA), y deducirse la secuencia de aminoácidos codificada en ella, para comparar con las regiones correspondientes de las secuencias proporcionadas en esta memoria.

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

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

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

para su uso como medicamento.

30

Los virus con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 pertenecen a la variante C-S8p260D417, presentan una deleción de 417 nucleótidos en la región que codifica para la proteasa L, respecto a la secuencia de polinucleótidos de la variante C-S8. La deleción $\Delta 417$ incluye de las
5 posiciones 1153 a 1517 (del genoma del VFA, siguiendo la numeración de Escarmís *et al.* 1996. Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an ARN virus. *J. Mol. Biol.* 264:255–267).

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

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

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

30

En esta memoria se entiende por "población de virus" o "población viral" a

una pluralidad de virus existente en cualquier forma, y que comprenda al menos dos variantes virales de un virus de la misma especie. Por ejemplo, una población de virus puede ser una suspensión de partículas de virus presentes en un medio de cultivo celular o en otra solución. Puede ser
5 también un pellet o una preparación liofilizada conteniendo los virus.

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

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una construcción genética, de aquí en adelante construcción genética de la invención, que dirigiría la transcripción *in vitro* o *intracelular* de las
15 secuencias de polinucleótidos de la población de virus de la invención, y comprende la secuencia de polinucleótidos que codifica la primera secuencia aminoacídica de la invención y otra secuencia seleccionada de entre:

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

poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc...

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

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

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucléico" se usan aquí de manera
intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de
cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxiribonucleótidos.
25

Los términos "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan
aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de
aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no
codificantes, química o bioquímicamente modificados.
30

La población de virus aislados de la invención, las secuencias

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

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

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

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

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

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

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

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

15

En el contexto de la presente invención el término “vacuna” se refiere a una preparación antigénica empleada para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad. Son preparados de antígenos que una vez dentro del organismo provocan la respuesta del sistema inmunitario, mediante la producción de anticuerpos, y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria.

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

30 El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio,

tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere, también, a los virus de la invención, la cápside de la invención, la construcción genética de la invención, el plásmido de la invención o la composición de la invención, que es capaz de generar una respuesta inmune frente a un organismo dado, que está causando dicha enfermedad en el hombre o los animales. Incluye, por tanto, lo que se conoce como vacuna, tal y como se ha definido previamente en esta memoria.

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

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

25

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

30

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

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

10

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

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

25

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

30

compatibles con las secuencias de control.

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

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

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

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

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de virus, secuencias aminoacídicas, cápsides, anticuerpos o construcciones genéticas que permitan su expresión calculada para producir el efecto deseado y, en

general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos virus, anticuerpos, secuencias y construcciones y el efecto terapéutico a conseguir. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

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

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

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes

ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

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

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

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

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

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

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

20

EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

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

Ejemplo 1.- Aislamiento y posterior creación de la población de VFA C-S8p260 de la invención

30 Los experimentos siguientes se llevaron a cabo con una población de VFA clonada, C-S8c1, de serotipo C (Sobrino, F.; Dávila, M.; Ortín, J. &

Domingo, E. (1983) *Virology*, 128: 310-318.). Este virus fue pasado 260 veces a alta multiplicidad de infección (MOI) en células BHK, denominando a la población viral resultante C-S8p260. El análisis mediante RT-PCR del ARN de la población C-S8p260 reveló la presencia de tres moléculas distintas de ARN:

- una molécula que contiene una deleción de 417 nucleótidos en la región que codifica para la proteasa L ($\Delta 417$);
- una segunda molécula con una deleción de 999 nucleótidos en la región que codifica para las proteínas estructurales ($\Delta 999$) y,
- 10 - una tercera, con una deleción de 1017 nucleótidos en la misma región ($\Delta 1017$) (García-Arriaza y col., 2004, J. Virol. 78: 11678-11685).

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

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

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

5 **Ejemplo 2.- Utilización de la población viral C-S8p260 en la elaboración de una vacuna viva atenuada**

La población viral C-S8p260 se ha probado, inicialmente, como posible vacuna viva atenuada en un modelo de ratón desarrollado en el laboratorio de los inventores (Salguero y col., 2005, *Virology* 332: 384-396). Ratones 10 C57BL/6 son altamente susceptibles a la infección con VFA C-S8c1. Así, la inoculación de VFA en la almohadilla plantar, inyección subcutánea, (sitio de inoculación equivalente al rodete coronario del cerdo, el hospedador natural) produjo la aparición de síntomas de enfermedad a las 15 24 horas post-inoculación (pi) (pelo erizado, apatía, postura encorvada y depresión), y muerte entre 36-48 horas pi).

2.1.- Vacunación vía en la almohadilla plantar

20 Un primer objetivo fue evaluar si la población viral C-S8p260 está atenuada *in vivo*. Para ello, 16 ratones fueron inoculados en la almohadilla plantar (AP) con 10^7 PFUs de C-S8p260 (la dosis más alta que se puede inocular con el volumen permitido en la AP que son 50 μ l). Los animales fueron sangrados a distintos tiempos pi (días 1, 2, 3 15 y 30 pi) para 25 determinar viremia y título de anticuerpos frente a VFA (Figura 1). Se determinó título viral en suero mediante titulación por plaqueo en células susceptibles BHK a tiempos cortos pi, 1, 2 y 3 días, y no se detectó replicación viral. Asimismo, los animales no detectaron ningún síntoma de enfermedad o muerte debido a la infección viral. Estos datos demuestran 30 que la población C-S8p260 está atenuada en ratones.

Este mismo esquema de experimento se utilizó para determinar la protección de los ratones inoculados con C-S8p260 frente a un desafío con una dosis letal de nuestro virus de referencia C-S8c1. Así, los 16 animales fueron desafiados al día 90 pi con 10^4 PFUs de C-S8c1 en la AP.

5 Se incluyeron 4 animales control sin vacunar. Los resultados (Figura 2) fueron que el 100% de los animales inoculados con C-S8p260 sobrevivieron al desafío con C-S8c1 (tiempo de observación de 30 días post-desafío) mientras que los animales control murieron a las 48 horas pi. Se determinó la viremia de los animales inoculados con C-S8p260

10 después del desafío con C-S8c1 con el objetivo de ver si, aunque los animales estaban protegidos porque no desarrollaron ningún síntoma de enfermedad, el virus había replicado. Los resultados mostraron ausencia completa de replicación de C-S8c1 en ratones previamente inoculados con C-S8p260. Estos datos indican que la población de VFA C-S8p260 está

15 atenuada e induce protección estéril en ratones, lo que sugiere la posible utilización de C-S8p260 como vacuna.

2.2.- *Vacuna intramuscular*

20 Dado que la población C-S8p260 fue inoculada inicialmente en la AP y las vacunas en hospedadores naturales se inoculan generalmente por vía intramuscular, se evaluó si la inoculación intramuscular en ratones de la población C-S8p260 también protegía a los ratones frente a un desafío con una dosis letal de C-S8c1. Para ello se inocularon 12 ratones C57BL/6

25 intramuscularmente con 10^7 PFUs de C-S8p260. A los 60 días post-inoculación se les desafío con 10^4 PFUs de VFA C-S8c1 en la AP. Los resultados indicaron la completa ausencia de síntomas en los ratones vacunados intramuscularmente.

30 2.3.- *Vacunas con menor dosis de antígeno*

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

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

2.4.- Vacunación de cerdos

La vacuna propuesta en esta patente se evaluó también en cerdo, el hospedador natural de VFA, en un ensayo preliminar. Los animales se

dividieron en cinco grupos. En cada uno de los grupos el protocolo seguido es común para todos ellos. El virus C-S8p260 se inoculó por vía intramuscular en 1 ml de PBS. El desafío se realizó en 500 µl en el rodete coronario. Se tomaron muestras de sangre a D0, antes de la inoculación de C-S8p260, D2, D4, D7, D15 y D30 (antes del desafío). Después del desafío los animales fueron sangrados cada dos días y sometidos a observación cada día para determinar aparición de síntomas de FA hasta el día 11 post-desafío. Se determinó aparición de aftas primarias (en el sitio de inoculación) y aftas secundarias, así como estado general de los cerdos (síntomas de FA: apatía, depresión, imposibilidad de andar...). Asimismo, se tomó temperatura diaria de cada uno de los cerdos.

Grupo 1. 4 animales. Se siguió el siguiente protocolo:

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

Grupo 2. 1 animal. En este grupo se utilizó la misma dosis de C-S8p260 que en el grupo anterior pero se añadió adyuvante en la segunda dosis.

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

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

Grupo 3. 3 animales. La dosis de C-S8p260 se diluyó 1:100 con el objetivo de evaluar si se necesitaba una dosis de defectivos alta.

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

- 5 Grupo 4. 2 animales. Se utilizó una dosis de defectivos 100 veces menor que inicialmente (igual que el grupo 3) pero se añadió adyuvante en la segunda dosis.

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

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

- 15 Grupo 5. 2 animales. Estos animales son el control positivo del experimento en el que los cerdos fueron inoculados con PBS en vez de la vacuna y desafiados con la misma dosis de C-S8c1. Estos animales no estaban protegidos y mostraron los síntomas de FA.

Nº cerdo	PBS	D30 Desafío
21	0	10 ⁵ PFUs C-S8c1
22	0	10 ⁵ PFUs C-S8c1

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

Los resultados se pueden describir desde dos puntos de vista:

1. Temperaturas
- 5 2. Síntomas medido como la aparición de aftas.

Grupo 1. Tabla de temperaturas expresada en °C. Se ha incluido para comparar los animales #21 y #22 del grupo 5 que son los controles desafiados pero sin vacunar que desarrollaron todos los síntomas esperados de FA.

10

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

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

15

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

Día p.i.	#2	#3	#4	#5	#21	#22
0	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-

2	-	-	-	-	Todas las patas	Todas las patas
3	Primaria	Primaria	-	-	Todas las patas	Todas las patas
4	Todas las patas	Primaria	Primaria	-	Todas las patas	Todas las patas
5	Todas las patas	Primaria	Todas las patas	-	Todas las patas	Todas las patas
7	Todas las patas	Primaria	Todas las patas	Primaria	SAC	SAC
8	SAC	Primaria	Todas las patas	Primaria		
9		Primaria	Todas las patas	Primaria		
10		SAC	SAC	SAC		

Se puede observar que en general todos los animales mostraron un retraso en la aparición de síntomas en relación a los controles (animales #21 y #22). En especial los animales #3 y #5 mostraron protección parcial ya que sólo aparecieron aftas primarias, no observándose una progresión de la infección.

Grupo 2. Se compara el animal #11 con los controles positivos.

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

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

Aparición de aftas.

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

5

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

10

Grupo 3. Se comparan los animales #7, #8 y #10 con los controles.

Día p.i.	#7	#8	#10	#21	#22
0	39.1	39.3	39.2	39.2	38.8
1	39.6	39.3	39.4	39.1	39.3
2	40.9	41.5	39.2	40.8	40.8
3	40.7	41.2	40.1	40.7	40.9

4	40	41.2	40.6	40.2	40.5
5	40.5	40.7	41.1	40.2	39.3
7	39.4	39.9	40.3	38.1	38.8
8	30.9	SAC	39.9	SAC	SAC
9	SAC		SAC		
10					

Todos los animales mostraron temperaturas similares a los controles.

5 Aparición de aftas.

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

Estos animales no mostraron ningún tipo de protección.

10 Grupo 4. Se comparan los animales #12 y #13 con los controles.

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

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

5

Aparición de aftas.

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

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

Conclusiones del experimento de vacunación en cerdos.

5

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

10

15 **Ejemplo 3.- Vacuna inactivada**

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

20

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

25

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

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

10 ⁷ PFUs pre- desafío		1:100 pre-desafío		72h post-desafío		72h post-desafío	
Ratón	PRN 7#	Ratón	PRN .7#	Ratón	PRN 7#	Ratón	PRN 7#
5	2,0	5	2,0	5	1,8	5	1,9
6	2,0	6	2,1	6	2,0	6	1,8
8	2,4	8	0	8	2,2	7	1,8
9	2,1	9	1,7	9	1,9	8	1,8
10	1,3	10	1,4	10	1,5	9	2,4
11	1,7	11	1,6	11	1,8	10	1,8
12	0,4	12	1,4	12	1,9	11	1,8
13	1,7	13	0,6	13	1,8	12	1,1
14	2,7	14	1,4	14	2,4	14	1,5
15	1,9	15	1,7	15	1,9	15	1,8
	1,8		1,4		1,9		1,8
	+/-0,6		+/- 0,6		+/- 0,2		+/- 0,3

REIVINDICACIONES

1. Población de virus aislada, caracterizada porque comprende una secuencia de polinucleótidos capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica homóloga a la SEQ ID NO: 1, y al menos una secuencia seleccionada de entre:
- 5
- a) una secuencia de polinucleótidos capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica homóloga a la SEQ ID NO: 2, ó
- 10
- b) una secuencia de polinucleótidos capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica homóloga a la SEQ ID NO: 3,
- para su uso como medicamento.
- 15
2. Población de virus aislada caracterizada porque comprende una secuencia de polinucleótidos capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 1, y al menos una secuencia seleccionada de entre:
- 20
- a) una secuencia de polinucleótidos capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 2, o
- 25
- b) una secuencia de polinucleótidos capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido con una identidad de al menos un 80% con la SEQ ID NO: 3,
- para su uso como medicamento.
- 30
3. Población de virus aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde las secuencias aminoacídicas

presentan una identidad de al menos un 90% con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente.

- 5 4. Población de virus aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde las secuencias aminoacídicas presentan una identidad de al menos un 95% con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente.
- 10 5. Población de virus aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde las secuencias aminoacídicas presentan una identidad de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente.
- 15 6. Población de virus aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde las secuencias aminoacídicas son la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente.
- 20 7. Uso de la población de virus aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para la elaboración de un medicamento.
- 25 8. Cápside proteica aislada que comprende una secuencia aminoacídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso como medicamento.
- 30 9. Construcción genética que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a la SEQ ID NO: 1 y al menos otra secuencia seleccionada de entre:
 - a) secuencia de polinucleótidos, que codifica una secuencia homóloga a la SEQ ID NO: 2,

- b) secuencia de polinucleótidos, que codifica una secuencia homóloga a la SEQ ID NO: 3,
- c) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a) y/o b),
- d) secuencia de nucleótidos de a), b), ó c), preferiblemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción.
10. Anticuerpos producidos tras la inmunización de un animal, con la población de virus según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, una cápsida proteica aislada según la reivindicación 8, una construcción genética según la reivindicación 9, o cualquiera de sus combinaciones.
11. Anticuerpos según la reivindicación anterior, para su uso como medicamento.
12. Composición que comprende:
- a) una población de virus aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-6,
- b) una cápsida proteica aislada según la reivindicación 8,
- c) una construcción genética según la reivindicación 9,
- d) un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 10-11,
- o cualquiera de sus combinaciones, para su uso como medicamento.

13. Composición según la reivindicación anterior donde el medicamento es una vacuna.
- 5 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12-13, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la fiebre aftosa.
- 10 15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, que además comprende excipientes farmacológicamente aceptables.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, que además comprende un adyuvante.
- 15 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12-16, donde las secuencias aminoacídicas de la población de virus aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, la cápsida proteica aislada según la reivindicación 8, o el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, presenta un origen recombinante.
- 20 18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12-17, que comprende dos o más tipos, serotipos, variedades o mutantes de virus de la aftosa.
- 25 19. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 12-18, para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento o prevención de la fiebre aftosa.
- 30

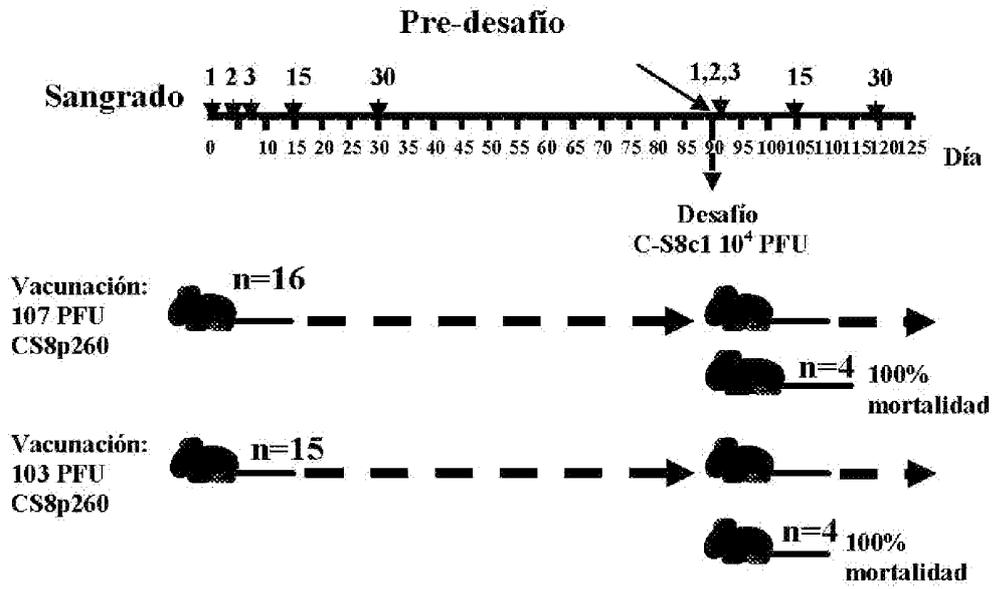


FIG. 1

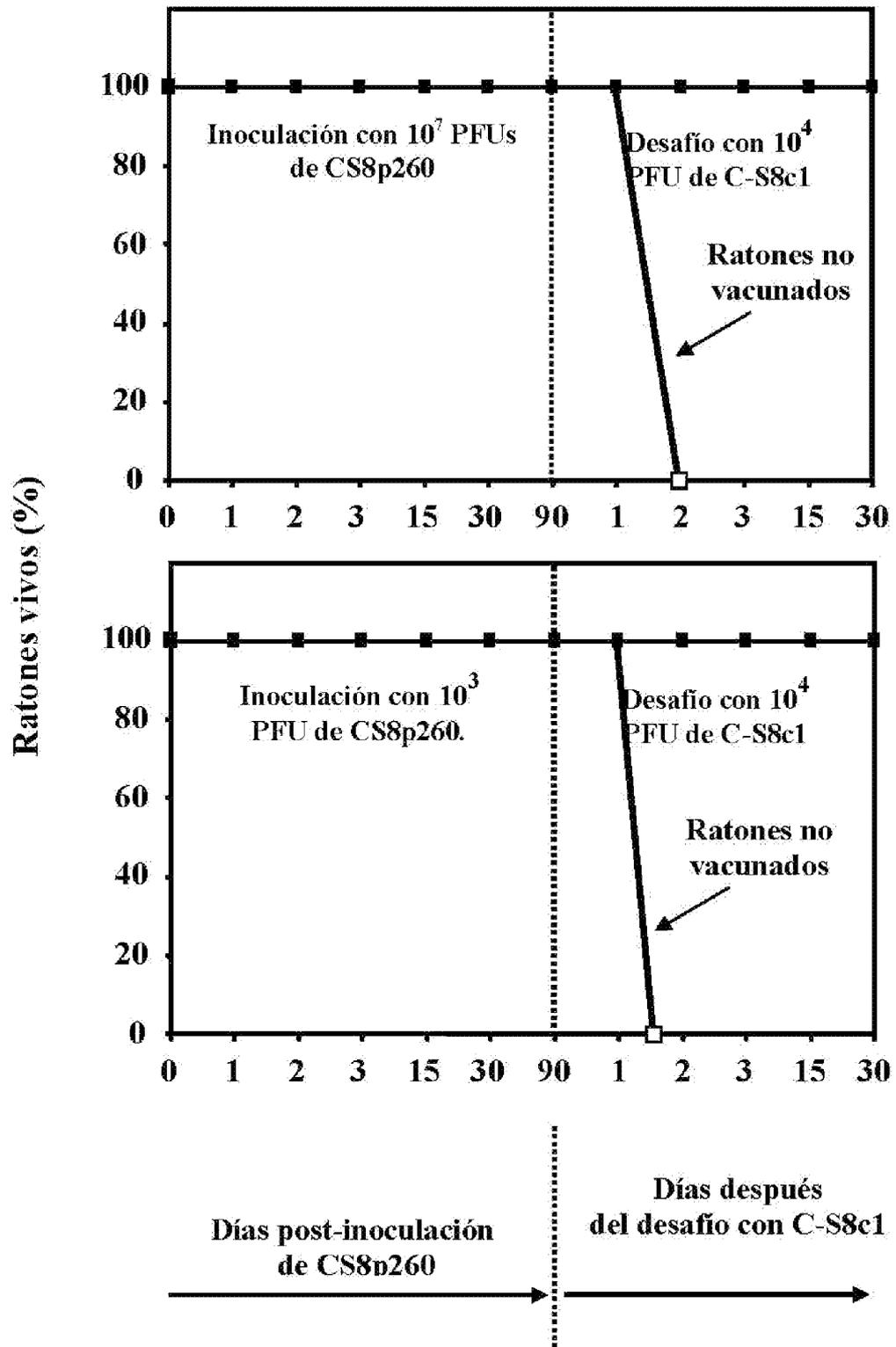


FIG. 2

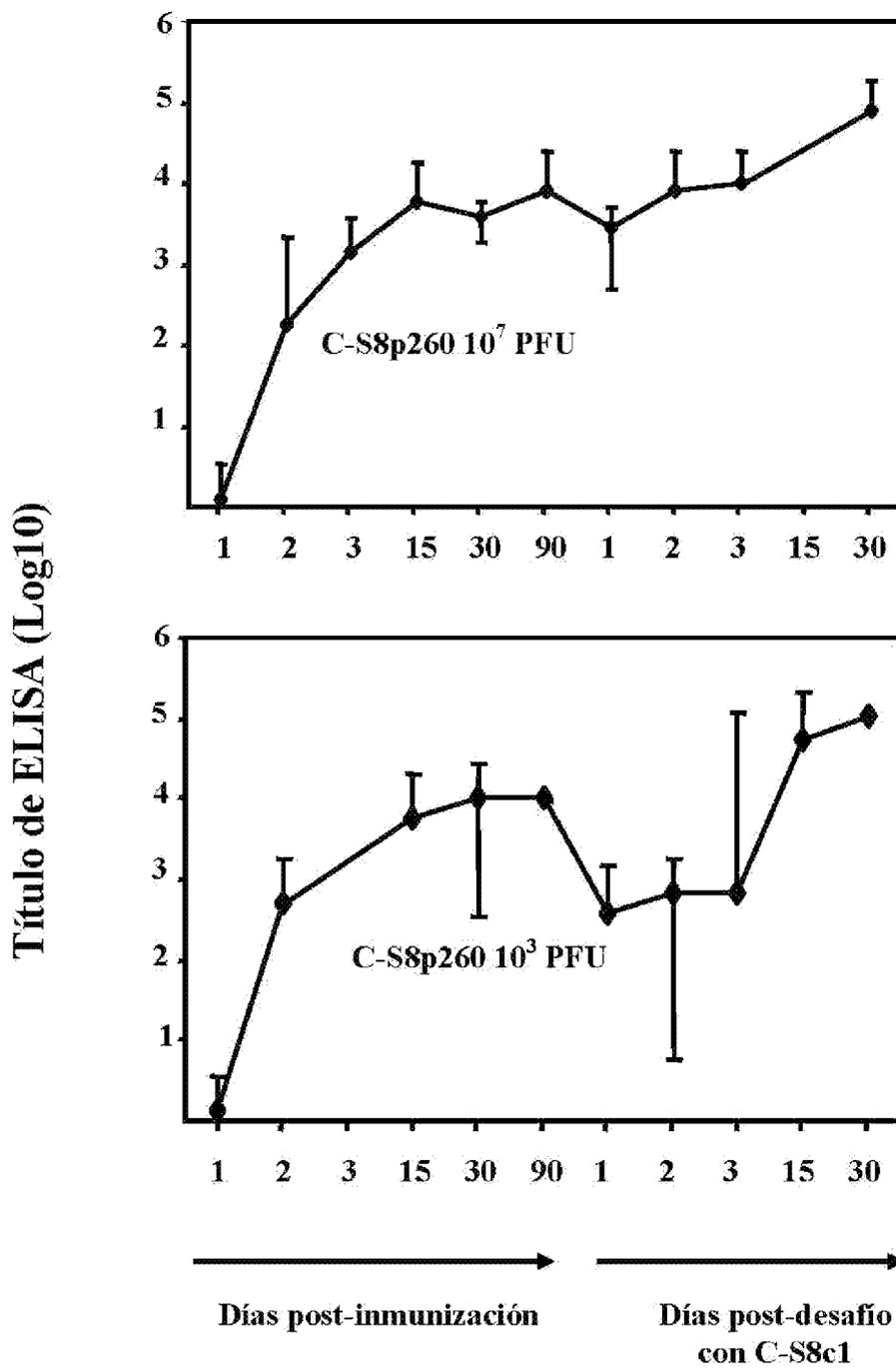
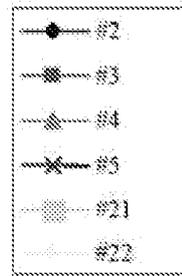
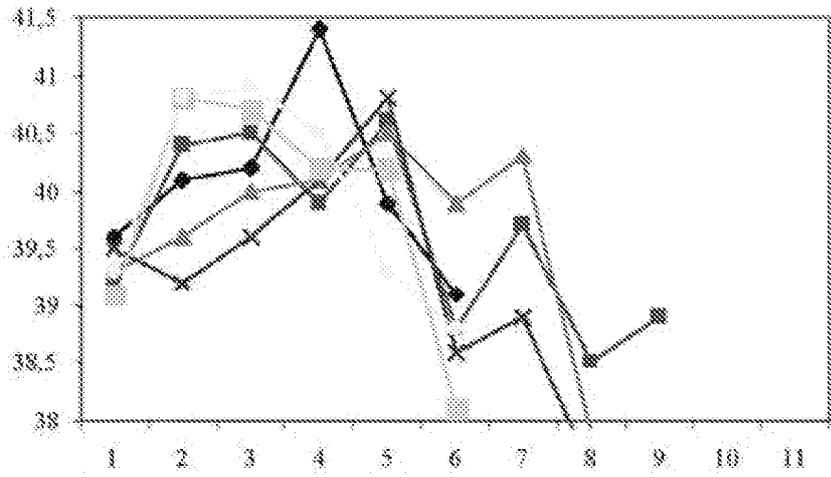


FIG. 3

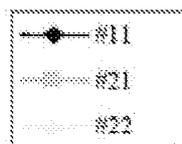
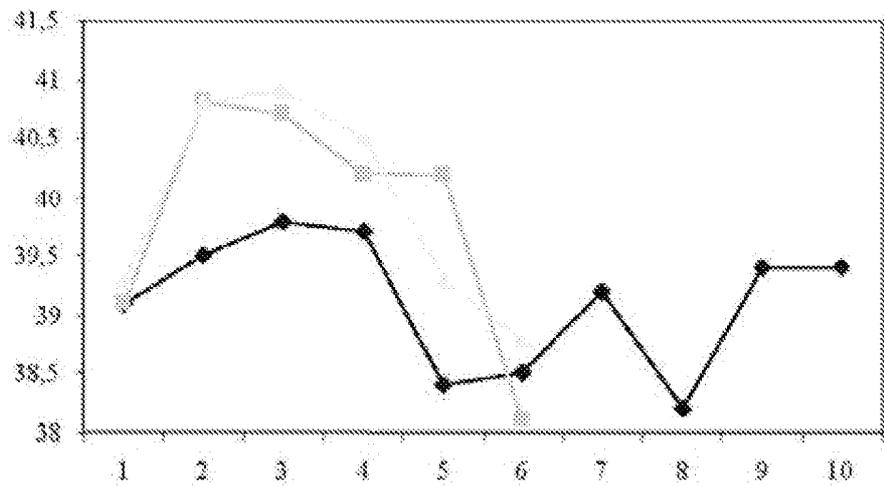
Grupo 1

Temperatura (°C)



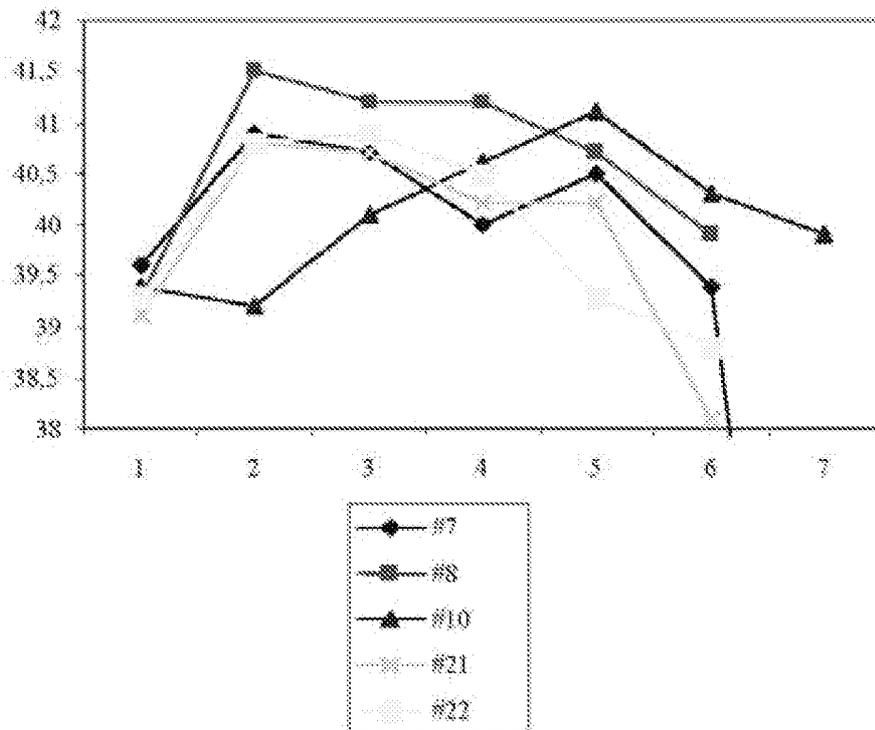
Grupo 2

Temperatura (°C)



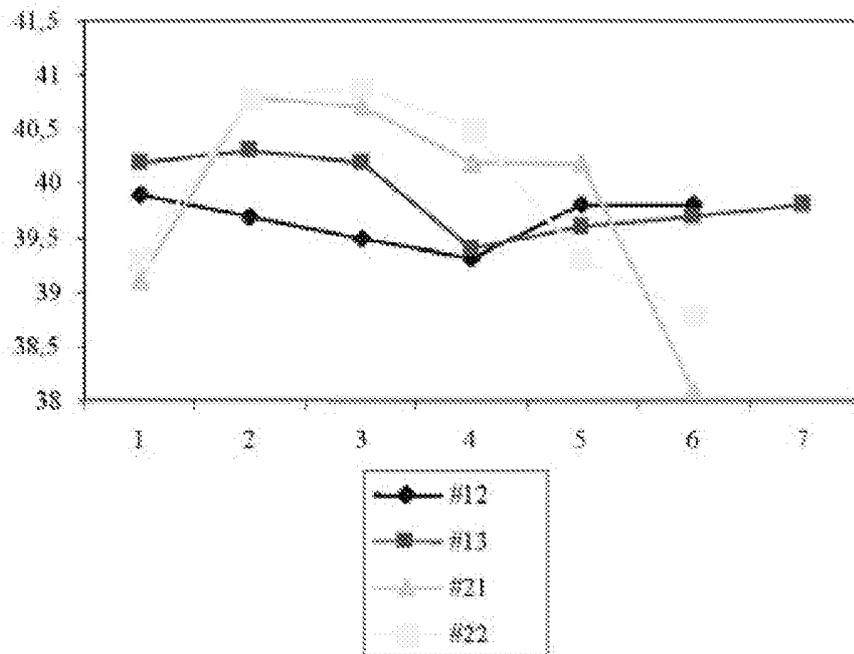
Grupo 3

Temperatura (°C)



Grupo 4

Temperatura (°C)



Días post-desafío con C-S8c1

FIG. 4

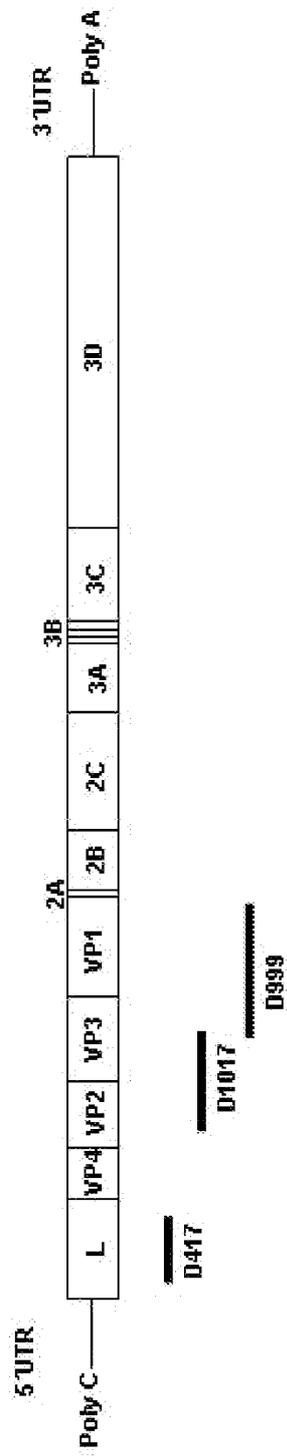


FIG. 5

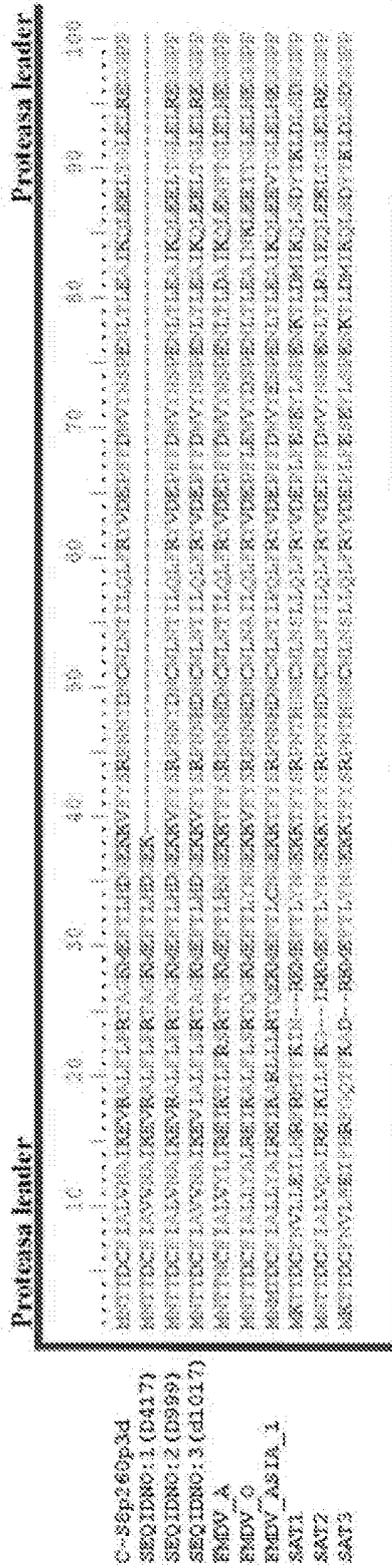
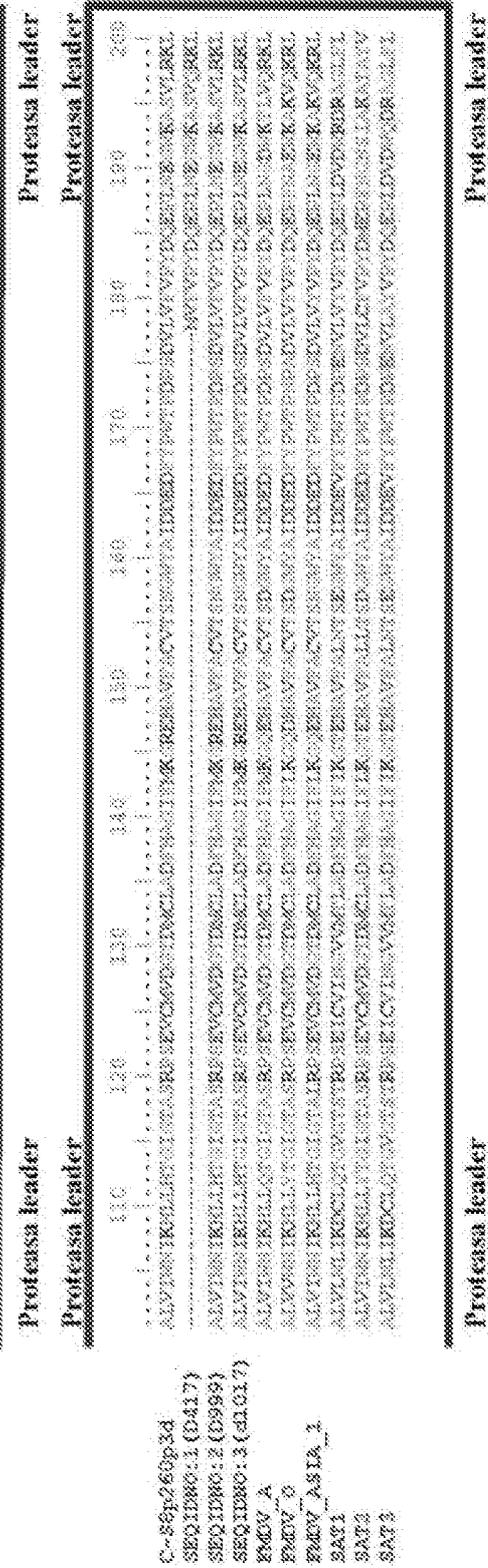
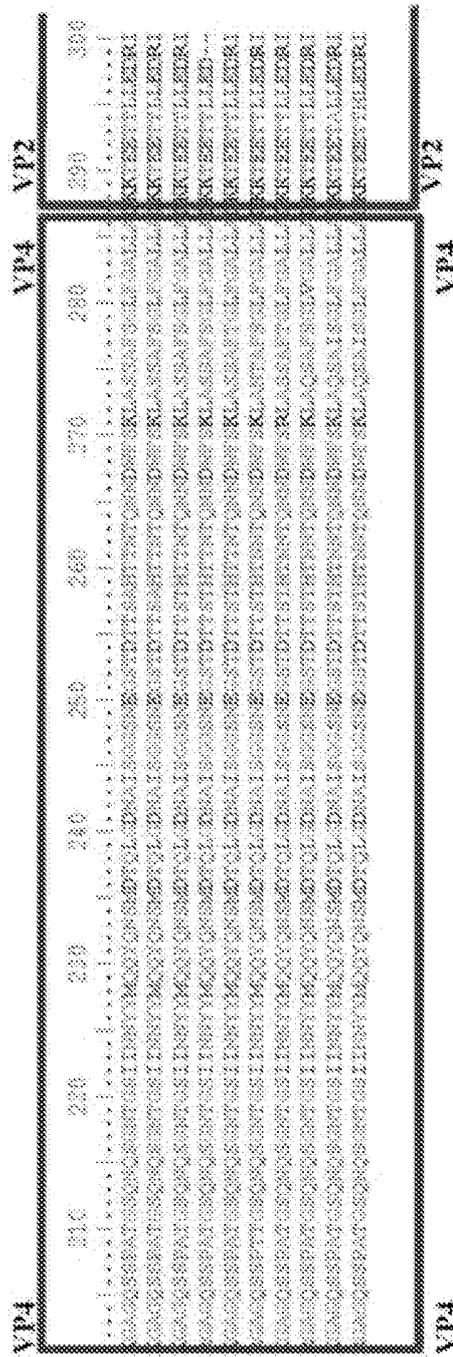


FIG 6





C-59p260p3d
 SEQIDNO:1 (D417)
 SEQIDNO:2 (D999)
 SEQIDNO:3 (d1017)
 PCDV_A
 PCDV_G
 PCDV_A&1A.1
 SAT1
 SAT2
 SAT3

FIG 6 (continuación)

VP2
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

 C-86p260p3d
 SEQ ID NO: 1 (D417)
 SEQ ID NO: 2 (D999)
 SEQ ID NO: 3 (d1017)
 FENV_A
 FENV_Q
 FENV_ASIA_1
 SAT1
 SAT2
 SAT3

VP2
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

 C-86p260p3d
 SEQ ID NO: 1 (D417)
 SEQ ID NO: 2 (D999)
 SEQ ID NO: 3 (d1017)
 FENV_A
 FENV_Q
 FENV_ASIA_1
 SAT1
 SAT2
 SAT3

VP2

VP2	VP3	VP2	VP3	VP2	VP3
	610	620	630	640	650
	660	670	680	690	700
	710	720	730	740	750
	760	770	780	790	800
	810	820	830	840	850
	860	870	880	890	900
	910	920	930	940	950
	960	970	980	990	1000

C-S&P:60p3d
 SEQIDNO: 1 (2417)
 SEQIDNO: 2 (2999)
 SEQIDNO: 3 (41017)
 EMOV_A
 EMOV_O
 EMOV_ASIA_1
 SAI1
 SAI2
 SAI3

VP3
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

 C-88p260p3d
 SECIDNO:1 (D417)
 SECIDNO:2 (D999)
 SECIDNO:3 (d1017)
 FMEV_A
 FMEV_O
 FMEV_AS1A_1
 SAT1
 SAT2
 SAT3

VP3
 710 720 730 740 750

 C-88p260p3d
 SECIDNO:1 (D417)
 SECIDNO:2 (D999)
 SECIDNO:3 (d1017)
 FMEV_A
 FMEV_O
 FMEV_AS1A_1
 SAT1
 SAT2
 SAT3

VP1
 760 770 780 790 800

 C-88p260p3d
 SECIDNO:1 (D417)
 SECIDNO:2 (D999)
 SECIDNO:3 (d1017)
 FMEV_A
 FMEV_O
 FMEV_AS1A_1
 SAT1
 SAT2
 SAT3

VP3
 810 820 830 840 850

 C-88p260p3d
 SECIDNO:1 (D417)
 SECIDNO:2 (D999)
 SECIDNO:3 (d1017)
 FMEV_A
 FMEV_O
 FMEV_AS1A_1
 SAT1
 SAT2
 SAT3

FIG 6 (continuación)

```

VPI
      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
.....
C-50250p3d
SEQIDNO:1 (2417)
.....
SEQIDNO:2 (2099)
.....
SEQIDNO:3 (21017)
.....
ENDV_A
ENDV_C
ENDV_AEA_1
SAT1
SAT2
SAT3
.....
VPI

```

FIG 6 (continuación)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070187

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

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)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GARCÍA-ARRIAZA, J., OJOSNEGROS, S., DÁVILA, M. et al. Dynamics of mutation and recombination in a replicating population of complementing, defective viral genomes. <i>Journal of Molecular Biology</i> . July 2006, Vol. 360, Nº 3, pages 558-572. ISSN 0022-2836. & Genbank Database; 20.07.2006; [on line] [Retrieved the 05.10.2009]; Access number DQ409183. Foot-and mouth disease virus – type C isolate C-S8p260d417, complete genome. & Genbank Database; 20.07.2006; [on line] [Retrieved the 05.10.2009]; Access number DQ409184. Foot-and mouth disease virus – type C isolate C-S8p260d999, complete genome.	1-6, 8, 9, 12-18
Y		7, 19
Y	US 5824316 A (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE)	7, 19
A	20.10.1998, columns 2-12.	1-6, 8, 9, 12-18

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

19 October 2009 (19.10.2009)

Date of mailing of the international search report

(23/10/2009)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

E. Relaño Reyes

Telephone No. +34 91 349 85 04

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070187

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GARCÍA-ARRIAZA, J. MANRUBIA, S. C., TOJA, M. et al. Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation.	1-6, 8, 9, 12-18
Y	Journal of Virology. November 2004, Vol. 78, N° 21, pages 11678-11685. ISSN 0022-538X.	7, 19
Y	CHINSANGARAM, J., MASON, P. W., GRUBMAN, M. J. Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. Vaccine. October 1998, Vol. 16, N° 16, pages 1516-1522. ISSN 0264-410X.	7, 19
A		1-6, 8, 9, 12-18
A	CHARPENTIER, N., DÁVILA, M., DOMINGO, E., ESCARMÍS, C. Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. Virology. September 1996, Vol. 223, N° 1, pages 10-18. ISSN 0042-6822.	1-9, 12-19
A	DÍEZ, J., HOFNER, M., DOMINGO, E., DONALDSON, A. I. Foot-and-mouth disease virus strains isolated from persistently infected cell cultures are attenuated for mice and cattle. Virus Research. December 1990, Vol. 18, N° 1, pages 3-7. ISSN 0168-1702.	1-9, 12-19

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: **10 and 11**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The subject matter of claims 10 and 11 fails to meet the requirements in respect of clarity and concision (PCT Article 6) to such an extent that it was not possible to carry out a meaningful search on the basis of these claims, for the following reasons: the antigen against which the antibodies are directed is not clearly defined.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070187

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5824316 A	20.10.1998	NONE	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/070187

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/08 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES 2009/070187

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

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)

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	GARCÍA-ARRIAZA, J., OJOSNEGROS, S., DÁVILA, M. et al. Dynamics of mutation and recombination in a replicating population of complementing, defective viral genomes. Journal of Molecular Biology. Julio 2006, Vol. 360, N° 3, páginas 558-572. ISSN 0022-2836. & Base de Datos Genbank; 20.07.2006; [en línea] [Recuperado el 05.10.2009]; Número de acceso DQ409183.	1-6, 8, 9, 12-18
Y	Foot-and mouth disease virus – type C isolate C-S8p260d417, complete genome. & Base de Datos Genbank; 20.07.2006; [en línea] [Recuperado el 05.10.2009]; Número de acceso DQ409184. Foot-and mouth disease virus – type C isolate C-S8p260d999, complete genome.	7, 19
Y	US 5824316 A (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE)	7, 19
A	20.10.1998, columnas 2-12.	1-6, 8, 9, 12-18

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.

19 Octubre 2009 (19.10.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

23-OCTUBRE-2009 (23/10/2009)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

E. Relaño Reyes

N° de teléfono +34 91 349 85 04

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070187

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	GARCÍA-ARRIAZA, J. MANRUBIA, S. C., TOJA, M. et al. Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation.	1-6, 8, 9, 12-18
Y	Journal of Virology. Noviembre 2004, Vol. 78, N° 21, páginas 11678-11685. ISSN 0022-538X.	7, 19
Y	CHINSANGARAM, J., MASON, P. W., GRUBMAN, M. J. Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. Vaccine. Octubre 1998, Vol. 16, N° 16, páginas 1516-1522. ISSN 0264-410X.	7, 19
A		1-6, 8, 9, 12-18
A	CHARPENTIER, N., DÁVILA, M., DOMINGO, E., ESCARMÍS, C. Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. Virology. Septiembre 1996, Vol. 223, N° 1, páginas 10-18. ISSN 0042-6822.	1-9, 12-19
A	DÍEZ, J., HOFNER, M., DOMINGO, E., DONALDSON, A. I. Foot-and-mouth disease virus strains isolated from persistently infected cell cultures are attenuated for mice and cattle. Virus Research. Diciembre 1990, Vol. 18, N° 1, páginas 3-7. ISSN 0168-1702.	1-9, 12-19

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070187

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones N°s: 10, 11 se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones N°s: 10, 11 se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
El objeto de las reivindicaciones 10 y 11 no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT, hasta tal extremo que una búsqueda significativa, basada en esas reivindicaciones, resulta imposible por las siguientes razones: no está claramente definido el antígeno frente al que van dirigidos los anticuerpos.
3. Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070187

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de:
 - a. Tipo de material
 - una lista de secuencias
 - tabla(s) relativas a la lista de secuencias
 - b. Formato del material
 - en papel
 - en formato electrónico
 - c. Fecha de presentación/entrega
 - contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó
 - presentado junto con la solicitud internacional en formato electrónico
 - presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda
2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070187

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 5824316 A	20.10.1998	NINGUNO	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070187

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/08 (2006.01)