

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 445 467**

21 Número de solicitud: 201231253

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)**C12N 15/10** (2006.01)**A61K 38/17** (2006.01)**A61K 39/00** (2006.01)**A61P 33/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

01.08.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.03.2014

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)
Serrano, 117
28006 Madrid ES y
UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**DE LA FUENTE GARCÍA, José De Jesús;
VILLAR RAYO, Margarita;
PRUDENCIO, Carlos Roberto y
PÉREZ DE LA LASTRA, José Manuel**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier54 Título: **VACUNA FRENTE A INFESTACIONES PROVOCADAS POR ARTRÓPODOS HEMATÓFAGOS**

57 Resumen:

La presente invención describe una vacuna frente a infestaciones provocadas por artrópodos hematófagos preferentemente garrapatas, mosquitos, flebótomos, ácaros rojos de las gallinas, pulgas, piojos, piojos de mar, etc. Así mismo, se protege un péptido capaz de inducir una respuesta inmune protectora y de reacción cruzada frente a una infestación provocada por artrópodos hematófagos, un polinucleótido, un vector de expresión, una célula hospedadora, un animal no humano, un anticuerpo, y un medicamento, así como el uso de estos productos en medicina, preferentemente en tecnologías del ADN recombinante y en inmunología.

ES 2 445 467 A1

VACUNA FRENTE A INFESTACIONES PROVOCADAS POR ARTRÓPODOS HEMATÓFAGOS**DESCRIPCIÓN****5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se encuadra dentro de la tecnología del ADN recombinante y la inmunología, específicamente, dentro del campo de los antígenos capaces de inducir inmunidad frente a infestaciones provocadas por artrópodos hematófagos que actúan como vectores de patógenos, garrapatas, mosquitos y flebótomos, y, por tanto, dentro del campo de las composiciones, preferiblemente vacunas, destinadas al tratamiento o prevención de dichas infestaciones.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 El control de las infestaciones de artrópodos hematófagos, vectores de patógenos que afectan a la salud animal y humana, es importante para la erradicación de enfermedades transmitidas por vectores. Las enfermedades provocadas por patógenos transmitidos por vectores afectan en buena medida a la salud humana y animal y representan más del 20% del total de las enfermedades infecciosas reemergentes constatadas desde 1940 hasta 2004 (Jones, *et al.*, 2008). Sin embargo, con la excepción de unas pocas enfermedades, tales como la fiebre amarilla, las vacunas frente a enfermedades transmitidas por vectores no se han desarrollado con éxito ni se han implementado.

A nivel mundial, el mosquito se considera el vector más importante de las enfermedades humanas mientras que las garrapatas ocupan el segundo lugar en importancia como vector de transmisión de enfermedades en humanos y el primero como vector de patógenos que afectan al ganado vacuno (de la Fuente, *et al.*, 2008b; Peter, *et al.*, 2005). Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados, que se encuentran distribuidas por todo el mundo, desde el Ártico hasta las regiones tropicales. Las garrapatas transmiten patógenos que afectan a los animales y a los humanos, cuyas enfermedades transmitidas provocan un gran impacto en la salud animal y humana. Las enfermedades transmitidas por garrapatas comprenden: Borreliosis, Anaplasmosis, Coxieliosis, Francisellosis, Riquetsiosis, Theileriosis, Ehrlichiosis y Babesiosis, así como enfermedades virales como la encefalitis transmitida por garrapatas. Las infestaciones por garrapatas también tienen un impacto económico en la ganadería, dado que provocan la pérdida de peso de los animales y la reducción de la producción de leche. No obstante, el control de las infestaciones transmitidas por garrapata es difícil dado que estos parásitos tienen pocos enemigos naturales.

Actualmente, el control de las infestaciones por garrapatas se efectúa mediante una serie de medidas integradas en las cuales actúan diversos métodos de control adaptados a un área geográfica. Un componente principal de estos métodos de control consiste en la aplicación de acaricidas químicos. Sin embargo, la aplicación de acaricidas ha mostrado una eficacia limitada en la reducción de las infestaciones y a menudo estas medidas se acompañan de serios efectos adversos, tales como la selección de garrapatas resistentes a acaricidas, la contaminación medioambiental y la contaminación de la carne y la leche con residuos de agentes químicos (Graf, *et al.*, 2004).

La posibilidad de controlar las infestaciones de garrapata mediante la inmunización de hospedadores con antígenos de garrapata fue una realidad con el desarrollo de vacunas que redujeron las infestaciones de *Boophilus* spp en rumiantes (de la Fuente y Kocan, 2003; de la Fuente y Kocan, 2006; Nuttall, *et al.*, 2006; Willadsen, 2006).

Las vacunas desarrolladas frente a artrópodos se basan en la inducción en el hospedador de anticuerpos específicos de antígenos que resulten dañinos para el vector artrópodo durante su alimentación (Almeida y Billingsley, 2002; de la Fuente, *et al.*, 2007; de la Fuente, *et al.*, 1998; Lal, *et al.*, 2001; Milleron, *et al.*, 2004; Suneja, *et al.*, 2003; Titus, *et al.*, 2006; Valenzuela, *et al.*, 2001; Willadsen, 2004). Actualmente existen en el mercado dos vacunas comerciales (Gavac y TickGard) frente a un antígeno de garrapata denominado Bm86, o Bm 89, que reducen las infestaciones por este parásito en animales de interés ganadero.

Los estudios de la interacción entre las garrapatas del género *Ixodes*, vector del patógeno *Anaplasma phagocytophilum*, agente causal de la anaplasmosis humana y animal y de la fiebre transmitida por garrapatas en rumiantes, y el hospedador, condujo al descubrimiento de la proteína 4D8 que después se bautizó como subolesina (SUB). Además, la SUB descubierta en la garrapata *Ixodes scapularis* es eficaz como un antígeno protector y, es estructural y funcionalmente ortóloga a las akirinas (AKR) en insectos y vertebrados. La AKR es una proteína evolutivamente conservada que regula la expresión génica y, por lo tanto, interviene en múltiples procesos celulares, como la digestión, la respuesta inmunitaria, la reproducción y el desarrollo (Almazán, *et al.*, 2005a; Almazán, *et al.*, 2005b; de la Fuente, *et al.*, 2006a; de la Fuente, *et al.*, 2006b; Kocan, *et al.*, 2009; Nijhof, *et al.*, 2007). Por ello, recientemente se han desarrollado vacunas que comprenden el antígeno subolesina y que inducen una protección inmunológica frente a las infestaciones de garrapatas en hospedadores vertebrados

(US2004/0022795 A1 y US2006/0040361 A1).

Las proteínas SUB o AKR están conservadas en diferentes especies de artrópodos, brindando así un candidato para la producción de una vacuna capaz de proteger frente a la infestación con diferentes vectores hematófagos de patógenos que afectan al hombre y los animales. Estas proteínas han demostrado su efectividad como vacunas frente a la infestación con diferentes vectores hematófagos y la disminución de la infección con patógenos transmitidos por garrapatas. Los experimentos de vacunación con antígenos recombinantes ortólogos de subolesina de garrapata o de mosquito muestran una reducción de la fertilidad y/o de la supervivencia de los artrópodos, como garrapatas, mosquitos y pulgas de arena. En rumiantes, las infestaciones de la garrapata *Ixodes scapularis* son reducidas mediante la vacunación con ortólogos de subolesina procedentes de garrapata y de mosquito con una eficacia similar. No obstante, diferentes ensayos han demostrado que la SUB o AKR de algunas especies producen un efecto mayor que otras frente a diferentes especies de vectores (Canales, M. *et al.*, 2009). La vacunación con el ortólogo de subolesina procedente de mosquito no ofrece protección de los animales frente a las infestaciones por otras dos especies de garrapatas (*Amblioma americanun* y *Rhipicephalus sanguineus*) (Canales M. *et al.*, 2009).

Actualmente existe la necesidad de desarrollar vacunas capaces de desencadenar en el hospedador una respuesta inmune protectora frente a las infestaciones por varios artrópodos hematófagos vectores de patógenos, como son la garrapata, el mosquito y el flebótomo. De esta manera, mejoraría la relación coste/eficacia de los tratamientos actuales, se reduciría el impacto de la contaminación ambiental derivada del empleo de productos químicos como los acaricidas, se evitaría la selección de parásitos resistentes a fármacos que pueden resultar de la aplicación continuada de estos productos y se evitaría la necesidad de aplicar varios tipos de vacunas individuales frente a cada uno de estos vectores.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Para lograr obviar la especificidad del antígeno a nivel de especie de vector y aumentar la inmunogenicidad de los antígenos vacunales, en la presente invención se han construido quimeras basadas en epítomos protectores identificados en la SUB de garrapata y la AKR de mosquito. La construcción de las quimeras está basada además en la posible estructura secundaria de las proteínas resultantes. No obstante, esta aproximación aparentemente trivial, resulta muy compleja pues es difícil anticipar cómo el sistema inmune del hospedador vacunado va a reconocer los epítomos incluidos en las proteínas quiméricas, generando anticuerpos que sean protectores. Sólo el ensayo empírico de diferentes combinaciones de secuencias puede llevar al descubrimiento de antígenos protectores como las quimeras Q38 y Q41, objeto de la presente invención. Finalmente, la capacidad de estas proteínas quiméricas de proteger frente a la infestación de otros vectores como los flebótomos, de donde no se derivaron secuencias incluidas en las quimeras pues estas sólo se basaron en secuencias de SUB de garrapata y AKR de mosquito, es un resultado sorprendente e inesperado, no siendo predecible, lo que sugiere que las quimeras aquí descritas pueden proteger también frente a otras especies de vectores no ensayadas aún.

La presente invención hace referencia a un péptido aislado capaz de inducir una respuesta inmune protectora y de reacción cruzada frente a una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago, caracterizado por que comprende al menos un epítomo lineal y al menos un epítomo conformacional, dichos epítomos son comunes a los ortólogos de la proteína subolesina de garrapata y de mosquito. Preferentemente dicho péptido es la SEQ ID No. 1 y/o la SEQ ID No. 2. Más preferentemente, dicho péptido es útil en medicina. Dicho péptido se denomina "péptido de la invención".

En una realización preferida, la invención hace referencia al péptido descrito anteriormente, caracterizado por ser útil para inducir una respuesta inmune protectora y de reacción cruzada frente a una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago seleccionado entre: una garrapata, un mosquito, un flebótomo, un ácaro rojo de las gallinas, una pulga, un piojo y un piojo de mar. Más preferentemente, dicho artrópodo hematófago se selecciona entre: *Ixodes ricinus*, *Aedes albopictus* y *Phlebotomus perniciosus*.

La presente invención hace referencia a un polinucleótido aislado que se caracteriza por codificar para un péptido descrito anteriormente. Preferentemente dicho polinucleótido es SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 4. Dicho polinucleótido se denomina "polinucleótido de la invención".

La presente invención hace referencia a un vector de expresión caracterizado por que comprende al menos un polinucleótido descrito anteriormente. Dicho vector de expresión se denomina "vector de expresión de la invención".

La presente invención hace referencia a una célula hospedadora, caracterizada por que comprende al menos un vector de expresión descrito anteriormente. Preferentemente, dicha célula es bacteriana, y más preferentemente, dicha célula bacteriana es *Escherichia coli*. Dicha célula hospedadora se denomina "célula hospedadora de la invención".

La presente invención hace referencia a un animal/organismo no humano, caracterizado por que comprende al menos una célula hospedadora descrita anteriormente. Preferentemente, dicho animal es un ratón. Dicho animal/organismo no humano se denomina "animal/organismo no humano de la invención".

La presente invención hace referencia a un anticuerpo aislado caracterizado por que reacciona frente a un péptido descrito anteriormente. Dicho anticuerpo se denomina "anticuerpo de la invención".

La presente invención hace referencia a una composición caracterizada por que comprende un péptido descrito anteriormente, o un polipéptido descrito anteriormente, o un vector de expresión descrito anteriormente, o una célula hospedadora descrita anteriormente. Preferentemente, dicha composición puede comprender adicionalmente un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Más preferentemente, dicha composición puede comprender adicionalmente un adyuvante. Aún más preferentemente, dicha composición puede comprender un segundo principio activo. Dicha composición se denomina "composición de la invención".

La presente invención hace referencia al uso de un péptido descrito anteriormente, o un polipéptido descrito anteriormente, o un vector de expresión descrito anteriormente, o una célula hospedadora descrita anteriormente, o un animal no humano descrito anteriormente, o un anticuerpo descrito anteriormente, para la preparación de un medicamento. Preferentemente, dicho medicamento es útil para la prevención y/o el tratamiento de una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago. Más preferentemente, dicho artrópodo hematófago es seleccionado entre: una garrapata, un mosquito, un flebótomo, un ácaro rojo de las gallinas, una pulga, un piojo y un piojo de mar. Aún más preferentemente, dicho artrópodo hematófago es un artrópodo hematófago seleccionado entre: *Ixodes ricinus*, *Aedes albopictus* y *Phlebotomus perniciosus*.

La presente invención hace referencia al uso de un péptido descrito anteriormente, o un polipéptido descrito anteriormente, o un vector de expresión descrito anteriormente, o una célula hospedadora descrita anteriormente, o un animal no humano descrito anteriormente, o un anticuerpo descrito anteriormente, para el control de las infestaciones transmitidas por artrópodos hematófagos descritos anteriormente.

La presente invención hace referencia a un medicamento capaz de inducir una respuesta inmune protectora y de reacción cruzada frente a una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago caracterizado por que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido descrito anteriormente, o un polipéptido descrito anteriormente, o un vector de expresión descrito anteriormente, o una célula hospedadora descrita anteriormente. Preferentemente, dicho medicamento es una vacuna. Dicho medicamento se denomina "medicamento de la invención".

La presente invención hace referencia a un método de prevención y/o tratamiento de frente a una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago caracterizado por la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un péptido descrito anteriormente, o un polipéptido descrito anteriormente, o un vector de expresión descrito anteriormente, o una célula hospedadora descrita anteriormente, o un anticuerpo descrito anteriormente, o un medicamento descrito anteriormente. Dicho método se denomina "método de la invención".

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona dos proteínas quimeras: Q38 y Q41 (SEQ.ID N°1 y SEQ.ID. N°2), diseñadas mediante la combinación de una serie de epítopos lineales, mimétopos conformacionales y estructurales o discontinuos, procedentes de los ortólogos de la proteínas subolesina de garrapata y de mosquito. Estas proteínas son capaces de inducir una respuesta inmune protectora y de reacción cruzada frente a las infestaciones provocadas por artrópodos hematófagos (garrapatas, mosquitos y flebótomos). La invención también comprende las composiciones de dichas proteínas quimera y al uso de las mismas y de estas composiciones para la elaboración de medicamentos, preferiblemente, vacunas, destinados al tratamiento o prevención de estas infestaciones.

Las proteínas quimeras Q38 y Q41 comparten un epítipo lineal derivado de SUB y otro de AKR, dos epítopos conformacionales derivados de SUB y tres derivados de AKR. La estructura tridimensional predicha para ambas quimeras indica que estas están compuestas por alfa hélices y plegamientos beta que exponen los epítopos protectores en la superficie.

En la presente descripción se entiende por "epítipo" la porción individual de un antígeno capaz de inducir una respuesta inmunitaria; normalmente está asociado a la porción del antígeno que es reconocida por un anticuerpo. Como "antígeno" se entiende una sustancia extraña a un organismo que, una vez introducido en éste, normalmente desencadena una respuesta inmunitaria. Como "respuesta inmunitaria" o "respuesta inmune" se entiende la actividad que realiza el sistema inmunitario para luchar contra las sustancia extrañas (antígenos).

Como “sistema inmunitario” se entiende el grupo de órganos y células que defiende al organismo frente a infecciones, infestaciones y otras enfermedades.

5 Como “proteína quimera” se entiende en la presente invención una proteína creada a partir de la unión de dos o más epitopos que originalmente codifican para proteínas separadas pero que la traducción de este gen de fusión resulta en un polipéptido individual con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales. Dentro del alcance de la presente invención también se incluyen los péptidos o polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos sea idéntica u homóloga en un 80%-95% a las secuencias descritas en la presente invención. Dos secuencias son idénticas si son iguales residuo a residuo. Sin embargo, para secuencias que no son idénticas, es útil tener una medida de cuánto se alejan de ser idénticas. Para esto se hace un alineamiento entre las dos secuencias, se cuenta el número de residuos que son idénticos y se divide por la longitud del alineamiento, dando el porcentaje de identidad.

15 La fusión proteica es una técnica que se emplea frecuentemente en biología molecular. Habitualmente está relacionada con la producción de proteínas en sistemas vivos, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, en bacterias, levaduras, células de mamífero, baculovirus o células de insecto. La inclusión de la secuencia codificante de interés en fase, respetando la pauta de lectura, permite la producción de una proteína quimérica.

20 Las proteínas de fusión o quiméricas, como las de la presente invención, se purifican con facilidad, empleando para ello las características de las proteínas de unirse a una matriz cromatográfica, o de precipitar en ciertas condiciones. La purificación de estas proteínas de fusión es fácil mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, columnas de sefarsa-glutation las cuales son conocidas por un experto en la materia.

25 Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diversas secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia aminoacídica. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido aislado, de ahora en adelante “polinucleótido de la invención”, que codifica para el péptido de la invención, o a la secuencia polinucleotídica complementaria a dicho polinucleótido. Las secuencias SEQ. ID. N°3 y SEQ.ID. N°4 describen las secuencias nucleotídicas a partir de la cual derivan las SEQ. ID. N°1 y SEQ. ID. N°2, respectivamente.

30 Los términos “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra.

35 El polinucleótido de la invención puede obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencional, o mediante secuenciación.

40 El polinucleótido, adicionalmente a la secuencia codificante, puede llevar otros elementos, como por ejemplo aunque sin limitarse, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' o 3', sitios de unión a ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Estos polinucleótidos adicionalmente también pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles, por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de él o permitir una mejor purificación del mismo.

45 El clonaje del polinucleótido de la invención se realiza preferiblemente empleando un vector de expresión. En estos vectores se incluyen en la secuencia del polinucleótido de la invención o, en su caso, entre la secuencia polinucleotídica codificante para una proteína portadora y la secuencia del polinucleótido de la invención una serie de secuencias de aminoácidos que son dianas de corte de proteasas. La ventaja de esta estructura es que, una vez producida la proteína de fusión, lisado el sistema de expresión y purificada ésta mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, cromatografía de afinidad, se puede escindir la proteína portadora del péptido de la invención mediante digestión con una proteasa y repurificar el péptido de la invención mediante el mismo sistema cromatográfico.

55 Las secuencias de polinucleótido de la invención (SEQ.ID. N°3 y SEQ.ID. N°4) pueden ser insertadas en un vector replicante para su clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. Ejemplos de vectores de expresión son, aunque sin limitarnos, plásmidos, cósmidos, partículas virales, es decir, vectores de ADN o ARN virales, o fagos. Los polinucleótidos de la invención pueden ser insertados en estos vectores mediante una serie de procedimientos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, la secuencia polinucleotídica se inserta en sitios adecuados para enzimas endonucleasas de restricción mediante técnicas estándar. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no están limitados a, una o más secuencia de señales, un origen de replicación, uno o más marcadores genéticos, un elemento “enhancer”, un promotor y/o una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores apropiados que contengan uno o más de estos componentes comprende técnicas de ligación estándar, las cuales son conocidas por un experto en la materia.

65 Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un vector de expresión, de ahora en adelante “vector de

expresión de la invención”, que comprenden los polinucleótidos de la invención (SEQ. ID. N°3 y SEQ. ID. N°4).

El vector de expresión de la invención puede ser introducido, mediante por ejemplo, aunque sin limitarnos, transfección o transformación, en células hospedadoras, como son, aunque sin limitarse a ellas, células vegetales, de mamífero, bacterias, levaduras o células de insecto, de ahora en adelante “célula hospedadora de la invención”. La introducción del vector de expresión de la invención en la célula se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los métodos físicos o biológicos para dar lugar a células transformadas o transfectadas. Dichos métodos biológicos incluyen, pero sin limitarse, el uso de vectores de ADN y ARN virales. La principal ventaja de los métodos físicos reside en que éstos no están asociados con procesos oncogénicos ni patológicos de virus. Sin embargo, los métodos físicos son menos precisos y, a menudo, resultan en inserciones de múltiples copias, integraciones aleatorias, interrupción de secuencias genéticas propias y foráneas, así como expresión impredecible. Entre los vectores virales más usados para la introducción de genes en células de mamífero, se encuentran, vectores de poxvirus, de herpes simplex, adenovirus, vectores asociados a adenovirus, etc.

Los péptidos de la invención SEQ. ID. N°1 y SEQ.ID. N°2 presentan capacidad antigénica y puede utilizarse para desarrollar anticuerpos mono y policlonales que se unan específicamente a él. Esto puede llevarse a cabo mediante diversos métodos conocidos por un experto en la materia. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo, de ahora en adelante “anticuerpo de la invención”, específico frente al péptido de la invención.

El término “anticuerpo”, tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con el péptido de la invención. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂, los cuales pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina.

Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítomos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente o mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento del péptido de la invención y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del anticuerpo o péptido de la invención, o que produce el anticuerpo o péptido de la invención como resultado de la recombinación homóloga.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante “composición de la invención”, que comprende un elemento seleccionado de entre:

- a. La proteína de la invención,
- b. el polinucleótido de la invención,
- c. el vector de expresión de la invención, y
- d. la célula hospedadora de la invención.

En una realización preferida, la composición de la invención además comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización más preferida, la composición de la invención además comprende un adyuvante. En una realización aun más preferida, la composición de la invención además comprende otro principio activo.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, como por ejemplo, es el caso del fosfato de calcio dibásico, la 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.

El “vehículo”, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes de la presente invención comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacológicamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos,

permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacológicamente aceptable es el diluyente.

5 En esta memoria, el término “adyuvante” se refiere a un agente que no posea un efecto antigénico por sí mismo, pero que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la composición de la invención. Existen multitud de adyuvantes conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo, aunque sin limitarse, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, agonistas de *toll-like receptors*, citoquinas, escualeno, adyuvante incompleto de Freund o adyuvante completo de Freund.

10 Las proteínas de la invención comprenden uno o varios epítomos comunes a los dos ortólogos de subolesina de garrapata y mosquito, por lo que, como muestran los ejemplos de la presente invención, es capaz de inducir una respuesta inmune protectora frente a las infestaciones provocadas al menos por ambos parásitos en varios hospedadores. Por tanto, su administración a un organismo es de gran utilidad para reducir la transmisión de patógenos por estos vectores.

15 Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del polinucleótido, del vector de expresión, de la célula, del organismo, del anticuerpo o de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento, de ahora en adelante “medicamento de la invención”; o alternativamente, al péptido, al polinucleótido, al vector de expresión, a la célula, al organismo, al anticuerpo o a la composición de la invención para su uso como medicamento.

20 El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, alivio, tratamiento o curación de infestaciones o enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a una composición que comprende el péptido, el polinucleótido, el vector de expresión, la célula, el organismo, el anticuerpo o la composición de la invención.

25 El medicamento de la invención comprende el péptido, el polinucleótido, el vector de expresión, la célula, el organismo, el anticuerpo o la composición de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva, que es capaz de inducir una respuesta inmune frente a las infestaciones provocadas por artrópodos hematófagos, preferiblemente, por garrapata, mosquito y flebótomo, en el organismo al que le es administrado. El término medicamento incluye, por tanto, lo que se conoce como vacuna.

30 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de péptido, polinucleótido, vector de expresión, célula, organismo, anticuerpo o composición de la invención, que produzca el efecto deseado. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en el medicamento de la invención son los conocidos por los técnicos en la materia.

35 Los medicamentos de la invención pueden utilizarse tanto solos como en combinación con otros medicamentos o composiciones para el tratamiento o prevención de infestaciones provocadas por artrópodos hematófagos, preferiblemente, por garrapata, mosquito y flebótomo.

40 El término “prevención”, tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de daños cuya causa sean las infestaciones provocadas por artrópodos hematófagos, preferiblemente, por garrapata y mosquito. El término “tratamiento” supone combatir los efectos causados como consecuencia de las infestaciones provocadas por artrópodos hematófagos, preferiblemente, por garrapata, mosquito y flebótomo, para estabilizar el estado de los individuos o prevenir daños posteriores.

45 Ya que la subolesina es un antígeno evolutivamente conservado entre garrapata y mosquito, es de esperar que otros géneros de artrópodos hematófagos posean proteínas ortólogas a ésta que presenten una homología global en su secuencia de aminoácidos con la secuencia de la misma, por lo que los péptidos de la invención, al comprender al menos un epítomo de subolesina, también sería de utilidad para inducir inmunidad frente a las infestaciones provocadas por otros parásitos artrópodos hematófagos que expresen proteínas ortólogas a la subolesina.

50 Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido, del polinucleótido, del vector de expresión, de la célula, del organismo, del anticuerpo o de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de infestaciones provocadas por artrópodos hematófagos, o alternativamente, al péptido, al polinucleótido, al vector de expresión, a la célula, al organismo, al anticuerpo o a la composición de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento o prevención de infestaciones provocadas por artrópodos hematófagos.

55 El término “infestación” se refiere a la invasión de un organismo vivo por agentes parásitos externos o internos. El objetivo de dichos parásitos es su supervivencia a costa del huésped que parasitan.

60 Se entiende por “artrópodos hematófagos” aquellos organismos invertebrados, de cuerpo segmentado, simetría

bilateral, exoesqueleto quitinoso, apéndices locomotores segmentados, presencia de órganos de sentidos, dioicos, de reproducción sexuada y cuyo crecimiento es por metamorfosis. Ejemplos de artrópodos hematófagos son, aunque sin limitarnos, ácaros, moscas, mosquitos, simúlidos, flebótomos, pulgas, coleópteros, arbovirosis, tripanosomas, filarias o garrapatas. En una realización preferida, los artrópodos hematófagos son la garrapata, el mosquito y el flebótomo.

Un ejemplo no limitante de algunas de las enfermedades transmitidas por una infestación de artrópodos hematófagos comprenden: Borreliosis, Anaplasmosis, Coxiqueliosis, Francisellosis, Riquetsiosis, Theileriosis, Elriquesiosis y Babesiosis, así como enfermedades virales como la encefalitis transmitida por artrópodos hematófagos. Las infestaciones por artrópodos hematófagos también tienen un impacto económico en la ganadería, dado que provocan la pérdida de peso de los animales y la reducción de la producción de leche.

En una realización más preferida, el medicamento de la invención es una vacuna. En el contexto de la presente invención el término "vacuna" se refiere a una preparación epitópica o antigénica empleada para provocar una respuesta del sistema inmune a una infestación parasítica o a una enfermedad. Son preparados de antígenos o epitópos 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.

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.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Respuesta de anticuerpos frente a las quimeras de SUB/AKR Q38 y Q41 (SEQ.ID.Nº 1 y SEQ.ID.Nº 2) en ratones vacunados con las mismas. El título de anticuerpos se determinó mediante ELISA en ratones vacunados (A) en muestras de suero recogidos a diferentes tiempos y enfrentados a cada proteína específica usada en la vacunación y el control se evaluó frente a una mezcla de todas las proteínas usadas en el experimento, y (B) al final del experimento (semana 8) frente a cada una de las proteínas recombinantes usadas en la vacunación. El título de anticuerpo se expresó como la media \pm S.D. OD_{450nm} ($OD_{suero\ ratón} - OD_{PBS\ control}$) y comparado entre grupos vacunados y control mediante un test ANOVA (A; * $P < 0.05$) o t de Student (B; * $P < 0.05$). Las flechas en (A) indican fechas para la 1ª, 2ª y 3ª inmunización y la infestación por vectores.

Figura 2. Efecto de la vacunación con las quimeras de SUB/AKR Q38 y Q41 (SEQ.ID.Nº 1 y SEQ.ID.Nº 2) en la infestación por vectores. La reducción del porcentaje en la infestación, muda y oviposición y/o fertilidad en los individuos alimentados en ratones vacunados respecto al control (ratones alimentados en ratones vacunados con solución salina adyuvada) se muestra para (A) garrapatas *I. ricinus*, (B) mosquitos *A. albopictus* y (C) flebótomos *P. perniciosus*. (D) La eficacia de la vacuna fue calculada como $E = 100(1 - a_k)$, donde a_k representa la reducción en el proceso afectado (k) en vectores alimentados en ratones vacunados cuando se comparan con ratones usados en el grupo control.

DESCRIPCIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID No 1. Identifica la secuencia de aminoácidos correspondientes a la proteína sintética "Quimera 38", de 238 residuos, de origen artificial. Dicha secuencia comprende una región rica en histidina, añadida para permitir la purificación de las proteínas recombinantes mediante columnas de afinidad y que son conocidas por el experto en la materia, localizada en el intervalo de bases 6-11 de la secuencia.

SEQ ID No 2. Identifica la secuencia de aminoácidos correspondientes a la proteína sintética "Quimera 41", de 234 residuos, de origen artificial. Dicha secuencia comprende una región rica en histidina, añadida para permitir la purificación de las proteínas recombinantes mediante columnas de afinidad y que son conocidas por el experto en la materia, localizada en el intervalo de bases 6-11 de la secuencia.

SEQ ID No 3. Secuencia DNA de 657 nucleótidos, de origen artificial o sintético, usada en la producción de la proteína sintética "Quimera 38" y que codifica para la SEQ.ID. No. 1.

SEQ ID No 4. Secuencia DNA de 645 nucleótidos, de origen artificial o sintético, usada en la producción de la proteína sintética "Quimera 41" y que codifica para la SEQ.ID. No. 2

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad del péptido de la invención en la inducción de una respuesta inmune

frente a infestaciones provocadas por artrópodos hematófagos. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que 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. Control de infestaciones producidas por múltiples vectores mediante vacunas de subolesina/akirina

Resumen

Las enfermedades transmitidas por vectores hematófagos, como mosquitos, garrapatas y flebótomos impactan causan un gran impacto en la sanidad animal y humana y, por lo tanto, su control es importante para la erradicación de enfermedades transmitidas por vector (ETV). La vacunación es una alternativa que no perjudica al medioambiente y que permite controlar las ETV mediante el uso de los elementos diana comunes a los vectores. Los resultados recientes han sugerido que subolesina/akirina (SUB/AKR) son buenos antígenos candidatos para el control de infestaciones de vectores artrópodos. En este trabajo, se describe el efecto de la vacunación con quimeras Q38 y Q41 que comprenden epítopos protectores conservados en SUB/AKR, en la mortalidad, muda, oviposición y/o fertilidad de los vectores garrapatas, mosquitos y flebótomos. Se demuestra que las quimeras SUB/AKR pueden controlar las infestaciones de vector, siendo la vacunación con Q41 la que muestra la eficacia más alta en mosquitos (99%) mediante la reducción de la fertilidad y de la supervivencia de las hembras. La vacunación con Q38 mostró el efecto más alto en la reducción de la oviposición de mosquitos (28%) y flebótomos (26%). El efecto producido por la vacunación en diferentes procesos del desarrollo y en varios vectores artrópodos demuestra que las quimeras de SUB/AKR son vacunas universales para el control de infestaciones por múltiples vectores y para la reducción de las ETV.

1.1. Introducción

Las enfermedades provocadas por patógenos transmitidos por vectores afectan en buena medida a la salud humana y animal y representan más del 20% del total de las enfermedades infecciosas reemergentes constatadas desde 1940 hasta 2004 (Jones, *et al.*, 2008). Las garrapatas del género *Ixodes* spp. (Acari: Ixodidae) constituyen importantes vectores de patógenos que causan enfermedades en humanos y animales domésticos en todo el mundo; incluyendo *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), el agente causante de la anaplasmosis granulocítica humana y de la fiebre transmitida por garrapatas de los rumiantes, *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae), que causa la enfermedad de Lyme en los Estados Unidos y Europa y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (Flaviviridae: Flavivirus) (Estrada-Peña A *et al.*, 2012). Los mosquitos del género *Aedes* spp. (Diptera: Culicidae) son vectores de muchos virus que causan enfermedades humanas, incluyendo la exposición al virus de la fiebre del Dengue a más de 2,5 millones de habitantes de países tropicales y subtropicales (Halstead SB. 2007). Los flebótomos (Diptera: Psychodidae) también son vectores de varios patógenos, incluyendo *Leishmania* spp., que causa varias formas de leishmaniosis humana y canina (Chappuis F *et al.*, 2007).

A pesar del impacto de enfermedades transmitidas por vector (ETV) en la salud humana y animal, pocas de estas ETV, tales como la fiebre amarilla, cuentan con vacunas efectivas (Hayes EB 2010). Por ello, el control de los vectores artrópodos es importante para la erradicación de ETV (de la Fuente y Kocan, 2003; Kishore K *et al.*, 2006; Sperança MA *et al.*, 2007; de la Fuente, *et al.*, 1998; Karunamoorthi K. 2011). La vacunación constituye una alternativa para el control de los vectores no perjudicial para el medio que permite el control de varias ETV mediante el uso de dianas comunes entre los vectores (de la Fuente, *et al.*, 1998; de la Fuente, *et al.*, 2007; Merino, O *et al.*, 2011). La vacunación con antígenos de los vectores artrópodos ha sido propuesta como una alternativa para el control de las infestaciones de vectores y la reducción de su capacidad para transmitir patógenos que impactan en la salud humana y animal (Kishore K *et al.*, 2006; de la Fuente, *et al.*, 2007; Merino, O *et al.*, 2011; Valenzuela, *et al.*, 2001; Lal, *et al.*, 2001; Almeida y Billingsley, 2002; Suneja, *et al.*, 2003; Milleron, *et al.*, 2004; Titus, *et al.*, 2006; Kedzierski L *et al.*, 2006; Saul A 2007; Canales M. *et al.*, 2009).

Subolesina (SUB) y akirina (AKR) son proteínas ortólogas de garrapatas e insectos (de la Fuente, *et al.*, 2006a; Macqueen DJ y Johnston IA, 2009; Galindo RC *et al.*, 2009; Mangold AJ *et al.*, 2009) que afectan a la expresión de la transducción de señales y a genes de respuesta innata, así como a reguladores transcripcionales positivos y negativos (de la Fuente, *et al.*, 2006; Macqueen DJ y Johnston IA, 2009; Galindo RC *et al.*, 2009; Mangold AJ *et al.*, 2009; Goto A *et al.*, 2006). Estas proteínas intermediarias interactúan con NF- κ B y otras proteínas reguladoras, se unen a DNA o remodelan la cromatina para regular la expresión génica (Galindo RC *et al.*, 2009; Mangold AJ *et al.*, 2009; Goto A *et al.*, 2008; de la Fuente, *et al.*, 2008b; Nowak SJ *et al.*, 2012). La amplia función de SUB/AKR como factores de transcripción explica el profundo efecto del silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia en la fisiología de las garrapatas, así como en la fisiología de los insectos y en el desarrollo y la expresión de genes en las garrapatas (de la Fuente, *et al.*, 2006a; de la Fuente, *et al.*, 2008b; de la Fuente, *et al.*, 2006b; Kocan, *et al.*, 2007).

La expresión de SUB en garrapatas infectadas sugiere que SUB podría ser funcionalmente importante en la respuesta innata de la garrapata frente a los patógenos (Zivkovic Z *et al.*, 2010). Por otro lado, SUB interviene en otras rutas moleculares incluyendo aquellas necesarias para el desarrollo y la función de los tejidos, así como para la infección y la multiplicación de los patógenos en las garrapatas (de la Fuente, *et al.*, 2006a; de la Fuente, *et al.*, 2006b; Kocan, *et al.*, 2007; Zivkovic Z *et al.*, 2010).

SUB fue descubierta como un antígeno protector en *Ixodes scapularis* (Almazán C *et al.*, 2003). La vacunación con SUB recombinante mostraba un control eficiente de las infestaciones de garrapata reduciendo su número, peso y oviposición, así como en la infección de diferentes patógenos transmitidos por garrapatas (Merino, O *et al.*, 2011a; Merino, O *et al.*, 2011b, de la Fuente J *et al.*, 2011). Experimentos posteriores con SUB/AKR recombinantes han mostrado un efecto de vacunación y/o de anticuerpos específicos de antígeno en varios vectores artrópodos, incluyendo garrapatas duras y blandas, mosquitos, flebótomos, ácaros rojos de las gallinas y piojos de mar (Canales M *et al.*, 2009; de la Fuente J *et al.*, 2011; Moreno-Cid JA *et al.*, 2011; Harrington D *et al.*, 2009; Manzano-Román R *et al.*, 2012; Carpio Y *et al.*, 2011).

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Garrapatas, mosquitos y flebótomos

Las garrapatas, *Ixodes ricinus*, fueron recogidas originalmente en Neuchâtel, Suiza y fueron mantenidas como colina en la Universidad de Neuchâtel, cedidas amablemente por Lise Gern. Diez hembras engordadas, se transfirieron a la Universidad de Zaragoza y se dejaron ovipositar a 24°C. Las larvas resultantes se mantuvieron en oscuridad a 22°C y 90% de humedad relativa (RH).

Los mosquitos usados en este estudio, *Aedes albopictus*, procedían de una colonia del Baix Llobregat (Barcelona, España) mantenida durante 31 generaciones en la Universidad de Zaragoza. Los mosquitos fueron criados en una cabina ambiental a 25±1°C, 75±5% RH, y fotoperíodo de 12 h luz: 12 h oscuridad.

Los flebótomos *Phlebotomus perniciosus* usados en este estudio procedían de una colonia autóctona (Madrid Province, Spain) establecida en la Unidad de Entomología Médica del Instituto de Salud Carlos III (España). La cepa de *P. perniciosus* ha sido mantenida en el laboratorio durante más de 200 generaciones. Los ejemplares fueron criados en una cabina ambiental a 28°C, 95-100% RH, y un fotoperíodo de 17 h luz: 7 h oscuridad.

Para ambas especies de insectos, las hembras fueron mezcladas con machos tras su emergencia hasta que las hembras fueron seleccionadas para el experimento. Bajo estas condiciones de cría se producen el apareamiento, tal y como se ha comprobado por la disección y examen de ovarios (Moreno-Cid JA *et al.*, 2011). Después de la emergencia, los insectos fueron suplementados con algodón absorbente saturado con 10-30% de una solución de sacarosa durante cuatro días. Al día cinco, los insectos fueron ayunados durante cinco horas antes de la infestación en ratones (Moreno-Cid JA *et al.*, 2011). Finalmente, las hembras fueron mantenidas en nuevas jaulas sin machos hasta el final del experimento.

1.2.2. Diseño y caracterización de quimeras SUB/AKR

Las quimeras SUB/AKR Q38 y Q41, fueron diseñadas mediante la combinación de epítomos protectores lineales de células B y conformacionales discontinuos identificados en los sueros de oveja y conejo inmunizados con SUB de *Ixodes scapularis* y AKR de *A. albopictus* (Canales M, *et al.*, 2009; Prudencio, C.R *et al.*, 2010).

La quimera Q38 fue diseñada mediante la combinación de epítomos protectores seleccionados de SUB y de AKR e introduciendo la secuencia espaciadora GGGS para mejorar la exposición de estos epítomos.

La quimera Q41 fue diseñada añadiendo cisteínas entre los epítomos protectores de SUB y AKR para la formación de puentes disulfuro y ayudar en la exposición de epítomos. Los aminoácidos R y K fueron también añadidos para mejorar la digestión por tripsina y el análisis de péptidos en experimentos futuros.

1.2.3. Formulación de vacunas

Las quimeras recombinantes de SUB/AKR Q38 y Q41 fueron expresadas en *Escherichia coli* a partir de genes sintéticos optimizados para el uso de codones en *E. coli* y purificados por cromatografía de afinidad con columnas de Ni (Genscript Corporation, Piscataway, NJ, USA). Los antígenos recombinantes o solución salina fueron adyuvados en Montanide ISA 50 V2 (Seppic, Paris, France).

1.2.4. Vacunación e infestación de ratones

Se realizaron tres experimentos para evaluar y comparar el efecto de la vacunación con las quimeras recombinantes de SUB/AKR Q38 y Q41 en ratones infestados con *I. ricinus*, *A. albopictus* y *P. perniciosus*. Estos experimentos se realizaron de manera independiente en la Universidad de Zaragoza (España) para garrapatas y mosquitos y en el Instituto de Salud Carlos III (España) para flebótomos. En cada grupo, fueron inmunizados tres

veces en las semanas 0, 3 y 6 con dosis de 0.2 ml inyectadas subcutáneamente en el dorsum cerca de la base de la cola usando una jeringa de tuberculina de 1ml y una aguja de 27,5 G. A los ratones vacunados y control se les inyectaron vacunas con proteínas recombinantes (25 µg/dosis) y adyuvante/salina respectivamente, y fueron infestados con vectores artrópodos a la semana 8. Las inmunizaciones, la recogida de artrópodos y las evaluaciones se realizaron de manera ciega y la identificación de los grupos experimentales no se desveló hasta el final del experimento. Para las garrapatas, se evaluó la mortalidad (n° de larvas muertas/Total de larvas usadas en la infestación) y la muda (n° de ninfas/n° de larvas repletas). Para los insectos, se evaluó la mortalidad (n° de hembras muertas/n° de hembras alimentadas), la oviposición (n° de huevos/hembra) y la fertilidad (Fertilidad 1= n° de larvas/huevo y Fertilidad 2= n° de adultos/huevos). La eficacia de la vacuna (E) se calculó como $E = 100 (1 - a_k)$, donde a_k representa la reducción en el proceso del desarrollo observado (k) en los vectores alimentados en ratones vacunados cuando éstos eran comparados con los alimentados en ratones control, vacunados con solución salina y adyuvante. Los datos fueron analizados estadísticamente para comparar los resultados de cada especie entre individuos alimentados sobre ratones vacunados y control mediante la t de Student y χ^2 (P=0.05). El cuidado y mantenimiento de los animales se realizó conforme los estándares especificados en la Guía del cuidado y uso de animales de laboratorio, aprobada por los comités de ética para el cuidado de animales de experimentación (ISCI (CBBA/4.2) PA 225/08 and UZ PI12/10).

1.2.4.1. Infestación por garrapatas *I. ricinus*

Para cada infestación de ratón se usaron las larvas derivadas de lotes de 100 huevos de garrapata. Los ratones se mantuvieron a 22°C y con un 80-90% RH. Las larvas engordadas se recogieron tres veces al día durante 7 días, dos días después de que las larvas repletas se desprendieran del hospedador. Las larvas se recogieron, se contaron y se incubaron para la muda a 24°C y 90% RH.

1.2.4.2. A. Infestaciones por mosquitos *A. albopictus*

Cada ratón fue depositado en una jaula de nylon, anestesiado con ketamina (100 mg/kg) e hidroxiclورو de xylazina (10 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal y fue expuesto a la infestación de 40 hembras de *A. albopictus* durante 30 min (Moreno-Cid JA *et al.*, 2009). Tras la exposición, 20 hembras de mosquito se introdujeron en viales individuales para el estudio de la oviposición. La mortalidad de las hembras de mosquito se evaluó a los 10 días post-infestación (dpi). Las parideras se retiraron a los 15 días dpi y se contaron los huevos para evaluar la oviposición. Éstos se incubaron durante 72 h a temperatura ambiente en agua hasta su emergencia para evaluar la fertilidad.

1.2.4.3. Infestación por flebótomos *P. perniciosus*

Cada ratón fue depositado en una jaula de nylon, anestesiado con ketamina (100 mg/kg) e hidroxiclورو de xylazina (10 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal y fue expuesto a la infestación de 35-40 hembras de *P. perniciosus* (Moreno-Cid JA *et al.*, 2009). Tras la exposición, 10 hembras de flebótomos se introdujeron en viales individuales para el estudio de la oviposición. Los huevos de las hembras alimentadas sobre el mismo ratón se transfirieron a un envase para el estudio del desarrollo a flebótomo adulto y evaluar la fertilidad como se ha descrito previamente (Canales M *et al.*, 2009; Moreno-Cid JA *et al.*, 2009).

1.2.5. Caracterización de la respuesta inmune de los ratones inmunizados mediante ELISA

Las muestras de sangre se recogieron para cada animal inmunizado y control a las semanas 0, 3, 6 y 8 antes de cada inmunización e infestación. El suero fue separado de la sangre mediante centrifugación y almacenado individualmente a -20°C.

En los sueros de ratones recogidos a diferentes tiempos, la detección de anticuerpos frente a las proteínas recombinantes específicas usadas en la vacunación se realizó mediante un test ELISA indirecto. Los controles de suero preinmune se realizaron para cada proteína. Se usaron placas de alta capacidad de absorción de poliestireno, recubiertas con 50µl por pocillo de una solución (0.02 µg/ml) de proteína recombinante purificada en buffer carbonato/bicarbonato (Sigma). Tras una incubación de una noche a 4°C, las placas recubiertas se bloquearon con 200 µl/pocillo de una solución de bloqueo (5% leche en polvo semidesnatada en PBS). Las muestras de suero o PBS, como control negativo, fueron diluidas 1:10 en solución de bloqueo y se añadieron 50 µl/pocillo en duplicados. Transcurridas 1 h de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron tres veces con una solución de lavado (PBS, 0.05% Tween 20). Seguidamente se añadieron 100 µl/pocillo de un conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa (Sigma) a una dilución de 1:500 en solución de bloqueo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras efectuar tres lavados con solución de lavado, se añadieron 200 µl/pocillo de una solución sustrato (Fast OPD, Sigma). Finalmente, la reacción fue detenida mediante la adición de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 3N y se determinó la densidad óptica (OD) con un espectrofotómetro a 450 nm. Los títulos de anticuerpos en ratones inmunizados y control se expresaron como $OD_{450nm} (OD_{suero\ ratón} - OD_{control})$ y la comparación entre los grupos vacunados y control se realizó mediante un test de ANOVA (P=0.05). Para caracterizar la cros-reactividad de las vacunas en el ELISA se evaluaron las muestras de sueros recogidas a la

semana 8 como se ha descrito anteriormente y se compararon entre diferentes grupos vacunados y el control mediante la t de Student (P=0.05).

1.3. Resultados

1.3.1. Caracterización de quimeras de SUB/AKR

Las quimeras de SUB/AKR Q38 y Q41 han sido diseñadas mediante la combinación de epítomos B lineales y epítomos protectores conformacionales discontinuos. Ambas quimeras comprenden epítomos protectores tanto de SUB como de AKR pero difieren en su composición y posición.

Los anticuerpos de ratón frente a las quimeras Q38 y Q41 son cros-reactivos entre ellos y con SUB y AKR (Fig. 1B), lo que sugiere la conservación de la inmunogenicidad de los epítomos protectores de SUB y AKR expresados en las proteínas quiméricas.

1.3.2. Efecto de la vacunación en las infestaciones de artrópodos

El efecto de los anticuerpos frente a quimeras recombinantes SUB/AKR se evaluó mediante la determinación de la mortalidad, muda, oviposición y /o fertilidad de los vectores artrópodos de garrapatas (*I. ricinus*), mosquitos (*A. albopictus*) y flebótomos (*P. perniciosus*) alimentados en ratones vacunados. La respuesta de anticuerpos en los ratones fue significativamente mayor en los ratones vacunados comparados con los ratones del grupo control y los títulos de anticuerpo al final del experimento fueron similares para todas las proteínas (Figs. 1A and 1B).

En las larvas de garrapata, la mortalidad se vio afectada (Tabla 1) con la reducción de la misma observada en los ratones vacunados con Q38 cuando fueron comparados con los ratones del grupo control (Fig. 2A). La muda de larvas a ninfas fue reducida significativamente en todos los grupos vacunados cuando fueron comparados con los del grupo control (Tabla 1; Fig. 2A).

En mosquitos, la vacunación con las quimeras Q41 y Q38 redujo la supervivencia de las hembras significativamente (12%), así como la oviposición (28%), cuando fueron comparados con los respectivos controles (Tabla 1; Fig. 2B). La fertilidad fue altamente reducida en mosquitos alimentados en ratones vacunados con la quimera Q41 (Tabla 1; Fig. 2B).

En flebótomos, la vacunación con todos los antígenos resultó en una reducción significativa de la oviposición respecto a los respectivos controles (Tabla 1; Fig. 2C).

La E de la vacuna es un parámetro que tiene en cuenta todos los efectos de la infestación del vector que se observa para un determinado antígeno. Este parámetro no puede usarse para comparar el efecto de la vacunación entre diferentes especies de vector debido a que los procesos del desarrollo evaluados pueden ser diferentes para cada vector. Sin embargo, la E de la vacuna es un buen parámetro para comparar los efectos de diferentes antígenos en la infestación por un determinado vector. El análisis de la E de la vacuna mostró una reducción de las infestaciones por vectores en los ratones vacunados (Fig. 2D).

Los resultados descritos en este trabajo mostraban que la vacunación con Q38 y Q41 tuvieron un efecto significativo en las infestaciones por *I. ricinus*, *A. albopictus* and *P. perniciosus* cuando se compararon con el grupo control (Tabla 1; Figs. 2A-2D). Particularmente interesante resultó el hecho de que la vacunación con Q38 fue la única que afectaba a la oviposición tanto de mosquitos (28%) como de flebótomos (26%) alimentados en animales vacunados (Tabla 1; Figs. 2B and 2C).

Tabla 1. Efecto de las quimeras SUB/AKR Q38 y Q41 en el control de las infestaciones de garrapata, mosquitos y flebótomos, tras ser alimentados en ratones vacunados.

Parámetro	<i>Ixodes ricinus</i>				
	Control	Vacunados SUB	Vacunados AKR	Vacunados Q38	Vacunados Q41
Mortalidad de larvas (Nº muertas/Total larvas)	0.84	0.70	0.79	0.83	0.65
	0.57	0.69	0.71	0.74	0.57
	0.72	0.78	0.67	0.75	0.73
	0.71	0.86	0.62	0.71	0.61
	0.64	0.68	0.61	0.89	0.59
	0.79	ND	0.80	0.71	0.71
	(0.71±0.10)	(0.74±0.08)	(0.70±0.08)	(0.77±0.07)	(0.64±0.07)
Muda (Nº ninfas/No. Larvas repletas)	0.88	0.33	0.52	0.47	0.60
	0.67	0.19	0.59	0.46	0.65
	0.68	0.64	0.45	0.32	0.70

ES 2 445 467 A1

	0.55	0.43	0.42	0.62	0.56
	0.56	0.28	0.41	0.82	0.51
	0.95	ND	0.70	0.38	0.66
	(0.71±0.17)	(0.37±0.7)* §	(0.52±0.11)* §	(0.51±0.18)* §	(0.61±0.07)*
<i>Aedes albopictus</i>					
Mortalidad de hembras (Nº muertas/hembras alimentadas)	0.00	0.10	0.20	0.00	0.05
	0.25	0.20	0.00	0.15	0.30
	0.10	0.10	0.05	0.10	0.10
	0.10	0.15	0.10	0.05	0.25
	0.10	0.15	0.05	0.00	0.30
	0.10	0.10	0.10	0.10	0.30
	(0.11±0.08)	(0.13±0.04)	(0.08±0.07)	(0.07±0.06)	(0.22±0.11)* §
Oviposición (Nº huevos/hembra)	42	49	55	41	57
	35	50	59	35	51
	32	51	38	25	54
	49	33	49	8	55
	41	36	51	37	53
	61	69	53	40	38
	(43±10)	(48±13)	(51±7)	(31±13)* §	(51±7)
Fertilidad 1 (Nº larvas/huevo)	0.38	0.10	0.07	0.21	0.02
	0.23	0.01	0.06	0.29	0.002
	0.37	0.00	0.06	0.27	0.03
	0.002	0.11	0.02	0.79	0.02
	0.45	0.07	0.01	0.25	0.06
	0.07	0.02	0.004	0.23	0.01
	(0.25±0.18)	(0.05±0.05)* §	(0.04±0.03)* §	(0.34±0.22)	(0.02±0.02)* §
Fertilidad 2 (Nº adultos/huevo)	0.18	0.08	0.05	0.05	0.02
	0.10	0.00	0.04	0.07	0.00
	0.18	0.00	0.04	0.14	0.02
	0.00	0.10	0.01	0.74	0.01
	0.20	0.07	0.00	0.10	0.05
	0.06	0.02	0.00	0.12	0.01
	(0.12±0.08)	(0.05±0.04)* §	(0.02±0.02)* §	(0.20±0.26)	(0.02±0.02)* §
<i>Phlebotomus perniciosus</i>					
Mortalidad de hembras (Nº muertas/hembras alimentadas)	0.00	0.50	0.40	0.80	0.70
	0.30	0.40	0.30	0.50	0.30
	0.40	0.30	0.40	0.30	0.20
	0.30	0.50	0.20	0.20	0.20
	0.30	0.30	0.40	0.30	0.60
	0.30	0.50	0.40	0.30	0.30
	(0.27±0.14)	(0.42±0.10) §	(0.35±0.08)	(0.40±0.22)	(0.38±0.21)
Oviposición (Nº huevos/hembra)	28	15	4	6	7
	24	16	15	6	18
	17	23	17	15	19
	16	9	22	20	22
	17	20	21	14	10
	14	13	14	22	16
	(19±6)	(16±5)*	(16±6)*	(14±7)*	(15±6)*
Fertilidad 2 (Nº adultos/huevo)	0.41	0.20	0.68	0.52	0.67
	0.33	0.17	0.31	0.53	0.53
	0.43	0.14	0.75	0.44	0.28
	0.53	0.25	0.62	0.15	0.61
	0.45	0.14	0.37	0.62	0.29
	0.52	0.20	0.37	0.27	0.51
	(0.44±0.08)	(0.18±0.04)* §	(0.52±0.19)	(0.42±0.18)	(0.48±0.16)

Los resultados se muestran para cada ratón infestado con la media±S.D en paréntesis. Los datos fueron analizados estadísticamente para comparar los resultados para cada especie entre los vectores alimentados en ratones vacunados y del grupo control mediante el test Chi² (*p<0.005) y de Student (§p<0.05). ND, sin determinar debido a la muerte del ratón.

5

1.4. Discusión

La presente invención muestra el efecto de la vacunación con quimeras de SUB/AK Q38 y Q41 en infestaciones por garrapatas, mosquitos y mosquitos de arena (flebotomos), con efectos en la muda, oviposición y/o en

10

fertilidad. Tal y como se muestra en experimentos previos, (de la Fuente *et al.* 2007; de la Fuente *et al.* 2011; Moreno-Cid JA *et al.* 2011), la hipótesis planteada en estos experimentos consiste en que la alimentación de artrópodos hematófagos sobre hospedadores inmunizados conlleva la ingestión de anticuerpos específicos para antígenos diana, los cuales provocan efectos deletéreos en su función alimentaria y reproductiva. Se desconoce el mecanismo preciso por el cual los anticuerpos anti-SUB/AKR afectan la infestación de vectores y a su fertilidad, pero es posible que incluya la reducción de la actividad biológica de SUB/AKR y/o la interacción de los anticuerpos con epítomos conservados en otras proteínas (de la Fuente *et al.* 2011; Moreno-Cid JA *et al.* 2011). El control de patógenos transmitidos por vectores artrópodos que afectan a la salud animal y humana es importante para la erradicación de enfermedades transmitidas por vector. Una ventaja importante de las vacunas frente a artrópodos es probablemente su capacidad para reducir o prevenir la transmisión de varios patógenos a través de la inmunización de hospedadores reservorios y poblaciones de animales susceptibles (de la Fuente *et al.* 2003; de la Fuente *et al.* 1998; Merino, O. *et al.* 2011). Además, la identificación de antígenos protectores evolutivamente conservados, tales SUB/AKR y la construcción de antígenos quiméricos que comprenden epítomos protectores, como los mostrados en la presente invención, puede conducir al desarrollo de vacunas multi-diana dirigidas hacia el control de varias especies de artrópodos. Sin embargo, a pesar de los recientes esfuerzos para desarrollar vacunas para el control de los artrópodos más importantes que son vectores de patógenos que afectan a la salud animal y humana, como las garrapatas, mosquitos y mosquitos de arena (flebotomos) (de la Fuente *et al.* 2003; Valenzuela JG *et al.* 2001; Lal AA *et al.* 2001; Almeida AP *et al.* 2002; Suneja A *et al.* 2003; Milleron RS *et al.* 2004; Titus RG *et al.* 2006; Willadsen, 2004), sólo dos vacunas han sido comercializadas para el control de las infestaciones de garrapatas en ganado vacuno (de la Fuente *et al.* 2003; de la Fuente *et al.* 2007; Willadsen, 2004).

En trabajos previos se ha demostrado que el efecto de los anticuerpos anti-AKR en la reducción de la supervivencia, ovoposición y/o fertilidad de garrapatas, mosquitos, flebotomos y ácaros rojos de las gallinas (Canales M *et al.* 2009; de la Fuente *et al.* 2011; Moreno-Cid JA *et al.* 2011; Harrington D *et al.* 2009). Sin embargo, los resultados de la presente invención son los primeros que muestran el efecto de quimeras de SUB/AKR en diferentes especies de vector, así como los primeros experimentos que muestran los efectos de la vacunación de infestaciones por garrapatas *I. ricinus*. La comparación entre las quimeras de SUB/AKR Q38 and Q41 en infestaciones de garrapatas, mosquitos y flebotomos mostraba que (a) la vacunación con Q41 mostraba el E más alto en mosquitos mediante la reducción de la supervivencia y la fertilidad de las hembras, y, (b) La vacunación con Q38 tuvo el efecto más alto en la reducción de la oviposición de mosquitos y flebotomos. Las vacunas de SUB y AKR controlaban las infestaciones de vectores debido a la alta conservación de las proteínas de garrapatas y mosquitos (Canales M *et al.* 2009; de la Fuente *et al.* 2006; Macqueen DJ y Johnston IA 2009; Galindo RC *et al.* 2009; Mangold AJ *et al.* 2009; de la Fuente *et al.* 2011; Prudencio, C.R *et al.* 2010). Sin embargo, el efecto de la vacunación con quimeras Q38 y Q41 al combinar en secuencias artificiales diferentes epítomos de SUB/AKR es que logra mejorar la E de vacunas frente a diferentes especies de vector.

BIBLIOGRAFÍA

- 5 Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 2003; 21: 1492-1501.
- 10 Almazán C, Kocan KM, Blouin EF, de la Fuente J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine* 2005; 23: 5294-5298.
- 15 Almeida AP, Billingsley PF. Induced immunity against the mosquito *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae): effects of cell fraction antigens on survival, fecundity, and *Plasmodium berghei* (Eucoccidiida: Plasmodiidae) transmission. *J Med Entomol* 2002; 39: 207-214.
- 20 Canales M, Naranjo V, Almazán C, Molina R, Tsuruta SA, Szabó MPJ, Manzano-Roman R, Pérez de la Lastra JM, Kocan KM, Jiménez MI, Lucientes J, Villar M, de la Fuente J. Conservation and immunogenicity of the mosquito ortholog of the tick protective antigen, subolesin. *Parasitol Res* 2009; 105: 97-111.
- 25 Carpio Y, Basabe L, Acosta J, Rodríguez A, Mendoza A, Lisperger A, Zamorano E, González M, Rivas M, Contreras S, Hausmann D, Figueroa J, Osorio VN, Asencio G, Mancilla J, Ritchie G, Borroto C, Estrada MP. Novel gene isolated from *Caligus rogercresseyi*: a promising target for vaccine development against sea lice. *Vaccine* 2011; 29: 2810-2820.
- 30 Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 873-882.
- 35 de la Fuente J, Almazán C, Blas-Machado U, Naranjo V, Mangold AJ, Blouin EF, Gortazar C, Kocan KM. The tick protective antigen, 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood ingestion and reproduction. *Vaccine* 2006a; 24: 4082-4095.
- 40 de la Fuente J, Almazán C, Canales M, Pérez de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res Rev* 2007a; 8: 23-28.
- 45 de la Fuente J, Almazán C, Naranjo V, Blouin EF, Meyer JM, Kocan KM. Autocidal control of ticks by silencing of a single gene by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* 2006b; 344: 332-338.
- 50 de la Fuente J, Almazán C, Canales M, Pérez de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res Rev* 2007b; 8: 23-28.
- 55 de la Fuente J, Kocan KM. Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2: 583-593.
- 60 de la Fuente J and Kocan, KM. Strategies for development of vaccines for control of ixidid tick species, *Parasite Immunol* 2006, 28: 275-283.
- 65 de la Fuente J, Rodríguez M, Redondo M, Montero C, García-García JC, Méndez L, Serrano E, Valdés M, Enríquez A, Canales M, Ramos E, de Armas CA, Rey S, Rodríguez JL, Artilles M, García L. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with GavacTM against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 1998; 16: 366-373.
- 70 de la Fuente J, Maritz-Olivier C, Naranjo V, Ayoubi P, Nijhof AM, Almazán C, Canales M, Pérez de la Lastra JM, Galindo RC, Blouin EF, Gortazar C, Jongejan F, Kocan KM. Evidence of the role of tick subolesin in gene expression. *BMC Genomics* 2008a; 9: 372.

- de la Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan, KM, Somenshine DE. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in human and animals. *Front Biosci* 2008b; 13: 6938-6946.
- 5 de la Fuente J, Moreno-Cid JA, Canales M, Villar M, Pérez de la Lastra JM, Kocan KM, Galindo RC, Almazán C, Blouin EF. Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Vet Parasitol* 2011; 181: 17-22.
- Estrada-Peña A, Ayllón N, de la Fuente, J. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Front Physiol* 2012; 3: 64.
- 10 Galindo RC, Doncel-Pérez E, Zivkovic Z, Naranjo V, Gortazar C, Mangold AJ, Martín-Hernando MP, Kocan KM, de la Fuente J. Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates. *Dev Comp Immunol* 2009; 33: 612-617.
- 15 Goto A, Matsushita K, Gesellchen V, El Chamy L, Kutteneuler D, Takeuchi O, Hoffmann JA, Akira S, Boutros M, Reichhart JM. Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-kappaB-dependent gene expression in drosophila and mice. *Nat Immunol* 2008; 9: 97-104.
- 20 Graf JF, Gogolewski R, Leach-Bing N, Sabatini, GA, Molento MB, Bordin EL, Arantes GJ. Tick control: an industry point of view, *Parasitology* 2004; 129: 427-442.
- Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007; 370: 1644-1652
- 25 Harrington D, Canales M, de la Fuente J, de Luna C, Robinson K, Guy J, Sparagano O. Immunisation with recombinant proteins subolesin and Bm86 for the control of *Dermanyssus gallinae* in poultry. *Vaccine* 2009; 27: 4056-4063.
- Hatfield PR. Detection and localization of antibody ingested with a mosquito bloodmeal. *Med Vet Entomol* 1988; 2: 339-345.
- 30 Hayes EB. Is it time for a new yellow fever vaccine? *Vaccine* 2010; 28: 8073-8076.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszac P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451: 990-994.
- 35 Karunamoorthi K. Vector control: a cornerstone in the malaria elimination campaign. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:1608-1616.
- Kedzierski L, Zhu Y, Handman E. Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitol* 2006; 133: S87-S112.
- 40 Kishore K, Kumar V, Kesari S, Dinesh DS, Kumar AJ, Das P, Bhattacharya SK. Vector control in leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123: 467-472.
- 45 Kocan KM, Zivkovic Z, Blouin EF, Naranjo V, Almazán C, Mitra R, de la Fuente J. Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. *BMC Dev Biol* 2009; 9: 42.

Lal AA, Patterson PS, Sacchi JB, Vaughan JA, Paul C, Collins WE, Wirtz RA, Azad AF. Anti-mosquito midgut antibodies block development of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in multiple species of *Anopheles* mosquitoes and reduce vector fecundity and survivorship. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5228-5233.

- 5 Macqueen DJ, Johnston IA. Evolution of the multifaceted eukaryotic akirin gene family. *BMC Evol Biol* 2009; 9: 34.
- 10 Mangold AJ, Galindo RC, de la Fuente J. Response to the commentary of D. Macqueen on: Galindo RC, Doncel-Pérez E, Zivkovic Z, Naranjo V, Gortazar C, Mangold AJ, et al. Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates [*Dev. Comp. Immunol.* 33 (2009) 612-617]. *Dev Comp Immunol* 2009; 33: 878-879.
- 15 Manzano-Román R, Díaz-Martín V, Oleaga A, Siles-Lucas M, Pérez-Sánchez R. Subolesin/akirin orthologs from *Ornithodoros* spp. soft ticks: cloning, RNAi gene silencing and protective effect of the recombinant proteins. *Vet Parasitol* 2012; 185: 248-259.
- 20 Merino, O., Almazán, C., Canales, M., Villar, M., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., de la Fuente, J. Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Vaccine* 2011a; 29: 8575-8579.
- Merino O, Almazán C, Canales M, Villar M, Moreno-Cid JA, Estrada-Peña A, Kocan KM, de la Fuente J. Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks fed on cattle. *Vaccine* 2011b; 29: 2248-2254.
- 25 Milleron RS, Ribeiro JM, Elnaime D, Soong L, Lanzaro G. Negative effect of antibodies against maxadilan on the fitness of the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70: 278-285.
- 30 Moreno-Cid JA, Jiménez M, Cornelie S, Molina R, Alarcón P, Lacroix M-N, Pinal R, Delacour S, Lucientes J, Canales M, Pérez de la Lastra JM, Villar M, de la Fuente J. Characterization of *Aedes albopictus* akirin for the control of mosquito and sand fly infestations. *Vaccine* 2011; 29: 77-82.
- 35 Nijhof AM, Taoufik A, de la Fuente J, Kocan KM, de Vries E, Jongejan F. Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91, subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *Int J Parasitol* 2007; 37: 653-662.
- Nowak SJ, Aihara H, Gonzalez K, Nibu Y, Baylies MK. Akirin links twist-regulated transcription with the Brahma chromatin remodeling complex during embryogenesis. *PLoS Genet* 2012; 8: e1002547.
- 40 Nuttall, PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling tick and tick-borne diseases. *Parasite Immunol* 2006; 28: 155-163.
- Peter RJ, Van den Bossche BL, Penzhorn BL, Sharp B. Tick, fly, and mosquito control-Lessons from the past, solutions for the future. *Vet Parasitol* 2005; 132: 205-215.
- 45 Prudencio, C.R., Pérez de la Lastra, J.M., Canales, M., Villar, M., de la Fuente, J. Mapping protective epitopes in the tick and mosquito subolesin ortholog proteins. *Vaccine* 2010; 28: 5398-5406.
- Saul A. Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 5: 476-481.
- 50 Sperança MA, Capurro ML. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 425-433.

Suneja A, Gulia M, Gakhar SK. Blocking of malaria parasite development in mosquito and fecundity reduction by midgut antibodies in *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 2003; 52: 63-70.

5 Titus RG, Bishop JV, Mejia JS. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol* 2006; 4: 131-141.

10 Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, Sacks DL, Ribeiro JM. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 2001; 194: 331-342.

Willadsen P. Anti-tick vaccines. *Parasitol* 2004; 129: S367-S874.

15 Willadsen, P. Tick control: Thoughts on a research agenda., *Vet Parasitol* 2006; 138: 161-168.

Zivkovic Z, Torina A, Mitra R, Alongi A, Scimeca S, Kocan KM, Galindo RC, Almazán C, Blouin EF, Villar M, Nijhof AM, Mani R, La Barbera G, Caracappa S, Jongejan F, de la Fuente J. Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. *BMC Immunol* 2010; 11: 7.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido aislado capaz de inducir una respuesta inmune protectora y de reacción cruzada frente a una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago, caracterizado por que comprende al menos un epítipo lineal y al menos un epítipo conformacional, comunes a los ortólogos de la proteína subolesina de garrapata y de mosquito, donde dicho péptido es la SEQ ID No. 1 o la SEQ ID No. 2.
- 10 2. El péptido según la reivindicación 1, caracterizado por ser útil en medicina.
- 15 3. El péptido según las reivindicaciones 1-2, caracterizado por ser útil para inducir una respuesta inmune protectora y de reacción cruzada frente a una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago seleccionado entre: una garrapata, un mosquito, un flebotomo, un ácaro rojo de las gallinas, una pulga, un piojo y un piojo de mar.
- 20 4. El péptido según las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que es capaz de inducir una respuesta inmune protectora y de reacción cruzada frente a una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago seleccionado entre: *Ixodes ricinus*, *Aedes albopictus* y *Phlebotomus perniciosus*.
- 25 5. Un polinucleótido aislado caracterizado por que codifica para un péptido descrito en las reivindicaciones 1-4.
- 30 6. El polinucleótido según la reivindicación 5, caracterizado por que dicho polinucleótido es SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 4.
- 35 7. Un vector de expresión caracterizado por que comprende al menos un polinucleótido descrito en las reivindicaciones 5-6.
- 40 8. Una célula hospedadora, caracterizada por que comprende al menos un vector de expresión descrito en la reivindicación 7.
- 45 9. La célula hospedadora según la reivindicación 8, caracterizada por que dicha célula es bacteriana.
- 50 10. La célula hospedadora según la reivindicación 9, caracterizada por que dicha célula bacteriana es *Escherichia coli*.
- 55 11. Un animal/organismo no humano, caracterizado por que comprende al menos una célula hospedadora descrita en las reivindicaciones 8-10.
- 60 12. El animal no humano según la reivindicación 11, caracterizado por que dicho animal es un ratón.
13. Un anticuerpo aislado caracterizado por que reacciona frente a un péptido descrito en las reivindicaciones 1-4.
14. Una composición caracterizada por que comprende un péptido descrito en las reivindicaciones 1-4, o un polipéptido descrito en las reivindicaciones 5-6, o un vector de expresión descrito en la reivindicación 7, o una célula hospedadora descrita en las reivindicaciones 8-10.
15. La composición según la reivindicación 14, caracterizado por que adicionalmente comprende un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
16. La composición según las reivindicaciones 14-15, caracterizada por que adicionalmente comprende un adyuvante.
17. La composición según las reivindicaciones 14-16, caracterizada por que adicionalmente comprende un segundo principio activo.
18. Uso de un péptido descrito en las reivindicaciones 1-4, o un polipéptido descrito en las reivindicaciones 5-6, o un vector de expresión descrito en la reivindicación 7, o una célula hospedadora descrita en las reivindicaciones 8-10, o un animal no humano descrito en las reivindicaciones 11-12, o un anticuerpo descrito en las reivindicación 13, para la preparación de un medicamento.
19. El uso según la reivindicación 18, caracterizado por que el medicamento es útil para la prevención y/o el tratamiento de una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago.

20. El uso según la reivindicación 19, caracterizado por que el medicamento es útil para la prevención y/o el tratamiento de una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago seleccionado entre: una garrapata, un mosquito, un flebótomo, un ácaro rojo de las gallinas, una pulga, un piojo y un piojo de mar.
- 5 21. El uso según la reivindicación 19, caracterizado por que el medicamento es útil para la prevención y/o el tratamiento de una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago seleccionado entre: *Ixodes ricinus*, *Aedes albopictus* y *Phlebotomus perniciosus*.
- 10 22. Un medicamento capaz de inducir una respuesta inmune protectora y de reacción cruzada frente a una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago caracterizado por que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido descrito en las reivindicaciones 1-4, o un polipéptido descrito en las reivindicaciones 5-6, o un vector de expresión descrito en la reivindicación 7, o una célula hospedadora descrita en las reivindicaciones 8-10.
- 15 23. El medicamento según la reivindicación 22, caracterizado por que es una vacuna.

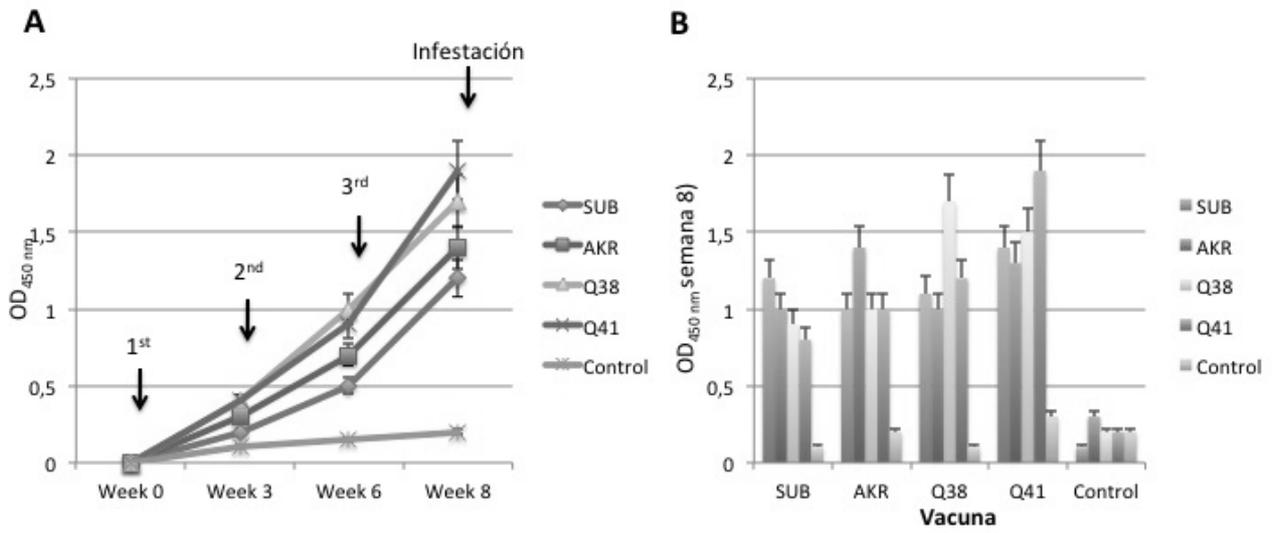


FIGURA 1

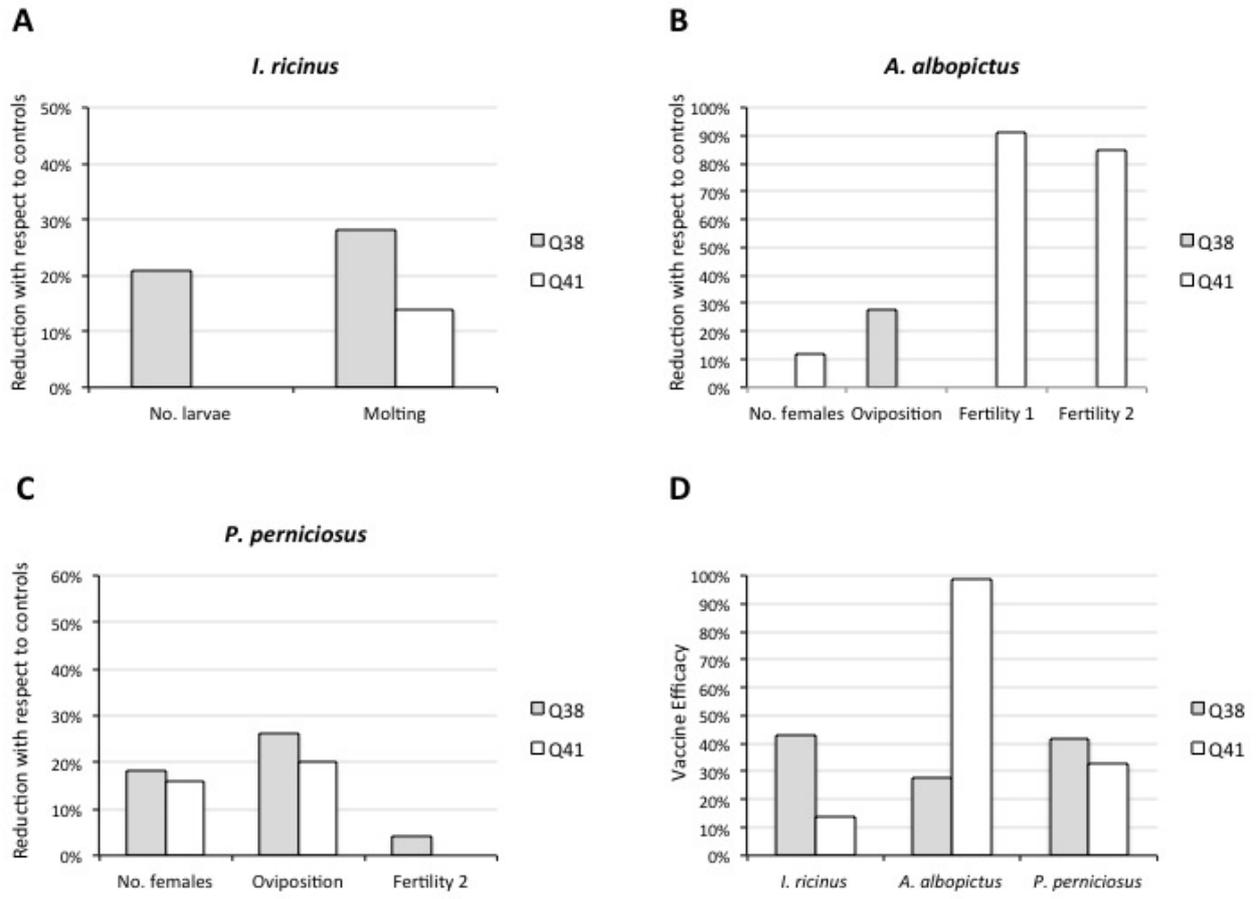


FIGURA 2

ES 2 445 467 A1

Listado de Secuencias

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

<120> VACUNA FRENTE A INFESTACIONES PROVOCADAS POR ARTROPODOS
HEMATOFAGOS

<130> 5120125 JOSE DE LA FUENTE

<160> 4

<170> BISSAP 1.0

<210> 1

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..238

<223> /mol_type="protein"

/note="secuencia correspondiente a la proteina sintetica
Quimera

38"

/organism="Artificial Sequence"

<220>

<221> REGION

<222> 6..11

<223> region rica en histidina

<400> 1

```
Met Asn His Lys Val His His His His His His Met Glu Asn Leu Tyr
1          5          10          15
Phe Gln Gly Met Ala Cys Ala Thr Leu Lys Arg Thr His Asp Trp Asp
20          25          30
Pro Leu His Ser Pro Asn Gly Arg Ser Pro Lys Pro Ser Pro Phe Gly
35          40          45
Glu Val Pro Pro Lys Ser Ser Pro Leu Glu Ser Gly Ser Pro Ser Ala
50          55          60
Thr Pro Pro Ala Ser Pro Thr Gly Leu Ser Pro Gly Gly Leu Leu Ser
65          70          75          80
Pro Val Arg Arg Asp Gln Pro Leu Phe Thr Phe Arg Gln Val Gly Leu
85          90          95
Ile Cys Glu Arg Met Met Lys Glu Arg Glu Ser Gln Ile Arg Asp Glu
100         105         110
Tyr Asp His Val Leu Ser Ala Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Thr Phe
115         120         125
Val Lys Phe Thr Tyr Asp Gln Ile Gln Lys Arg Phe Glu Gly Ala Thr
130         135         140
Pro Ser Tyr Leu Ser Gly Gly Gly Ser His Lys Pro Phe Gly Ser Pro
145         150         155         160
Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ala Ile Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys
165         170         175
Arg Pro Ser Pro Phe Ala Glu Ala Val Cys Pro Lys Gln Leu Thr Phe
180         185         190
Asn Thr Gly Ser Arg Pro Asp Ser Pro Pro Ser Met Val Leu Phe Thr
195         200         205
Phe Lys Gln Ala Leu Arg Glu Gln Tyr Asp Ala Val Leu Thr Asn Lys
210         215         220
Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Pro Ser Tyr Leu Ser
225         230         235
```

<210> 2

<211> 234

ES 2 445 467 A1

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..234
 <223> /mol_type="protein"
 /note="secuencia correspondiente a la proteina sintetica
 Quimera
 41"
 /organism="Artificial Sequence"

<220>
 <221> REGION
 <222> 6..11
 <223> region rica en histidina

<400> 2
 Met Asn His Lys Val His His His His His His Met Glu Asn Leu Tyr
 1 5 10 15
 Phe Gln Gly Met Ala Cys Ala Thr Leu Lys Arg Thr His Asp Trp Asp
 20 25 30
 Pro Leu His Ser Pro Asn Gly Arg Ser Pro Lys Arg Arg Cys Met
 35 40 45
 Pro Leu Gly Ser Pro Ser Ser Asn Ala Pro Asn Ser Pro Ser Ser Ser
 50 55 60
 Ala Ile Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala His Gln Ile Asn Ser Ala Met
 65 70 75 80
 Arg Val Met Glu Pro Lys Pro Ser Pro Phe Ala Glu Ala Val Cys Pro
 85 90 95
 Lys Leu Thr Ser Glu Glu Ile Ala Ala Asn Ile Arg Glu Glu Met Arg
 100 105 110
 Arg Leu Gln Arg Arg Lys Gln Leu Thr Phe Ser Ser Pro Leu Glu Ser
 115 120 125
 Gly Ser Pro Ser Ala Thr Pro Pro Ala Ala Asp Cys Gly Pro Ala Ser
 130 135 140
 Pro Thr Gly Leu Ser Pro Gly Gly Leu Leu Ser Pro Val Arg Arg Asp
 145 150 155 160
 Gln Pro Pro Ser Met Val Lys His Pro Glu Lys Ala Leu Phe Thr Phe
 165 170 175
 Arg Gln Val Gly Leu Ile Cys Glu Arg Met Met Lys Glu Arg Glu Ser
 180 185 190
 Gln Ile Arg Asp Gln Tyr Asp Ala Val Leu Ser Ala Lys Leu Ala Glu
 195 200 205
 Gln Tyr Asp Thr Phe Val Lys Phe Thr Tyr Asp Gln Ile Gln Lys Arg
 210 215 220
 Phe Glu Gly Ala Ala Pro Ser Tyr Leu Ser
 225 230

<210> 3
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..657
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Secuencia usada en la produccion de Quimera 38 que
 codific
 a para SEQ ID No 1"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 3
 atggcctgtg ccacgctgaa acgcacgcat gattgggacc cgctgcatag cccgaatggt
 60

ES 2 445 467 A1

cgetcgcga aaccgtcgcc gtttggtgaa gtgccgcaa aaagctctcc gctggagtct
120

ggtagtcocat ccgctacccc accagcaagt ccaacgggtc tgtccccggg tggcctgctg
180

agtccgggtgc gtcgcatca gccgctgttt actttccgcc aagttggtct gatttgcgaa
240

cgtatgatga aagaacgcga gagccagatc cgtgatgaat atgaccatgt cctgtctgcc
300

aaactggcag agcaatacga tactttcgta aaattcacat acgaccagat tcaaaaacgc
360

tttgaagggtg caacgccatc atacctgagc ggcggcggct cacacaaacc gttcggctcg
420

ccgagttccc catcatcgag cgcaatcgca gcagcagctg cagcagcaaa acgtccgagc
480

ccatttgctg aagcgggtgtg tccgaaacag ctgaccttca acacgggtag ccgtccagat
540

agcccacat ctatggttct gtttaccttc aaacaggccc tgcgtgagca atatgacgt
600

gtcctgacca ataaactggc cgaacaatac gatgccgccc caccgtccta cctgtcc
657

<210> 4

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..645

<223> /mol_type="DNA"

/note="Secuencia usada en la produccion de Quimera 41 que
codific

a para SEQ ID No 2"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 4

atggcttgcg ctacgctgaa acgcacccac gactgggacc cgctgcactc gccgaatggc
60

cgetctccga aacgccgccc ctgtatgcca ctgggcagcc cgagctctaa cgctccaaat
120

tctccgagtt cctcagcaat tgcagcagca gctgcagcag cacatcagat caactcagcc
180

atgcggtca tggaaaccgaa accatcgccc tttgctgagg cggatgccc gaaactgact
240

agcgaagaga ttgctgcgaa tatccgtgaa gagatgcgtc gcctgcagcg tcgcaaacaa
300

ctgacattct cgagcccgtt ggaatctggt agtccgtccg caaccccacc agcagcagat
360

tgcgggtccag catcaccaac gggctctgctg ccgggcggtc tgctgagtc agtgcgtcgc

ES 2 445 467 A1

420

gaccagccac catccatggt taaacacccg gaaaaagctc tgtttacctt ccgccaagtg
480

gggctgattt gtgaacgtat gatgaaagaa cgcgagtccc agatccgtga tcaatatgac
540

gcagtgctga gcgccaaact ggcagaacag tacgatacgt ttgttaaatt tacctacgac
600

cagatccaga aacgctttga aggcgctgcc ccgtcatacc tgagc
645



- ②① N.º solicitud: 201231253
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.08.2012
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DE LA FUENTE J. Targetin Arthropod subolesin/akirin for the developente of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmisión. Veterinary Parasitology. 2011. Vol. 181(1), páginas: 17-22, todo el documento.	1-23
A	MANZANO-ROMAN R. Subolesin/akirin orthologs from Ornithodoros spp. soft ticks: cloning, RNAi gene silencing and protective effect of the recombinant proteins. Veterinary Parasitology. 2012. Vol. 185(2-4), páginas: 248-259, resumen.	1-23
A	DE LA FUENTE J. & KOCAN KM. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. Expert Review of Vaccines. 2003. Vol. 2(4): 583-593, resumen.	1-23
A	WO 2009146513 A1 (VALLÉE S.A. [BR/BR] & UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA – UFU [BR/BR] & IMUNOSCAN ENGENHARIA MOLECULAR LTDA [BR/BR]) 10.12.2009, Página 20, línea 15 – página 16, línea 3; reivindicaciones 1-7.	1-23

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 11.12.2013</p>	<p>Examinador M. D. García Grávalos</p>	<p>Página 1/5</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/435 (2006.01)

C12N15/10 (2006.01)

A61K38/17 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

A61P33/00 (2006.01)

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

C07K, C12N, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, EBI, D-GENE, STN.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.12.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-23	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-23	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
	DE LA FUENTE J. Veterinary Parasitology. Sept. 2011. Vol. 181(1), páginas:17-22.	08.09.2011
	MANZANO-ROMAN R. Veterinary Parasitology. Apr. 2012. Vol. 185(2-4), páginas: 248-259.	30.04.2012
	DE LA FUENTE J. & KOCAN KM. Expert Review of Vaccines. 2003. Vol. 2(4): 583-593.	2003
	WO 2009146513 A1	10.12.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga unas proteínas quimeras basadas en epítomos de las proteínas subolesina (SUB) de la garrapata y akirina (AKR) del mosquito, formadas por péptidos definidos como SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 (reivindicaciones 1-13). Se refiere también al uso de dichos péptidos para preparar una composición farmacéutica y/o vacuna para tratamiento y/o prevención de una infestación provocada por un artrópodo hematófago (reivindicaciones 14-24).

El documento D01 divulga el uso de antígenos de las proteínas SUB y AKR, que se encuentran altamente conservados entre las especies que actúan como vectores de garrapatas, para desarrollo de vacunas con la doble finalidad de controlar por una parte las infestaciones producidas por artrópodos y por otra, reducir la capacidad del vector que transmite el agente infeccioso. Se refiere también al uso de estos antígenos para desarrollo de una vacuna universal para control de infestaciones provocadas por artrópodos (ver todo el documento).

El documento D02, basándose en el uso de antígenos de las proteínas SUB y AKR para desarrollo de una vacuna universal para control de infestaciones provocadas por artrópodos, divulga la clonación y caracterización de ortólogos de la subolesina de dos especies vectores de garrapatas blandas para evaluar el silenciamiento del gen de la subolesina por el ARNi y determinar el efecto protector de los antígenos recombinantes en ensayos de vacunación (ver resumen).

El documento D03 divulga estudios realizados para identificación y caracterización de antígenos protectores para obtención de vacunas recombinantes para combatir infestaciones producidas por artrópodos (ver resumen).

El documento D04 divulga péptidos miméticos recombinantes derivados de un antígeno de garrapata bovina, así como su uso para elaboración de una vacuna para combatir infestaciones provocadas por artrópodos (ver página 20, línea 15 – página 16, línea 3; reivindicaciones 1-7).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la presente invención es un péptido, definido como SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, y su uso para preparar una composición farmacéutica y/o vacuna para tratamiento y/o prevención de una infestación provocada por un artrópodo hematófago.

.1. REIVINDICACIONES 1-23

El uso de antígenos de las proteínas subolesina de garrapatas y/o akirina de mosquitos para desarrollo de vacunas para control de las infestaciones producidas por artrópodos es conocido en el estado de estado de la técnica. De hecho, el documento D01 es el más cercano al estado de la técnica divulgando una vacuna universal, basada en antígenos de estas proteínas para control de infestaciones provocadas por artrópodos. Sin embargo, las características técnicas que presentan no coinciden con las reivindicadas en la presente solicitud.

La presente invención reivindica un péptido, basado en epítomos de las proteínas subolesina y akirina definido como SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2. Dicho péptido no ha sido encontrado en el estado de la técnica.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-23 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D02-D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente solicitud de patente.