



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 347**

51 Int. Cl.:
A61K 39/175 (2006.01)
C12N 15/38 (2006.01)
C12N 15/27 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00940474 .0**
96 Fecha de presentación : **08.06.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1185662**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.03.2002**

54 Título: **Vacuna de ADN para perros.**

30 Prioridad: **10.06.1999 FR 99 07604**
19.07.1999 US 144490 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2011

73 Titular/es: **MERIAL**
29, avenue Tony Garnier
69007 Lyon, FR

72 Inventor/es: **Fischer, Laurent, Jean-Charles;**
Barzu-Le Roux, Simona y
Audonnet, Jean-Christophe, Francis

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 362 347 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna de ADN para perros.

[0001] La presente invención se refiere a vacunas de ADN mejoradas para los perros.

5 **[0002]** La utilización de moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) para la vacunación es conocida desde el principio de los años 90 (Wolf y al. Science 1990. 247. 1465-1468). Esta técnica de vacunación induce una inmunidad celular y humoral tras la transfección in vivo de células del sujeto a vacunar por unas moléculas de ADN o de aARN codifican y que expresan proteínas inmunológicamente activas.

10 **[0003]** Una vacuna de ADN se compone de al menos un plásmido que puede ser expresado por la maquinaria celular del sujeto a vacunar y de un vehículo o de un excipiente farmacéuticamente aceptable. La secuencia nucleotídica de este plásmido codifica y expresa, entre otros, uno o varios inmunógenos, tales como proteínas o glicoproteínas capaces de inducir, en el sujeto a vacunar, una respuesta inmunitaria celular (movilización de los linfocitos T) y humoral (estimulación de la producción de anticuerpos específicamente dirigidos contra el inmunógeno) (Davis H. L. Current Opinion Biotech. 1997.8. 635-640).

15 **[0004]** Todos los inmunógenos provenientes de un patógeno no son antígenos bastante eficaces naturalmente para inducir una respuesta inmunitaria protectora óptima en el animal a vacunar. Es por lo tanto necesario mejorar la respuesta inmunitaria.

[0005] Cada vía de administración comprende sus propias restricciones y dificultades; así una vacuna de ADN eficaz por una vía de administración puede ser ineficaz por otra.

20 **[0006]** La elección de la vía de administración debe tener en cuenta necesidades de los enfermeros y de los criadores, dificultades ligadas a la contención de los animales o a la naturaleza del producto.

[0007] Aunque pueda ser utilizada la vía intramuscular, la vía subcutánea presenta un gran interés para la vacunación de los animales de compañía, sobre todo para los animales de pequeño tamaño y de manipulación difícil.

25 **[0008]** Por lo tanto, las vacunas de ADN deben mejorarse para permitir su administración eficaz por unas vías diferentes.

30 **[0009]** Ya se han utilizado vacunas de ADN experimentalmente, en especial una vacuna de ADN que codifica para la hemaglutinina (HA) del virus de la rubéola (Etchart y al. J. Gen. Virol. 1997. 78. 1577-1580) cuya administración intranasal en los ratones ha mostrado ser más eficaz que una administración oral. En otro ejemplo, una vacuna de ADN que codifica para la proteína de la envoltura (Env) del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) cuya administración subcutánea no ha sido eficaz en comparación con la administración por la vía intramuscular (Ishii y al. AIDS Res. Hum. Retro. 1997. 13. 1421-1428).0

35 **[0010]** Las vacunas de ADN también se han utilizado experimentalmente contra virus de animales, en especial contra los virus de la enfermedad canino (CDV). Son conocidos determinados inmunógenos de CDV, en especial la proteína de nucleocápside (N), la proteína de matriz (M), la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina (HA) (WO-A-9741236). Sin embargo, la administración subcutánea de una vacuna de ADN que codifica para la hemaglutinina y la proteína de fusión de CDV no han permitido detectar la producción de anticuerpos en ratones, y únicamente una reducida producción de anticuerpos tras la administración intramuscular de esta vacuna de ADN (Sixt y al. J. Virol. 1998. 72. 8472-8476).

40 **[0011]** La inducción de una respuesta inmunitaria y las relaciones entre los diferentes elementos del sistema inmunitario que intervienen durante esta respuesta pueden ser diferentes entre una especie animal y otra. Las numerosas enseñanzas sacadas de los experimentos llevados en el modelo ratón han permitido comprender mejor el funcionamiento del sistema inmunitario en los ratones, pero estas enseñanzas no son directamente transferibles a las otras especies, en especial porque es más fácil inducir una respuesta inmunitaria en los ratones que en las otras especies (van Drunen Little-van den Hurk y al. J. Gen. Virol. 1998. 79. 831-839; Bôhm y al. Vacunae 1998. 16. 949-954).

45 **[0012]** Se han propuesto diferentes vías de administración de la vacuna de ADN (intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, mucosa, etc.). También se han propuesto diferentes medios de administración, en especial partículas de oro cubiertas de ADN y proyectadas de tal manera que puedan penetrar en las células de la piel del sujeto a vacunar (Tang y al. nature 1992. 356. 152-154) y los inyectores por chorro líquido que permiten transfectar a la vez células de la piel y células de los tejidos subyacentes (Furth y al. Analytical Bioch. 1992. 205. 365-368).

50 **[0013]** Se han utilizado compuestos químicos para la transfección in vitro de ADN:

A/ - los lípidos catiónicos.

Los lípidos catiónicos se dividen a su vez en cuatro sub-grupos.

- 1) los lípidos catiónicos que contienen sales de amonio cuaternario, como por ejemplo el DOTMA (dioleitoxiopropil-trimetilamonio, producido por Gibco con el nombre de Lipofectina), el DOTAP (trimetil- 2,3-(octadec-9-ene-oiloxi)-1-propanamonio; Gregoriadis y al. FEBS Letters 1997. 402. 107-110), el DMRIE (N-(2-hidroxietyl)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propanamonio; WO-A-9634109), el DLRIE (N-(2-hidroxietyl)-N,N-dimetil-2,3-bis(dodeciloxi)-1-propanamonio; Felgner y al. Ann. N Y Acad. Sci. 1995. 772. 126-139). Estos lípidos catiónicos que contienen sales de amonio cuaternario pueden ser asociados o no con un lípido neutro suplementario, tal como el DOPC (dioleoil-fosfatidil-colina) o el DOPE (dioleoil-fosfatidil- etanolamina) (J.P. Behr, Bioconjugate Chemistry 1994. 5. 382-389).
- 2) las lipoaminas, como por ejemplo el DOGS (dioctadecilamidoglicilspermina, producido por Promega con el nombre de Transfectam; Abdallah y al. Biol. Cell. 1995. 85. 1-7), el DC-Chol (dimetilaminoetano-carbamoilcolesterol; Gao y Huang, Biochem. Biophys. Res. Común. 1991. 179. 280-285), el BGSC (bis-guanidinaspermidina- colesterol), el BGTC (bis-guanidina-tren-colesterol) (Vigneron y al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996. 93. 9682-9686).
- 3) los lípidos catiónicos que contienen sales de amonio cuaternario y lipoaminas, como por ejemplo el DOSPA (N,N-dimetil-N-(2-(sperminacarboxamido) etil)-2, 3-bis(dioleoiloxi)-1-propanimidio pentahidrocloruro, comercializado por Gibco con el nombre de LipofectAmine®; Hawley-Nelson y al. Focus 1993. 15. 73-79), el GAP-DLRIE (N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(dodeciloxi)-i-propanaminio; Wheeler y al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996. 93. 11454-11459; Norman y al. Vaccine 1997. 15. 801-803).
- 4) los lípidos que contienen sales de amidina, como por ejemplo el ADPDE, el ADODE (Ruysschaert y al. Biochem. Biophys. Res. Común. 1994. 203. 1622-1628).
- B/ - los polímeros, como por ejemplo el SuperFect™ (moléculas de dendrímeros activados, producidos por Qiagen; Xu y al. Mol. Genet. Metab. 1998. 64. 193-197), y
- C/ - los agentes bioquímicos, como por ejemplo las toxinas, en especial las toxinas coléricas.

[0014] Determinados de estos compuestos también se han utilizado en la formulación de vacunas de ADN con resultados más que mitigados. Los conocimientos en materia de transfección in vitro no son trasladables a la vacunación ADN donde el objetivo final es asegurar una reacción inmunitaria protectora. También se han constatado efectos negativos en la inducción de una protección inmunitaria eficaz con compuestos conocidos para favorecer la transfección in vitro. Determinados compuestos químicos de formulación son tóxicos en dosis para las células transfectadas.

[0015] En los trabajos de Etchart ya citados (Etchart y al. J. Gen. Virol. 1997. 78. 1577-1580), la utilización del DOTAP no ha tenido efecto adyuvante durante la administración de la vacuna de ADN por la vía intranasal, mientras que si lo tuvo por la vía oral. El DOTAP también se ha utilizado en vacunas de ADN que codifican para la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe en el modelo ratón administrados por la vía intranasal (Ban y al. Vaccine 1997. 15. 811-813), pero la adición de DOTAP ha inhibido la respuesta inmunitaria. La utilización de DC-Chol o de DOTAP/DOPE en vacunas de ADN que codifican para la proteína de superficie (S) del virus de la hepatitis B en el modelo ratón administrados por la vía intramuscular ha permitido aumentar la respuesta en anticuerpos, mientras que la utilización de la Lipofectina (o DOTMA) no ha aumentado esta respuesta (Gregoriadis y al. FEBS Letters 1997. 402. 107-110). El DC-Chol/DOPE también se ha utilizado en vacunas de ADN contra el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, proteína Env) en el modelo ratón, cuya administración por la vía intramuscular indujo una respuesta inmunitaria más eficaz, mientras que la administración por la vía subcutánea o intradérmica no la aumentó (Ishii y al. AIDS Res. Hum. Retro. 1997. 13. 1421-1428).

[0016] Asimismo, WO-A-98 40499 propone realizar complejos de ácido nucleico + lípidos catiónicos para transfectar el epitelio mucosal de los mamíferos, para la terapia génica o la expresión de antígeno destinado a inducir una respuesta inmunitaria. Este documento propone la vía mucosal, por inhalación, por ejemplo el epitelio pulmonar. Ahí se precisa que sus resultados divergen de trabajos anteriores. Y añade que para la vía intramuscular (parenteral), el ADN desnudo es más eficaz que una mezcla de ADN + lípido.

[0017] La adición de determinadas citoquinas, en especial de interleuquinas o de interferones, puede permitir mejorar la respuesta inmunitaria inducida en particular por las vacunas de ADN. Cada citoquina activa una reacción que le es propia y orienta más o menos la respuesta inmunitaria hacia una respuesta celular o hacia una respuesta humoral (Pasquini y al. Inmunol. Cell. Biol. 1997. 75. 397-401; Kim y al. J. Interferon citokine Res. 1999. 19. 77-84). Los efectos adyuvantes de una citoquina proveniente de una especie determinada no son necesariamente los mismos si el contexto inmunitario varía, en especial si esta citoquina es administrada a otra especie, por lo tanto en un sistema inmunitario heterólogo. La adición de citoquina puede también no tener ningún efecto adyuvante, incluso llevar a una inversión del efecto buscado, es decir una disminución o una inhibición de la respuesta inmunitaria. Así, una vacuna de ADN que codifica para una cadena simple de una inmunoglobulina fusionada con el GM-CSF no aumenta la respuesta inmunitaria, mientras que la administración directa en los ratones de esta proteína de fusión es eficaz, como también lo es la administración de una proteína de fusión formada por Fv y de la citoquina IL-1beta o la administración de una vacuna de ADN que codifica para esta última proteína de fusión (Hakim y al. J. Immunol 1996.

157. 5503-5511). La utilización de plásmidos que expresan conjuntamente la citoquina IL-2 y la proteína de envoltura del virus de la hepatitis B en una conformación fusionada o no fusionada resulta en el aumento de las respuestas inmunitarias humorales y celulares (Chow y al. J. Virol. 1997. 71. 169-78). Sin embargo, la utilización de un plásmido bicistrónico que codifica para la glicoproteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (HIV-1) y la citoquina IL-2 indujo una respuesta inmunitaria específica anti-gp120 más reducida que aquella obtenida mediante la utilización de un plásmido monocistrónico que codifica únicamente para gp120 (Barouch y al. J. Immunol 1998. 161. 1875-1882). La co-inyección en los ratones de dos vectores de expresión, uno que codifica para la glicoproteína G del virus de la rabia, y el otro para el GM-CSF murino estimula la actividad de los linfocitos B y T, mientras que la co-inyección con un plásmido que codifica para el interferón gama (en lugar del GM-CSF murino) tiene como resultado una disminución de la respuesta inmunitaria (Xiang y al. Immunity 1995. 2. 129-135).

[0018] Determinadas modificaciones al nivel de los antígenos, tales como las eliminaciones de una parte de la secuencia nucleotídica que codifica para el antígeno, las inserciones de un fragmento de ADN en la secuencia nucleotídica que codifica para el antígeno o en las regiones no traducidas en dirección 5' o más abajo, pueden también mejorar la eficacia de las vacunas de ADN, en especial mejorando el nivel de expresión del antígeno o su presentación.

[0019] Pero en la práctica, las manipulaciones al nivel de la secuencia nucleotídica que codifica para el antígeno pueden conducir a una disminución o a la pérdida de la actividad inmunológica inicial. Así, la eliminación del dominio transmembrana en el gen que codifica para el antígeno G del virus de la rabia ha disminuido el nivel de protección inducido en el modelo ratón tras la administración por la vía intramuscular de una vacuna de ADN que codifica para este antígeno modificado (Xiang y al. Virol. 1995. 209. 569). La eliminación del dominio transmembrana en el gen que codifica para la glicoproteína gD del virus herpes bovino (BHV) no ha permitido aumentar la respuesta en anticuerpos y solamente ha inducido una protección parcial en los bovinos vacunados por la vía intramuscular (van Drunen Little-van den Hurk y al. J. Gen. Virol. 1998. 79. 831-839). Las respuestas inmunitarias humorales y celulares y la protección conferida son idénticas en cobayas probadas tras haber sido inmunizadas con ayuda o bien de una vacuna de ADN que codifica para la glicoproteína GP del virus Ebola, o de una vacuna de ADN que codifica para esta glicoproteína GP pero bajo una forma secretada (Xu y al. nature Medicine 1998. 4. 37-42).

[0020] La inserción de la secuencia señal del activador plasminógeno tisular humano (en inglés human tissue Plasminogen Activator o human tPA) en el gen que codifica para el antígeno Pf332 de la malaria no han permitido aumentar la respuesta en anticuerpos en los ratones vacunados por vía intramuscular (Haddad y al. FEMS 1997. 18. 193-202). La adición en fase de una secuencia tPA al gen que codifica para el antígeno VP7 del rotavirus murino tampoco ha permitido aumentar la respuesta en anticuerpos en los ratones vacunados por vía intradérmica, mientras que la proteína de fusión formada por el antígeno VP4 y del tPA ha permitido este aumento, pero sin inducir una protección eficaz (Choi y al. Virology 1998. 250. 230-240).

[0021] Las modificaciones efectuadas en la secuencia nucleotídica de un antígeno no pueden en general ser directamente transferidas a otro antígeno, puesto que los antígenos no tienen siempre las mismas disposiciones estructurales.

[0022] El solicitante tiene como objetivo la mejora de la eficacia de la vacunación ADN. En particular tiene como objetivo obtener una mejor respuesta inmunitaria y en especial una protección eficaz en perros, mediante la vacunación ADN, para diferentes vías de administración, y en particular para la vía subcutánea.

[0023] El solicitante tiene como objetivo la elaboración de vacunas de ADN mejoradas induciendo una respuesta inmunitaria eficaz y protectora contra el virus de la enfermedad canino (CDV) en perros.

[0024] El solicitante también tiene como objetivo la elaboración de vacunas de ADN mejoradas que permitan obtener una protección eficaz en perros, que comprende una valencia formada por el virus CDV.

[0025] La invención tiene por objeto vacunas de ADN mejoradas que permiten obtener una protección eficaz contra al menos un patógeno que infecta a los perros.

[0026] La vacuna de ADN mejora con su formulación, y facultativamente o bien mediante la adición de GM-CSF, o por la optimización del o de los antígenos, finalmente o por la adición de GM-CSF y mediante la optimización del o de los antígenos.

[0027] Por definición, la vacuna de ADN comprende como principio activo un plásmido que codifica para y que expresa un gen o fragmento de gen. El término plásmido cubre una unidad de transcripción ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia del gen a expresar y los elementos necesarios para su expresión in vivo. Se prefiere la forma plásmido circular, superenrollada o no. La forma lineal entra también en el marco de esta invención.

[0028] Cada plásmido comprende un promotor capaz de asegurar, en las células huésped, la expresión del gen insertado bajo su dependencia. Se trata en general de un promotor eucariota fuerte y en particular de un promotor temprano del citomegalovirus CMV-IE, de origen humano o murino, o también eventualmente otro origen tal como la

- 5 rata, cobaya. De manera más general, el promotor es o bien de origen vírico, o de origen celular. Como promotor vírico distinto del CMV-IE, se puede citar el promotor temprano o tardío del virus SV40 o el promotor LTR del virus del Sarcoma de Rous. También puede tratarse de un promotor de virus del cual proviene el gen, por ejemplo el promotor propio del gen. Como promotor celular, se puede citar el promotor de un gen del citoesqueleto, tal como por ejemplo el promotor de la desmina, o también el promotor de la actina. Cuando varios genes están presentes en el mismo plásmido, estos pueden estar presentes en la misma unidad de transcripción o en dos unidades diferentes.
- [0029] Según una primera modalidad, las vacunas de ADN según la invención están formuladas por adición a título de adyuvante, el DMRIE, asociado con el DOPE.
- 10 [0030] La presente invención tiene por lo tanto por objeto una vacuna de ADN contra al menos un patógeno que afecta a los perros, que comprende al menos un plásmido que contiene al menos una secuencia nucleotídica que codifica para un inmunógeno de un patógeno de la especie animal considerada, en condiciones que permiten la expresión in vivo de esta secuencia, y el DMRIE (N-(2-hidroxiethyl)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propanamónio; WO-A-9634109) asociado con el DOPE (dioleoil-fosfatidil-etanolamina).
- 15 [0031] Preferentemente, la mezcla vector que se recombina con este adyuvante se hace de manera extemporánea y se prefiere, antes de su administración al animal, dejar tiempo para que la mezcla así constituida se vuelva compleja, por ejemplo durante una duración comprendida entre 10 y 60 minutos, en especial del orden de 30 minutos.
- [0032] El ratio molar DMRIE: DOPE va preferentemente de 95: 5 a 5: 95, más especialmente de 1: 1.
- 20 [0033] El ratio ponderal plásmido: adyuvante DMRIE-DOPE puede ir en especial de 50: 1 a 1: 10, en especial de 10: 1 a 1: 5, preferentemente de 1: 1 a 1: 2.
- 25 [0034] Según una segunda modalidad, se añade a las vacunas según la invención el GM-CSF (en inglés Granulocyte macrophage - colony stimulating factor; Clark S. C. y al. Science 1987. 230. 1229; Grant S. M. y al. Drugs 1992. 53. 516), lo cual puede hacerse por incorporación de proteína GM-CSF directamente en la composición de la vacuna o preferentemente mediante la inserción de la secuencia que codifica para el GM-CSF en un vector de expresión en condiciones que permiten su expresión in vivo. Como vector de expresión, se prefiere utilizar un plásmido, por ejemplo el plásmido que contiene a la secuencia nucleotídica que codifica para el (o los) antígeno(s) de interés u otro plásmido. La elección del GMCSF se hace en función de la especie animal a vacunar, así para los perros se utiliza el GM-CSF canino.
- 30 [0035] Según una tercera modalidad, la (o las) secuencia nucleotídica que codifica para el inmunógeno están bajo una forma optimizada. Por optimización, se entiende cualquier modificación de la secuencia nucleotídica, en especial las que se manifiestan al menos por un nivel de expresión más elevado de esta secuencia nucleotídica, por un aumento de la estabilidad del ARN mensajero que codifica para este antígeno, por la secreción provocada por este antígeno en el medio extracelular, y que tiene como consecuencia directa o indirecta un aumento de la respuesta inmunitaria inducida.
- 35 [0036] En la presente invención, la optimización del antígeno de interés consiste preferentemente en la eliminación del fragmento de la secuencia nucleotídica que codifica para el dominio transmembrana del antígeno de interés (por eliminación, se entiende la eliminación total o una eliminación parcial suficiente para que el dominio transmembrana ya no sea, o sustancialmente menos, funcional), y/o en la adición en fase de una secuencia nucleotídica que codifica para la señal tPA (en inglés tissue plasminogen activator; Montgomery y al. Cell. Mol. Biol. 1997. 43. 285-292; Harris y al. Mol. Biol. Med 1986. 3. 279-292), y/o en la inserción de intrón estabilizador en dirección 5' del gen a expresar. La eliminación del fragmento de ADN que codifica para el dominio transmembrana del antígeno de interés favorece la secreción hacia el medio extracelular de los antígenos así truncados y así aumenta sus posibilidades de contacto con las células del sistema inmunitario. La inserción de la secuencia nucleotídica que codifica para la señal tPA facilita la traductibilidad del ARN mensajero al cual se añade la señal tPA, y aumenta así el nivel de expresión de este ARN mensajero y por lo tanto la producción de antígenos. La señal tPA también juega un papel en la secreción del antígeno sintetizado. La inserción de un intrón estabilizador en el gen que codifica para el antígeno de interés evita los empalmes aberrantes de su ARN mensajero y mantiene la integridad física de este último.
- 40 [0037] Preferentemente la señal tPA es de origen humano. La secuencia nucleotídica de la señal tPA humana es accesible en la base de datos Genbank bajo el número de acceso NM000930. Preferentemente, el intrón es el intrón II del gen de la beta-globina del conejo (van Ooyen y al. Science 1979. 206. 337-344), cuya secuencia nucleotídica es accesible en la base de datos GenBank con el número de acceso V00882 y referenciado con intrón n°2.
- 45 [0038] La presente invención tiene por objeto una vacuna de ADN mejorada capaz de inducir una respuesta inmunitaria eficaz y protectora en perros contra la enfermedad canino (en inglés Canine Distemper Virus o CDV).
- 50 [0039] El virus de la enfermedad canino es un Morbillivirus, miembro de la familia de los Paramixoviridae. Este virus infecta la especie canina, y también los felinos salvajes (Harder y al. J. Gen. Virol. 1996. 77. 397-405).
- 55

- [0040]** La presente invención permite obtener una vacuna de ADN eficaz y protectora contra la enfermedad canino en perros, en particular por la vía subcutánea que hasta hoy inducía un nivel de protección marginal (Sixt y al. J. Virol. 1998. 72. 8472-8476).
- 5 **[0041]** Según la invención, la vacuna de ADN contra la CDV mejora mediante su formulación con un adyuvante según la invención, el DMRIE-DOPE. Facultativamente, puede combinarse o bien con la adición de GM-CSF canino (Nash y al. Blood 1991. 78. 50-56), o mediante la optimización de al menos un antígeno de CDV, finalmente o bien la adición de GM-CSF canino y la optimización de al menos un antígeno de CDV.
- [0042]** Una secuencia nucleotídica que codifica para el GM-CSF canino es accesible en la base de datos GenBank con el número de acceso S49738.
- 10 **[0043]** La adición de GM-CSF canino puede hacerse por incorporación del polipéptido GM-CSF canino en la composición de la vacuna o preferentemente mediante la inserción de la secuencia nucleotídica que codifica para el GM-CSF canino en un vector de expresión in vivo, preferentemente un plásmido. Preferentemente, la secuencia nucleotídica que codifica para el GM-CSF canino está insertada en un segundo plásmido de expresión, diferente de aquel (o de aquellos) en el cual está insertado el o los genes que codifican para el o los antígenos de CDV.
- 15 **[0044]** La optimización de los antígenos provenientes de CDV se hace por sustitución, mediante una secuencia " señal ", en especial la de la señal tPA de origen humano (GenBank número de acceso NM000930), de la secuencia del péptido señal de la hemaglutinina (HA) y/o de la proteína de fusión (F), y/o por la eliminación del fragmento de ADN que codifica para el dominio transmembrana de HA y/o de F, y/o mediante la inserción de un intrón, en especial del intrón II del gen de la beta-globina del conejo (cuya secuencia nucleotídica, referenciada intrón n°2, es accesible
20 en la base de datos GenBank con el número de acceso V00882) en dirección 5' de la secuencia nucleotídica que codifica para HA y/o F. Por lo tanto, la vacuna de ADN contra la CDV según la invención puede codificar y expresar un único antígeno de CDV optimizado (HA o F) o los dos, es decir HA optimizado y F optimizado.
- [0045]** Opcionalmente, la secuencia que codifica para la proteína de matriz (M) de CDV bajo su forma nativa (sin modificación) y/o la secuencia nucleotídica que codifica para la nucleoproteína (N) de CDV bajo su forma nativa (sin modificación) pueden ser también insertadas y expresadas en un plásmido y asociadas a los plásmidos que contienen HA optimizado y/o F optimizado.
- 25 **[0046]** Unas secuencias nucleotídicas que codifican para los antígenos de CDV utilizable en la presente invención y diferentes construcciones de vectores de expresión se ilustran en los ejemplos adjuntos y en WO-A-9803199, en particular en sus ejemplos 8 y 9 y sus figuras 2 y 3.
- 30 **[0047]** De manera preferente según la invención, la vacuna de ADN contra la CDV con vistas a una administración por la vía intramuscular se formula con DMRIE-DOPE, y se compone de un plásmido de expresión (por ejemplo pNS024, Figura 4) que codifica para el antígeno HA de CDV optimizado mediante sustitución de la secuencia señal de HA por la secuencia péptido señal tPA humano, mediante la eliminación del fragmento de la secuencia nucleotídica que codifica para el dominio transmembrana de HA y mediante la inserción del intrón 11 del gen de la beta-globina del conejo en dirección 5' del gen HA, y de un segundo plásmido de expresión (por ejemplo pNS021, Figura 3) que codifica para el antígeno F de CDV optimizado mediante la eliminación del fragmento de la secuencia nucleotídica que codifica para el dominio transmembrana y mediante la inserción del intrón II del gen de la betaglobina del conejo en dirección 5' del gen F.
- 35 **[0048]** De manera preferente según la invención, la vacuna de ADN contra la CDV con vistas a una administración por la vía subcutánea se formula con DMRIE-DOPE, y se compone de un plásmido de expresión que codifica para el GM-CSF canino y dos plásmidos anteriormente definidos (por ejemplo pNS024 y pNS021).
- 40 **[0049]** Las vacunas según la invención pueden ser, para una especie animal, combinadas con vacunas de ADN dirigidas contra otros patógenos de la misma especie.
- 45 **[0050]** Así, la presente invención también tiene por objeto vacunas de ADN multivalentes mejoradas que permiten obtener una protección eficaz en perros contra al menos CDV y un patógeno canino seleccionados de entre el grupo formado por: CPI-2, CHV-1, virus de la rabia (rhabdovirus), parvovirus canino (CPV), coronavirus canino (CCV), Borrelia burgdorferi.
- 50 **[0051]** Las vacunas de ADN multivalentes mejoran mediante su formulación con un adyuvante según la invención, el DMRIE-DOPE. Esto puede ser facultativamente combinado o bien con la adición de GM-CSF tal como se ha descrito más arriba, o bien con la optimización de al menos un antígeno de interés tal como se ha descrito más arriba, o finalmente por la adición de GM-CSF y la optimización de al menos un antígeno de interés.
- 55 **[0052]** Las vacunas de ADN multivalentes mejoradas según la invención se componen de uno o varios plásmidos de expresión, de tal manera que estas vacunas conducen a la expresión in vivo de al menos un inmunógeno de un primer patógeno y de al menos un inmunógeno de al menos otro patógeno, que infecta a la misma especie animal. Uno al menos de estos inmunógenos se selecciona preferentemente de entre los miembros del grupo siguiente:

- F de CDV y HA de CDV, para los perros.

- 5 **[0053]** Las vacunas de ADN monovalentes o multivalentes mejoradas según la invención pueden ser también asociadas a al menos una vacuna clásica (inactivada, viva atenuada, sub-unidades) o vacuna recombinada que utiliza un vector de expresión in vivo (por ejemplo poxvirus, adenovirus, herpesvirus) dirigida contra al menos un patógeno en especial diferente que infecta a la misma especie.
- [0054]** El experto en la materia puede consultar WO-A-9803198 para los procedimientos para construir plásmidos que contienen a estas valencias equinoas, WO-A-9803660 para las valencias felinas y WO-A-9803199 para las valencias caninas.
- 10 **[0055]** La cantidad de ADN utilizada en las vacunas según la presente invención está comprendida entre aproximadamente 10 Pg y aproximadamente 1000 Pg, y preferentemente entre aproximadamente 50 Pg y aproximadamente 500 Pg, para un plásmido determinado. El experto en la materia tiene las competencias necesarias para definir con precisión la dosis eficaz de ADN a utilizar para cada protocolo de vacunación.
- [0056]** Los volúmenes de dosis pueden estar preferentemente comprendidos entre 0,5 y 5 ml, preferentemente entre 1 y 3 ml.
- 15 **[0057]** Las vacunas de ADN mejoradas según la invención pueden ser administradas, en el marco de este procedimiento de vacunación, por las diferentes vías de administración propuestas en el estado de la técnica para la vacunación polinucleotídica y mediante técnicas de administración conocidas.
- [0058]** Según las dos modalidades preferidas de la invención, los procedimientos de vacunación comprenden la administración por la vía intramuscular o por la vía subcutánea de las vacunas de ADN mejoradas según la invención.
- 20 **[0059]** La invención se describirá a continuación más en detalle con ayuda de modos de realización ofrecidos a título de ejemplos no limitativos y con referencia a los dibujos, en los cuales:
- Figura N° 1: Plásmido pAB110
- Figura N° 2: Plásmido pVR1012
- 25 Figura N° 3: Plásmido pNS021
- Figura N° 4: Plásmido pNS024
- Figura N° 5: Plásmido pSB032
- Figura N° 6: Plásmido pSB034
- Figura N° 7: Plásmido pSB016
- 30 Figura N° 8: Plásmido pSB019
- Figura N° 9: Plásmido pSB017
- Figura N° 10: Plásmido pSB021
- Figura N° 11: Plásmido pSB023
- Figura N° 12: Plásmido pSB024
- 35 Figura N° 13: Plásmido pSB028
- Figura N° 14: Plásmido pSB029
- Figura N° 15: Plásmido pSB030
- Figura N° 16: Plásmido pSB025
- Figura N° 17: Plásmido pSB026
- 40 Figura N° 18: Plásmido pSB027
- Figura N° 19: Plásmido pJP084
- Figura N° 20: secuencia del gen GM-CSF canino
- Figura N° 21: Plásmido pJP089

Figura N° 22: secuencia del gen GM-CSF felino 3R3

Figura N° 23: Plásmido pJP090

Figura N° 24: secuencia del gen GM-CSF felino 3R4

Figura N° 25: Plásmido pJP097

5 Figura N° 26: secuencia del gen GM-CSF equino

Figura N° 27: secuencia del gen CPI-2 F

Figura N° 28: secuencia del gen CPI-2 HN

Listas de las secuencias:

10 **[0060]**

SET ID N° 1: oligonucleótido NS030

SEQ ID N° 2: oligonucleótido NS031

SET ID N° 3: oligonucleótido NS034

SEQ ID N° 4: oligonucleótido NS035

15 SEQ ID N° 5: oligonucleótido NS036

SEQ ID N° 6: oligonucleótido NS037

SEQ ID N° 7: oligonucleótido SB090

SEQ ID N° 8: oligonucleótido SB091

SEQ ID N° 9: oligonucleótido PB326

20 SEQ ID N° 10: oligonucleótido PB329

SEQ ID N° 11: oligonucleótido PB381

SEQ ID NO 12: oligonucleótido PB382

SEQ ID NO 13: oligonucleótido PB383

SEQ ID NO 14: oligonucleótido PB384

25 SEQ ID NO 15: oligonucleótido SB101

SEQ ID NO 16: oligonucleótido SB102

SEQ ID NO 17: oligonucleótido SB103

SEQ ID NO 18: oligonucleótido SB104

SEQ ID NO 19: oligonucleótido SB105

30 SEQ ID NO 20: oligonucleótido SB106

SEQ ID NO 21: oligonucleótido SB107

SEQ ID NO 22: oligonucleótido SB108

SEQ ID NO 23: oligonucleótido SB109

SEQ ID NO 24: oligonucleótido SB110

35 SEQ ID NO 25: oligonucleótido SB111

SEQ ID NO 26: oligonucleótido SB112

SEQ ID NO 27: oligonucleótido SB113

- SEQ ID NO 28: oligonucleótido SB114
SEQ ID NO 29: oligonucleótido SB115
SEQ ID NO 30: oligonucleótido SB116
SET ID NO 31: oligonucleótido SB117
5 SEQ ID NO 32: oligonucleótido SB118
SEQ ID NO 33: oligonucleótido AB325
SEQ ID NO 34: oligonucleótido AB326
SEQ ID NO 35: oligonucleótido AB327
SEQ ID NO 36: oligonucleótido AB328
10 SEQ ID NO 37: oligonucleótido AB329
SEQ ID NO 38: oligonucleótido AB330
SEQ ID NO 39: oligonucleótido NS003
SEQ ID NO 40: oligonucleótido NS004
SEQ ID NO 41: oligonucleótido NS005
15 SET ID NO 42: oligonucleótido NS006
SEQ ID NO 43: oligonucleótido NS007
SEC ID NO 44: oligonucleótido NS008
SEQ ID NO 45: oligonucleótido SB119
SEC ID NO 46: oligonucleótido SB120
20 SEQ ID NO 47: oligonucleótido SB121
SEQ ID NO 48: oligonucleótido SB122
SEQ ID NO 49: oligonucleótido SB123
SEQ ID NO 50: oligonucleótido SB124
SEQ ID NO 51: oligonucleótido SB125
25 SET ID NO 52: oligonucleótido SB126
SEQ ID NO 53: oligonucleótido SB127
SEQ ID NO 54: oligonucleótido SB128
SEQ ID NO 55: oligonucleótido SB129
SEC ID NO 56: oligonucleótido SB130
30 SEC ID NO 57: oligonucleótido SB131
SEC ID NO 58: oligonucleótido SB132
SEQ ID NO 59: oligonucleótido SB133
SEC ID NO 60: oligonucleótido SB134
SEQ ID NO 61: oligonucleótido SB135
35 SEC ID NO 62: oligonucleótido SB136
SEC ID NO 63: oligonucleótido SB137
SEQ ID NO 64: oligonucleótido JP578

SEQ ID NO 65: oligonucleótido JP579

SEQ ID NO 66: secuencia del gen GM-CSF canino (ver figura 20)

SEQ ID NO 67: secuencia del gen GM-CSF felino 3R3 (ver figura 22)

SEQ ID NO 68: secuencia del gen GM-CSF felino 3R4 (ver figura 24)

5 SEQ ID NO 69: secuencia del gen GM-CSF equino (ver figura 26)

SEQ ID NO 70: oligonucleótido JP734

SEQ ID NO 71: oligonucleótido JP735

SEQ ID NO 72: secuencia del gen CPI-2 F (ver figura 27)

SEQ ID NO 73: secuencia del gen CPI-2 HN (ver figura 28)

10

EJEMPLOS.

[0061] Los ejemplos que se refieren al CDV son ilustrativos de la invención. Los otros ejemplos se ofrecen solamente a título informativo.

15 [0062] Para los patógenos considerados, cada gen que codifica para los principales antígenos de superficie (forma nativa y forma modificada) ha sido el objeto de una construcción particular en un plásmido de expresión eucariota. Las formas secretadas de los antígenos de superficie han sido obtenidas por eliminación de los fragmentos de genes que codifican para los dominios transmembrana y citoplásmicos. En todos los casos, los dominios transmembrana de las glicoproteínas han sido identificados a partir de los perfiles de hidropatía de las secuencias proteicas correspondientes. La tabla ofrecida en el ejemplo 11 resume los tamaños de las proteínas salvajes (en aminoácidos), las posiciones identificadas de los dominios transmembrana, los tamaños de las proteínas truncadas, así como las designaciones de los plásmidos de expresión correspondientes.

20

Ejemplo 1: Construcciones plasmídicas de base

25 [0063] El plásmido de expresión eucariota pVR1020 (C. J. Luke y al. J. of Infectious Diseases 1997, 175: 95-97), derivado del plásmido pVR1012 (figura 1, ejemplo 7 de WO-A-9803199, reproducido en la figura 2 de la presente solicitud), contiene a la fase codificadora de la secuencia-señal del activador del plasminógeno tisular humano (tPA). El plásmido pVR1020 ha sido modificado por digestión BamHI-BglII e inserción de una secuencia que contiene varios lugares de clonado

[0064] (BamHI, NotI, EcoRI, XbaI, PmlI, PstI, BglII) y resultante del apareamiento de los oligonucleótidos siguientes:

30 PB326 (40 mer) (SEQ ID NO 9)
5' GATCTGCAGCACGTGTCTAGAGGATATCGAATTCGCGGCC 3' y
PB329 (40 mer) (SEQ ID NO 10)
5' GATCCGCGGCCGCGAATTCGATATCCTCTAGACACGTGCT 3'.

35 [0065] El vector resultante, pAB110 (Figura N° 1), ha sido utilizado para la construcción de los plásmidos que contienen las formas truncadas de los genes que codifican para la hemaglutinina (HA) del virus de la enfermedad canino (CDV) y para la hemaglutinina- neuraminidase (HN) del virus parainfluenza de tipo 2 (CPI-2).

40 [0066] El intrón II del gen de la β -globina de conejo se ha clonado en el vector pCRII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) tras obtención del fragmento de ADN correspondiente por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

45 SB090 (20 mer) (SEQ ID NO 7)
5' TTGGGGACCCTTGATTGTTC 3' y
SB091 (21 mer) (SEQ ID NO 8)
5' CTGTAGGAAAAAGAAGAAGGC 3'

utilizando como matriz el ADN genómico de células de la sangre periférica de conejo. El plásmido resultante se ha designado pNS050.

Ejemplo 2: Plásmidos que codifican para las diferentes formas de los antígenos de CDV

50 [0067] Los genes que codifican para la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina (HA) de CDV cepa Snyder Hill (SH) se han obtenido mediante RT-PCR a partir del ARN vírico de la cepa SH (accesible en la cepoteca American Tissue Culture Collection con el número ATCC VR-526).

2.1. Plásmidos que codifican para las diferentes formas de CDV-F

2.1.1. pPB229: gen F (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

[0068] EL ADNc del gen F de CDV ha sido sintetizado con ayuda del inicio PB383 y amplificado por una reacción de PCR con ayuda del par de oligonucleótidos siguiente:

PB383 (26 mer) (SEQ ID NO 13)
5' TTTCTAGACAGCCGAGCCCCATGCAC 3' y
PB384 (30 mer) (SEQ ID NO 14)
5' TTGGATCCGATATATGACCAGAATACTTCA 3'.

El producto de PCR ha sido digerido por BamHI y XbaI y clonado en el vector de expresión pVR1012 (ejemplo 1) previamente digerido por BamHI y XbaI, generando el plásmido pPB229 (6925 pares de bases o pb). El gen F salvaje de CDV codifica para una proteína de 662 residuos.

2.1.2. pNS021: gen F (forma β -globina F Δ TM) clonado en el vector pVR1012

[0069] El plásmido pNS013 (6735 pb) que contiene al gen F truncado del dominio transmembrana y C-terminal ha sido obtenido por la unión de un fragmento Bsu36I-BamHI (6593 pb) proveniente del plásmido pPB229 (ejemplo 2.1.1), y de un fragmento de 142 pb obtenido por PCR a partir de la matriz pPB229 con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

NS030 (21 mer) (SEQ ID NO 1)
5' ATGAGCCCACTCTTACAACAA 3' y
NS031 (35 mer) (SEQ ID NO 2)
5' TTTGCGGATCCATTAAAGGAAGAGCGCCTAACCG 3'

y digerido Bsu36I-BamHI. El gen F truncado de CDV codifica para una proteína de 605 residuos.

[0070] En un segundo tiempo, una secuencia correspondiente al intrón II del gen de la β -globina del conejo ha sido insertada en dirección 5' de la secuencia codificadora del gen F truncado, en el sitio Sall del plásmido pNS013. El fragmento de ADN correspondiente al intrón (573 pb) ha sido obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

NS036 (34 mer) (SEQ ID NO 5)
5' TTTACGCGTCTGACTTGGGGACCCTTGATTGTTC 3' y
NS037 (36 mer) (SEQ ID NO 6)
5' TTTACGCGTCTGACCTGTAGGAAAAAGAAGAAGGCAT 3'

en la matriz pNS050 (ejemplo 1), seguida de una digestión Sall para liberar extremos compatibles Sall. El derivado del plásmido pNS013 que contiene al intrón II del gen de la β -globina se designa pNS021 (7308 pb) (Figura N°3).

2.2. Plásmidos que codifican para las diferentes formas de CDV-HA

2.2.1. pNS018: gen HA (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

[0071] EL ADNc del gen HA de CDV ha sido sintetizado con ayuda del inicio PB381 y amplificado por reacción PCR con ayuda del par de oligonucleótidos siguiente:

PB381 (30 mer) (SEQ ID NO 11)
5' TTCTGCAGATGCTCTCCTACCAAGAYAAGG 3' y
PB382 (28 mer) (SEQ ID NO 12)
5' TTGTGACATGTGTATCATCATMCTGTC 3'.

[0072] El producto PCR se ha clonado en el vector pCRII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), generando el plásmido pPB235. El fragmento PstI-Sall de 1846 pb del plásmido pPB235 que contiene al gen HA ha sido a continuación clonado en el vector de expresión pVR1012 (ejemplo 1) digerido PstI-Sall, generando el plásmido pNS018 (6748 pb). El gen HA salvaje de CDV codifica para una proteína de 607 residuos.

2.2.2. pNS024: gen HA (forma β -globina tPA Δ TM HA) clonado en el vector pVR1012

[0073] La forma truncada del gen HA de CDV ha sido obtenida por eliminación del fragmento de ADN que codifica para los 60 primeros residuos de la proteína HA. Al confundirse la secuenciaseñal y transmembrana de esta

proteína, la secreción del producto truncado está asegurada mediante la obtención de una fusión en fase entre la secuencia señal del activador del plasminógeno tisular humano (tPA) y el gen HA truncado. El plásmido pNS019, el derivado de pNS018 que codifica para un producto de fusión con la señal tPA, ha sido obtenido por la unión de los 3 fragmentos de ADN siguientes:

5
- el fragmento A ha sido obtenido por digestión BamHI-EcoRV de pAB110 (ejemplo 1).
- el fragmento B ha sido obtenido por reacción PCR en la matriz pNS018 (ejemplo 2.2.1) con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

- 10 o NS034 (30 mer) (SEQ ID NO 3)
- o 5' TTTCGCGGATCCCACAAAGTATCAACTAGC 3' y
- o NS035 (23 mer) (SEQ ID NO 4)
- o 5' GGGATTTGCTGCCGATGCAATAG 3' seguida de una digestión BamHI-SapI del producto PCR.

15 - el fragmento C es un fragmento de digestión SapI-EcoRV de pNS018.

[0074] El gen híbrido tPA Δ TM HA codifica para una proteína de 574 residuos (1725 pb).

20 **[0075]** El intrón II del gen de la β -globina de conejo (ejemplo 2.1.2) se ha insertado en dirección 5' de la fase codificadora del gen HA en el sitio Sall de pNS019 para generar el plásmido pNS024 (Figura N° 4).

Ejemplo 3: Plásmidos que codifican para las diferentes formas de los antígenos del virus parainfluenza canino de tipo 2 (CPI-2)

25 **[0076]** Los genes F y HN de CPI-2 cepa D008 (MERIAL) se han obtenido mediante RT-PCR a partir del ARN vírico.
3.1. Plásmidos que codifican para las diferentes formas de CPI-2 F

3.1.1. pAB115: gen F (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

30 **[0077]** EL ADNc del gen F de CPI-2 ha sido sintetizado y amplificado mediante RT-PCR con ayuda del par de oligonucleótidos siguiente:

SB131 (38 mer) (SEQ ID NO 57)
5' AAAAACGCGTCGACATGGGTACTATAATTCAATTTCTG 3'
35 SB132 (38 mer) (SEQ ID NO 58)
5' TTTTCTAGTCTAGATTATTTATGATAAACAAAATTCTC 3'.

40 **[0078]** El producto de PCR ha sido digerido por Sall y XbaI, generando un fragmento de 1594 pb, y clonado en el vector de expresión pVR1012 (ejemplo 1) previamente digerido por las mismas encimas, generando el plásmido pAB115 (6479 pb). El gen F salvaje de CPI-2 (SEQ ID NO72) (figura 27) clonado en este plásmido codifica para una proteína de 529 residuos.

3.1.2. pSB032: gen F (forma β -globina F Δ TM) clonado en el vector pVR1012

45 **[0079]** El plásmido pSB031 que contiene al gen F truncado de los dominios transmembrana y citoplásmico C-terminal se ha obtenido de la manera siguiente. Se ha realizado una reacción PCR con la matriz pAB115 (ejemplo 3.1.1.) con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

50 SB131 (SEQ ID NO 57) y
SB133 (41 mer) (SEQ ID NO 59)
5' TTTTCTAGTCTAGATTAGTATGTGTCACCTTTGTGCTAAGTG 3'

55 para generar un fragmento PCR de aproximadamente 1450 pb. Este fragmento ha sido digerido por Sall y XbaI para aislar el fragmento de restricción Sall-XbaI de 1436 pb. Este fragmento se ha ligado con el vector pVR1012 (ejemplo 1) previamente digerido por Sall y XbaI para dar como resultado el plásmido pSB031. El gen F truncado de CPI-2 codifica para una proteína de 473 residuos.

60 **[0080]** En un segundo tiempo, una secuencia correspondiente al intrón II del gen de la β -globina del conejo ha sido insertada en dirección 5' de la secuencia codificadora del gen F truncado de CPI-2, en el sitio Sall del plásmido pSB031. El fragmento de ADN correspondiente al intrón (573 pb) ha sido obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos NS036 (SEQ ID NO 5) y NS037 (SEQ ID NO 6) en la matriz pNS050 (ejemplo 1), seguida de una digestión Sall para liberar extremos compatibles Sall. Este fragmento de restricción Sall-Sall se ha ligado con el plásmido pSB031 previamente digerido por Sall, y desfosforilado para dar como resultado el plásmido pSB032 (6884 pb) (Figura N° 5).

3.2. Plásmidos que codifican para las diferentes formas de CPI-2 HN

3.2.1. pAB114: gen HN (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

[0081] EL ADNc del gen HN de CPI-2 ha sido sintetizado y amplificado con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

SB134 (41 mer) (SEQ ID NO 60)
5' AAAAACGCGTCGACATGGTTGCAGAAGATGCCCTGTTAGG 3'
SB135 (35 mer) (SEQ ID NO 61)
5' TTTTGAAGATCTTTAGGATAGTGTCACCTGACGG 3'

para generar un fragmento PCR de aproximadamente 1720 pb. Este fragmento ha sido digerido por Sall y BglII para aislar el fragmento Sall-BglII de 1704 pb. Luego este fragmento se ha ligado con el vector pVR1012 (ejemplo 1), previamente digerido por Sall y BglII, para dar como resultado el plásmido pAB114 (6566 pb). El gen HN salvaje de CPI-2 (SEQ ID NO73) (figura 28) clonado en este plásmido codifica para una proteína de 565 residuos.

3.2.2. pSB034: gen HN (forma β -globina HN tPA Δ TM) clonado en el vector pVR1012

[0082] La forma truncada del gen HN de CPI-2 ha sido obtenida por eliminación del fragmento de ADN que codifica para los 40 primeros residuos de la proteína HN. Al confundirse las secuencias señal y transmembrana de esta proteína, la secreción del producto truncado está asegurada mediante la obtención de una fusión en fase entre la secuencia señal del activador del plasminógeno tisular humano (tPA) y el gen HN truncado. El plásmido pSB033, derivado de pAB114 (ejemplo 3.2.1.), que codifica para un producto de fusión con el tPA, ha sido obtenido por la unión del fragmento EcoRI-PmlI de pAB110 (ejemplo 1), un derivado de pVR1012 que contiene una fase abierta de lectura que codifica para la secuencia señal tPA y de un fragmento de (1599 pb) obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

SB136 (37 mer) (SEQ ID NO 62)
5'TTAAAAGAATTCGACCCAAAAGCAAATCATGAGCCAC 3'
SB137 (33 mer) (SEQ ID NO 63)
5' TTAAAAGGCCTTTAGGATAGTGTCACCTGACGG 3'

en la matriz pAB114 y digerido por EcoRI y EcoRV.

[0083] El intrón II del gen de la α -globina de conejo se ha insertado en dirección 5' de la fase codificadora del gen HN en el sitio Sall de pBS033 para generar el plásmido pSB034 (Figura N° 6). El fragmento Sall que contiene al intrón ha sido obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos NS036 (SEQ ID NO 5) y NS037 (SEQ ID NO 6) en la matriz pNS050 (ejemplo 1).

Ejemplo 4: Plásmidos que codifican para las diferentes formas de las glicoproteínas del virus CHV-1

[0084] Los genes que codifican para las glicoproteínas gB, gC y gD de la cepa Carmichael del virus herpes canino de tipo 1 (CHV-1) han sido aislados por PCR a partir del genoma vírico. El clonado de los genes que codifican para gB y gD en el vector pVR1012 se ha descrito anteriormente en la solicitud de patente WO-A-9803199 (plásmidos pAB037 y pAB038, respectivamente en las figuras 7 y 8 y en los ejemplos 13 y 14). En cambio, el clonado del gen que codifica para gC se describe en este documento.

4.1. Plásmido que codifica para la forma truncada de CHV-gB

4.1.1. pSB016: gen gB (forma Δ TM) clonado en el vector pVR1012

[0085] Según el perfil de hidropatía, el dominio transmembrana de la proteína gB de CHV-1 (878 aminoácidos) está posicionado entre los residuos 702 y 769. El plásmido que contiene a la forma truncada del gen que codifica para gB ha sido obtenido mediante el ligado de los tres fragmentos de ADN siguientes: (a) el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado mediante una doble digestión PstI-XbaI, (b) un fragmento de 1997 pb obtenido por la digestión PstI-NsiI de pAB037 (ejemplo 4) y (c) un fragmento de 225 pb obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes: SB101 (22 mer) (SEQ ID NO 15)

5'TATATTGAAGGACAACCTTGGGG 3' y
SB102 (36 mer) (SEQ ID NO 16)
5'CTAGTCTAGATTAATTATTATCAACTTTTACAACAC 3'

utilizando el plásmido pAB037 como matriz y digerido por NsiI y XbaI. El plásmido resultante, pSB016 (6983 pb) (Figura N° 7) contiene un gen gB truncado que codifica para una proteína de 701 residuos.

4.2. Plásmidos que codifican para las diferentes formas de CHV-gC

4.2.1. pSB018: gen gC (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

[0086] El fragmento de ADN que contiene a la fase abierta de lectura del gen gC de CHV-1 ha sido obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

- 5 SB105 (32 mer) (SEQ ID NO 19)
5'AAACTGCAGATGAGTTTTAAAAATTTTTATC 3' y
SB106 (30 mer) (SEQ ID NO 20)
5'CTAGTCTAGATTAGATCTTATTATTTTTTG 3'

10 utilizando el ADN vírico como matriz. Este producto PCR ha sido digerido por PstI y XbaI generando un fragmento de 1400 pb, que a continuación ha sido ligado en el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado por la misma doble digestión. El plásmido resultante, pSB018 (6253 pb) contiene al gen que codifica para la glicoproteína gC de 459 residuos.

15 4.2.2. pSB019: gen gC (forma Δ TM) clonado en el vector pVR1012

[0087] Según el perfil de hidropatía, el dominio transmembrana de la proteína gC está comprendido entre los residuos 422 y 452. El plásmido que contiene a la forma truncada del gen que codifica para gD ha sido obtenido mediante el ligado de los tres fragmentos de ADN siguientes: (a) el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado mediante una doble digestión PstI-XbaI, (b) un fragmento de 934 pb obtenido por la digestión PstI-StuI de pSB018 (ejemplo precedente) y (c) un fragmento de 335 pb obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

- 20 SB107 (24 mer) (SEQ ID NO 21)
5'TGGATTGACGGTCTTATAACACGC 3' y
SB108 (37 mer) (SEQ ID NO 22)
5'CTAGTCTAGATTAATTTTCATCCGATGCATCAAACAC 3'

25 utilizando el plásmido pSB018 como matriz y digerido por StuI y XbaI. El plásmido resultante, pSB019 (6139 pb) (Figura N° 8), contiene un gen gC truncado que codifica para una proteína de 421 residuos.

4.3. Plásmido que codifica para la forma truncada de CHV-gO

4.3.1 pSB017: gen gD (forma Δ TM) clonado en el vector pVR1012

30 [0088] El dominio transmembrana de la proteína gD de CHV-1 (345 aminoácidos) está comprendido entre los residuos 310 y 328. El plásmido que contiene a la forma truncada del gen que codifica para gD ha sido obtenido mediante el ligado de los tres fragmentos de ADN siguientes: (a) el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado mediante una doble digestión PstI-NotI, (b) un fragmento de 663 pb obtenido por la digestión PstI-AvaI de pAB038 (ejemplo 4) y (c) un fragmento de 415 pb obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

- 35 SB103 (25 mer) (SEQ ID NO 17)
5'CGAGAACTTGTATTTTTCTAAAG 3' y
SB104 (51 mer) (SEQ ID NO 18)
5'ATAAGAATGCGGCCGCAAAGGCTATATATTTTTGGGGTATTATTTATTGG 3'

40 utilizando el plásmido pAB038 como matriz y digerido por AvaI y NotI. El plásmido resultante, pSB017 (5819 pb) (Figura N° 9), contiene un gen gD truncado que codifica para una proteína de 309 residuos.

Ejemplo 5: Plásmidos que codifican para las diferentes formas de las glicoproteínas de FHV-1

45 [0089] Los genes que codifican para las glicoproteínas gB, gC y gD de la cepa CO del virus herpes felino de tipo 1 (FHV- 1) han sido aislados mediante PCR a partir del genoma vírico. En el caso particular del gen que codifica para gD, cuya secuencia nucleotídica es idéntica a la de la cepa C-27, se ha utilizado el plásmido pAB029, derivado de pVR1012 que contiene al gen correspondiente clonado a partir de la cepa C-27 y descrito en la solicitud de patente WO-A-9803660 (plásmido pAB029, figura 12 y ejemplo 15).

5.1. Plásmidos que codifican para las diferentes formas de FHV-gB

5.1.1. pSB020: gen gB (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

50 [0090] El fragmento de ADN que contiene a la fase abierta de lectura del gen gB de FHV-1 ha sido obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

- SB113 (34 mer) (SEQ ID NO 27).
5'TTTTCTGCAGATGTCCACTCGTGGCGATCTTGGG 3'

y SB114 (40 mer) (SEQ ID NO 28)
5'ATAGTTTAGCGGCCGCTTAGACAAGATTTGTTTCAGTATC 3'

5 utilizando el ADN vírico como matriz. El producto PCR ha sido digerido por PstI y NotI, generando un fragmento de 2849 pb, que a continuación ha sido ligado en el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado mediante la misma doble digestión. El plásmido resultante, pSB020 (7728 pb), contiene al gen que codifica para la glicoproteína gB de 949 residuos.

5.1.2. pSB021: gen gB (forma Δ TM) clonado en el vector pVR1012

10 **[0091]** Según el perfil de hidropatía, el dominio transmembrana de la proteína gB de FHV-1 está situado entre los residuos 761 y 834. El plásmido que contiene a la forma truncada del gen que codifica para gB ha sido obtenido mediante el ligado de los tres fragmentos de ADN siguientes: (a) el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado mediante una doble digestión PstI-NotI, (b) un fragmento de 1839 pb obtenido por la digestión PstI-HindIII de pSB020 (ejemplo precedente) y (c) un fragmento de 447 pb obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

15 SB109 (24 mer) (SEQ ID NO 23)
5' CTGTGGACAGAGACCCTAAAACCTC 3' y
SB110 (50 mer) (SEQ ID NO 24)
5' TTTCTTTTTCGCGGCCGCTTATATGCTGTCTATATCATAAAATTTTAAGGC 3'

20 utilizando el plásmido pSB020 como matriz y digerido por HindIII y NotI. El plásmido resultante, pSB021 (7164 pb) (Figura N° 10), contiene un gen gB truncado que codifica para una proteína de 760 residuos.

5.2. Plásmidos que codifican para las diferentes formas de FHV-gC

5.2.1. pSB022: gen gC (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

25 **[0092]** El fragmento de ADN que contiene a la fase abierta de lectura del gen gC de FHV-1 ha sido obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

SB115 (34 mer) (SEQ ID NO 29)
5'TTTTCTGCAGATGAGACGATATAGGATGGGACGC 3' y
SB116 (34 mer) (SEQ ID NO 30)
5'AGTTTAGCGGCCGCTTATAATCGCCGGGGATGAG 3'

30 utilizando el ADN vírico como matriz. Este producto PCR ha sido digerido por PstI y NotI, generando un fragmento de 1605 pb, que a continuación ha sido ligado en el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado mediante la misma doble digestión. El plásmido resultante, pSB022 (6483 pb) contiene al gen que codifica para la glicoproteína gC de 534 residuos.

5.2.2. pSB023: gen gC (forma Δ TM) clonado en el vector pVR1012

35 **[0093]** Según el perfil de hidropatía, el dominio transmembrana de la proteína gC de FHV-1 está comprendido entre los residuos 495 y 526. El plásmido que contiene a la forma truncada del gen que codifica para gC ha sido obtenido mediante el ligado de los dos fragmentos de ADN siguientes: (a) un fragmento de 6198 pb obtenido por la digestión BclI-NotI de pSB022 (ejemplo precedente) y (b) un fragmento de 168 pb obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

40 SB117 (24 mer) (SEQ ID NO 31)
5'GTAAATGTGTACCACGGGACGGG 3' y
SB118 (41 mer) (SEQ ID NO 32)
45 5'AGTTTAGCGGCCGCTTATTACGGGGACGCGTCGTAGACTTG 3'

utilizando el plásmido pSB022 como matriz y digerido por BclI y NotI. El plásmido resultante, pSB023 (6366 pb) (Figura N° 11), contiene un gen gC truncado que codifica para una proteína de 494 residuos.

5.3. Plásmido que codifica para la forma truncada de FHV-gD

5.3.1. pSB024: gen gD (forma Δ TM) clonado en el vector pVR1012

50 **[0094]** El dominio transmembrana de la proteína gD de FHV-1 (374 aminoácidos) está comprendido entre los residuos 328 y 353. El plásmido que contiene a la forma truncada del gen que codifica para gD ha sido obtenido mediante el ligado de los dos fragmentos de ADN siguientes: (a) un fragmento de 5712 pb obtenido por la digestión XbaI-BglII de pAB029 (ejemplo 5) y (b) un fragmento de 129 pb obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

55

SB111 (24 mer) (SEQ ID NO 25)
 5'GATCGTCCCGCCATACCGTCTGGG 3' y
 SB112 (39 mer) (SEQ ID NO 26)
 5'TTTGGAAGATCTTTACTGATTATTCATGCCCTTGGGAGG 3'

utilizando el plásmido pAB029 como matriz y digerido por XbaI y BglII. El plásmido resultante, pSB024 (5841 pb) (Figura N° 12), contiene un gen gD truncado que codifica para una proteína de 327 residuos.

Ejemplo 6: Plásmidos que codifican para las diferentes formas de las glicoproteínas de EHV-1

[0095] Los genes que codifican para las glicoproteínas gB, gC y gD de la cepa 2234/88-2 de EHV-1 han sido aislados mediante PCR a partir de el ADN vírico purificado.

6.1. Plásmidos que codifican para las diferentes formas de EHV-1 gB

6.1.1. pAB127: gen gB (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

[0096] La fase codificadora del gen gB de EHV-1 ha sido amplificada mediante PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

NS003 (30 mer) (SEQ ID NO 39)
 5' TTCTGCAGATGTCCTCTGGTTGCCGTTTCGT 3'y
 NS004 (30 mer) (SEQ ID NO 40)
 5' TTTCTAGATTAAACCATTTTTTCATTTTCC 3',

el fragmento de ADN obtenido ha sido digerido por PstI y XbaI y ligado en el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado por PstI y XbaI, generando el plásmido pAB127 (7818 pb). El gen gB codifica para una proteína de 980 aminoácidos.

6.1.2. pSB028: gen gB (forma Δ TM) clonado en el vector pVR1012

[0097] Según el perfil de hidropatía, el dominio transmembrana de la proteína gB de EHV-1 está posicionado entre los residuos 801 y 875. El plásmido que contiene a la forma truncada del gen que codifica para gB ha sido obtenido mediante el ligado de los dos fragmentos de ADN siguientes: (a) el plásmido pAB127 (ejemplo 6.1.1.) digerido por Afel y XbaI, y (b) un fragmento de 276 pb obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

SB125 (24 mer) (SEQ ID NO 51)
 5' AACCAACAGAGGGTCGATAGAAGGC 3' y
 SB126 (39 mer) (SEQ ID NO 52)
 5' AATTTTTCTAGATTACACGTTGACCACGCTGTCGATGTC 3'

utilizando el plásmido pAB127 como matriz y digerido por Afel y XbaI. El plásmido resultante, pSB028 (7279 pb) contiene un gen gB de EHV-1 truncado que codifica para una proteína de 800 residuos.

6.2. Plásmidos que codifican para las diferentes formas de EHV-1 gC

6.2.1. pAB129: gen gC (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

[0098] El fragmento de ADN que contiene a la fase abierta de lectura del gen gC de EHV-1 ha sido obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

NS005 (31 mer) (SEQ ID NO 41)
 5' TTGTCGACATGTGGTTGCCTAATCTCGTGAG 3' y
 NS006 (33 mer) (SEQ ID NO 42)
 5' TTGGATCCCTAAAAGTCAGACTTCTTGACGGC 3'.

Este producto PCR ha sido digerido por Sall y BamHI generando un fragmento de 1412 pb, que a continuación ha sido ligado en el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado mediante la misma doble digestión. El plásmido resultante, pAB129 (6281 pb) contiene al gen que codifica para la glicoproteína gC de EHV-1 y que tiene un tamaño de 468 residuos.

6.2.2. pSB029: gen gC (forma Δ TM) clonado en el vector pVR1012

[0099] Según el perfil de hidropatía, el dominio transmembrana de la proteína gC de EHV-1 está comprendido entre los residuos 429 y 455. El plásmido que contiene a la forma truncada del gen que codifica para gC ha sido obtenido mediante el ligado de los dos fragmentos de ADN siguientes: (a) el plásmido pAB129 (ejemplo 6.2.1.) linealizado

mediante una doble digestión Aspl- BamHI y (b) un fragmento de 287 pb obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

5 SB127 (24 mer) (SEQ ID NO 53)
5' GATCCGGAGGAGGAATACACACCC 3' y
SB128 (39 mer) (SEQ ID NO 54)
5' AATTTTGGATCCCTAAACCGGCCTGTCCTCAACAATCGG 3'

10 utilizando el plásmido pAB129 como matriz y digerido por Aspl y BamHI. El plásmido resultante, pSB029 (6161 pb), contiene un gen gC truncado que codifica para una proteína de 428 residuos.

6.3. Plásmidos que codifican para la forma truncada de EHV-1 gD

6.3.1. pAB131: gen gD (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

15 [0100] El fragmento de ADN que contiene a la fase abierta de lectura del gen gD de EHV-1 ha sido obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

20 NS007 (33 mer) (SEQ ID NO 43)
5' TTGTCGACATGTCTACCTTCAAGCTTATGATGG 3' y
NS008 (32 mer) (SEQ ID NO 44)
5' TTGGATCCTTACGGAAGCTGGGTATATTTAAC 3'.

25 Este producto PCR ha sido digerido por Sall y BamHI generando un fragmento de 1214 pb, que a continuación ha sido ligado en el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado mediante la misma doble digestión. El plásmido resultante, pAB138 (6083 pb) contiene al gen que codifica para la glicoproteína gD de 402 residuos.

6.3.2. pSB030: gen gD (forma Δ TM) clonado en el vector pVR1012

30 [0101] Según el perfil de hidropatía, el dominio transmembrana de la proteína gD de EHV-1 está comprendido entre los residuos 348 y 371. El plásmido que contiene a la forma truncada del gen que codifica para gD ha sido obtenido mediante el ligado de los tres fragmentos de ADN siguientes: (a) el plásmido pVR1012 (ejemplo 1) linealizado mediante una doble digestión Sall-BamHI, (b) el fragmento de 825 pb issu de la digestión de pAB131 (ejemplo 6.3.1.) par Sall y BsmI y (c) un fragmento de 239 pb obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

35 SB129 (24 mer) (SEQ ID NO 55)
5' CGGTTTCTTGGTGAATTCAACTTC 3' y
SB130 (42 mer) (SEQ ID NO 56)
5' AATTTTGGATCCTTACGTAGAGTTGCTCTTAGACGTTTTTGG 3'

40 utilizando el plásmido pAB131 como matriz y digerido por BsmI y BamHI. El plásmido resultante, pSB030 (5921 pb), contiene un gen IgD truncado que codifica para una proteína de 347 residuos.

Ejemplo 7: Plásmidos que codifican para las diferentes formas de las glicoproteínas de EHV-4

45 [0102] Los genes que codifican para las glicoproteínas gB, gC y gD de la cepa KYT445/2 de EHV-4 han sido aislados mediante PCR a partir de el ADN vírico purificado.

7.1. Plásmidos que codifican para las diferentes formas de EHV-4 gB

7.1.1. pAB136: gen gB (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

50 [0103] La secuencia codificadora del gen gB de EHV-4 se ha amplificada mediante PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

55 AB325 (35 mer) (SEQ ID NO 33)
5' TTTCTGCAGATGTCCACTTGTGCGTGCTATTTG 3' y
AB326 (31 mer) (SEQ ID NO 34)
5' TTTTCTAGATTAAACCATTTTTTCGCTTTCC 3',

60 el fragmento de ADN obtenido ha sido digerido por PstI y XbaI y ligado en el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado par PstI y XbaI, generando el plásmido pAB136 (7801 pb). El gen gB de EHV-4 codifica para una proteína de 975 aminoácidos.

7.1.2. pSB025: gen gB (forma Δ TM) clonado en el vector pVR1012

[0104] Según el perfil de hidropatía, el dominio transmembrana de la proteína gB de EHV-4 está posicionado entre los residuos 797 y 867. El plásmido que contiene a la forma truncada del gen que codifica para gB ha sido obtenido mediante el ligado de los dos fragmentos de ADN siguientes: (a) el plásmido pAB136 (ejemplo 7.1.1.) digerido por S_{ph}I y XbaI, y (b) un fragmento de 231 pb obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

SB119 (36 mer) (SEQ ID NO 45)
5' TTTTGGTCTAGATTAGTCCACGTTGACAACGCTGTC 3' y
SB120 (23 mer) (SEQ ID NO 46)
5' CGCAAGCTTATCGAGCCGTGCGC 3'

utilizando el plásmido pAB136 como matriz y digerido por S_{ph}I y XbaI. El plásmido resultante, pSB025 (7264 pb) contiene un gen gB truncado que codifica para una proteína de 796 residuos.

7.2. Plásmidos que codifican para las diferentes formas de EHV-4 gC

7.2.1. pAB137: gen gC (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

[0105] el fragmento de ADN que contiene a la fase abierta de lectura del gen gC de EHV-4 ha sido obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

AB327 (32 mer) (SEQ ID NO 35)
5' TTTGTCGACATGGGTTTGGTAAATATAATGCG 3' y
AB328 (33 mer) (SEQ ID NO 36)
5' TTTGGATCCTTAGAAGTCTGCTTTCTTGTAGGG 3'.

Este producto PCR ha sido digerido por S_{al}I y BamHI generando un fragmento de 1463 pb, que a continuación ha sido ligado en el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado mediante la misma doble digestión. El plásmido resultante, pAB137 (6330 pb) contiene al gen que codifica para la glicoproteína gC de 485 residuos.

7.2.2. pSB026: gen gC (forma Δ TM) clonado en el vector pVR1012

[0106] Según el perfil de hidropatía, el dominio transmembrana de la proteína gC de EHV-4 está comprendido entre los residuos 425 y 472. El plásmido que contiene a la forma truncada del gen que codifica para gC ha sido obtenido mediante el ligado de los dos fragmentos de ADN siguientes: (a) el plásmido pAB137 (ejemplo 7.2.1.) linealizado mediante una doble digestión AclI-BamHI y (b) un fragmento de 237 pb obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

SB121 (24 mer) (SEQ ID NO 47)
5' GTATCAATCCCAGCTGACCCCGAC 3' y
SB122 (41 mer) (SEQ ID NO 48)
5' AATTTTGGATCCTTAGCCGTCGGGTAACCCTCTATGATGC 3'

utilizando el plásmido pAB137 como matriz y digerido por AclI y BamHI. El plásmido resultante, pSB026 (6147 pb), contiene un gen gC truncado que codifica para una proteína de 424 residuos.

7.3. Plásmidos que codifican para la forma truncada de EHV-4 gD

7.3.1. pAB138: gen gD (forma nativa) clonado en el vector pVR1012

[0107] El fragmento de ADN que contiene a la fase abierta de lectura del gen gD de EHV-4 ha sido obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

AB329 (33 mer) (SEQ ID NO 37)
5' TTTGTCGACATGTCTACCTTCAAGCCTATGATG 3' y
AB330 (33 mer) (SEQ ID NO 38)
5' TTTGGATCCTTACGGAAGCTGAGTATATTTGAC 3'.

Este producto PCR ha sido digerido por S_{al}I y BamHI generando un fragmento de 1214 pb, que a continuación ha sido ligado en el vector pVR1012 (ejemplo 1) linealizado mediante la misma doble digestión. El plásmido resultante, pAB138 (6081 pb) contiene al gen que codifica para la glicoproteína gD de 402 residuos.

7.3.2. pSB027: gen gD (forma Δ TM) clonado en el vector pVR1012

[0108] Según el perfil de hidropatía, el dominio transmembrana de la proteína gD de EHV-4 está comprendido entre los residuos 348 y 371. El plásmido que contiene a la forma truncada del gen que codifica para gD ha sido obtenido

mediante el ligado de los dos fragmentos de ADN siguientes: (a) el plásmido pAB138 (ejemplo 7.3.1.) linealizado mediante una doble digestión EcoRI/BamHI y (b) un fragmento de 310 pb obtenido por PCR con ayuda de los oligonucleótidos siguientes:

5 SB123 (24 mer) (SEQ ID NO 49)
5' TTTTCCGTAACAATTCCGAGCAGC 3' y
SB124 (39 mer) (SEQ ID NO 50)
5' AATTTTGGATCCTTACGTAGAGTTGCTATTAGACGCTGG 3'

10 utilizando el plásmido pAB138 como matriz y digerido por EcoRI y BamHI. El plásmido resultante, pSB027 (5919 pb), contiene un gen gD truncado que codifica para una proteína de 347 residuos.

Ejemplo 8: Plásmido que codifica para el GM-CSF canino

15 8.1. Preparación del ARN total de linfocitos de perro estimulados in vitro mediante unos mitógenos

[0109] Se ha recogido sangre de perro en un tubo que contiene EDTA mediante una recolección de sangre realizada en una perra Beagle. Las células mononucleadas se han recogido por centrifugado con un gradiente de Ficoll, y cultivadas en placa de Petri de 60 mm de diámetro. Entonces se han estimulado las células mononucleadas de perro con concanavalina A (conA) (concentración final de aproximadamente 4 Pg/ml) y con fito-hemaglutinina (PHA) (concentración final de aproximadamente 10 Pg/ml). Tras estimulación, los linfoblastos " ConA " y " PHA " se han recogido por raspado de las placas de cultivo, y el ARN total de estas células se ha extraído utilizando el kit " mRNA isolating kit for White Blood Cells " (Boehringer Mannheim/Roche Cat # 1 934 325).

25 8.2. Aislamiento del gen que codifica para el GM-CSF canino y construcción del plásmido pJP074

[0110] EL ARN total extraído de los linfoblastos de perro estimulados con ConA o con PHA (ejemplo 8.1.) ha servido de matriz para la síntesis de la primera hebra de ADN complementario. Esta primera hebra de ADN complementario ha sido producido por alargamiento del oligonucleótido p(dT)15 (Boehringer Mannheim/Roche Cat # 814 270). EL ADN complementario se hebra simple obtenido ha sido a continuación utilizado como matriz para una reacción de aCP con los oligonucleótidos siguientes:

35 JP578 (SEQ ID NO 64) (33 mer)
5' TATGCGGCCGCCACCATGTGGCTGCAGAACCTG 3' y
JP579 (SEQ ID NO 65) (36 mer)
5' TATGCGGCCGCTACGTATCACTTCTTGACTGGTTTC 3'

40 para amplificar un fragmento ACP de aproximadamente 450 pares de bases (pb). Este fragmento ha sido purificado por electroforesis en gel de agarosa, y luego ligado con el vector pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para dar como resultado el plásmido pJP074. La secuencia del gen GM-CSF canino clonado en el plásmido pJP074 se ha hallado equivalente a la de la secuencia del GM-CSF canino disponible en GenBank (n° de acceso # S49738).

8.3. Construcción del plásmido pJP084 y secuencia del gen GM-CSF canino

45 [0111] El plásmido pJP074 (ejemplo 8.2.) ha sido digerido por NotI para aislar, tras electroforesis en gel de agarosa, el fragmento NotI-NotI de aproximadamente 450 pb que contiene al gen GM-CSF canino. Este fragmento se ha ligado con el plásmido pVR1012 (ejemplo 1). El clon que contiene a la secuencia GM-CSF canino (SEQ ID NO66, Figura N° 20) en la buena orientación con respecto al promotor hCMV/IE ha sido identificado como pJP084. Este plásmido tiene un tamaño de 5364 pb (Figura N° 19).

Ejemplo 9: Plásmido que codifica para el GM-CSF felino

50 9.1. Preparación del ARN total de linfocitos de gato estimulados in vitro mediante unos mitógenos

[0112] Se ha recogido sangre de gato por recolección de sangre en un tubo que contiene EDTA. Las células mononucleadas se han recogido por centrifugación en un gradiente de Ficoll, y luego cultivadas en placa de Petri de 60 mm de diámetro. Entonces se han estimulado las células mononucleadas de gato con concanavalina A (ConA) (concentración final de aproximadamente 4 Pg/ml) y con fito-hemaglutinina (PHA) (concentración final de aproximadamente 10 Pg/ml). Tras estimulación, los linfoblastos " ConA " y " PHA " se han recogido por raspado de las placas de cultivo, y el ARN total de estas células se ha extraído utilizando el kit " mRNA isolating kit for White Blood Cells " (Boehringer Mannheim/Roche Cat # 1 934 325).

9.2. Aislamiento del gen que codifica para el GM-CSF felino y construcción de los plásmidos pJ089 y pJP090

60 [0113] EL ARN total extraído de los linfoblastos de gato estimulados por la ConA y la PHA (ejemplo 9.1.) ha servido de matriz para la síntesis de la primera hebra de ADN complementario. Esta primera hebra de ADN complementario ha sido producida por alargamiento del oligonucleótido p(dT)15 (Boehringer Mannheim/Roche Cat # 814 270). EL

ADN complementario se simple hebra obtenido ha sido a continuación utilizado como matriz para una reacción de aCP con los oligonucleótidos siguientes:

JP578 (SEQ ID NO 64) (33 mer)
5' TATGCGGCCGCCACCATGTGGCTGCAGAACCTG 3' y
5 JP579 (SEQ ID NO 65) (36 mer)
5' TATGCGGCCGCTACGTATCACTTCTTGACTGGTTTC 3'

para amplificar un fragmento ACP de aproximadamente 450 pares de bases (pb). Este fragmento ha sido digerido por NotI para aislar, tras electroforesis en gel de agarosa, el fragmento NotI-NotI de 450 pb. Entonces este fragmento se ha ligado con el plásmido pVR1012 (ejemplo 1). Se han identificado dos clones que contienen a la secuencia GM-CSF felino (SEQ ID NO 67 y SEQ ID NO 68), en la buena orientación con respecto al promotor hCMV/IE respectivamente como pJP089 y pJP090. Estos dos plásmidos tienen un tamaño de 5364 pb (figuras N° 21 y 23).

[0114] La secuencia del gen GM-CSF felino clonado en el plásmido pJP089 contiene 13 diferencias al nivel nucleotídico con la secuencia GM-CSF felina disponible en GenBank (n° de acceso AF053007). El cambio más importante es un cambio C → T que conlleva un cambio Leucina → Fenilalanina para el aminoácido (primera base del codón del aminoácido # 107; Figura N° 22). La secuencia del gen GM-CSF felino clonado en el plásmido pJP090 es equivalente a aquella contenida en el plásmido pJP089, excepto que el cambio Leucina → Fenilalanina no existe para el aminoácido # 107 (Figura N° 24). La verificación de la secuencia 3' del gen GM-CSF felino mediante el kit 3' RACE ha mostrado que, en esta posición 107, se puede tener en el mismo gato, el aminoácido Leucina o el aminoácido Fenilalanina.

Ejemplo 10: Plásmido que codifica para el GM-CSF equino

10.1. Preparación del ARN total de linfocitos de caballo estimulados in vitro mediante unos mitógenos

[0115] Se ha recogido sangre de caballo por recolección de sangre en un tubo que contiene EDTA por una extracción de sangre en la vena yugular. Las células mononucleadas se han recogido por centrifugación en un gradiente de Ficoll, y luego cultivadas en placa de Petri de 60 mm de diámetro. entonces se han estimulado las células mononucleadas de caballo o bien con concanavalina A (ConA) (concentración final de aproximadamente 5 Pg/ml) o bien con fito-hemaglutinina (PHA) (concentración final de aproximadamente 10 Pg/ml). Tras estimulación, los linfoblastos " ConA " y " PHA " se han recogido por rascado de las placas de cultivo, y el ARN total de estas células se ha extraído utilizando el kit " mRNA isolating kit for White Blood Cells " (Boehringer Mannheim/Roche Cat # 1 934 325).

10.2. Aislamiento del gen que codifica para el GM-CSF equino

[0116] EL ARN total extraído de los linfoblastos de caballo estimulados por la ConA o por la PHA (ejemplo 10.1.) ha servido de matriz para la síntesis de la primera hebra de ADN complementario. Esta primera hebra de ADN complementaria ha sido producida por alargamiento del oligonucleótido p(dT)₁₅ (Boehringer Mannheim/Roche Cat # 814 270). EL ADN complementario de hebra simple obtenido se ha utilizado a continuación como matriz para una reacción de aCP con los oligonucleótidos siguientes:

JP734 (SEQ ID NO 70) (44 mer)
5' CATCATCATGTGCGGCCACCATGTGGCTGCAGAACCTGCTTCT 3' y
JP735 (SEQ ID NO 71) (41 mer)
5' CATCATCATGCGGCCGCTACTTCTGGGCTGCTGGCTTCCAG 3'

para amplificar un fragmento ACP de aproximadamente 500 pares de bases (pb). Este fragmento se ha purificado por electroforesis en gel de agarosa.

10.3. Construcción del plásmido pJP097 y secuencia del gen GM-CSF equino

[0117] El fragmento ACP purificado obtenido en el ejemplo 10.2. ha sido digerido por NotI para aislar, tras electroforesis en gel de agarosa, el fragmento NotI-NotI de aproximadamente 450 pb que contiene al gen GM-CSF equino. Este fragmento se ha ligado con el plásmido pVR1012 (ejemplo 1). El clon que contiene a la secuencia GM-CSF equina (SEQ ID NO 69, Figura N° 26) en la buena orientación con respecto al promotor hCMV/IE ha sido identificado con pJP097. Este plásmido tiene un tamaño de 5334 pb (Figura N° 25).

Ejemplo 11: Tabla recapitulativa de los plásmidos**[0118]**

Patógeno	Antígeno	Nº de residuos nativa	forma ámbito TM	Nº de residuos forma truncada	Plásmidos de expresión
CDV	F	662	606-626	605	pPB229 y pNS021*
	HA	607	1-60**	574	pNS018 y pNS024*
CPI-2	F	529	474-517	473	pAB115 y pSB032*
	HN	565	1-40**	557	pAB114 y pSB034*
CHV-1	gB	878	702-769	701	pAB037 y pSB016*
	gC	459	422-452	421	pSB018 y pSB019*
	gD	345	310-328	309	pAB038 y pSB017*
FHV-1	gB	949	761-834	760	pSB020 y pSB021*
	gC	534	495-526	494	pSB022 y pSB023*
	gD	374	328-353	327	pAB029 y pSB024*
EHV-1	gB	980	801-875	800	pAB127 y pSB028*
	gC	468	429-455	428	pAB129 y pSB029*
	gD	402	348-371	347	pAB131 y pSB030*
EHV-4	gB	975	797-867	796	pAB136 y pSB025*
	gC	485	425-472	424	pAB137 y pSB026*
	gD	402	348-371	347	pAB138 y pSB027* *

Plásmidos que codifican para las formas truncadas de los antígenos

** caso particular de los genes HA de CDV y HN de CPI-2: dominio transmembrana y secuencia señal confundidos

Ejemplo 12: Procedimientos de biología molecular**5 Cultivo y purificación de los virus**

[0119] Se han cultivado los virus en sistemas celulares apropiados hasta la obtención de un efecto citopático. Los sistemas celulares a utilizar para cada virus son bien conocidos por el experto en la materia. En breve, se han infectado las células apropiadas por la cepa vírica estudiada con una multiplicidad de infección de 1 y se han incubado a 37°C durante el tiempo necesario para la obtención de un efecto citopático (en promedio 36 horas).

10 [0120] En el caso de los virus de ADN, tras el cultivo, lo que queda flotando y las células lisadas se han recogido y los restos celulares se han eliminado mediante un centrifugado a 1000 g y a 4°C durante 10 minutos. Las partículas virales se han recogido por ultracentrifugado a 400 000 g y 4°C durante 1 hora. Los residuos se han recuperado en un volumen mínimo de tampón (Tris 10 mM, EDTA 1 mM).

[0121] Los virus de ARN se han purificado según las técnicas estándar de purificación bien conocidas por el experto en la materia.

Extracción de ADN genómico viral

5 [0122] Las suspensiones virales concentradas se han tratado con la proteinasa K (100 mg/ml final) en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) (0.5% final) durante 2 horas a 37 °C. A continuación se ha extraído el ADN vírico con ayuda de una mezcla fenol/ cloroformo, que luego se ha precipitado con dos volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante 16 horas y a continuación centrifugado a 10 000 g durante 15 minutos a 4°C. Los residuos de ADN se han secado, y se han recuperado en un volumen mínimo de agua ultrapura estéril.

Aislamiento de aRN genómico viral

10 [0123] EL ARN genómico de cada virus se ha extraído utilizando la técnica del " tiocianato de guanidinio/ fenolcloroformo" descrita por P. Chomczynski y N. Sacchi (Anal. Biochem. 1987. 162. 156-159).

Técnicas de biología molecular

15 [0124] Todas las construcciones de plásmidos se han realizado utilizando las técnicas estándar de biología molecular descritas por Sambrook y al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Todos los fragmentos de restricción utilizados para la presente invención se han aislado con ayuda del kit " GeneClean " (BIO101 Inc., La Jolla, CA). Para todas las construcciones, los fragmentos de ADN clonados, así como las uniones con el vector de expresión, se han secuenciado mediante el procedimiento de Sanger (Sambrook y al., 1989).

PCR y RT-PCR

20 [0125] Los oligonucleótidos específicos de los genes o de los fragmentos de genes clonados se han sintetizado, comprendiendo determinados de ellos en determinados casos en su extremo 5' unos sitios de restricción que facilitan el clonado de los fragmentos amplificados. Las reacciones de transcripción inversa (RT) y la amplificación en cadena por polimerasa (PCR) se han efectuado con técnicas estándar (Sambrook y al., 1989).

Purificación de plásmidos a gran escala

25 [0126] La producción, a escala de la decena de mg, de plásmidos purificados que están en las composiciones de las vacunas se ha realizado mediante el procedimiento de los gradientes de cloruro de cesio-bromuro de etidio (Sambrook y al, 1989).

Ejemplo 13: Formulación de los plásmidos vacunales

30 [0127] La solución de ADN que contiene uno o varios plásmidos según los ejemplos 2 a 10 se concentra por precipitación etanólica tal como se describe en Sambrook y al (1989). El residuo de ADN se recupera con una solución de NaCl 0.9% de tal manera que se pueda obtener una concentración de 1 mg/ml. Se prepara una solución de DMRIE-DOPE de 0,75mM por introducción de un liofilizado de DMRIE-DOPE mediante un volumen adaptado de H2O estéril.

35 [0128] La formación de los complejos de ADN plasmídico-lípido se ha realizado por dilución a partes iguales de la solución de DMRIE-DOPE 0.75 mM mediante la solución de ADN a 1 mg/ml en NaCl 0.9%. La solución de ADN se introduce progresivamente con ayuda de una aguja insertada 26G a lo largo de la pared del frasco que contiene a la solución de lípido catiónico de tal manera que pueda evitar la formación de espuma. Se procede a una agitación suave a partir del momento en que las dos soluciones se han mezclado. Se obtiene al final una composición que comprende 0,375 mM de DMRIE-DOPE y 500 Pg/ml de plásmido.

40 [0129] Es deseable que el conjunto de las soluciones utilizadas estén a temperatura ambiente para el conjunto de las operaciones descritas más arriba. Se deja que tenga lugar la formación de complejos de ADN/DMRIE-DOPE a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de proceder a la inmunización de los animales.

Ejemplo 14: Inmunización de los perros contra el CDV

45 [0130] Se repite una inyección de 2 ml por vía subcutánea o intramuscular 28 días más tarde. La masa total de plásmido utilizada durante cada inmunización es de 100, 500, 1000 o 2000 Pg según las vacunas. El experto en la materia tiene los conocimientos necesarios para adaptar el volumen o la concentración en función de la dosis de plásmido requerida.

14.1. Prueba virulenta

50 [0131] La cepa de prueba utilizada corresponde a un triturado de bazo extraído de un perro infectado por el virus de la enfermedad canino, cepa Snyder Hill y diluida cien veces en tampón PBS. La dilución se conserva en hielo triturado hasta utilización.

[0132] Tras la anestesia general, se administra la cepa de prueba diluida cien veces por vía intracraneal bajo un volumen de 0,5 ml, 49 días tras la primera inyección.

14.2. Seguimiento clínico tras la prueba

5 **[0133]** Este seguimiento clínico cotidiano se ha realizado durante los 21 días tras la prueba y ha comprendido para cada perro un examen clínico para detectar eventuales signos clínicos de la enfermedad canino y una toma de la temperatura rectal.

[0134] El examen clínico comprende:

- una observación del estado general del animal en una escala a 4 niveles:

10 " bueno " con un resultado de 0, " apatía " con un resultado de 1, " depresión " con un resultado de 2 y " postración " con un resultado de 3. La muerte del animal equivale a un resultado clínico de 10.

- una evaluación de los síntomas oculo-nasales (búsqueda de circulación seroso o purulenta, de rinitis y/o conjuntivitis). Una conjuntivitis/ rinitis con un derrame nasal seroso equivale a un resultado de 1, aquella con un derrame nasal purulento equivale a un resultado de 2.

15 - una evaluación de los síntomas digestivos (búsqueda de signos de gastroenteritis). Una gastroenteritis ligera equivale a un resultado de 1, una severa a un resultado de 2.

- una evaluación de los síntomas nerviosos (búsqueda de mioclonias, convulsiones y/o parálisis). Una mioclonia equivale a un resultado de 1, una convulsión a un resultado de 2 y una parálisis a un resultado de 3.

- el seguimiento de la temperatura corporal del animal.

20 **[0135]** Una temperatura inferior o igual a 37,5°C equivale a un resultado de 3, una temperatura comprendida entre 37,5°C y 39,5°C equivale a un resultado de 0, una temperatura a39,5°C o comprendida entre 39,5°C y 40°C equivale a un resultado de 1, una temperatura igual a 40°C o comprendida entre 40°C y 40,5°C equivale a un resultado de 2, y finalmente una temperatura superior a 40,5°C equivale a un resultado de 3.

[0136] En los animales que han sucumbido a la prueba, se ha hecho una extracción de bazo mediante la puesta en evidencia del virus de Carré por inmunofluorescencia.

25 **[0137]** Se ha calculado un resultado clínico global de la manera siguiente: para cada signo clínico se ha establecido un resultado medio por grupo de animales en el periodo de observación y el resultado total es la suma de los resultados medios para los cinco signos clínicos considerados.

[0138] Resultados de los experimentos de las pruebas tras inmunización de los perros por la vía intramuscular:

Plásmido	Formulación	Antígenos	Dosis	Citoquina	Mortalidad	Resultado clínico	Respuesta en anticuerpos*
Control	---	---	---	---	4/4	26,1	0,3 +/- 0,3
pNS018 pPB229	---	HA nativo F nativo	50 µg 50 µg	---	4/5	21,6	0,3 +/- 0,2
pNS018 pPB229	DMRIE- DOPE	HA nativo F nativo	50 µg 50 µg	---	1/5	7,8	0,8 +/- 0,3
pNS024 pNS021	DMRIE- DOPE	HA optimizado F optimizado	50 µg 50 µg	---	1/5	7,2	1,9 +/- 0,8
pNS024 pNS021	DMRIE- DOPE	HA optimizado F optimizado	500 µg 500 µg	---	0/5	0,6	1,5 +/- 0,3
Control	---	---	---	---	4/4	25,0	0,2 +/- 0,0
pNS018 pPB229	DMRIE- DOPE	HA nativo F nativo	50 µg 50 µg	---	5/5	24,4	0,2 +/- 0,0
pNS018 pPB229	DMRIE- DOPE	HA nativo F nativo	500 µg 500 µg	---	3/5	19,0	0,4 +/- 0,2
pNS024 pNS021	DMRIE- DOPE	HA optimizado F optimizado	500 µg 500 µg	---	1/5	9,2	0,6 +/- 0,7
pNS024 pNS021 pJP084	DMRIE- DOPE	HA optimizado F optimizado	500 µg 500 µg 200 µg	GM-CSF	0/5	2,4	1,7 +/- 0,9
pNS024	DMRIE- DOPE	HA optimizado	500 µg	---	0/5	0,8	1,4 +/- 1,0
pNS024 pNS021 pNS016 pNS017	DMRIE- DOPE	HA optimizado F optimizado M nativo N nativo	500 µg 500 µg 500 µg 500 µg	---	0/5	5	1,4 +/- 1,3

* concentración media +/- desviación tipo

[0139] Los plásmidos pNS016 y pNS017 que insertan respectivamente el gen nativo M y el gen nativo N, se han construido de la misma manera que el plásmido pNS018.

- 5 **[0140]** Es sorprendente constatar que el resultado de protección obtenido con HA optimizado solamente es superior o igual a los resultados obtenidos con HA y F optimizados o con HA y F optimizados + M y N nativos.

LISTA DE SECUENCIAS

[0141]

<110> Merial

5 <120> Vacuna de ADN pets mejorado

<130> Vacuna de ADN pets mejorado

10 <140> número de solicitud

<141> fecha de solicitud

<160> 73

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

25 <400> 1

atgagcccac tcttacaaca a 21

<210> 2

<211> 35

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

35

<400> 2

tttcgcggat ccattaaagg aagagcgct aaccg 35

<210> 3

<211> 30

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

10

<400> 3

tttcgcggat cccacaaagt atcaactagc 30

<210> 4

15 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 4

gggatttgc gccgatgcaa tag 23

25 <210> 5

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 5

tttacgctc gacttgggga cccttgattg ttc 33

35

<210> 6

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 6

tttacgctg c gacctgtagg aaaaagaaga aggcac 36

10 <210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 7

ttggggacc ttgattgtc 20

20

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 8

30 ctgtaggaaa aagaagaagg c 21

<210> 9

<211> 40

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 9

gatctgcagc acgtgtctag aggatcga attcgcggcc 40

5

<210> 10

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 10

15 gatccgcggc cgcgaattcg ataccctcta gacacgtgct 40

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

25 <400> 11

ttctgcagat gctctctac caagayaagg 30

<210> 12

<211> 28

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

35

<400> 12

ttgtcgacat gtgtatcatc atmctgtc 28

<210> 13
 <211> 26
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

 10 <400> 13
 ttcttagaca gccgagcccc atgcac 26

 <210> 14
 <211> 30
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
 20
 <400> 14
 ttggatccga tatatgacca gaatacttca 30

 <210> 15
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

 <400> 15
 tatattgaag gacaacttgg gg 22

 35 <210> 16
 <211> 36
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

5

<400> 16

ctagtctaga ttaattatta tcaacttta caacac 36

<210> 17

10

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 17

cgagaaactt gttattttc taaag 25

<210> 18

20

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 18

ataagaatgc ggccgcaaag gctatatatt tttggggta ttattattg g 51

30

<210> 19

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 19
 aaaactgcag atgagttta aaaatttta tc 32

5 <210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 20
 ctagtctaga ttagatctta ttatttttg 30

15 <210> 21
 <211> 24 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 21
 tggattgacg gtcttataac acgc 24

25 <210> 22
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 22
 35 ctagtctaga ttaatttca tccgatgcat caaacac 37

<210> 23

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 23

ctgtggacag agaccctaaa actc 24

10

<210> 24

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 24

20 ttctcttttg cggccgctta tatgctgtct atatcataaa attttaaggc 50

<210> 25

<211> 24

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

30 <400> 25

gatcgtcccg ccataccgctc tggg 24

<210> 26

<211> 39

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 26

5 tttggaagat ctttactgat tattcatgcc ctggggagg 39

<210> 27

<211> 34

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

15 <400> 27

ttttctgcag atgtccactc gtggcgatct tggg 34

<210> 28

<211> 40

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

25

<400> 28

atagtttagc ggccgcttag acaagatttg ttcagtatc 40

<210> 29

30 <211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 29

tttctgcag atgagacgat ataggatggg acgc 34

 <210> 30
 <211> 34
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
 10
 <400> 30
 agtttagcgg ccgctataa tcgccgggga tgag 34

 <210> 31
 15 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

 <400> 31
 gttaaatttg taccacggga cggg 24

 25 <210> 32
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

 <400> 32
 agtttagcgg ccgctattc aggggacgcg tcgtagactt g 41
 35
 <210> 33
 <211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 33

tttctgcaga tgtccacttg ttgccgtgct atttg 35

10 <210> 34

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 34

tttctagat taaaccattt ttcgcttc c 31

20

<210> 35

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 35

30 tttgtcgaca tgggtttggt aaatataatg cg 32

<210> 36

<211> 33

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 36

tttggatcct tagaagtctg ctttctgta ggg 33

5

<210> 37

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 37

15 tttgtcgaca tgtctacctt caagcctatg atg 33

<210> 38

<211> 33

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

25 <400> 38

tttggatcct tacggaagct gagtatattt gac 33

<210> 39

<211> 30

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

35

<400> 39

ttctgcagat gtcctctggt tgccgttcgt 30

<210> 40
 <211> 30
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

 10 <400> 40
 ttcttagatt aaaccatttt ttcattttcc 30

 <210> 41
 <211> 31
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

 20 <400> 41
 ttgtcgacat gtggtgcct aatctcgtga g 31

 <210> 42
 25 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220> <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

 30 <400> 42
 ttggatccct aaaagtcaga cttctgtac ggc 33

 <210> 43
 35 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

5 <400> 43
 ttgtcgacat gtctaccttc aagcttatga tgg 33

<210> 44

<211> 32

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

15 <400> 44
 ttggatcctt acggaagctg ggtatattta ac 32

<210> 45

20 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 45

tttgggtcta gattagtcca cggtgacaac gctgtc 36

30 <210> 46

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 46
 cgcaagctta tcgagccgtg cgc 23

<210> 47
 5 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 47
 gatcaatcc cagctgacct cgac 24

15 <210> 48
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 48
 aatdddgat ccttagccgt ccgggtaacc ctctatgatg c 41

25 <210> 49
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 49
 35 tttccgtaa caattccgag cagc 24

<210> 50

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 50

aattttggat ccttacgtag agttgctatt agacgctgg 39

10

<210> 51

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 51

20 aacaacagag ggtcgataga aggc 24

<210> 52

<211> 39

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

30 <400> 52

aatttttcta gattacacgt tgaccacgct gtcgatgct 39

<210> 53

<211> 24

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 53

5 gatccggagg aggaatacac accc 24

<210> 54

<211> 39

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

15 <400> 54

aatthttgat ccctaaaccg gcctgtcctc aacaatcgg 39

<210> 55

<211> 24

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

25

<400> 55

cggthttcttg gtgaattcaa ctc 24

<210> 56

30 <211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 56

aatttggat ccttacgtag agtgctctt agacgtttt gg 42

<210> 57
 <211> 38
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

10 <400> 57
 aaaaacgcgt cgacatgggt actataattc aatttctg 38

<210> 58
 15 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 58
 ttttctagtc tagattattt atgataaaca aaattctc 38

25 <210> 59
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 59
 ttttctagtc tagattagta tgtgtcactt tgtgctaagt g 41

35 <210> 60
 <211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 60

aaaaacgcgt cgacatggtt gcagaagatg cccctgtag g 41

10 <210> 61

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 61

ttttggaaga tcttaggat agtgtcacct gacgg 35

20

<210> 62

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 62

30 ttaaaagaat tcgaccctaaa agcaaatcat gagccac 37

<210> 63

<211> 33

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 63

ttaaaaggcc ttaggatag tgtcacctga cgg 33

5

<210> 64

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 64

15 tatgcgcccg ccaccatgtg gctgcagaac ctg 33

<210> 65

<211> 36

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

25 <400> 65

tatgcgcccg ctacgtatca ctcttgact ggtttc 36

<210> 66

<211> 435

30 <212> ADN

<213> Canis sp.

<400> 66

35

```

atgtggctgc agaacctgct tttcttgggc actgtggctc gcagcatctc tgcaccacc 60
cgctaccca cccttgtcac tcggccctct cagcacgtgg atgcatcca ggaagccctg 120
agccttttga acaacagtaa tgacgtgact gctgtgatga ataaagcagt aaaagtggtc 180
tctgaagtgt ttgaccctga ggggccaaca tgcctggaga cccgcctaca gctgtacaag 240
gagggcctgc agggcagcct caccagcctc aagaatccct taaccatgat ggccaatcac 300
tataagcagc actgtceccc taccocggaa tctocctgtg caaccagaa tattaacttc 360
aaaagtttca aagagaacct gaaggatttt ctgtttaaca tcccctttga ctgctggaaa 420
ccagtcaaga agtga 435
    
```

<210> 67

<211> 435

<212> ADN

5 <213> Felis catus

<400> 67

10	<pre> atgtggctgc agaacctgct tttcctgggc actgtggtct gcagcatctc tgcacccacc 60 agttcaccca gctctgtcac tcggccctgg caacacgtgg atgcatcaa ggaggctctg 120 agccttctga acaacagtag tgaataact gctgtgatga atgaagcagt agaagtcgtc 180 tctgaaatgt ttgaccctga ggagccgaaa tgcctgcaga ctcacctaaa gctgtacgag 240 cagggcctac ggggcagcct catcagcctc aaggagcctc tgagaatgat ggccaacccat 300 tacaagcagc actgcccctt tactccggaa acgcccctgtg aaaccagac tatcaccttc 360 aaaaatttca aagagaatct gaaggatctt ctgtttaaca tcccctttga ctgctggaaa 420 ccagtcaaga agtga 435 </pre>
----	---

<210> 68

<211> 435

15 <212> ADN

<213> Felis catus

<400> 68

```

    atgtggctgc agaacctgct tttcctgggc actgtggctc gcagcatctc tgcacccacc 60
    agttcaccca gctctgtcac tcggccctgg caacacgtgg atgccatcaa ggaggctctg 120
    agccttctga acaacagtag tgaaataact gctgtgatga atgaagcagt agaagtcgtc 180
    tctgaaatgt ttgacctga ggagccgaaa tgcctgcaga ctcacctaaa gctgtacgag 240
    cagggcctac ggggcagcct catcagcctc aaggagcctc tgaggatgat ggccaacat 300
    tacaagcagc actgccccct tactccggaa acgccctgtg aaaccagac tatcaccttc 360
5   aaaaatttca aagagaatct gaaggatctt ctgtttaaca tcccccttga ctgctggaaa 420
    ccagtcaaga agtga                                     435

```

<210> 69

<211> 435

<212> ADN

10 <213> Equus sp.

<400> 69

```

    atgtggctgc agaacctgct tcttctgggc actgtggctt acagcatgcc cgcacccacc 60
15   cgccaaccca gccctgtcac tcggccctgg cagcatgtgg atgccatcaa ggaggccctg 120
    agccttctga acaacagtag tgacactgct gctatcatga atgaaacagt agaagtcgtc 180
    tctgaaacgt ttgacgccga ggagctgaca tgcctgcaga ctgcctgaa gctgtacaaa 240
    cagggttgc ggggcagcct catcaagctc gaaggcccct tgaccatgat ggccagccac 300
    tacaagcagc actgcccccc caccctggaa acttctctgt caaccagat gatcaccttc 360
    aaaagtttca aaaagaacct gaaggatctt ctgtttgaga tccccgttga ctgctggaag 420
    ccagcccaga agtaa                                     435

```

20 <211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 70

catcatcatg tcgacgccac catgtggctg cagaacctgc ttct 44

30 <210> 71

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 71

catcatcatg cggccgctac ttctgggctg ctggctcca g 41

5 <210> 72

<211> 1590

<212> ADN

<213> virus de la parainfluenza canina

10 <400> 72

```

atgggtacta taattcaatt tctgggtggc tcctgtctat tggcaggagc aggcagcctt 60
gatctagcag ccctcatgca aatcgggtgc attccaacaa atgtccggca acttatgtat 120
tatactgagg cctcatcagc attcattggt gtgaagttaa tgcctacaat tgactcgccg 180
attagtggat gtaatataac atcaatttca agctataatg caacagtgc aaaactccta 240
cagccgatcg gtgagaattt ggaaacgatt aggaaccagt tgattccaac tcggaggaga 300
cgccggtttg caggggtggg gattggatta gctgcattag gagtagctac tgccgcacag 360
gtcactgccg cagtagcact agtaaaggca aataaaaaatg ctgctggctat actcaatctc 420
aaaaatgcaa tccaaaaaac aaatacagca gttgcagatg tgggccaggc cacacaatca 480
ctaggaacgg cagttcaagc agttcaagat cacataaaca gtgtggtaag tccagcaatt 540
acagcagcca attgtaaggc ccaagatgct atcattggct caatcctcaa tctctatttg 600
accgagttga caactatctt ccacaatcaa attacaaacc ctgcattgag tctattaca 660
attcaagctt taaggatcct actggggagt accttgccga ctgtggtcga aaaatctttc 720
aataccaga taagtgcagc tgagcttctc tcatcagggt tattgacagg ccagattgtg 780
ggattagatt tgacctatat gcagatggc ataaaaattg agctgccaac ttaactgta 840
caacctgcaa cccagatcat agatctggcc accatttctg cattcattaa caatcaagaa 900
gtcatggccc aattaccaac acgtgttatt gtgactggca gcttgatcca agcctatccc 960
gcatcgcaat gcactattac acccaacact gtgtactgta ggtataatga tgcccaagta 1020
ctctcagatg atacgatggc ttgcctcaa ggtaacttga caagatgcac cttctctcca 1080
gtgggtggga gctttctcac tcgattcgtg ctgttcgatg gaatagtta tgcaaatgac 1140
aggtcagatg tatgcaagtg catgcagcct gctgctgtga tcctacagcc gagttcatcc 1200

```

15

20

25

```

cctgtaactg tcattgacat gtacaaatgt gtgagtctgc agcttgacaa tctcagattc 1260
accatcactc aattggccaa tgtaacctac aatagcacca tcaagcttga aacatcccag 1320
atcttgcta ttgatccggt ggatatatcc cagaatctag ctgctggtaa taagagtcta 1380
agtgatgcac tacaacactt agcacaaggt gacacatacc tttctgcaat cacatcagct 1440
acgactacaa gtgtattatc cataatggca atctgtcttg gatcgtagg ttaaatatta 1500
ataatcttgc tcagtgtagt tgtgtggaag ttattgacca ttgtcactgc taatcgaat 1560
agaatggaga attttgttta tcataaataa 1590

```

<210> 73

<211> 1698

<212> ADN

30

<213> virus de la parainfluenza canina

<400> 73

```

atggttgag aagatgcccc tgtaggggc acttgccgag tattatttcg aacaacaact 60
ttaattttc tatgcacact actagcatta agcatctcta tcctttatga gagtttaata 120
acccaaaagc aatcatgag ccacgcaggc tcaactggat ctaattctag attaggaagt 180
atcactgatc ttcttaataa tattctctct gtcgcaaate agattatata taactctgca 240
gtcgctctac ctctacaatt ggacactctt gaatcaacac tccttacagc cattaagtct 300
cttcaaacca gtgacaagct agaacagaac tgctcgtggg gtgctgcact gattaataat 360
aatagataca ttaatggcat caatcagttc ttttctcaa ttgctgaggg tcgcaatctg 420
acacttggcc cacttcttaa tatacctagt ttcatccaa ctgccacgac accagagggc 480
tgcaccagga tcccatcatt ctcgctcacc aagacacact ggtgttatac acacaatgtt 540
atcctgaatg gatgccagga tcatgtatcc tcaaatcaat ttgtttccat gggaatcatt 600
gaaccactt ctgcccgggt tccatccttt cgaaccctaa agactctata tctcagcgat 660
ggggtcaatc gtaagagctg ctctatcagt acagttccgg ggggttgat gatgtactgt 720
tttgtctcta ctcaaccaga gagggatgac tacttttcta ccgctcctcc agaacaacga 780
attattataa tgtactataa tgatacaatc gtggagcgca taattaatcc acccggggta 840
ctagatgat gggcaacatt gaccccagga acaggaagcg gggatatatta tttaggttgg 900
gtgctctttc caatatatgg cggcgtgatt aaagatacga gtttatggaa taatcaagca 960
aataaatact ttatccccc aatggttgcg gctctctgct cacaaaacca ggcaactcaa 1020
gtccaaaatg ctaagtcatc atactatagc agctggtttg gcaatcgaat gattcagtct 1080
gggatcctgg catgtcctct tcaacaggat ctaaccaatg agtgtttagt tctgcccttt 1140
tctaatagat aggtgcttat ggggtgctgaa gggagattat acatgtatgg tgactcgggtg 1200
tattactacc aaagaagcac tagttgggtg cctatgacca tgctgtataa ggtaaccata 1260
acattcacta atggtcagcc atctgctata tcagctcaga atgtgcccac acagcaggtc 1320
cctagacctg ggacaggagg ctgctctgca acaaatagat gtcccggttt ttgcttgaaa 1380
ggagtgtatg ctgatgcctg gttactgacc aaccctctgt ctaccagtac atttggatca 1440
gaagcaacct tcaactggttc ttatctcaac gcagcaactc agcgtatcaa tccgacgatg 1500
tatatcgcg aacaacacaca gatcataagc tcacagcaat ttggatcaag cggtaagaa 1560
gcagcatata gccacacaac ttgttttagg gacacaggct ctggtatggt atactgtatc 1620
tatattattg aattgtcctc atctctctta ggacaatttc agattgtccc atttatccgt 1680
caggtgacac taticta 1698

```

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Vacuna de ADN contra el virus de la enfermedad canino (CDV) que afecta a los perros, que comprende un plásmido que contiene una secuencia nucleotídica que codifica para un inmunógeno de CDV, y los elementos necesarios para su expresión in vivo, un lípido catiónico, (N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1 propanoamónio (DMRIE) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), en el cual la vacuna de ADN administrada por vía intramuscular o subcutánea induce una respuesta inmunitaria eficaz y protectora en perros contra la CDV.
- 2.** Vacuna según la reivindicación 1, que comprende además una proteína GM-CSF canina.
- 10 **3.** Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además un vector de expresión que contiene una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína GM-CSF canina en condiciones que permiten la expresión in vivo de esta secuencia.
- 4.** Vacuna según la reivindicación 3, en el cual el vector de expresión es un plásmido.
- 15 **5.** Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual la secuencia nucleotídica que codifica para un inmunógeno de CDV es la secuencia de un gen del cual se ha eliminado la parte que codifica para el dominio transmembrana.
- 6.** Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el plásmido que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para un inmunógeno de CDV comprende también una secuencia nucleotídica que codifica para una señal tPA.
- 20 **7.** Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el plásmido que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para un inmunógeno de CDV comprende también un intrón estabilizador.
- 8.** Vacuna según la reivindicación 7, en el cual el intrón estabilizador es el intrón II del gen de la beta-globina del conejo.
- 9.** Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual el plásmido contiene una secuencia nucleotídica que codifica para el antígeno HA de CDV.
- 25 **10.** Vacuna según la reivindicación 9, en el cual la secuencia nucleotídica que codifica para el antígeno HA está optimizada mediante la substitución de la secuencia que codifica para la señal de HA por una secuencia nucleotídica que codifica para una señal tPA, mediante la eliminación del fragmento de la secuencia nucleotídica que codifica para el dominio transmembrana de HA, mediante la inserción de un intrón en dirección 5' de la secuencia nucleotídica que codifica para HA o mediante una combinación de estas modificaciones.
- 30 **11.** Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual el plásmido contiene una secuencia nucleotídica que codifica para el antígeno F de CDV.
- 12.** Vacuna según la reivindicación 11, en el cual la secuencia nucleotídica que codifica para el antígeno F está optimizada mediante la substitución de la secuencia que codifica para la señal de F por una secuencia nucleotídica que codifica para una señal tPA, mediante la eliminación del fragmento de la secuencia nucleotídica que codifica para el dominio transmembrana de F, mediante la inserción de un intrón en dirección 5' de la secuencia nucleotídica que codifica para F o mediante una combinación de estas modificaciones.
- 35 **13.** Vacuna según la reivindicación 10 o la reivindicación 12, en el cual la señal tPA es la señal tPA humana.
- 14.** Vacuna según la reivindicación 10 o la reivindicación 12, en el cual el intrón es el intrón II de la beta globina del conejo.
- 40 **15.** Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, que comprende además, en el mismo plásmido o en otro plásmido, una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína M o la proteína N de CDV.
- 45 **16.** Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, que comprende un primer plásmido de expresión que contiene una secuencia nucleotídica que codifica para el antígeno HA de CDV optimizada mediante la substitución de la secuencia que codifica para la señal de HA por una secuencia nucleotídica que codifica para la señal tPA humana, mediante la eliminación del fragmento de la secuencia nucleotídica que codifica para el dominio transmembrana de HA y mediante la inserción del intrón II del gen de la beta-globina del conejo en dirección 5' de la secuencia nucleotídica que codifica para HA, y de un segundo plásmido de expresión que contiene una secuencia nucleotídica que codifica para el antígeno F de CDV optimizada mediante la eliminación del fragmento de la secuencia nucleotídica que codifica para el dominio transmembrana de F y mediante la inserción del intrón II de la beta-globina del conejo en dirección 5' de la secuencia nucleotídica que codifica para F.
- 50 **17.** Vacuna según la reivindicación 16, que comprende además un plásmido de expresión que codifica para el GM-CSF canino.

Figura 1

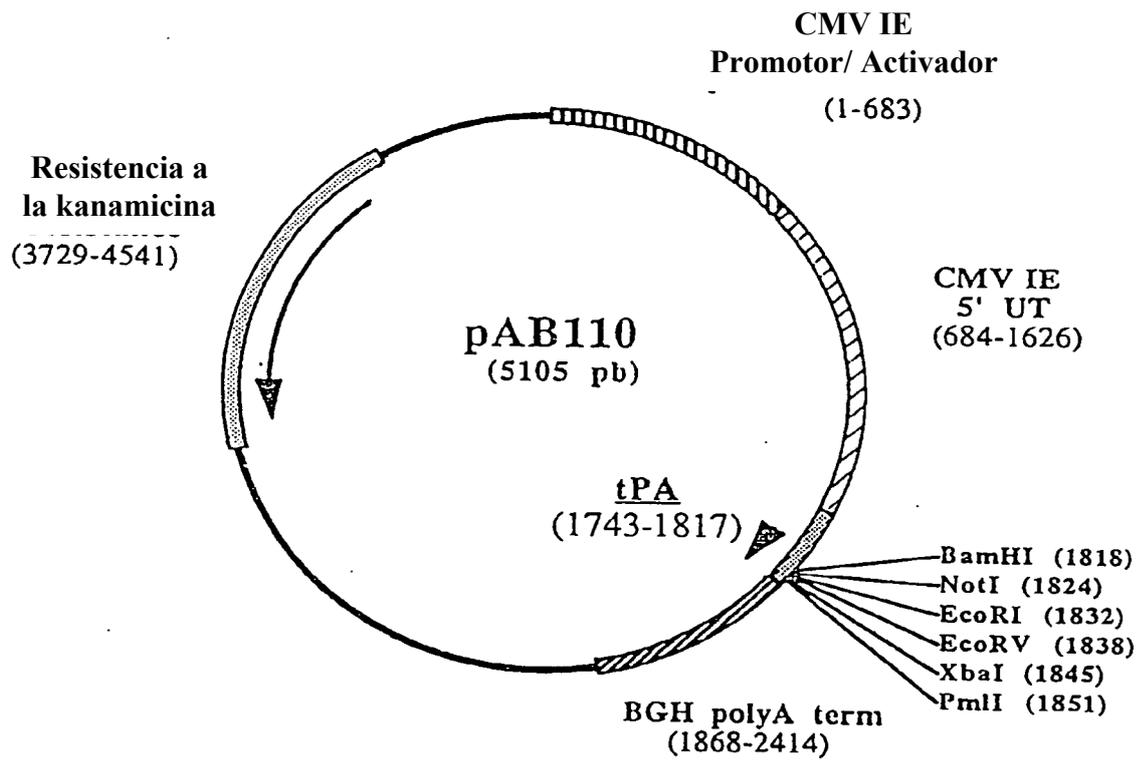


Figura 2

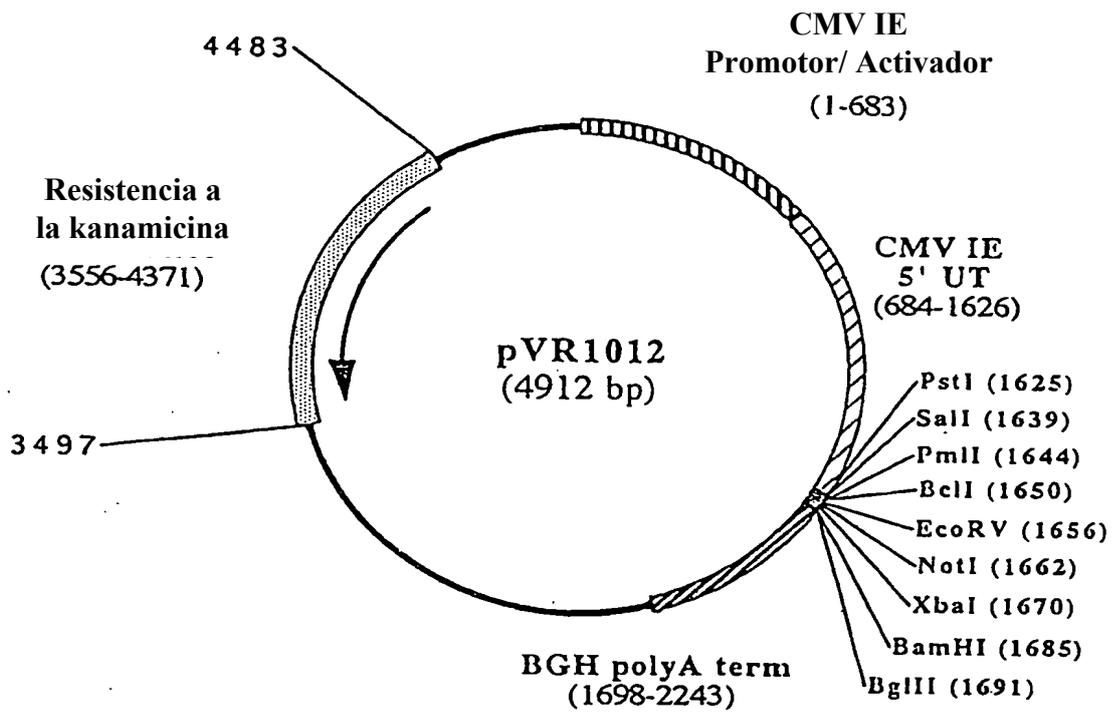


Figura 3

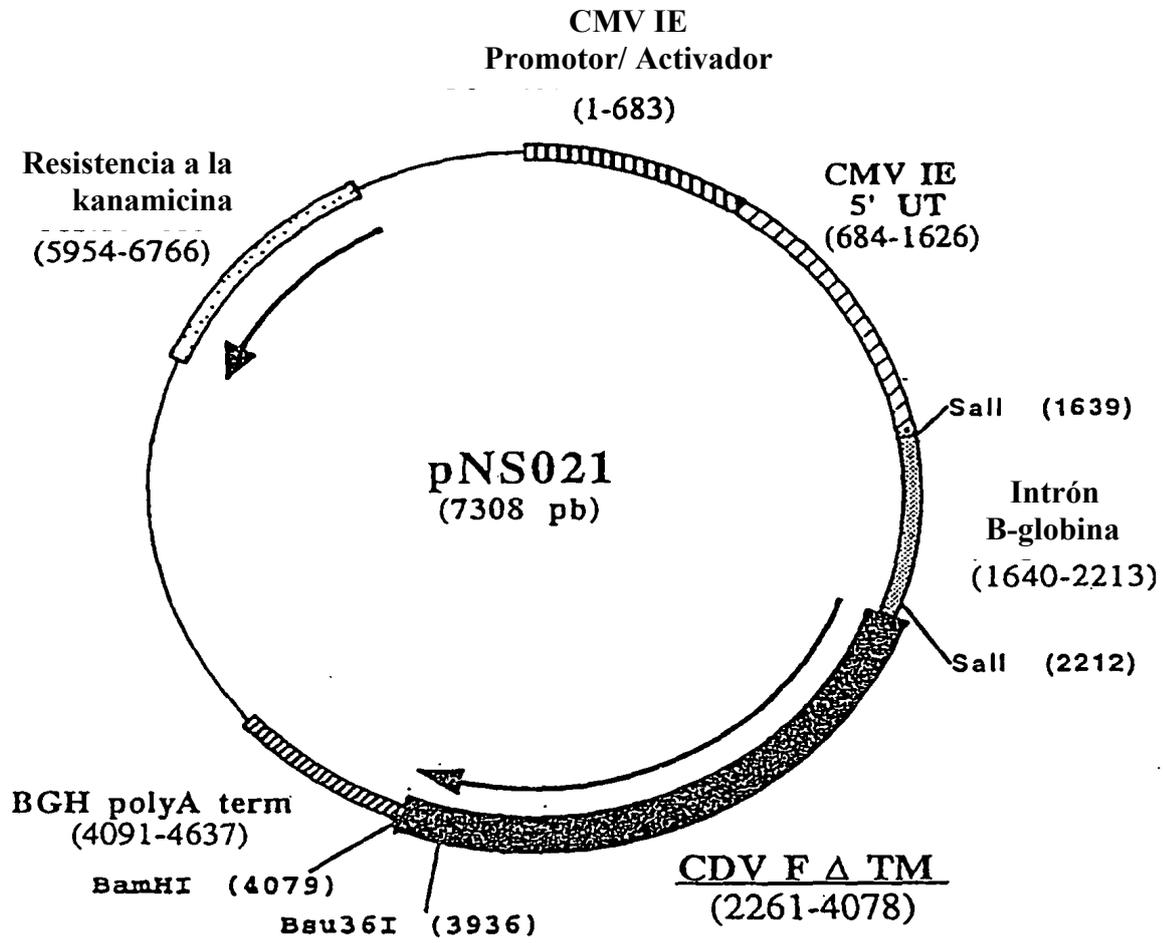


Figura 4

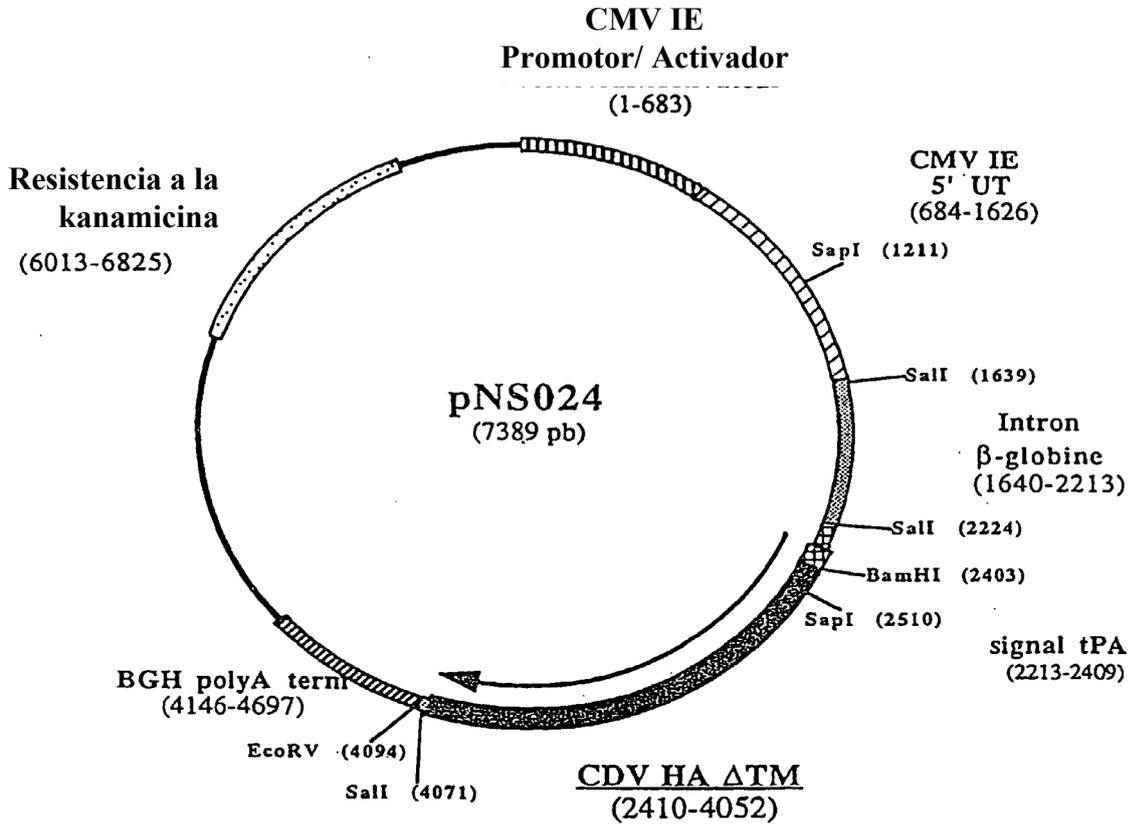


Figura 5

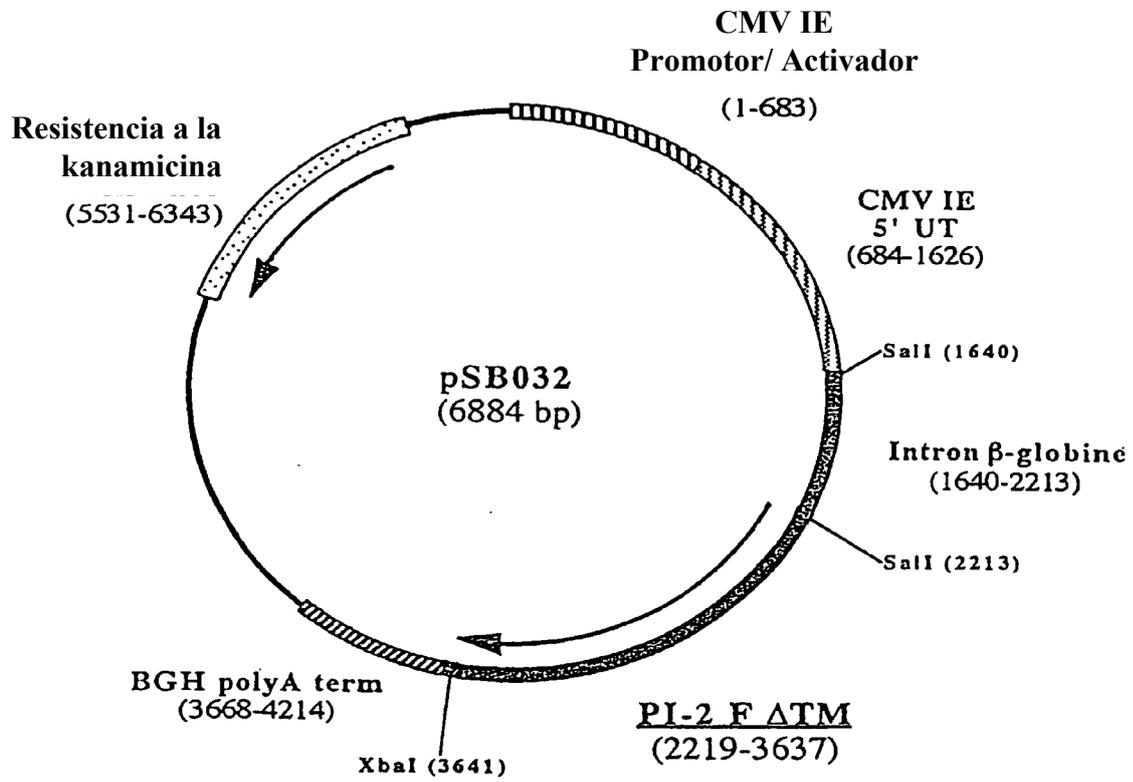


Figura 6

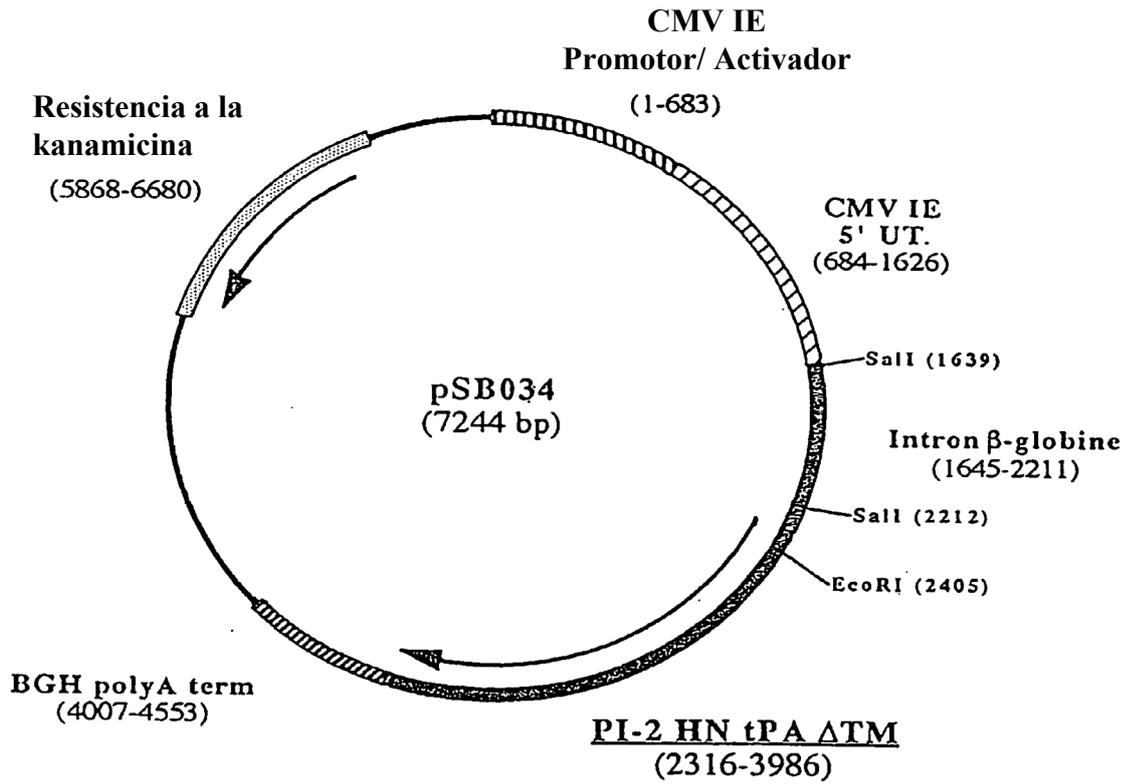


Figura 7

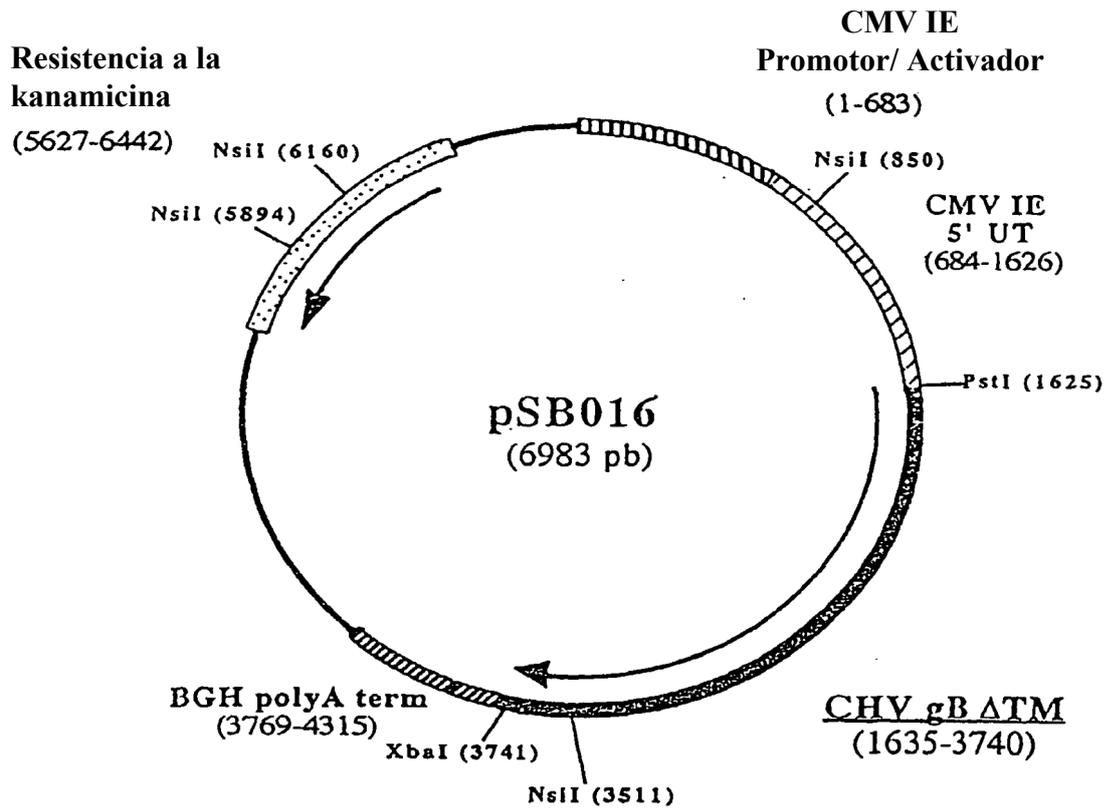


Figura 8

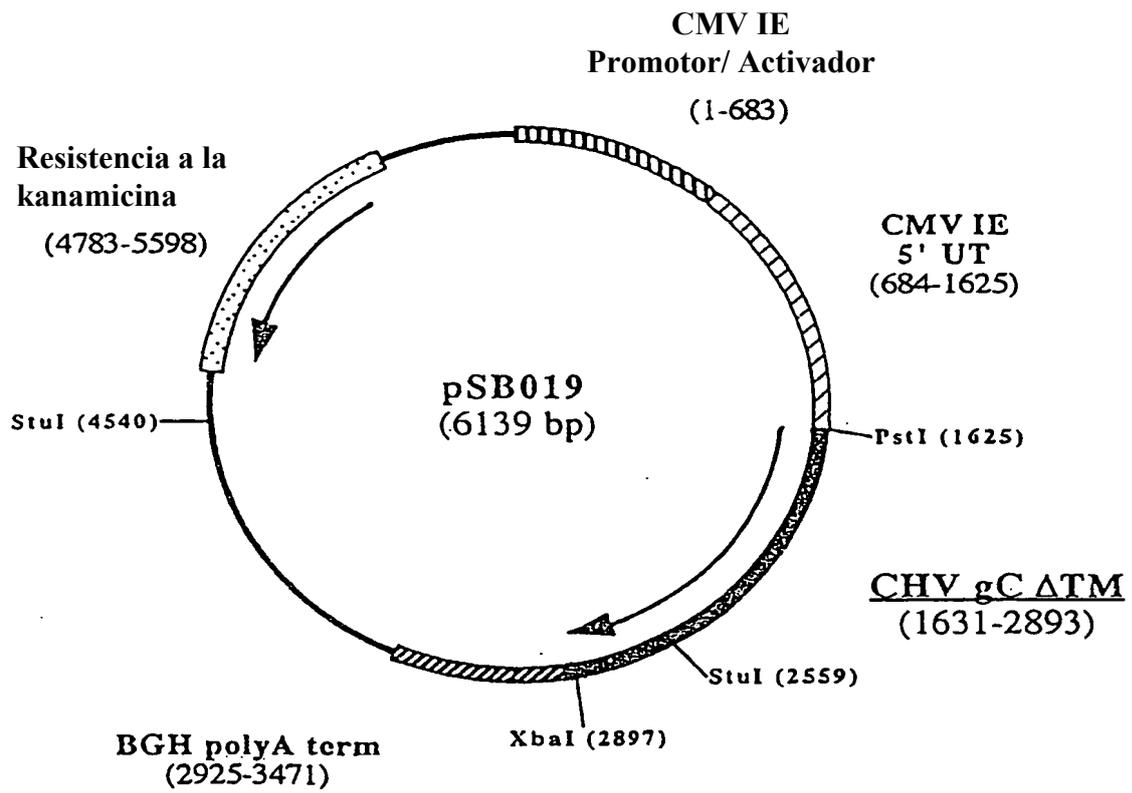


Figura 9

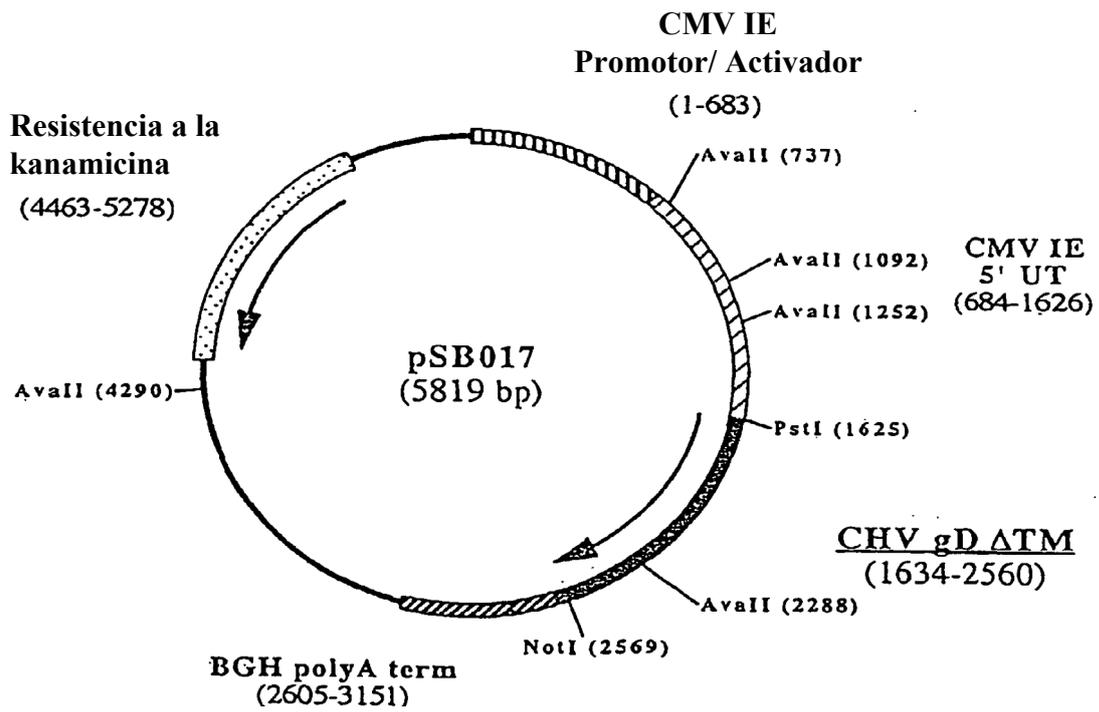


Figura 10

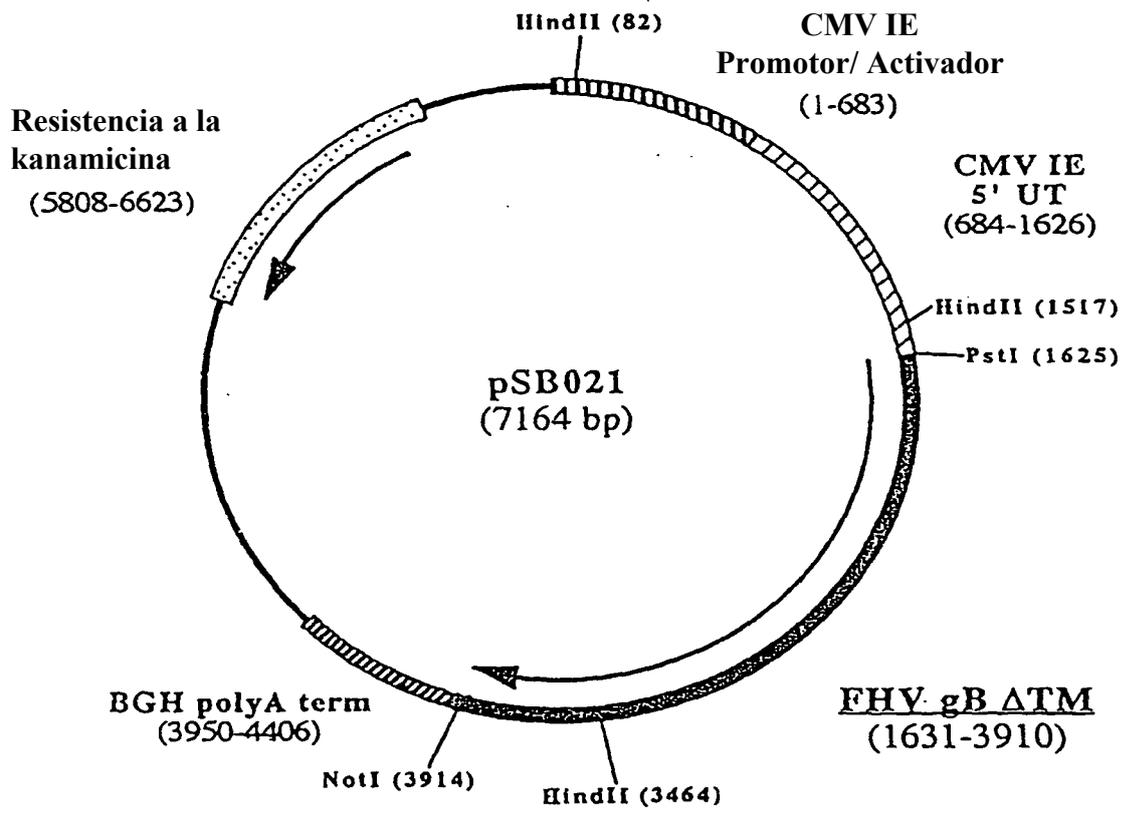


Figura 11

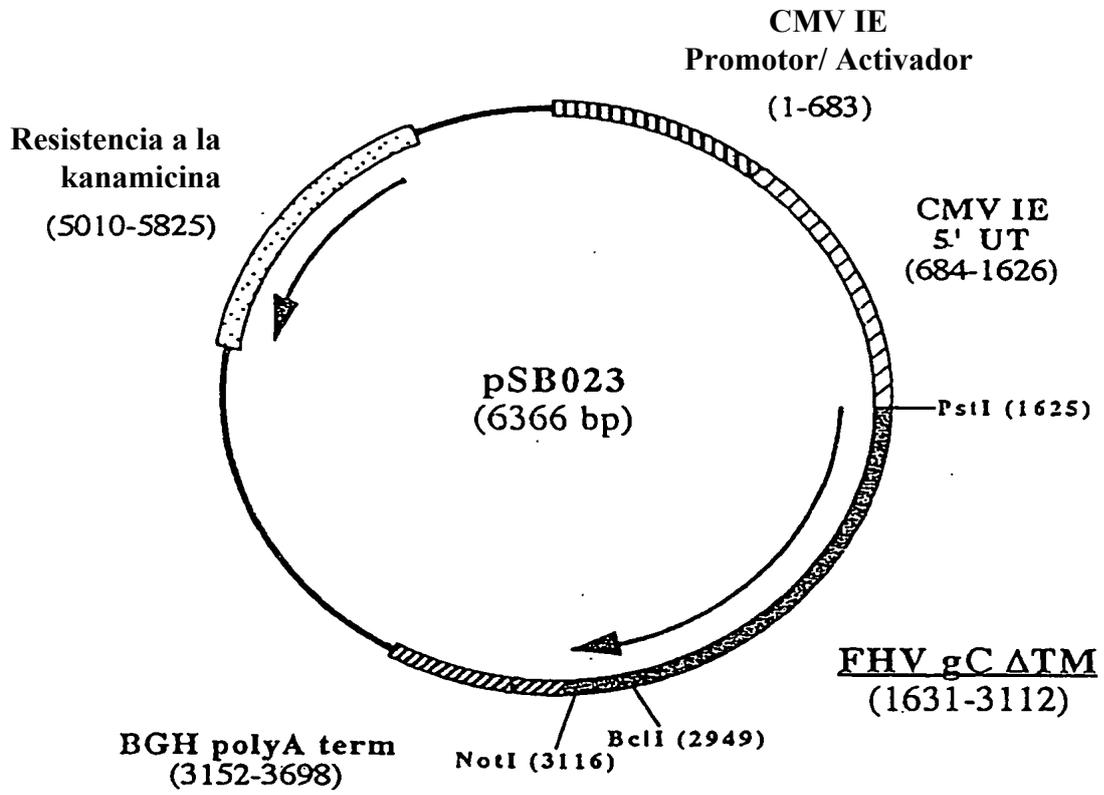


Figura 12

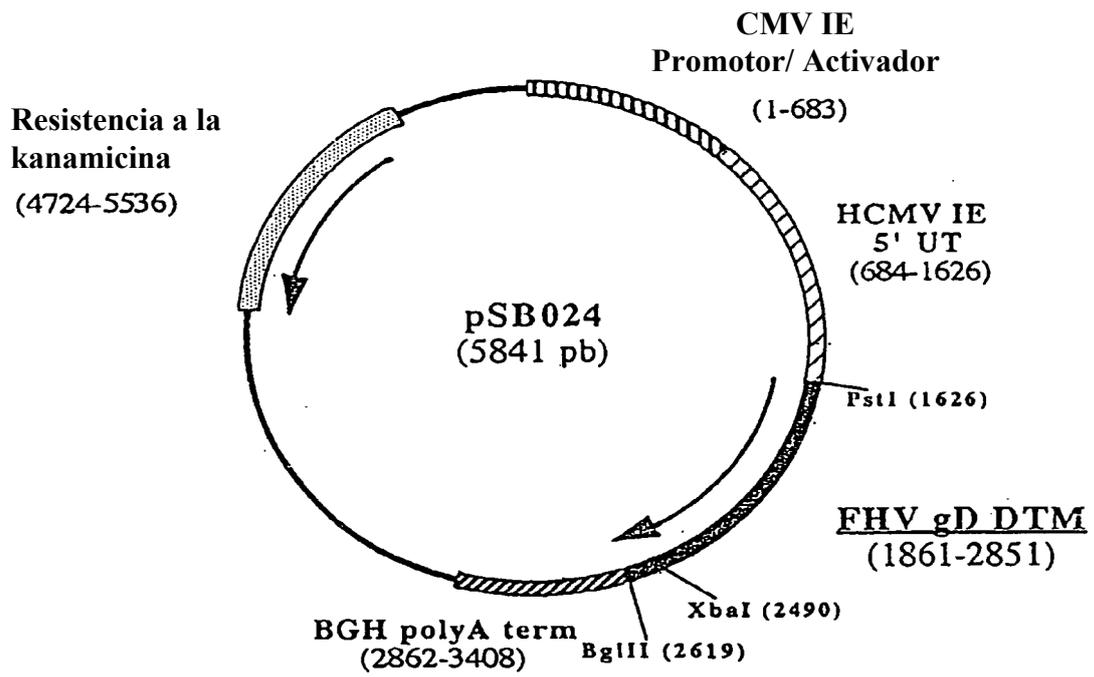


Figura 13

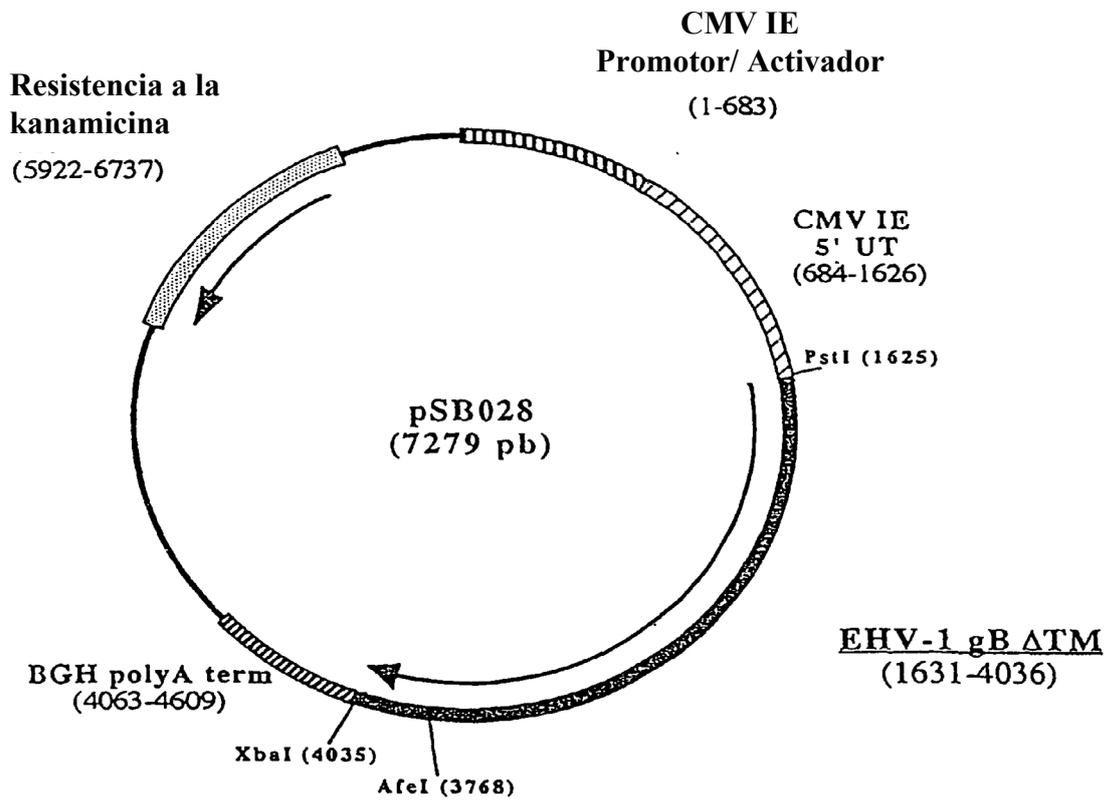


Figura 14

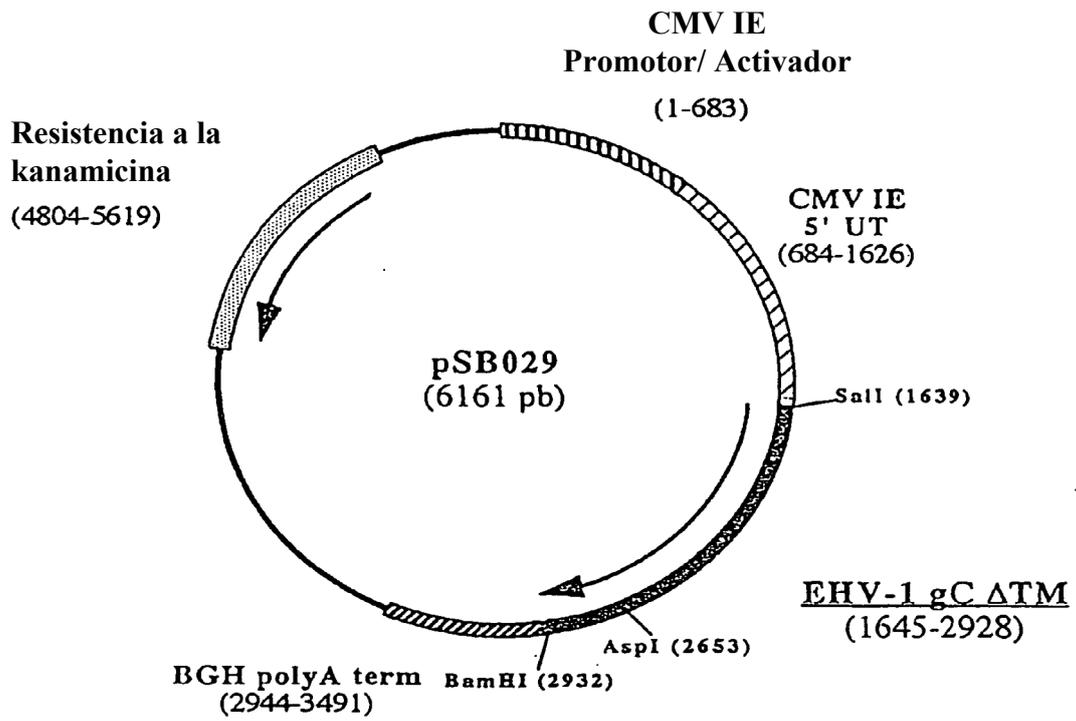


Figura 15

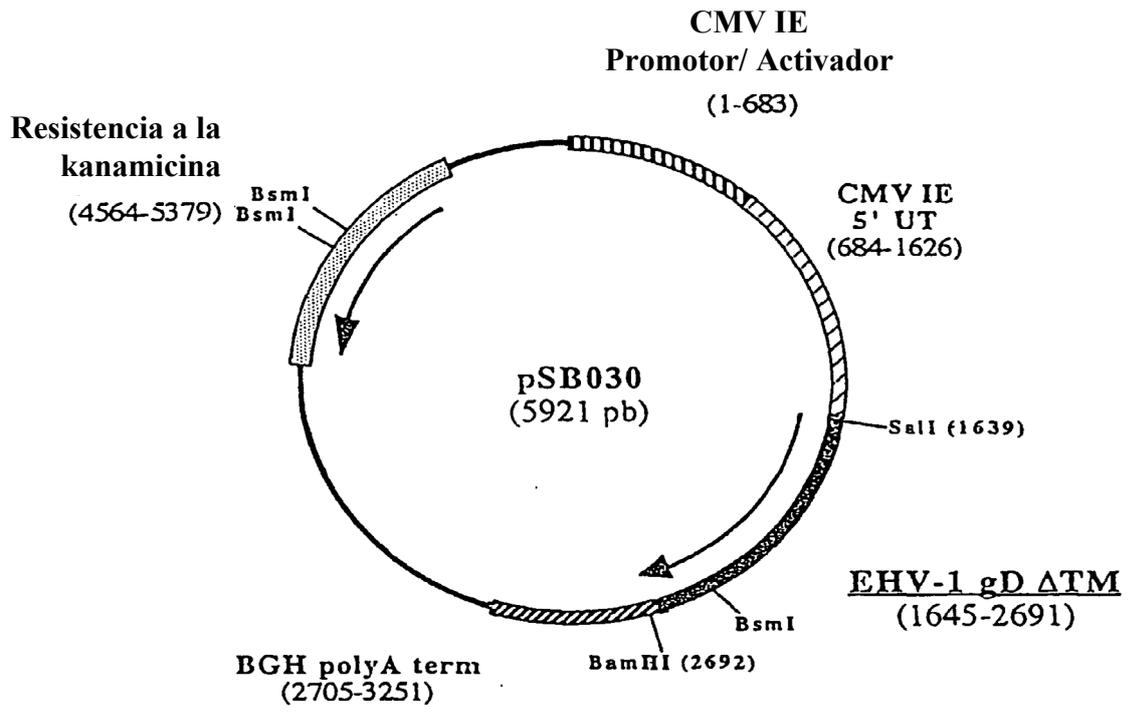


Figura 16

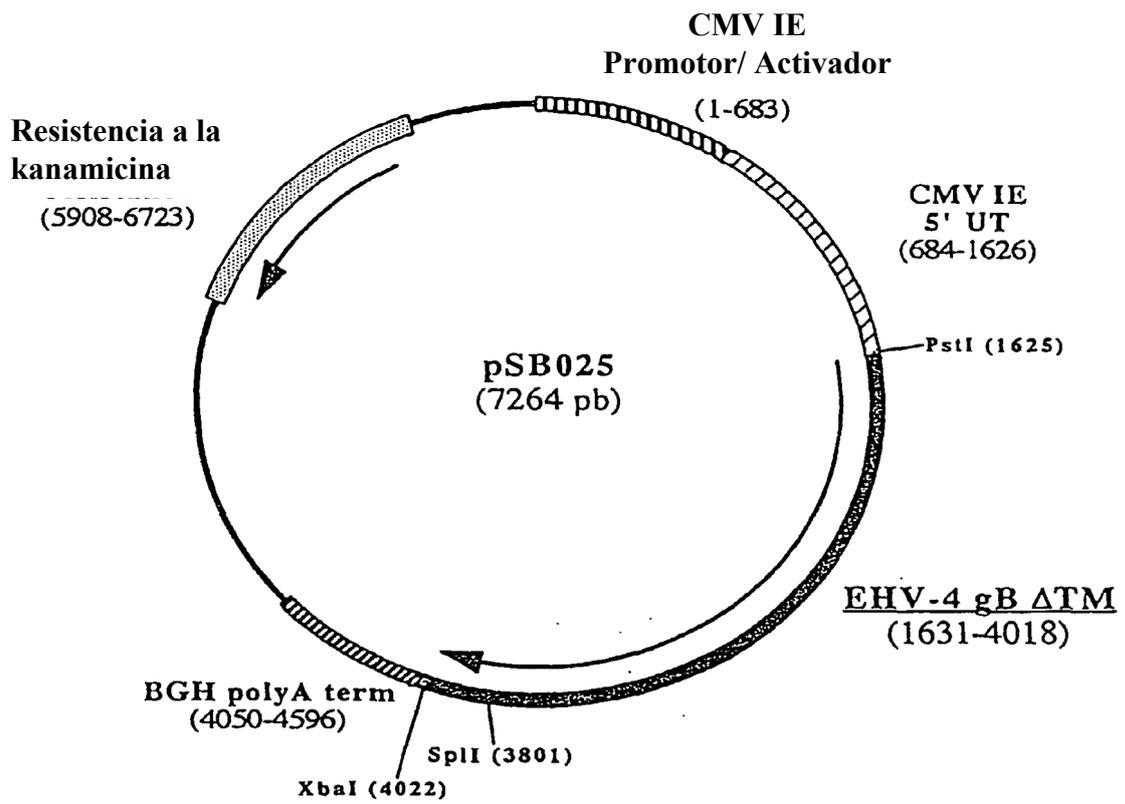


Figura 17

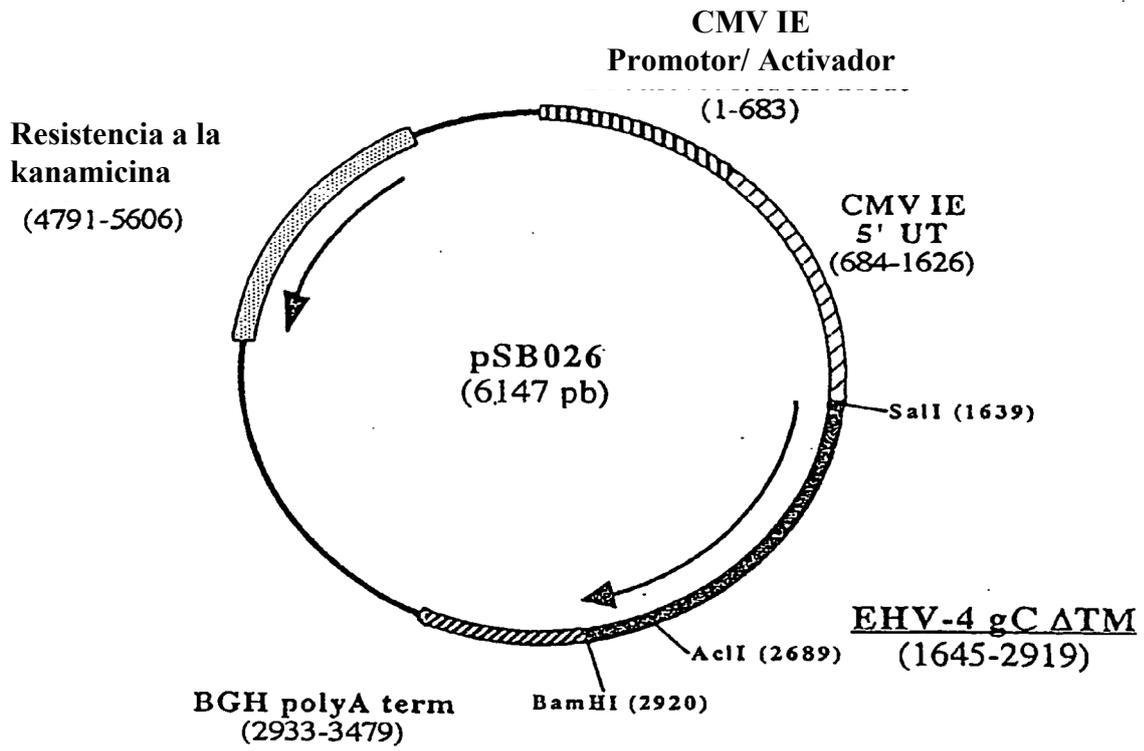


Figura 18

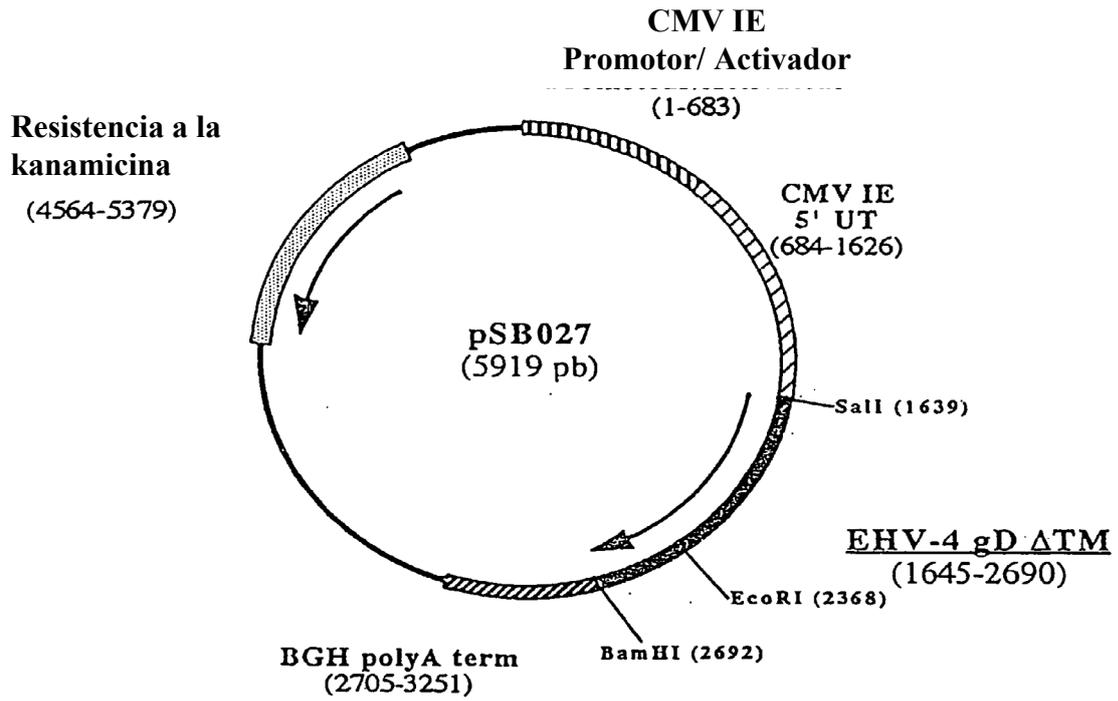


Figura 19

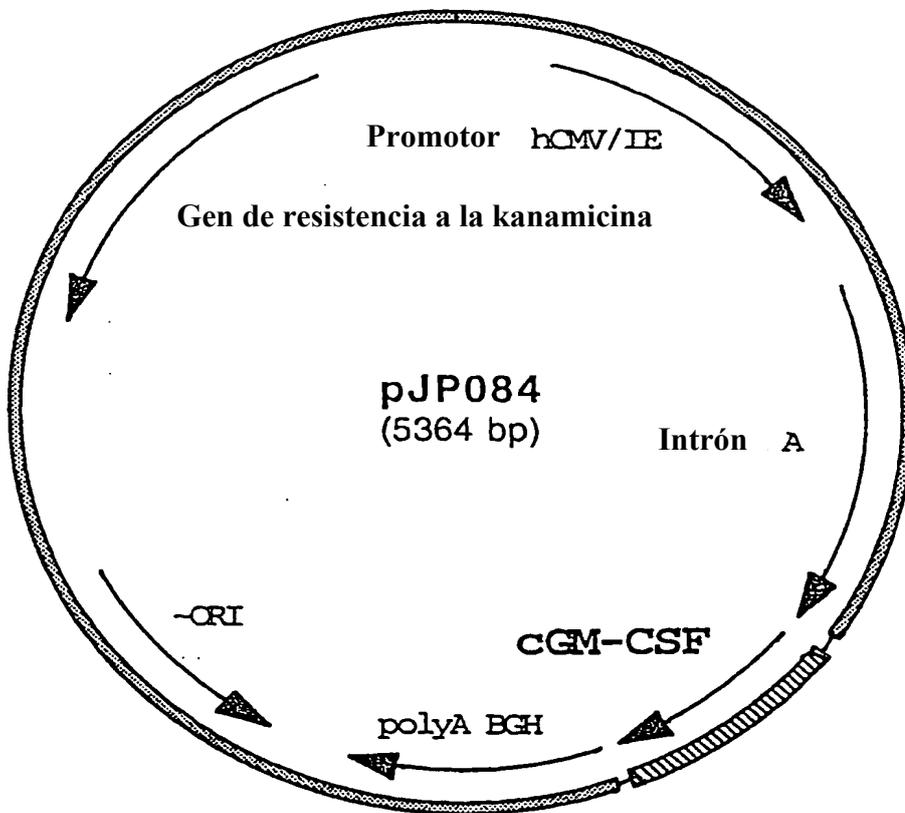


Figura 20

```

1909 ATG TGG CTG CAG AAC CTG CTT TTC TTG GGC ACT GTG GTC TGC AGC ATC TCT GCA CCC
    TAC ACC GAC GTC TTG GAC GAA AAG AAC CCG TGA CAC CAG ACG TCG TAG AGA CGT GGG
    1▶ Met Trp Leu Gln Asn Leu Leu Phe Leu Gly Thr Val Val Cys Ser Ile Ser Ala Pro
1966 ACC CGC TCA CCC ACC CTT GTC ACT CGG CCC TCT CAG CAC GTG GAT GCC ATC CAG GAA
    TGG CCG AGT GGG TGG GAA CAG TGA GCC GGG AGA GTC GTG CAC CTA CGG TAG GTC CTT
    20▶ Thr Arg Ser Pro Thr Leu Val Thr Arg Pro Ser Gln His Val Asp Ala Ile Gln Glu
2023 GCC CTG AGC CTT TTG AAC AAC AGT AAT GAC GTG ACT GCT GTG ATG AAT AAA GCA GTA
    CGG GAC TCG GAA AAC TTG TTG TCA TTA CTG CAC TGA CGA CAC TAC TTA TTT CGT CAT
    39▶ Ala Leu Ser Leu Leu Asn Asn Ser Asn Asp Val Thr Ala Val Met Asn Lys Ala Val
2080 AAA GTG GTC TCT GAA GTG TTT GAC CCT GAG GGG CCA ACA TGC CTG GAG ACC CGC CTA
    TTT CAC CAG AGA CTT CAC AAA CTG GGA CTC CCC GGT TGT ACG GAC CTC TGG GCG GAT
    58▶ Lys Val Val Ser Glu Val Phe Asp Pro Glu Gly Pro Thr Cys Leu Glu Thr Arg Leu
2137 CAG CTG TAC AAG GAG GGC CTG CAG GGC AGC CTC ACC AGC CTC AAG AAT CCC TTA ACC
    GTC GAC ATG TTC CTC CCG GAC GTC CCG TCG GAG TGG TCG GAG TTC TTA GGG AAT TGG
    77▶ Gln Leu Tyr Lys Glu Gly Leu Gln Gly Ser Leu Thr Ser Leu Lys Asn Pro Leu Thr
2194 ATG ATG GCC AAT CAC TAT AAG CAG CAC TGT CCC CCT ACC CCG GAA TCT CCC TGT GCA
    TAC TAC CCG TTA GTG ATA TTC GTC GTG ACA GGG GGA TGG GGC CTT AGA GGG ACA CGT
    96▶ Met Met Ala Asn His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Ser Pro Cys Ala
2251 ACC CAG AAT ATT AAC TTC AAA AGT TTC AAA GAG AAC CTG AAG GAT TTT CTG TTT AAC
    TGG GTC TTA TAA TTG AAG TTT TCA AAG TTT CTC TTG GAC TTC CTA AAA GAC AAA TTG
    115▶ Thr Gln Asn Ile Asn Phe Lys Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Phe Asn
2308 ATC CCC TTT GAC TGC TGG AAA CCA GTC AAG AAG TGA
    TAG GGG AAA CTG ACG ACC TTT GGT CAG TTC TTC ACT
    134▶ Ile Pro Phe Asp Cys Trp Lys Pro Val Lys Lys ...

```

Figura 21

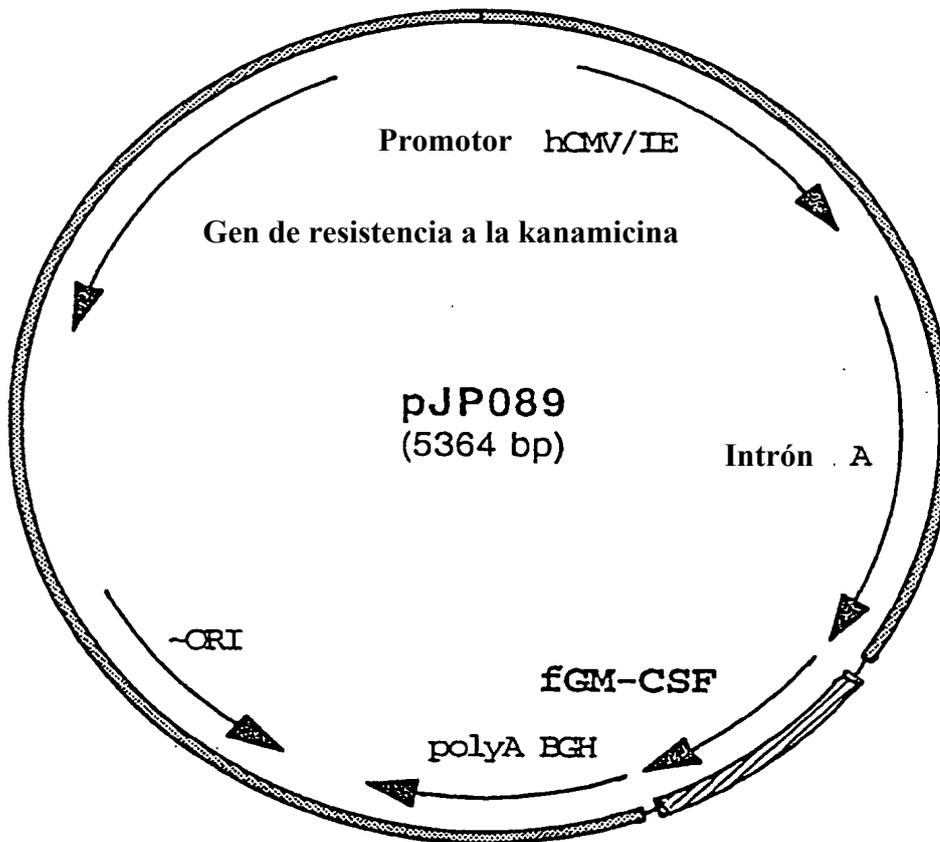


Figura 22

```

1909 ATG TGG CTG CAG AAC CTG CTT TTC CTG GGC ACT GTG GTC TGC AGC ATC TCT GCA CCC
    TAC ACC GAC GTC TTG GAC GAA AAG GAC CCG TGA CAC CAG ACG TCG TAG AGA CGT GGG
    1▶Met Trp Leu Gln Asn Leu Leu Phe Leu Gly Thr Val Val Cys Ser Ile Ser Ala Pro
1966 ACC AGT TCA CCC AGC TCT GTC ACT CGG CCC TGG CAA CAC GTG GAT GCC ATC AAG GAG
    TGG TCA AGT GGG TCG AGA CAG TGA GCC GGG ACC GTT GTG CAC CTA CGG TAG TTC CTC
    20▶Thr Ser Ser Pro Ser Ser Val Thr Arg Pro Trp Gln His Val Asp Ala Ile Lys Glu
2023 GCT CTG AGC CTT CTG AAC AAC AGT AGT GAA ATA ACT GCT GTG ATG AAT GAA GCA GTA
    CGA GAC TCG GAA GAC TTG TTG TCA TCA CTT TAT TGA CGA CAC TAC TTA CTT CGT CAT
    39▶Ala Leu Ser Leu Leu Asn Asn Ser Ser Glu Ile Thr Ala Val Met Asn Glu Ala Val
2080 GAA GTC GTC TCT GAA ATG TTT GAC CCT GAG GAG CCG AAA TGC CTG CAG ACT CAC CTA
    CTT CAG CAG AGA CTT TAC AAA CTG GGA CTC CTC GGC TTT ACG GAC GTC TGA GTG GAT
    58▶Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp Pro Glu Glu Pro Lys Cys Leu Gln Thr His Leu
2137 AAG CTG TAC GAG CAG GGC CTA CCG GGC AGC CTC ATC AGC CTC AAG GAG CCT CTG AGA
    TTC GAC ATG CTC GTC CCG GAT GCC CCG TCG GAG TAG TCG GAG TTC CTC GGA GAC TCT
    77▶Lys Leu Tyr Glu Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Ile Ser Leu Lys Glu Pro Leu Arg
2194 ATG ATG GCC AAC CAT TAC AAG CAG CAC TGC CCC TTT ACT CCG GAA ACG CCC TGT GAA
    TAC TAC CGG TIG GTA ATG TTC GTC GTG ACG GGG AAA TGA GGC CTT TGC GGG ACA CTT
    96▶Met Met Ala Asn His Tyr Lys Gln His Cys Pro Phe Thr Pro Glu Thr Pro Cys Glu
2251 ACC CAG ACT ATC ACC TTC AAA AAT TTC AAA GAG AAT CTG AAG GAT TTT CTG TTT AAC
    TGG GTC TGA TAG TGG AAG TTT TTA AAG TTT CTC TTA GAC TTC CTA AAA GAC AAA TTG
    115▶Thr Gln Thr Ile Thr Phe Lys Asn Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Phe Asn
2308 ATC CCC TTT GAC TGC TGG AAA CCA GTC AAG AAG TGA
    TAG GGG AAA CTG ACG ACC TTT GGT CAG TTC TTC ACT
    134▶Ile Pro Phe Asp Cys Trp Lys Pro Val Lys Lys ...

```

Figura 23

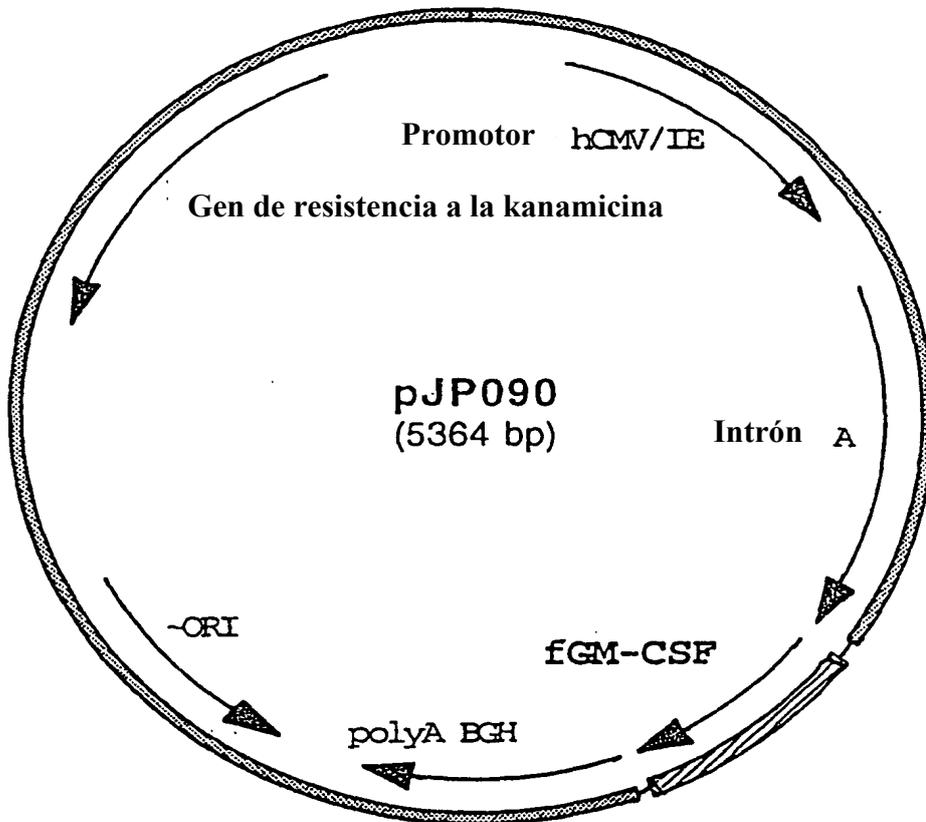


Figura 24

1909 ATG TGG CTG CAG AAC CTG CTT TTC CTG GGC ACT GTG GTC TGC AGC ATC TCT GCA CCC
 TAC ACC GAC GTC TTG GAC GAA AAG GAC CCG TGA CAC CAG ACG TCG TAG AGA CGT GGG
 1►Met Trp Leu Gln Asn Leu Leu Phe Leu Gly Thr Val Val Cys Ser Ile Ser Ala Pro
 1966 ACC AGT TCA CCC AGC TCT GTC ACT CGG CCC TGG CAA CAC GTG GAT GCC ATC AAG GAG
 TGG TCA AGT GGG TCG AGA CAG TGA GCC GGG ACC GTT GTG CAC CTA CGG TAG TTC CTC
 20►Thr Ser Ser Pro Ser Ser Val Thr Arg Pro Trp Gln His Val Asp Ala Ile Lys Glu
 2023 GCT CTG AGC CTT CTG AAC AAC AGT AGT GAA ATA ACT GCT GTG ATG AAT GAA GCA GTA
 CGA GAC TCG GAA GAC TTG TTG TCA TCA CTT TAT TGA CGA CAC TAC TTA CTT CGT CAT
 39►Ala Leu Ser Leu Leu Asn Asn Ser Ser Glu Ile Thr Ala Val Met Asn Glu Ala Val
 2080 GAA GTC GTC TCT GAA ATG TTT GAC CCT GAG GAG CCG AAA TGC CTG CAG ACT CAC CTA
 CTT CAG CAG AGA CTT TAC AAA CTG GGA CTC CTC GGC TTT ACG GAC GTC TGA GTG GAT
 58►Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp Pro Glu Glu Pro Lys Cys Leu Gln Thr His Leu
 2137 AAG CTG TAC GAG CAG GGC CTA CGG GGC AGC CTC ATC AGC CTC AAG GAG CCT CTG AGG
 TTC GAC ATG CTC GTC CCG GAT GCC CCG TCG GAG TAG TCG GAG TTC CTC GGA GAC TCC
 77►Lys Leu Tyr Glu Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Ile Ser Leu Lys Glu Pro Leu Arg
 2194 ATG ATG GCC AAC CAT TAC AAG CAG CAC TGC CCC CTT ACT CCG GAA ACG CCC TGT GAA
 TAC TAC CGG TTG GTA ATG TTC GTC GTG ACG GGG GAA TGA GGC CTT TGC GGG ACA CTT
 96►Met Met Ala Asn His Tyr Lys Gln His Cys Pro Leu Thr Pro Glu Thr Pro Cys Glu
 2251 ACC CAG ACT ATC ACC TTC AAA AAT TTC AAA GAG AAT CTG AAG GAT TTT CTG TTT AAC
 TGG GTC TGA TAG TGG AAG TTT TTA AAG TTT CTC TTA GAC TTC CTA AAA GAC AAA TTG
 115►Thr Gln Thr Ile Thr Phe Lys Asn Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Phe Asn
 2308 ATC CCC TTT GAC TGC TGG AAA CCA GTC AAG AAG TGA
 TAG GGG AAA CTG ACG ACC TTT GGT CAG TTC TTC ACT
 134►Ile Pro Phe Asp Cys Trp Lys Pro Val Lys Lys ...

Figura 25

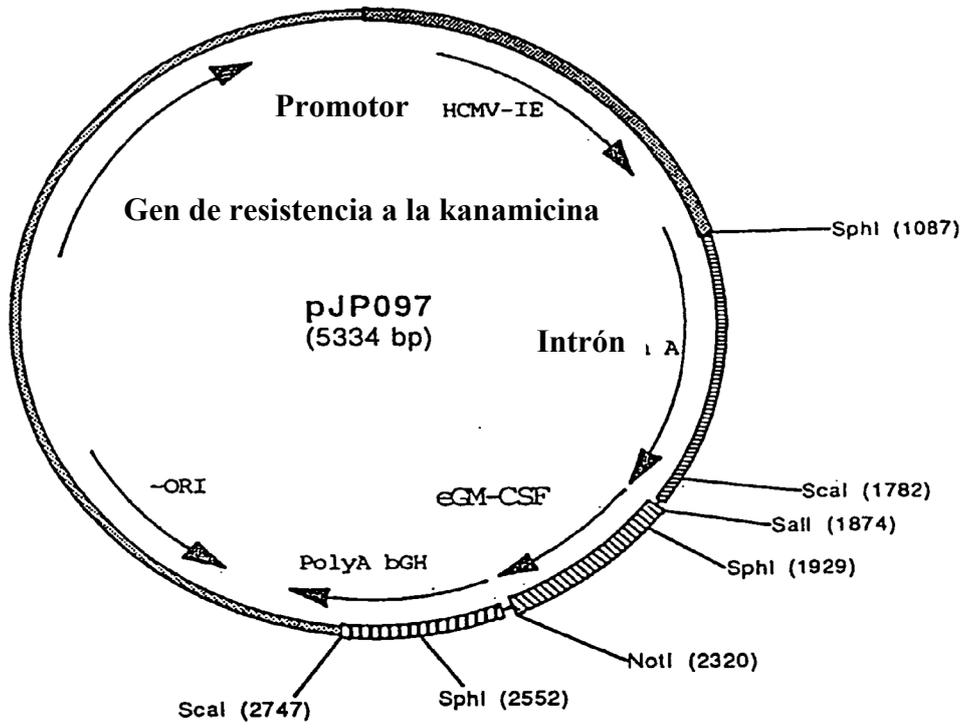


Figura 26

```

1  ATG TGG CTG CAG AAC CTG CTT CTT CTG GGC ACT GTG GTT TAC AGC ATG OCC GCA OCC ACC
   TAC ACC GAC GTC TTG GAC GAA GAA GAC CCG TGA CAC CAA ATG TCG TAC GGG CGT GGG TGG
1▶ M  W  L  Q  N  L  L  L  L  G  T  V  V  Y  S  M  P  A  P  T

61  GGC CAA CCC AGC CCT GTC ACT CCG CCC TGG CAG CAT GTG GAT GCC ATC AAG GAG GCC CTG
   GCG GTT GGG TCG GGA CAG TGA GCC GGG ACC GTC GTA CAC CTA CCG TAG TTC CTC CGG GAC
21▶ R  Q  P  S  P  V  T  R  P  W  Q  H  V  D  A  I  K  E  A  L

121 AGC CTT CTG AAC AAC AGT AGT GAC ACT GCT GCT ATC ATG AAT GAA ACA GTA GAA GTC GTC
   TCG GAA GAC TTG TTG TCA TCA CTG TGA CGA CGA TAG TAC TTA CTT TGT CAT CTT CAG CAG
41▶ S  L  L  N  N  S  S  D  T  A  A  I  M  N  E  T  V  E  V  V

181 TCT GAA ACG TTT GAC GCC GAG GAG CTG ACA TGC CTG CAG ACT CGC CTG AAG CTG TAC AAA
   AGA CTT TGC AAA CTG GCG CTC CTC GAC TGT ACG GAC GTC TGA GCG GAC TTC GAC ATG TTT
61▶ S  E  T  F  D  A  E  E  L  T  C  L  Q  T  R  L  K  L  Y  K

241 CAG GGC TTG CCG GGC AGC CTC ATC AAG CTC GAA GGC CCC TTG ACC ATG ATG GCC AGC CAC
   GTC CCG AAC GCC CCG TCG GAG TAG TTC GAG CTT CCG GCG AAC TGG TAC TAC CCG TCG GTG
81▶ Q  G  L  R  G  S  L  I  K  L  E  G  P  L  T  M  M  A  S  H

301 TAC AAG CAG CAC TGC CCC CCC ACC CTG GAA ACT TCC TGT GCA ACC CAG ATG ATC ACC TTC
   ATG TTC GTC GTG ACG GGG GGG TGG GAC CTT TGA ACG ACA CGT TGG GTC TAC TAG TGG AAG
101▶ Y  K  Q  H  C  P  P  T  L  E  T  S  C  A  T  Q  M  I  T  F

361 AAA AGT TTC AAA AAG AAC CTG AAG GAT TTT CTG TTT GAG ATC CCG TTT GAC TGC TGG AAG
   TTT TCA AAG TTT TTC TTG GAC TTC CTA AAA GAC AAA CTC TAG GGC AAA CTG ACG ACC TTC
121▶ K  S  F  K  K  N  L  K  D  F  L  F  E  I  P  F  D  C  W  K

421 CCA GCC CAG AAG TAA
   GGT CCG GTC TTC ATT
141▶ P  A  Q  K

```

Figura 27

1 ATGGGTACTATAATTC AATTCTGGTGGTCTCTCTGCTATTGGCAGGAGCAGGCAGCCTTGATCTAGCAGCCECTC
 1▶ MetGlyThrIleIleGlnPheLeuValValSerCysLeuLeuAlaGlyAlaGlySerLeuAspLeuAlaAlaLeu
 76 ATGCAAATCGGTGTCATTCCAACAAATGTCCGGCAACTTATGTATTATACTGAGGCCCTCATCAGCATTTCATTGTT
 26▶ MetGlnIleGlyValIleProThrAsnValArgGlnLeuMetTyrTyrThrGluAlaSerSerAlaPheIleVal
 151 GTGAAGTTAATGCCTACAATTGACTCGCCGATTAGTGGATGTAATATAACATCAATTTCAAGCTATAATGCAACA
 51▶ ValLysLeuMetProThrIleAspSerProIleSerGlyCysAsnIleThrSerIleSerSerTyrAsnAlaThr
 226 GTGACAAAACCTCTACAGCCGATCGGTGAGAATTTGGAAACGATTAGGAACCAGTTGATTCCAACCTCGGAGGAGA
 76▶ ValThrLysLeuLeuGlnProIleGlyGluAsnLeuGluThrIleArgAsnGlnLeuIleProThrArgArgArg
 301 CGCCGGTTTGCAGGGGTGGTATTGGATTAGCTGCATTAGGAGTAGCTACTGCCGCACAGGTCAGTCCGCAGTA
 101▶ ArgArgPheAlaGlyValValIleGlyLeuAlaAlaLeuGlyValAlaThrAlaAlaGlnValThrAlaAlaVal
 376 GCACTAGTAAAGGCAAATAAAAATGCTGCGGCTATACTCAATCTCAAAAATGCAATCCAAAAACAAATACAGCA
 126▶ AlaLeuValLysAlaAsnLysAsnAlaAlaAlaIleLeuAsnLeuLysAsnAlaIleGlnLysThrAsnThrAla
 451 GTTGACAGATGTGGTCCAGGCCACACAATCAGTAGGAACCGCAGTTCAAGCAGTTCAAGATCATAAAACAGTGTG
 151▶ ValAlaAspValValGlnAlaThrGlnSerLeuGlyThrAlaValGlnAlaValGlnAspHisIleAsnSerVal
 526 GTAAGTCCAGCAATTACAGCAGCCAATGTAAAGCCCAAGATGCATCATTGGCTCAATCCTCAATCTCTATTTG
 176▶ ValSerProAlaIleThrAlaAlaAsnCysLysAlaGlnAspAlaIleIleGlySerIleLeuAsnLeuTyrLeu
 601 ACCGAGTTGACAACACTATCTTCCACAATCAAATTCAAAACCTGCATTGAGTCTATTACAATCAAGCTTTAAGG
 201▶ ThrGluLeuThrThrIlePheHisAsnGlnIleThrAsnProAlaLeuSerProIleThrIleGlnAlaLeuArg
 676 ATCCTACTGGGGAGTACCTTGGCCGACTGTGGTTCGAAAAATCTTTCAATACCCAGATAAGTGCAGCTGAGCTTCTC
 226▶ IleLeuLeuGlySerThrLeuProThrValValGluLysSerPheAsnThrGlnIleSerAlaAlaGluLeuLeu
 751 TCATCAGGGTTATTGACAGGCCAGATTGTTGGATTAGATTGACCTATATGCAGATGGTCATAAAAATGAGCTG
 251▶ SerSerGlyLeuLeuThrGlyGlnIleValGlyLeuAspLeuThrTyrMetGlnMetValIleLysIleGluLeu
 826 CCAACTTTAACTGTACAACCTGCAACCCAGATCATAGATCTGGCCACCATTCTGCATTTCATTAACAATCAAGAA
 276▶ ProThrLeuThrValGlnProAlaThrGlnIleIleAspLeuAlaThrIleSerAlaPheIleAsnAsnGlnGlu
 901 GTCATGGCCCAATTACCAACACGTGTTATGTGACTGGCAGCTTGATCCAAGCCTATCCCGCATCGCAATGCACT
 301▶ ValMetAlaGlnLeuProThrArgValIleValThrGlySerLeuIleGlnAlaTyrProAlaSerGlnCysThr
 976 ATTACACCCACACTGTGTACTGTAGGTATAATGATGCCCAAGTACTCTCAGATGATACGATGGCTTGCCCTCCAA
 326▶ IleThrProAsnThrValTyrCysArgTyrAsnAspAlaGlnValLeuSerAspAspThrMetAlaCysLeuGln
 1051 GGTAACCTGACAAGATGCACCTTCTCTCCAGTGGTGGGAGCTTTCTACTCGATTCTGCTGTTTCGATGGAATA
 351▶ GlyAsnLeuThrArgCysThrPheSerProValValGlySerPheLeuThrArgPheValLeuPheAspGlyIle
 1126 GTTTATGCAAATGTCAGGTGCGATGTTATGCAAGTGCATGCAGCCTGCTGCTGTGATCCTACAGCCGAGTTCATCC
 376▶ ValTyrAlaAsnCysArgSerMetLeuCysLysCysMetGlnProAlaAlaValIleLeuGlnProSerSerSer
 1201 CCTGTAACCTGTCATTGACATGTACAAATGTGTGAGTCTGCAGCTTGACAATCTCAGATTACCATCACTCAATTG
 401▶ ProValThrValIleAspMetTyrLysCysValSerLeuGlnLeuAspAsnLeuArgPheThrIleThrGlnLeu

 1276 GCCAATGTAACCTACAATAGCACCATCAAGCTTGAAACATCCAGATCTTGCCCTATTGATCCGTTGGATATATCC
 426▶ AlaAsnValThrTyrAsnSerThrIleLysLeuGluThrSerGlnIleLeuProIleAspProLeuAspIleSer
 1351 CAGAATCTAGCTGCGGTGAATAAGAGTCTAAGTGTACTGCACTACAACACTTAGCACAAAAGTGACACATACCTTTCT
 451▶ GlnAsnLeuAlaAlaValAsnLysSerLeuSerAspAlaLeuGlnHisLeuAlaGlnSerAspThrTyrLeuSer
 1426 GCAATCACAATCAGCTACGACTACAAGTGTATTATCCATAATGGCAATCTGTCTTGGATCGTTAGGTTTAAATATTA
 476▶ AlaIleThrSerAlaThrThrThrSerValLeuSerIleMetAlaIleCysLeuGlySerLeuGlyLeuIleLeu
 1501 ATAATCTTGCTCAGTGTAGTGTGTGGAAGTTATTGACCATTGTCAGTCTAATCGAAATAGAATGGAGAATTTT
 501▶ IleIleLeuLeuSerValValValTrpLysLeuLeuThrIleValThrAlaAsnArgAsnArgMetGluAsnPhe
 1576 GTTTATCATAAATAA
 526▶ ValTyrHisLys...

Figura 28

1 ATGGTTGCAGAAGATGCCCTGTTAGGGGCACTTGCCGAGTATTATTTGAAACAACAACCTTTAATTTTTCT
 1 MetValAlaGluAspAlaProValArgGlyThrCysArgValLeuPheArgThrThrThrLeuIlePheLe
 72 ATGCACACTACTAGCATTAAAGCATCTCTATCCTTTATGAGAGTTTAATAACCCAAAAGCAAATCATGAGCC
 24 uCysThrLeuLeuAlaLeuSerIleSerIleLeuTyrGluSerLeuIleThrGlnLysGlnIleMetSerH
 143 ACGCAGGCTCAACTGGATCTAATTCTAGATTAGGAAGTATCACTGATCTTCTTAATAATATTCTCTCTGTC
 48 isAlaGlySerThrGlySerAsnSerArgLeuGlySerIleThrAspLeuLeuAsnAsnIleLeuSerVal
 214 GCAAATCAGATTATATAAATCTGACGCTGCTCTACCTCTACAATTGGACACTCTTGAATCAACACTCCT
 72 AlaAsnGlnIleIleTyrAsnSerAlaValAlaLeuProLeuGlnLeuAspThrLeuGluSerThrLeuLo
 285 TACAGCCATTAAGTCTCTTCAAACCAGTGACAAGCTAGAACAGAAGCTGCTCGTGGGGTCTGCACTGATTA
 95 uThrAlaIleLysSerLeuGlnThrSerAspLysLeuGluGlnAsnCysSerTrpGlyAlaAlaLeuIleA
 356 ATAATAATAGATACATTAATGGCATCAATCAGTTCTATTTCTCAATTGCTGAGGGTCCGCAATCTGACACT
 119 snAsnAsnArgTyrIleAsnGlyIleAsnGlnPheTyrPheSerIleAlaGluGlyArgAsnLeuThrLeu
 427 GGCCCACTTCTTAATATACCTAGTTTCATTCCAACTGCCACGACACCAGAGGGCTGCACCAGGATCCCATC
 143 GlyProLeuLeuAsnIleProSerPheIleProThrAlaThrThrProGluGlyCysThrArgIleProSe
 498 ATTCTCGCTCACCAAGACACACTGGTGTATACACACAATGTTATCCTGAATGGATGCCAGGATCATGTAT
 166 rPheSerLeuThrLysThrHisTrpCysTyrThrHisAsnValIleLeuAsnGlyCysGlnAspHisValS
 569 CCTCAAATCAATTTGTTTCCATGGGAATCATTGAACCCACTTCTGCCGGGTTTCCATCCTTTGCAACCTA
 190 erSerAsnGlnPheValSerMetGlyIleIleGluProThrSerAlaGlyPheProSerPheArgThrLeu
 640 AAGACTCTATATCTCAGCGATGGGGTCAATCGTAAGAGCTGCTCTATCAGTACAGTTCCGGGGGTTGTAT
 214 LysThrLeuTyrLeuSerAspGlyValAsnArgLysSerCysSerIleSerThrValProGlyGlyCysMe
 711 GATGTACTGTTTTGTCTCTACTCAACCAGAGGGGATGACTACTTTTTCTACCCTCCTCCAGAACAACGAA
 237 tMetTyrCysPheValSerThrGlnProGluArgAspAspTyrPheSerThrAlaProProGluGlnArgI
 782 TTATTATAATGTACTATAATGATACAATCGTGGAGCGCATAATTAATCCACCCGGGTACTAGATGTATGG
 261 leIleIleMetTyrTyrAsnAspThrIleValGluArgIleIleAsnProProGlyValLeuAspValTrp
 853 GCAACATTGACCCAGGAACAGGAAGCGGGTATATTATTTAGGTTGGGTGCTCTTTCCAATATATGGCGG
 285 AlaThrLeuThrProGlyThrGlySerGlyValTyrTyrLeuGlyTrpValLeuPheProIleTyrGlyGl
 924 CGTGATTAAGATACGAGTTTATGGAATAATCAAGCAAATAAATACTTTATCCCCAGATGGTTGCTGCTC
 308 yValIleLysAspThrSerLeuTrpAsnAsnGlnAlaAsnLysTyrPheIleProGlnMetValAlaAlaL
 995 TCTGCTCACAAAACCAGGCAACTCAAGTCCAAAATGCTAAGTCATCATACTATAGCAGCTGGTTGGCAAT
 332 euCysSerGlnAsnGlnAlaThrGlnValGlnAsnAlaLysSerSerTyrTyrSerSerTrpPheGlyAsn
 1066 CGAATGATTCAGTCTGGGATCCTGGCATGTCTCTTCAACAGGATCTAACCAATGAGTGTATTACTTCTGCC
 356 ArgMetIleGlnSerGlyIleLeuAlaCysProLeuGlnGlnAspLeuThrAsnGluCysLeuValLeuPr
 1137 CTTTTCTAATGATCAGGTGCTTATGGGTGCTGAAGGGAGATTATACATGTATGGTGACTCGGTGTATTACT
 379 oPheSerAsnAspGlnValLeuMetGlyAlaGluGlyArgLeuTyrMetTyrGlyAspSerValTyrTyrT
 1208 ACCAAGAAGCACTAGTTGGTGGCCTATGACCATGCTGTATAAGGTAACCATAACATTCCTAATGGTCAG
 403 yrGlnArgSerThrSerTrpTrpProMetThrMetLeuTyrLysValThrIleThrPheThrAsnGlyGln
 1279 CCATCTGCTATATCAGCTCAGAATGTGCCACACAGCAGGTCCCTAGACCTGGGACAGGAGCTGCTCTGC
 427 ProSerAlaIleSerAlaGlnAsnValProThrGlnGlnValProArgProGlyThrGlyGlyCysSerAl
 1350 AACAAATAGATGTCCTGGTMTTGTCTGAAAGGAGTGATGCTGATGCCTGGTACTGACCAACCCCTCGT
 450 aThrAsnArgCysProGlyPheCysLeuLysGlyValTyrAlaAspAlaTrpLeuLeuThrAsnProSerS
 1421 CTACCAGTACATTTGGATCAGAAGCAACCTTCACTGGTCTTATCTCAACGCAGCAACTCAGCGTATCAAT
 474 erThrSerThrPheGlySerGluAlaThrPheThrGlySerTyrLeuAsnAlaAlaThrGlnArgIleAsn
 1492 CCGACGATGTATATCGCGAACAACACACAGATCATAAGCTCACAGCAATTTGGATCAAGCGGTCAAGAAGC
 498 ProThrMetTyrIleAlaAsnAsnThrGlnIleIleSerSerGlnGlnPheGlySerSerGlyGlnGluAl
 1563 AGCATATAGCCACACAACCTGTTTTAGGGACACAGGCTCTGTTATGGTATACTGTATCTATATTATTGAAT
 521 aAlaTyrSerHisThrThrCysPheArgAspThrGlySerValMetValTyrCysIleTyrIleIleGluL
 1634 TGCTCTCATCTCTTAGGACAATTTAGATTGTCCCATTTATCCGTCAGGTGACACTATCCTAA
 545 euSerSerSerLeuLeuGlyGlnPheGlnIleValProPheIleArgGlnValThrLeuSer...