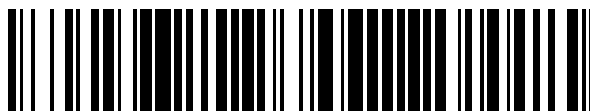


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 817**

51 Int. Cl.:

C12N 15/34 (2006.01)

C07K 14/01 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00960628 .6**

96 Fecha de presentación: **28.08.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1246920**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.10.2002**

54 Título: **PREVENCIÓN DE AFECCIONES ASOCIADAS CON CIRCOVIRUS-2 PORCINO.**

30 Prioridad:
31.08.1999 US 151564 P
31.05.2000 US 583350

45 Fecha de publicación de la mención BOP: **20.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente: **20.03.2012**

73 Titular/es:
MERIAL
29, Avenue Tony Garnier
69007 Lyon, FR;
UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN y
The Queen's University of Belfast

72 Inventor/es:
ELLIS, John Albert;
ALLAN, Gordon, Moore;
MEEHAN, Brian;
CLARK, Edward;
HAINES, Deborah;
HASSARD, Lori;
HARDING, John;
CHARREYRE, Catherine, Elisabeth;
CHAPPUIS, Gilles, Emile;
KRAKOWKA, George, Steve;
AUDONNET, Jean-Christophe, Francis y
MCNEILLY, Francis

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

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).

ES 2 376 817 T3

DESCRIPCIÓN

Prevención de afecciones asociadas con circovirus-2 porcino

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere a vectores de ADN y/o composiciones para reducir la carga viral en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El circovirus-2 porcino (PCV-2) se identificó recientemente como un agente que se ha asociado consistentemente con síndrome multisistémico de emaciación posdestete (SMEP) en poblaciones porcinas en varias partes del mundo (Allan y col., 1998; Ellis y col., 1998). Las muestras aisladas de PCV-2 obtenidas de cerdos infectados en varios países son virtualmente idénticas genéticamente, y son claramente diferentes del PCV (CCL33, PCV-1) que fue identificado originariamente en la década de 1970 como un contaminante no citopático de la línea celular de riñón porcino (PK/15) (Meehan y col., 1998; Tischer y col., 1974). Los cerdos con infecciones por PCV-2 adquiridas naturalmente o inducidas experimentalmente se presentan con pérdida de peso progresiva, taquipnea, disnea e ictericia (Allan y col., 1998; Allan y col., 1999; Ellis y col., 1998; Ellis y col., 1999). Entre los grandes hallazgos patológicos que se han asociado directamente con antígeno de PCV-2 se incluyen linfadenopatía, neumonía intersticial, hepatitis y nefritis (Allan y col., 1998; Allan y col., 1999; Ellis y col., 1998; Ellis y col., 1999). Véanse también los documentos WO-A-99/18.214, WO-A-00/01.409, WO-A-99/29.717 y WO-A-99/29.871. Hasta el presente PCV-2 no se ha relacionado directamente con aborto o lesiones en cerdos fetales.

[0003] Así, hasta el momento, no se ha propuesto abordar la cuestión de la miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina causados por PCV-2.

OBJETOS Y RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] Sorprendentemente se ha encontrado que PCV-2 es un agente causante de miocarditis, aborto e infección intrauterina, así como síndrome multisistémico de emaciación posdestete.

[0005] Por definición, un inmunógeno de PCV-2 pretende comprender PCV-2 vivo atenuado o inactivado, o subunidad(es) de PCV-2 obtenida(s) por expresión *in vitro* o por extracción, o fragmento(s) que comprende(n) al menos un epítipo de interés que puede obtenerse por síntesis química o por expresión recombinante *in vitro*, así como vector(es) recombinante(s) que comprende(n) y que expresa(n) secuencia(s) o fragmento(s) o epítipo(s) *in vivo* de genoma de PCV-2 según se desvela en la presente memoria descriptiva o según se cita en los documentos o se refiere en la presente memoria descriptiva.

[0006] Se aplica una definición similar para un inmunógeno de otro patógeno porcino según se desvela en la presente memoria descriptiva.

[0007] Por definición, una composición inmunógena desencadena una respuesta inmunógena local o sistémica. Una composición de vacuna desencadena una respuesta de protección local o sistémica. El término "composición inmunógena" incluye una "composición de vacuna" (ya que el término anterior puede ser composición protectora).

[0008] Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un primer vector de plásmido de ADN que comprende una primera secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF13 de cepa Imp1010 de PCV-2, para su uso en la reducción de la carga viral de PCV-2 en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo.

[0009] Según un segundo aspecto de la presente invención se proporciona una composición inmunógena para su uso en la reducción de la carga viral de PCV-2 en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo, en la que dicha composición comprende:

a) un primer vector de plásmido de ADN que comprende una primera secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF13 de cepa Imp1010 de PCV-2, y

b) un soporte y/o vehículo y/o excipiente y/o adyuvante aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.

[0010] Según un tercer aspecto de la presente invención se proporciona uso de:

a) un primer vector de plásmido de ADN que comprende una primera secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF13 de cepa Imp1010 de PCV-2 y

b) un soporte y/o vehículo y/o excipiente y/o adyuvante aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario en la preparación de una composición inmunógena para su uso en la reducción de la carga viral de PCV-2 en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo.

[0011] Según un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona un primer vector de plásmido de ADN que comprende una primera secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF13 de la cepa Imp1010 de PCV-2, y un segundo vector de plásmido de ADN que comprende una segunda secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF4 de la cepa Imp1010 de PCV-2, para su uso en la reducción de la carga viral de PCV-2 en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo.

[0012] Según un quinto aspecto de la presente invención se proporciona una composición inmunógena para su uso en la reducción de la carga viral de PCV-2 en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo, en la que dicha composición comprende:

a) un primer vector de plásmido de ADN que comprende una primera secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF13 de cepa Imp1010 de PCV-2,

b) un segundo vector de plásmido de ADN que comprende una segunda secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF4 de la cepa Imp1010 de PCV-2, y

c) un soporte y/o vehículo y/o excipiente y/o adyuvante aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario

[0013] Según un sexto aspecto de la presente invención se proporciona el uso de:

a) un primer vector de plásmido de ADN que comprende una primera secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF13 de cepa Imp1010 de PCV-2,

b) un segundo vector de plásmido de ADN que comprende una segunda secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF4 de la cepa Imp1010 de PCV-2, y

c) un soporte y/o vehículo y/o excipiente y/o adyuvante aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario en la preparación de una composición inmunógena para su uso en la reducción de la carga viral de PCV-2 en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo.

[0014] Según un séptimo aspecto de la presente invención se proporciona el primer plásmido para su uso según el primer aspecto de la presente invención; o la composición inmunógena para su uso según el segundo aspecto de la presente invención; o el uso del primer plásmido según el tercer aspecto de la presente invención; o los plásmidos primero y segundo para su uso según el cuarto aspecto de la presente invención; o la composición inmunógena para su uso según el quinto aspecto de la presente invención; o el uso de plásmidos primero y segundo según el sexto aspecto de la presente invención; en el que dicha primera secuencia de nucleótidos es ORF13 de cepa Imp1010 de PCV-2.

[0015] Según un octavo aspecto de la presente invención se proporcionan los plásmidos primero y segundo para su uso según el cuarto o el séptimo aspecto de la presente invención; o la composición inmunógena para su uso según el quinto o el séptimo aspecto de la presente invención; o el uso de un primer y segundo plásmido según el sexto y el séptimo aspecto de la presente invención; en el que dicha segunda secuencia de nucleótidos es ORF4 de la cepa Imp1010 de PCV-2.

[0016] Los autores de la invención describen procedimientos y/o composiciones para la prevención y/o tratamiento de miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina causados por PCV-2, así como síndrome multisistémico de emaciación posdestete y/o secuelas patológicas que incluyen pero no se limitan a síndrome multisistémico de emaciación posdestete; y procedimientos para formular dichas composiciones (las composiciones pueden incluir también un inmunógeno de parvovirus porcino (PPV)) y usos de un inmunógeno de PCV-2 para formular dichas composiciones.

[0017] Los autores de la invención describen el uso de inmunógenos de PCV-2 para preparar

composiciones para prevención y/o tratamiento de miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina causados por PCV-2.

[0018] Los autores de la invención describen el aislamiento y caracterización de nuevas cepas 1103 (1103/1 P.2) y 1121 (1121/1 P.1) de PCV-2 identificadas, y sus usos para producir inmunógenos, en relación con miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina causados por PCV-2, así como síndrome multisistémico de emaciación posdestete y/o secuelas patológicas asociadas.

[0019] Los autores de la invención describen la inoculación de cerdas (por ejemplo, cerdas adultas, cerdas jóvenes que no han parido) con una composición que comprende un (al menos uno) inmunógeno de PCV-2 (la composición puede incluir también un inmunógeno de parvovirus porcino) antes de la reproducción y/o antes de la inseminación y/o durante la gestación (o preñez); y/o antes del periodo perinatal o de parto y/o repetidamente a lo largo de la vida, para prevenir miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina asociados con PCV-2, así como síndrome multisistémico de emaciación posdestete y otras secuelas patológicas asociadas con PCV-2; o, para desencadenar una respuesta inmunógena o de protección frente a PCV-2 y prevenir con ello síndrome multisistémico de emaciación posdestete y/o miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina asociados con circovirus-2 porcino y/u otras secuelas patológicas asociadas con PCV-2.

[0020] Ventajosamente, se realiza al menos una inoculación antes de la inseminación. También se sigue ventajosamente de una inoculación que se realizará durante la gestación, por ejemplo, aproximadamente mediada la gestación (aproximadamente en 6-8 semanas de gestación) y/o al final de la gestación (aproximadamente en 11-13 semanas de gestación). Así, un régimen ventajoso es una inoculación antes de la inseminación y una inoculación de recuerdo durante la gestación. Posteriormente, puede realizarse reinoculación antes de cada inseminación y/o durante la gestación aproximadamente mediada la gestación (aproximadamente en 6-8 semanas de gestación) y/o al final de la gestación (aproximadamente en 11-13 semanas de gestación). Preferentemente, la reinoculación puede realizarse sólo durante la gestación.

[0021] En otra forma de realización preferida, lechones, como lechones de hembras vacunadas (por ejemplo, inoculadas según se expone en la presente memoria descriptiva), son inoculados en las primeras semanas de vida, por ejemplo, inoculación con una y/o dos y/o tres y/o cuatro y/o cinco semanas de vida. Más preferentemente, los lechones son inoculados por primera vez en la primera semana de vida o en la tercera semana de vida (por ejemplo, en el momento del destete). Más ventajoso todavía es que dichos lechones reciban inoculación de recuerdo de dos (2) a cuatro (4) semanas más tarde (después de la primera inoculación). Así, tanto a la progenie como a las cerdas (por ejemplo, cerda adulta, cerda joven que no ha parido) pueden administrarse composiciones de la invención y/o pueden ser objeto del rendimiento de los procedimientos de la invención.

[0022] Los autores de la invención describen composiciones de vacunas o inmunógenas que comprenden inmunógeno(s) de cepa(s) 1103 y/o 1121 de PCV-2, para prevenir o tratar miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina asociados con circovirus-2 porcino, así como síndrome multisistémico de emaciación posdestete y otras secuelas patológicas asociadas con PCV-2.

[0023] Los autores de la invención describen además usos de un inmunógeno de PCV-2 para formular una composición de vacuna o inmunógena para prevenir o tratar miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina asociados con circovirus-2 porcino, así como síndrome multisistémico de emaciación posdestete y otras secuelas patológicas asociadas con PCV-2.

[0024] Adicionalmente, los autores de la invención describen una composición de vacuna o inmunógena para la prevención y/o tratamiento de miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina causados por PCV-2 y/o síndrome multisistémico de emaciación posdestete que comprende un soporte y/o vehículo y/o excipiente y/o adyuvante aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, y un inmunógeno de PCV-2.

[0025] Los autores de la invención describen que la composición puede incluir adicionalmente al menos un inmunógeno entre al menos un patógeno de cerdo adicional, por ejemplo: síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *E. coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, seudorrabia, cólera porcino, gripe porcina, y Parvovirus porcino (PPV). Así, las composiciones basadas en vectores pueden incluir al menos un inmunógeno de al menos un patógeno de cerdo adicional, como, por ejemplo, un vector que expresa una secuencia de este patógeno, en el que el vector puede ser también el vector que expresa el inmunógeno de PCV-2. El vector que expresa una secuencia de PCV-2 puede comprender una secuencia o fragmento de PCV-2; y la invención comprende dichas moléculas de ácidos nucleicos, vectores que los contienen, composiciones que comprenden dichas moléculas de ácidos nucleicos o productos de expresión de vectores a partir de dichas moléculas de ácidos nucleicos, composiciones que comprenden dichos productos de expresión, sondas o cebadores para

dichas moléculas de ácidos nucleicos, y procedimientos para preparar y usar cualquiera o la totalidad de lo anterior.

[0026] Según la presente invención, el vector comprende un plásmido de vector de ADN. Los autores de la invención describen también los siguientes vectores: una bacteria como *E. coli*, un virus como baculovirus, un herpesvirus que incluye virus del herpes porcino, que incluye el virus de la enfermedad de Aujeszky, un adenovirus que incluye un adenovirus porcino, un poxvirus, que incluye un virus de vacuna, un virus de viruela aviar, un virus de viruela del canario, un virus de viruela del mapache y un virus de viruela porcina, y similares. Las composiciones basadas en vectores pueden comprender un vector que contiene y expresa un ORF seleccionado entre los ORF 4 y/o 13, de un PCV-2, ventajosamente de una cualquiera de las cepas de PCV-2 identificadas en la presente memoria descriptiva y en particular de cepas 1103 y/o 1121. Y, el inmunógeno en las composiciones (ya sean de PCV-2 y/o de otro patógeno porcino) puede producirse de forma recombinante.

[0027] La palabra plásmido pretende incluir cualquier unidad de transcripción de ADN en la forma de una secuencia de polinucleótidos que comprende la secuencia de PCV que se expresará. Ventajosamente, el plásmido incluye elementos necesarios para su expresión; por ejemplo, expresión *in vivo*. La forma de plásmido circular, superhelicoidal u otra, es ventajosa; y, la forma lineal se incluye también dentro del ámbito de la invención. La composición de plásmido de vacuna o inmunógena puede administrarse por medio de un cañón de genes, por vía intradérmica a través de un inyector sin aguja, por vía subcutánea o intramuscular, o por vía mucosa, o por cualquier otro medio que permita la expresión *in vivo*, y ventajosamente una respuesta inmunógena o de protección.

[0028] Debe observarse que el producto de expresión generado por vectores o recombinantes que describen los autores de la invención puede estar también opcionalmente aislado y/o purificado a partir de células infectadas o transfectadas; por ejemplo, para preparar composiciones para administración a cerdos; sin embargo, en ciertos casos, puede ser ventajoso no aislar y/o purificar un producto de expresión a partir de una célula; por ejemplo, cuando la célula o partes de la misma potencian el efecto inmunógeno del polipéptido.

[0029] Y se conocen y pueden usarse técnicas para purificación y/o aislamiento de proteínas, sin experimentación innecesaria, para purificar y/o aislar productos de expresión de vectores o recombinantes y/o subunidades de PCV-2 y/u otros patógenos porcinos, en la práctica de la invención; dichas técnicas, en general, pueden incluir: precipitación para aprovechar la solubilidad de la proteína de interés a diversas concentraciones de sales, precipitación con disolventes orgánicos, polímeros y otros materiales, precipitación por afinidad y desnaturalización selectiva; cromatografía en columna, que incluye cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, de inunoafinidad o de ligando colorante; inmunoprecipitación, filtración de gel, procedimientos electroforéticos, ultrafiltración y enfoque isoeléctrico, y sus combinaciones, entre otros.

[0030] Los autores de la invención describen procedimientos para la prevención y/o tratamiento de miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina causados por circovirus-2 porcino (PCV-2) y/o síndrome multisistémico de emaciación posdestete y/u otras secuelas patológicas asociadas con PCV-2 que comprenden la inducción de una respuesta inmunógena o de protección frente a PCV-2 en un cerdo que comprende la administración al cerdo de una composición mencionada anteriormente o desvelada en la presente memoria descriptiva.

[0031] Así, los autores de la invención describen un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina causados por circovirus-2 porcino (PCV-2) y/o síndrome multisistémico de emaciación posdestete y/u otras secuelas patológicas asociadas con PCV-2 que comprende la inducción de una respuesta inmunógena o de protección frente a PCV-2 en un cerdo que comprende la administración al cerdo de una composición que comprende un soporte o excipiente o vehículo aceptable desde un punto de vista farmacéutico o veterinario, preferentemente con un adyuvante, y un agente activo que comprende un inmunógeno de PCV-2. El procedimiento puede ser para la prevención de miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina causados por PCV-2 que comprende la administración de una composición que comprende un soporte aceptable y un inmunógeno de PCV-2. El procedimiento puede implicar una composición que es una composición inmunógena de subunidad. El procedimiento puede implicar la composición que incluye adicionalmente al menos un inmunógeno de al menos un patógeno porcino adicional, que incluye un vector que expresa dicho inmunógeno o epítipo; por ejemplo, el al menos un patógeno porcino adicional puede seleccionarse entre el grupo que consiste en SRRP, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *E. coli*, seudorrabia, cólera porcino, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, gripe porcina y PPV y combinaciones de los mismos. El procedimiento puede implicar un vector que es el plásmido de vector de ADN para su uso en la invención o un vector descrito que es una bacteria como *E. coli*, un virus como baculovirus, un herpesvirus que incluye virus de la enfermedad de

Aujeszký, un adenovirus que incluye un adenovirus porcino, un poxvirus, que incluye un virus de la vacuna, un virus de la viruela aviar, un virus de la viruela del canario y un virus de la viruela porcina, y similares. El procedimiento puede implicar una composición basada en vector adicionalmente que incluye al menos una secuencia, fragmento o epítipo de al menos un patógeno porcino adicional, o un vector que expresa dicha secuencia, fragmento o epítipo, en el que el vector puede ser también el vector que expresa la secuencia, fragmento o epítipo de PCV-2. El procedimiento puede implicar un vector que contiene y expresa un ORF seleccionado entre el grupo que consiste en los ORF 1 a 13, por ejemplo, un ORF seleccionado entre los ORF 4, 7, 10 y 13; preferentemente los ORF 4 y/o 13. El procedimiento puede implicar también una composición de base inmunógena en la que uno o más del o de los inmunógenos se produce recombinantemente. En este procedimiento, se inocula preferentemente a las hembras y/o los lechones según se describe anteriormente.

[0032] En otra forma de realización, la invención implica un procedimiento para preparar cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente o desveladas en la presente memoria descriptiva que comprende la mezcla del soporte y posiblemente el adyuvante aceptable desde un punto de vista farmacéutico o veterinario, y el vector de plásmido de ADN. Los autores de la invención describen un procedimiento que puede incluir además la transfección o infección de una célula u hospedador con un vector recombinante que contiene ADN que codifica un inmunógeno de PCV-2 y expresa ese inmunógeno; y opcionalmente la purificación y/o el aislamiento del inmunógeno a partir de la célula. Análogamente el procedimiento puede incluir el aislamiento y/o purificación de un inmunógeno de PCV-2 de PCV-2, o el aislamiento de PCV-2 a partir de una muestra.

[0033] Los autores de la invención describen también un kit para preparar cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente o desveladas en la presente memoria descriptiva o para realizar cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente o desvelados en la presente memoria descriptiva que comprenden en un primer recipiente el soporte o vehículo o excipiente aceptable desde un punto de vista farmacéutico o veterinario y en un segundo recipiente el agente activo que comprende el inmunógeno de PCV-2, en el que el primer y el segundo recipiente están envasados opcionalmente juntos, y el kit incluye opcionalmente instrucciones para la mezcla de ingredientes de la composición y/o administración de la composición.

[0034] Los autores de la invención describen además la administración de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente o desveladas en la presente memoria descriptiva para cerdos machos y/o hembras; para prevenir la transmisión de PCV-2 y prevenir o tratar o controlar miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina asociados con circovirus-2 porcino, así como síndrome multisistémico de emaciación posdestete y otras secuelas patológicas asociadas con PCV-2.

[0035] La administración se realiza preferentemente según se describe anteriormente.

[0036] El término "que comprende" en esta descripción puede significar "que incluye" o puede tener el significado dado comúnmente al término "que comprende" en la Ley de Patentes de EE.UU.

[0037] Se describen otros aspectos de la invención en, o son evidentes a partir de (y dentro del ámbito de la invención) la siguiente descripción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0038] El circovirus-2 porcino (PCV-2) es un agente asociado con síndrome multisistémico de emaciación posdestete (SMEP) en poblaciones porcinas. Según se muestra en los Ejemplos de referencia 1 y 2, el espectro potencial de enfermedad asociado a PCV-2 se ha ampliado por la evidencia de transmisión vertical y fallo reproductor asociado.

[0039] En particular, el Ejemplo 1 muestra que se aisló PCV-2 a partir de una camada de lechones abortados de una granja que estaba sufriendo abortos a término y mortinatos. En un lechón estaba presente una miocarditis difusa grave asociada con tinción inmunohistoquímica extensa para antígeno de PCV-2. Había también cantidades variables de antígeno de PCV-2 en el hígado, el pulmón y el riñón de múltiples fetos. La presencia de otros agentes que se han asociado con lesiones fetales y abortos en ganado porcino que incluyen parvovirus porcino, virus del síndrome reproductivo respiratorio porcino, virus de encefalomiocarditis y enterovirus no pudo establecerse.

[0040] Más en particular, el Ejemplo de referencia 2 muestra que los tejidos obtenidos de 30 rebaños con buena salud durante un periodo de cuatro años, y sometidos a ensayo en casos rutinarios de aborto o fallo reproductivo, fueron positivos para PCV-2 en dos remisiones que afectaban a varios lechones mortinatos y neonatos no viables que presentaban miocarditis difusa grave, hipertrofia cardíaca y evidencia de congestión crónica pasiva. Las dos remisiones positivas procedían de la misma granja, pero ocurrieron en dos momentos

diferentes. La presencia de PCV-2 en los corazones y otros tejidos de lechones afectados se confirmó mediante inmunohistoquímica y aislamiento de virus. La incapacidad de detectar circovirus porcinos en casos de fallo reproductivo antes de 1999 en áreas de infecciones endémicas sustenta la opinión de que la enfermedad reproductiva es una nueva manifestación clínica de infección por PCV-2, y sugiere además que los modos de transmisión sexuales, así como verticales, son responsables para la diseminación vírica en la población porcina.

[0041] En consecuencia, la inoculación de cerdos, por ejemplo, cerdas, como cerdas adultas o cerdas jóvenes que no han parido, con una composición que incluye al menos un inmunógeno de PCV-2 (por ejemplo, entre al menos una cepa elegida entre cepas Imp1008, Imp1010, Imp999, Imp1011-48285, Imp1011-48121, 1103 y 1121) (la composición puede incluir también al menos un inmunógeno a partir de al menos otro patógeno porcino como, por ejemplo, al menos un parvovirus porcino, en la que cuando se usa un vector el vector puede coexpresar tanto el o los inmunógenos de PCV-2 como el al menos un inmunógeno del al menos otro patógeno porcino, por ejemplo, inmunógeno(s) de PPV, entre otros, en particular en un programa de inmunización según se describe anteriormente, puede prevenir la miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina asociados con PCV-2, así como síndrome multisistémico de emaciación posdestete y otras secuelas patológicas asociadas con PCV-2.

[0042] Así, los autores de la invención describen procedimientos y composiciones que usan inmunógeno de PCV-2 para prevenir miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina asociados con circovirus-2 porcino, así como síndrome multisistémico de emaciación posdestete y otras secuelas patológicas asociadas con PCV-2. En particular, el inmunógeno de la cepa 1103 y/o la cepa 1121 es útil para procedimientos y composiciones que usan inmunógeno de PCV-2 para prevenir miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina asociados con circovirus-2 porcino.

[0043] Los autores de la invención describen el uso de cualquier cepa de PCV-2 conocida o inmunógeno del mismo para formular una composición de vacuna o inmunógena para prevenir o tratar miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina asociados con PCV-2, así como síndrome multisistémico posdestete y otras secuelas patológicas asociadas con PCV-2 (estas cepas incluyen cepas Imp1008, Imp1010, Imp999, Imp1011-48285, Imp1011-48121, 1103 y 1121), en particular cuando la composición está destinada a administrarse a lechones como, por ejemplo, a lechones de hembras vacunadas y más en particular a cerdas, en particular a hembras gestantes o hembras que serán sometidas a inseminación; y más en particular según los programas de inoculación definidos anteriormente.

[0044] Más en particular, el uso es para formular dichas composiciones destinadas a prevenir o tratar miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina asociados con PCV-2, en particular cuando la composición está destinada a administrarse a lechones como, por ejemplo, a lechones de hembras vacunadas y más en particular a cerdas, en particular a hembras gestantes o hembras que se someterán a inseminación; y más en particular según los programas de inoculación definidos anteriormente.

[0045] El al menos un inmunógeno de al menos otro patógeno porcino puede ser según se usa en vacunas porcinas conocidas o composiciones inmunógenas, o según el documento WO-98/03.658.

[0046] Las composiciones para su uso en la invención pueden prepararse de acuerdo con técnicas estándar bien conocidos para los expertos en las técnicas veterinarias o farmacéuticas. Dichas composiciones pueden administrarse en dosis y mediante técnicas bien conocidas para los expertos en las técnicas veterinarias teniendo en consideración factores como la edad el sexo, el peso, el estado y el tratamiento particular del cerdo, y la vía de administración. Las composiciones pueden administrarse en solitario, o pueden coadministrarse o administrarse en secuencia con otras composiciones descritas en la presente memoria descriptiva (por ejemplo, otras composiciones que comprenden un inmunógeno de PCV-2) o con otras composiciones profilácticas o terapéuticas (por ejemplo, otras composiciones de vacunas o inmunógenas porcinas). Así, la invención también proporciona composiciones multivalentes o de "cóctel" o en combinación y procedimientos que las emplean. A este respecto, se hace referencia a la patente de EE.UU. nº 5.843.456 dirigida a composiciones de rabia y composiciones de combinación y usos de las mismas.

[0047] Las composiciones para su uso en la invención pueden usarse para administración parenteral o mucosa, preferentemente por vías intradérmica o intramuscular. En particular para vía intradérmica, la inyección puede realizarse usando un inyector sin aguja. Cuando se usa administración mucosa, es posible usar vías oral, nasal u ocular.

[0048] En dichas composiciones el o los inmunógenos pueden estar en una mezcla con un soporte, diluyente o excipiente adecuado como agua estéril, suero fisiológico salino, glucosa o similares y/o preferentemente con un adyuvante. Las composiciones pueden estar también liofilizadas o congeladas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares como agentes amortiguadores de pH, adyuvantes,

conservantes, excipientes de polímero usados para vías mucosas, y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseadas.

[0049] Pueden consultarse los textos estándar, como "REMINGTONS PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17ª edición, 1985, para preparar preparaciones adecuadas, sin experimentación innecesaria. Las dosificaciones adecuadas pueden basarse también en el texto de la presente memoria descriptiva y los documentos citados en la presente memoria descriptiva.

[0050] Los adyuvantes son sustancias que potencian la respuesta inmunitaria a inmunógenos. Los adyuvantes pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas por ejemplo, Quil A, emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión puede basarse en particular en aceite de parafina líquida ligero (tipo Farmacopea Europea); aceite isoprenoide como escualano o escualeno; aceite resultante de la oligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más en particular aceites de vegetales, oleato de etilo, di(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos o de alcoholes grasos ramificados, en particular ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferentemente tensioactivos no iónicos, en particular ésteres de sorbitán, de manida (por ejemplo oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxiesteárico, que están opcionalmente etoxilados, y bloques de copolímero de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos de Pluronic®; especialmente L121. Véase Hunter y col., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995) y Todd y col., *Vaccine* 15:564-570 (1997).

[0051] Por ejemplo, es posible usar la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunity and Adjuvant Approach" editado por M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de este mismo libro.

[0052] Por ejemplo la vacuna que contiene adyuvante se prepara de la siguiente forma: el 67% v/v de fase acuosa que comprende el inmunógeno se emulsiona en el 2,3% p/v de oleato de anhidromanitol, el 2,6% p/v de ácido oleico etoxilado con 11 OE (óxido de etileno) y el 28,1% v/v de aceite de parafina líquida ligero (tipo Farmacopea Europea) con la ayuda de un turbomezclador emulsionante.

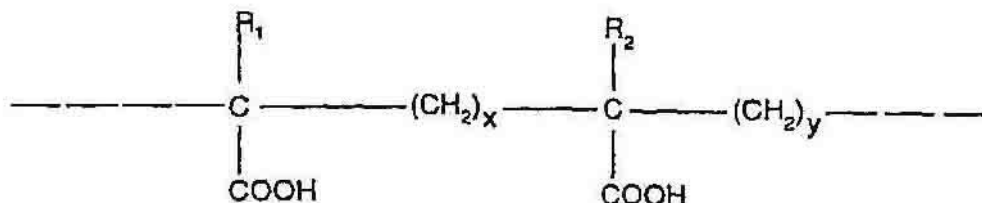
[0053] Un procedimiento alternativo para preparar la emulsión consiste en emulsión, por pasos a través de un homogeneizador de alta presión, una mezcla del 5% p/v de escualano, el 2,5% p/v de Pluronic® L121, el 0,2% p/v de un éster de ácido oleico y de anhidrosorbitol etoxilado con 20 EO, el 92,3% v/v de la fase acuosa que comprende el inmunógeno.

[0054] También es posible formular con polímeros sintéticos (por ejemplo, homo- y copolímeros de ácido láctico y glicólico, que se han usado para producir microesferas que encapsulan inmunógenos, véase Eldridge y col., *Mol. Immunol.* 28:287-294 (1993), por ejemplo, microesferas biodegradables), con citocinas como IL-2 y IL-12 (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. nº 5.334.379), y GMCSF, ventajosamente GMCSF porcino (factor de estimulación de colonias de macrófagos de granulocitos, véase, generalmente, patentes de EE.UU. nº 4.999.291 y 5.461.663, véase también Clark y col., *Science* 1987, 230:1229; Grant y col., *Drugs*, 1992, 53:516), entre otros. Determinados adyuvantes pueden expresarse *in vivo* con inmunógeno(s) y/o epítipo(s); por ejemplo, citocinas, GMCSF (véase, por ejemplo, Inumaru y Takamatsu, *Immunol. Cell. Biol.*, 1995, 73:474-76 que se refieren a un plásmido que codifica y que expresa GM-CSF porcino).

[0055] Un caso adicional de un adyuvante es un compuesto escogido entre los polímeros de ácido acrílico y metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno. Los compuestos de adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con éteres de polialqueno de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos por el término carbómero (Phameuropa Vol. 8, nº 2, junio de 1996). Los expertos en la materia pueden referirse también a la patente de EE.UU. nº 2.909.462 que describe dichos polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferentemente no más de 8, estando sustituidos los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener en sí otros sustituyentes, como metilo. Los productos comercializados con el nombre de Carbopol® (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son especialmente apropiados. Están reticulados con una sacarosa de alilo o con pentaeritritol de alilo. Entre ellos, puede mencionarse Carbopol® 974P, 934P y 971P. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno, se prefieren los copolímeros EMA® (Monsanto) que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno, lineales o reticulados, por ejemplo reticulados con éter divinílico. Puede hacerse referencia a J. Fields y col., *Nature*, 186:

778-780, 4 de junio de 1960.

[0056] Desde el punto de vista de su estructura, los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros EMA® están formados preferentemente por unidades básicas de la fórmula siguiente:



en la que:

R_1 , y R_2 , que son idénticos o diferentes, representan H o CH_3 ;
 $x = 0$ ó 1 , preferentemente $x = 1$; e
 $y = 1$ ó 2 , con $x + y = 2$.

[0057] Para los copolímeros EMA®, $x = 0$ e $y = 2$. Para los carbómeros, $x = y = 1$.

[0058] La disolución de estos polímeros en agua conduce a una solución ácida que será neutralizada, preferentemente a pH fisiológico, con el fin de dar la solución adyuvante en la que se incorporará en sí la composición inmunógena, inmunológica o de vacuna. Los grupos carboxilo del polímero están entonces en parte en la forma COO^- . Preferentemente, se prepara una solución de adyuvante según la invención, especialmente de carbómero, en agua destilada, preferentemente en presencia de cloruro de sodio, obteniéndose la solución a pH ácido. Esta solución de reserva se diluye añadiéndola a la cantidad deseada (para obtener la concentración final deseada), o una parte sustancial de la misma, de agua cargada con NaCl, preferentemente suero salino fisiológico (NaCl 9 g/l) todo de una vez en varias porciones con neutralización simultánea o subsiguiente (pH 7,3 a 7,4), preferentemente con NaOH. Esta solución a pH fisiológico se usará tal cual para su mezcla con la vacuna, que puede almacenarse especialmente en forma congelada en seco, líquida o congelada.

[0059] La concentración del polímero en la composición final de vacuna puede ser del 0,01% al 2% p/v, por ejemplo, del 0,06 al 1% p/v, por ejemplo, del 0,1 al 0.6% p/v.

[0060] A partir de esta descripción y del conocimiento de la técnica, el experto en la materia puede seleccionar un adyuvante adecuado, si lo desea, y la cantidad del mismo para emplear en una composición inmunógena para su uso en la invención, sin experimentación innecesaria.

[0061] Los autores de la invención describen que las composiciones inmunógenas para su uso en la invención pueden estar asociadas a al menos una vacuna viva atenuada, inactivada o de subunidad, o vacuna recombinante (por ejemplo, poxvirus como plásmido de ADN o vector) que expresa al menos un inmunógeno o epítipo de interés a partir de al menos otro patógeno porcino.

[0062] Se plantean composiciones en formas para diversas vías de administración para su uso en la invención. Y de nuevo, la dosificación eficaz y la vía de administración están determinadas por factores conocidos, como, por ejemplo, la edad, el sexo, el peso y otros procedimientos de cribado que son conocidos y no requieren experimentación innecesaria. Las dosificaciones de cada agente activo pueden ser como en los documentos citados en la presente memoria descriptiva y/o pueden estar comprendidas entre uno o algunos y varios centenares o miles de microgramos, por ejemplo, de $1 \mu\text{g}$ a 1 mg , para una composición inmunógena de subunidad; y, los autores de la invención describen de 10^4 a 10^{10} DICT₅₀ ventajosamente de 10^6 a 10^8 DICT₅₀ para una composición inmunógena o de vacuna inactivada (valoración antes de inactivación). Para una composición de vacuna o inmunógena viva atenuada descrita, la dosis puede estar entre 10^1 y 10^8 DICT₅₀ ventajosamente de 10^3 y 10^6 DICT₅₀.

[0063] Los recombinantes o vectores pueden administrarse en una cantidad adecuada para obtener expresión *in vivo* que corresponde a las dosificaciones descritas en la presente memoria descriptiva y/o en los documentos citados en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, los autores de la invención describen intervalos adecuados para suspensiones víricas que pueden determinarse empíricamente. El recombinante o vector vírico descrito puede administrarse a un cerdo o infectarse o transfectarse en células en una cantidad de

aproximadamente al menos 10^3 ufp; más preferentemente de aproximadamente 10^4 ufp a aproximadamente 10^{10} ufp, por ejemplo, de aproximadamente 10^5 ufp a aproximadamente 10^9 ufp, por ejemplo de aproximadamente 10^6 ufp a aproximadamente 10^8 ufp, por dosis, por ejemplo de aproximadamente 2 ml. Y, si se expresa más de un producto génico mediante más de un recombinante, cada recombinante puede administrarse en estas cantidades; o, cada recombinante puede administrarse de manera que existe, en combinación, una suma de recombinantes que comprende estas cantidades.

[0064] En composiciones de plásmido empleadas en la invención, las dosificaciones puede ser según se describe en los documentos citados en la presente memoria descriptiva o según se describe en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, las cantidades adecuadas de cada ADN de plásmido en composiciones de plásmido puede ser de 1 µg a 2 mg, preferentemente de 50 µg a 1 mg. Los documentos citados en la presente memoria descriptiva en relación con vectores de plásmido de ADN pueden ser consultados por el experto en la materia para determinar otras dosificaciones adecuadas para composiciones de vectores de plásmido de ADN de la invención, sin experimentación innecesaria.

[0065] Sin embargo, la dosificación de la o las composiciones, la concentración de componentes de las mismas y el tiempo de administración de la o las composiciones, que desencadenan una respuesta inmunogénica adecuada, pueden determinarse mediante procedimientos como valoraciones de anticuerpos de sueros, por ejemplo, por ELISA y/o análisis de ensayo de seroneutralización y/o por evaluación de provocación de vacunación en cerdos. Dicha determinación no requiere experimentación innecesaria a partir del conocimiento del experto en la materia, esta descripción y los documentos citados en la presente memoria descriptiva. Y, el momento para administraciones en secuencia puede determinarse análogamente con procedimientos que pueden deducirse a partir de esta descripción, y el conocimiento en la materia, sin experimentación innecesaria.

[0066] El inmunógeno de PCV-2 puede obtenerse a partir de PCV-2 o puede obtenerse a partir de expresión recombinante *in vitro* de gen(es) de PCV-2 o porciones o epítomos de los mismos. Los procedimientos para preparar y/o usar vectores (o recombinantes) para expresión pueden realizarse por o ser análogos a los procedimientos desvelados en: patentes de EE.UU. nº 4.603.112, 4.769.330, 5.174.993, 5.505.941, 5.338.683, 5.494.807, 4.722.848, 5.942.235, 5.364.773, 5.762.938, 5.770.212, 5.942.235, 5.756.103, 5.766.599, 6.004.777, 5.990.091, 6.033.904, 5.869.312, 5.382.425, las publicaciones PCT WO-94/16.716, WO-96/39.491, WO-95/30.018, Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update", PNAS USA 93:11349-11353, octubre de 1996, Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety", PNAS USA 93:11341-11348, octubre de 1996, Smith y col., patente de EE.UU. nº 4.745.051 (baculovirus recombinante), Richardson, C.D. (Editor), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.), Smith y col., "Production of Huma Beta Interferon in Insect Células Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, Dic., 1983, Vol. 3, nº 12, p. 2156-2165; Pennock y col., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector", Molecular and Cellular Biology Mar. 1984, Vol. 4, nº 3, p. 399-406; EP-A-0.370.573, solicitud de EE.UU. nº serie 920.197, registrada el 16 de octubre de 1986, publicación de patente EP nº 265.785, patente de EE.UU. nº 4.769.331 (herpesvirus recombinante), Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectores", PNAS USA 93:11307-1131. 2 de octubre de 1996, Andreansky y col., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors", PNAS USA 93:11313-11318, octubre de 1996, Robertson y col., "Epstein-Barr virus vectores for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93:11334-11340, octubre de 1996, Frolov y col., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications", PNAS USA 93:11371-11377, octubre de 1996, Kitson y col., J. Virol. 65, 3068-3075, 1991; patentes de EE.UU. nº 5.591.439, 5.552.143, WO-98/00.166, solicitudes de EE.UU. permitidas nº serie 08/675.556, y 08/675.566 ambas registradas el 3 de julio de 1996 (adenovirus recombinante), Grunhaus y col., 1992, "Adenovirus as cloning vectors", Seminars in Virology (Vol. 3) p. 237-52, 1993, Ballay y col., EMBO Journal, vol. 4, p. 3861-65, Graham, Tibtech 8, 85-87, abril de, 1990, Prevec y col., J. Gen Virol. 70, 429-434, PCT WO-91/11.525, Felgner y col., (1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561, Science, 259: 1745-49, 1993 y McClements y col., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D o glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93:11414-11420, octubre de 1996, y patentes de EE.UU. nº 5.591.639, 5.589.466 y 5.580.859, así como los documentos WO-A-90/11.092, WO-A-93/19.183, WO-A-94/21.797, WO-A-95/11.307, WO-A-95/20.660, Tang y col., Nature 356, 152-154, 1992, y Furth y col., Analytical Biochemistry, 205, 365-368, 1992, en relación con vectores de expresión de ADN, entre otros. Véase también el documento WO-98/33.510; Ju y col., Diabetology, 41:736-739, 1998 (expresión y sistema de lentivirus); Sanford y col., patente de EE.UU. nº 4.945.050; Fischbach y col., (Intracel), el documento WO-90/01.543; Robinson y col., Seminars in IMMUNOLOGY, vol. 9, pág. 271-283 (1997) (sistemas de vectores de ADN); Szoka y col., patente de EE.UU. nº 4.394.448 (procedimiento de introducción de ADN en células vivas); McCormick y col., patente de EE.UU. nº 5.677.178 (uso de virus citopáticos); y patente de EE.UU. nº 5.928.913 (vectores para suministro de genes), así como otros documentos citados en la presente memoria descriptiva. Los autores de la invención describen que un vector vírico seleccionado, por ejemplo, a partir de virus de herpes del

cerdo, como virus de la enfermedad de Aujeszky, adenovirus porcino, poxvirus, especialmente virus de vacuna, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario y virus de la viruela porcina, se emplea ventajosamente, así como vectores de plásmido de ADN empleados en la práctica de la invención.

5 **[0067]** El producto de expresión a partir del o los genes de PCV-2 o porciones de los mismos puede ser útil para generar anticuerpos como anticuerpos monoclonales o policlonales que son útiles para fines de diagnóstico. Análogamente, el o los productos de expresión a partir del o los genes de PCV-2 o porciones de los mismos pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico.

10 **[0068]** Además, el experto en la materia puede determinar un epítipo de interés en un inmunógeno de PCV-2, o en un inmunógeno de otro patógeno porcino, sin experimentación innecesaria, a partir de la descripción de la presente memoria descriptiva y del conocimiento en la materia; véase, por ejemplo, el documento WO-98/40.500, en relación con información general para determinar un epítipo o una región epitópica de interés de una proteína, entre otros.

15 **[0069]** Los autores de la invención describen que son composiciones de vacuna o inmunógenas ventajosas: una composición de vacuna o inmunógena, reunida a partir de un cultivo celular *in vitro* que ha sido infectada con una preparación purificada de PCV-2, como, por ejemplo, una preparación purificada de circovirus porcino seleccionada a partir del grupo que consiste en las preparaciones depositadas en la ECACC (European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology & Research, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, RU), con las siguientes referencias: nº acceso V97100219 (cepa Imp. 1008), nº V97100218 (cepa Imp. 1010) y nº acceso V97100217 (cepa Imp. 999) depositadas el 2 de octubre de 1997, nº acceso V98011608 (cepa Imp. 1011-48285) y nº V98011609 (cepa Imp. 1011-48121) depositadas el 16 de enero de 1998, nº acceso 00012710 (cepa 1103) y nº 00012709 (cepa 1121) depositadas el 2 de febrero de 2000, o una composición de vacuna o inmunógena formada por circovirus porcino producida en, y aislada a partir de cultivo celular *in vitro*, habiéndose infectado estas células con un circovirus porcino susceptible de ser aislado a partir de una muestra fisiológica o de una muestra de tejido, especialmente lesiones, a partir de un cerdo que tiene el síndrome SMEP, por ejemplo, una composición en la que el circovirus porcino se ha producido en, y aislado a partir de una línea celular de riñón de cerdo, por ejemplo, producido en, y aislado a partir de células PK/15 libres de contaminación con PCV-1; o una composición que comprende o que se prepara a partir de un extracto de cultivo o sobrenadante, recogido a partir de un cultivo celular *in vitro* que ha sido infectado con dicho circovirus. Así, los autores de la invención describen que el circovirus porcino puede ser un inmunógeno.

35 **[0070]** Los autores de la invención describen que la composición de vacuna inmunógena puede comprender inmunógenos de PCV-2 y/o inmunógenos de varios circovirus porcinos (que incluyen PCV-2 o varias cepas de PCV-2, y que incluyen PCV-1), así como opcionalmente inmunógenos adicionales de otro patógeno porcino; por ejemplo, SRRP, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *E. coli*, seudorrabia, cólera porcino, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, gripe porcina, PPV (véase también documento WO-A-00/01.409).

40 **[0071]** Los autores de la invención describen que el inmunógeno en la composición inmunógena para su uso en la invención puede expresarse a partir de un fragmento de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos de PCV-2 o fragmento de los mismos (que codifica ventajosamente al menos un epítipo), seleccionada por ejemplo a partir del grupo que consiste en las secuencias designadas por las referencias SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, así como SEQ ID No: 6 y SEQ ID No: 7 (fig. 1-4 y 6-7). El inmunógeno en la composición inmunógena puede expresarse a partir de un fragmento de ADN que contiene un ORF seleccionado entre los ORF 4 y/o 13, de una cepa de PCV-2, en particular de una de las cepas identificadas anteriormente (según se designa en el documento WO-A-99/18.214-véase también tabla 1 a continuación). Así, los autores de la invención describen que el inmunógeno o una porción del mismo, por ejemplo, un epítipo de interés puede obtenerse por expresión *in vitro* del mismo a partir de un recombinante o un vector. El inmunógeno puede purificarse y/o concentrarse adicionalmente mediante los procedimientos convencionales.

55 **[0072]** Los autores de la invención describen que el inmunógeno en la composición inmunógena para su uso en la invención puede expresarse *in vivo* mediante un vector de expresión que comprende un fragmento de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos de PCV-2 o un fragmento de la misma (ventajosamente que codifica al menos un epítipo), seleccionada por ejemplo entre el grupo que consiste en las secuencias designadas por las referencias SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 6, así como SEQ ID No: 6 y SEQ ID No: 7 (fig. 1-4 y 6-7). Análogamente, el inmunógeno en la composición inmunógena puede expresarse *in vivo* mediante un vector de expresión que comprende un fragmento de ADN que contiene un ORF seleccionado entre los ORF 4 y/o 13, de una cepa de PCV-2, en particular de una de las cepas identificadas anteriormente. Es decir, los autores de la invención describen que la composición inmunógena puede comprender un vector de expresión que expresa el inmunógeno o una porción del mismo, por ejemplo, un epítipo de interés,

in vivo.

[0073] Según la invención el vector de expresión es un vector seleccionado a partir de plásmidos de ADN. Los autores de la invención describen también los siguientes vectores: bacterias como *E. coli*, virus como baculovirus, herpesvirus como virus de la enfermedad de Aujeszky, adenovirus que incluye adenovirus porcinos, poxvirus, especialmente virus de vacuna, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario y virus de la viruela porcina, entre otros. (El experto en la materia puede referirse también a las solicitudes EE.UU. de Audonnet y col., y Bublot y col., nº serie 60/138.352 y 60/138.478, respectivamente, las dos registradas el 10 de junio de 1999, en particular a la descripción detallada y más en particular a los ejemplos (se proporcionan extractos de los cuales en "VACUNA DE ADN-PCV Ejemplo 12", y "VACUNA DE POXVIRUS RECOMBINANTE DE CIRCOVIRUS PORCINO Ejemplo 13", respectivamente).

[0074] En consecuencia, la invención incluye vectores de plásmido de ADN que contienen moléculas de ácidos nucleicos. Los autores de la invención describen también productos de expresión de los mismos, composiciones que comprenden dichas moléculas de ácidos nucleicos y/o vectores y/o productos de expresión, así como procedimientos para preparar y usar cualquiera o la totalidad de estas formas de realización. Los autores de la invención describen en la presente memoria descriptiva ORF y/o fragmentos que codifican un inmunógeno o epítipo, así como moléculas de ácidos nucleicos de cepas 1103 y/o 1121, en particular sus ORF 1 a 13, como, por ejemplo, los ORF 4, 7, 10 y 13, preferentemente los ORF 4 y/o 13, y fragmentos de los mismos, así como vectores que comprenden estas moléculas de ácidos nucleicos, composiciones que comprenden estas moléculas nucleicas, vectores, o productos de expresión de las mismas, composiciones que comprenden dichos productos de expresión, cebadores o sondas para dichas moléculas de ácidos nucleicos, y usos o procedimientos que afectan a estas formas de realización, por ejemplo, para detectar, diagnosticar, someter a ensayo para PCV-2, para inducir una respuesta inmunógena o de protección, y similares.

[0075] Los autores de la invención describen también sondas o cebadores a partir de las cepas 1103 y/o 1121 de PCV-2 que pueden ser útiles, para amplificar ADN de PCV-2, por ejemplo, para preparar un vector de expresión. Una sonda o cebador puede ser cualquier extensión de al menos 8, preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 12, 13, 14, ó 15, por ejemplo, al menos 20, por ejemplo, al menos 23 ó 25, por ejemplo al menos 27 ó 30 nucleótidos en el genoma de PCV-2 o un gen de PCV-2 que son únicos para PCV-2, y posiblemente para estas cepas, o que están en PCV-2 y están menos conservados entre la familia de PCV o circovirus. En cuanto a cebadores o sondas de hibridación o de PCR y longitudes óptimas de los mismos, se hace referencia también a Kajimura y col., GATA 7 (4): 71-79 (1990). La hibridación se realiza ventajosamente en condiciones de gran fidelidad, en el sentido en que debe entenderse el término "gran fidelidad" entre los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. y Hames y Higgins, eds., 1985, Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, RU). Se entenderá que la hibridación se realiza usando técnicas bien establecidas, que incluyen pero no se limitan a hibridación por transferencia Southern, hibridación por transferencia Northern, hibridación *in situ* y, ventajosamente, hibridación Southern para fragmentos de ADN amplificados por PCR.

[0076] Como sondas o cebadores, se describen péptidos que no son de proteínas de PCV-2 de longitud completa y pueden ser cualquier extensión de al menos 8, preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 12, 13, 14 ó 15, por ejemplo, al menos 20, por ejemplo, al menos 23 ó 25, por ejemplo al menos 27 ó 30 aminoácidos en PCV-2 que son únicos para PCV-2, y posiblemente para esas cepas, o que están en PCV-2 y están menos conservados entre la familia de PCV y/o circovirus. Alternativa o adicionalmente, los aminoácidos que no son proteínas de PCV-2 de longitud completa pueden ser una región epitópica de una proteína de PCV-2.

[0077] Las secuencias de PCV-2 se desvelan en Meehan y col., 1998 (cepa Imp. 1010; ORF1 nucleótidos 398-1342; ORF2 nucleótidos 1381-314; y corresponden respectivamente a ORF4 y ORF13 en la terminología de la invención (véase tabla 1), en la solicitud de EE.UU. nº serie 09/161.092 de 25 de septiembre de 1998 y a COL4 y COL13 en el documento WO-A-99/18.214). En la presente memoria descriptiva se desvelan varias cepas de PCV-2 y sus secuencias y se denominan ImplO08, Imp999, ImplO11-48285, Imp1011-48121, 1103 y 1121. Se desvelan otras cepas en A. L. Hamel y col., J. Virol. junio de 1998, vol. 72, 6: 5262-5267 (GenBank AF027217) y en I. Morozov y col., J. Clinical Microb. Sept 1998 vol. 36, 9: 2535-2541, así como GenBank AF086834, AF086835 y AF086836. Los autores de la invención describen el uso de estas secuencias, o de ORF de las mismas, o de regiones de las mismas que codifican un antígeno o inmunógeno o epítipo de interés.

[0078] La invención también comprende las secuencias equivalentes a las usadas o mencionadas en la presente memoria descriptiva y en documentos citados en la presente memoria descriptiva; por ejemplo, secuencias que son susceptibles de hibridación a la secuencia de nucleótidos en condiciones de gran fidelidad (véase, por ejemplo, Sambrook y col., (1989)).

[0079] Entre las secuencias equivalentes, pueden mencionarse también los fragmentos génicos que conservan la inmunogenicidad de la secuencia completa, por ejemplo, un epítipo de interés.

[0080] La homología entre el genoma completo de PCV tipos 1 y 2 es aproximadamente del 75%. Pero dentro del tipo 2, la homología es generalmente superior al 95%. Así, en la práctica de la invención, el uso de cualquier cepa de PCV-2 está comprendido por equivalencia. Un criterio puede ser que la cepa es de tipo 2, por ejemplo que la homología en el nivel de nucleótido del genoma completo es igual o mayor que el 85%, ventajosamente el 90% o más, más ventajosamente el 95% o más, preferentemente el 97, el 98 o el 99% o más, con las cepas desveladas en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, la cepa Imp1010.

[0081] Los límites de los ORF de la cepa Imp1010 se dan en la siguiente tabla 1:

Nombre	Inicio	Fin	Hebra	Tamaño de ORF (nucleótidos (nt))	Tamaño de proteína (aminoácidos (aa))
ORF1	103	210	Codificante	108 nt	35 aa
ORF2	1180	1317	Codificante	138 nt	45 aa
ORF3	1363	1524	Codificante	162 nt	53 aa
ORF4	398	1342	Codificante	945 nt	314 aa
ORF5	900	1079	Codificante	180 nt	59 aa
ORF6	1254	1334	Codificante	81 nt	26 aa
ORF7	1018	704	No codificante	315 nt	104 aa
ORF8	439	311	No codificante	129 nt	42 aa
ORF9	190	101	No codificante	90 nt	29 aa
ORF10	912	733	No codificante	180 nt	59 aa
ORF11	645	565	No codificante	81 nt	26 aa
ORF12	1100	1035	No codificante	66 nt	21 aa
ORF13	314	1381	No codificante	702 nt	213 aa

[0082] Los ORF se definen con respecto a la cepa Imp1010. La invención también comprende el uso de los ORF correspondientes en cualquier otra cepa de PCV-2, y cualquiera de las cepas de PCV-2 según se define en la presente memoria descriptiva o en documentos citados en la presente memoria descriptiva. Así, a partir de la secuencia genómica de nucleótidos, es una técnica rutinaria la determinación de los ORF que usan un software estándar, por ejemplo, MacVector®. Además, la alineación de los genomas con los de la cepa 1010 y la comparación con los ORF de la cepa 1010 permite al experto en la materia determinar fácilmente los ORF en el genoma para otra cepa (por ejemplo, los desvelados en el documento WO-A-99/18.214, es decir, Impl008, Impl011-48121, Impl011-48285, Imp999, así como las nuevas cepas 1103 y 1121). El uso del software o la realización de la alineación no es experimentación innecesaria y proporcionan directamente acceso a estos ORF.

[0083] Por ejemplo, en referencia a las fig. 6 y 7, los ORF correspondientes de las cepas 1103 y 1121 son según se indica en la siguiente Tabla 2:

Nombre	Inicio	Fin	Hebra	Tamaño de ORF (nucleótidos (nt))	Tamaño de proteína (aminoácidos (aa))
ORF1	1524	1631	Codificante	108 nt	35 aa
ORF2	833	970	Codificante	138 nt	45 aa
ORF3	1016	1177	Codificante	162 nt	53 aa
ORF4	51	995	Codificante	945 nt.	314 aa
ORF5	553	732	Codificante	180 nt	59 aa
ORF6	907	987	Codificante	81 nt	26 aa
ORF7	671	357	No codificante	315 nt	104 aa
ORF8	92	1732	No codificante	129 nt	42 aa
ORF9	1611	1522	No codificante	90 nt	29 aa
ORF10	565	386	No codificante	180 nt	59 aa
ORF11	298	218	No codificante	81 nt	26 aa
ORF12	753	688	No codificante	66 nt	21 aa
ORF13	1735	1037	No codificante	702 nt	213 aa

[0084] También son equivalentes y útiles en la práctica de la invención las secuencias de nucleótidos que no cambian la funcionalidad ni la especificidad de la cepa (es decir, de la cepa de tipo 2) del gen considerado o de los de los polipéptidos codificados por este gen. Naturalmente, las secuencias que difieren a través de la degeneración del código están incluidas en la práctica de la invención.

[0085] Para ORF4, la homología entre PCV-1 y PCV-2 es de aproximadamente el 86%, y para ORF13, la homología entre PCV-1 y PCV-2 es aproximadamente del 66%. Así, son también secuencias equivalentes útiles en la práctica de la presente invención, para ORF4, aquellas secuencias que tienen una homología del 95% o más homología con ORF4 de la cepa Imp1010, y para ORF13, aquellas secuencias que tienen una homología del 95% o más que ORF13 de cepa Imp1010 (usando la terminología de la tabla 1).

[0086] Para homología relativa a los otros ORF, que se describen en la presente memoria descriptiva, se pueden determinar aquellas secuencias que provienen de una cepa de PCV que tiene un ORF4 y/o un ORF13 que tienen una homología según se define anteriormente con el ORF correspondiente de la cepa 1010. Para ORF7, los autores de la invención describen secuencias que tienen una homología que es ventajosamente igual o superior al 80%, más ventajosamente del 85% o más, preferentemente del 90% o el 95% o más con ORF7 de cepa Imp1010. Para ORF10, los autores de la invención describen secuencias que tienen una homología que es ventajosamente igual o superior al 86%, más ventajosamente el 90% o más, preferentemente del 95% o más con ORF10 de cepa Imp1010 (usando la terminología de la tabla 1).

[0087] También, son secuencias equivalentes útiles en la práctica de la presente invención, para ORF4 aquellas secuencias que tienen una homología del 95% o más con ORF4 de la cepa Imp1010, y para ORF13, aquellas secuencias que tienen una homología del 95% o más con ORF13 de cepa Imp1010.

[0088] ORF4 y ORF13 tienen el potencial de codificar proteínas con pesos moleculares predichos de 37,7 kD y 27,8 kD respectivamente. ORF7 y ORF10 (corresponden a ORF3 y ORF4 en Meehan y col., 1998) tienen el potencial de codificar proteínas con pesos moleculares predichos de 11,9 y 6,5 kD respectivamente. Las secuencias de estos ORF están disponibles también en Genbank AF 055392. Los autores de la invención describen que pueden incorporarse también en plásmidos y usarse de acuerdo con la invención en combinación con ORF4 y/o ORF13.

[0089] Los otros ORF 1-3 y 5, 6, 8-9, 11-12 desvelados en la tabla anterior (COL 1-3 y 5, 6, 8-9, 11-12 en el documento WO-A-9918214), o región o regiones de los mismos que codifican un antígeno o epítipo de interés se describen, por ejemplo, en solitario o en combinación o de otro modo entre sí o con los ORF 4 y/o 13 o región o regiones de los mismos que codifican antígeno(s) o epítipo(s). Análogamente, para homología, se puede determinar que existen secuencias equivalentes que provienen de una cepa de PCV que tiene un ORF13 y/o un ORF4 que tienen una homología según se define anteriormente con el ORF correspondiente de la cepa 1010 según se define en la presente memoria descriptiva o en Meehan y col., 1998. Para ORF7, una secuencia equivalente tiene una homología de la misma que es ventajosamente, por ejemplo, igual o superior al 80%, por ejemplo el 85% o más, preferentemente el 90% o el 95% o más con ORF7 de cepa Imp1010. Y, para ORF10, ventajosamente una secuencia equivalente tiene homología que es igual o superior al 86%, ventajosamente el 90% o más, preferentemente que el 95% o más con ORF10 de cepa Imp1010.

[0090] La homología de la secuencia de nucleótidos puede determinarse usando el programa "Align" de Myers y Miller, ("Optimal Alignments in Linear Space", CABIOS 4, 11-17, 1988, y disponible en NCBI). Alternativa o adicionalmente, el término "homología" o "identidad", por ejemplo, con respecto a una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, puede indicar una medida cuantitativa de homología entre dos secuencias. La homología de secuencia porcentual puede calcularse como $(N_{ref} - N_{dif}) * 100 / N_{ref}$, en la que N_{dif} es el número total de residuos no idénticos en las dos secuencias cuando se alinean y en la que N_{ref} es el número de residuos en una de las secuencias. De ahí que la secuencia de ADN AGTCAGTC tenga una semejanza de secuencia del 75% con la secuencia AATCAATC ($N_{ref} = 8$; $N_{dif} = 2$).

[0091] Alternativa o adicionalmente, la "homología" o "identidad" con respecto a secuencias puede referirse al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las dos secuencias en la que la alineación de las dos secuencias puede determinarse de acuerdo con el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur y Lipman, 1983 PNAS USA 80: 726), por ejemplo, usando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una penalización de hueco de 4, y puede realizarse convenientemente análisis asistidos por ordenador e interpretación de los datos de secuencias que incluyen alineación usando programas disponibles comercialmente (por ejemplo, Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc. CA.). Cuando se dice que las secuencias de ARN son similares, o tienen un grado de identidad u homología de secuencias con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN.

[0092] Las secuencias de ARN dentro del ámbito de la invención pueden obtenerse a partir de secuencias de ADN, considerando la timidina (T) en la secuencia de ADN igual al uracilo (U) en las secuencias de ARN.

[0093] Adicional o alternativamente, la semejanza o identidad u homología de las secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el programa BlastP (Altschul y col., Nucl. Acids Res. 25,3389-3402) y disponible en NCBI. Las siguientes referencias proporcionan algoritmos para comparar la identidad u homología relativa de residuos de aminoácidos de dos proteínas, y adicional o alternativamente con respecto a lo anterior, las enseñanzas en estas referencias pueden usarse para determinar la homología o identidad porcentual: Needleman SB y Wunsch CD, "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins", J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970); Smith TF y Waterman MS, "Comparison of Bio-sequences". Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981); Smith TF, Waterman MS y Sadler JR, "Statistical characterization of nucleic acid sequence functional domains", Nucleic Acids Res., 11:2205-2220 (1983); Feng DF y Dolittle RF, "Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees", J. of Molec. Evol., 25:351-360 (1987); Higgins DG y Sharp PM, "Fast and sensitive multiple sequence alignment on a microcomputer CABIOS, 5: 151-153 (1989); Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ, "ClusterW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions-specific gap penalties and peso matrix choice, Nucleic Acid Res., 22:4673-480 (1994); y, Devereux J, Haeblerle P and Smithies O, "A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX". Nucl. Acids Res., 12: 387-395 (1984).

[0094] Los autores de la invención describen además usos de un inmunógeno de PCV-2, ya sea en solitario o en combinación adicional con un inmunógeno de otro patógeno porcino para generar composiciones según la invención, por ejemplo, mezcla de los ingredientes; y, la invención comprende también por tanto kits en los que los componentes se contienen individualmente y opcionalmente los recipientes se envasan juntos para mezcla y/o administración, en la que el kit puede incluir también opcionalmente instrucciones para mezcla y/o administración.

[0095] Aunque la invención se ha expuesto en términos de administración a composiciones inmunógenas de cerdas que comprenden un inmunógeno de PCV-2, la invención puede comprender también la administración de dichas composiciones a una cerda adulta o cerda joven que no ha parido y/o a una jabalina según se describe en la presente memoria descriptiva. Así, pueden administrarse composiciones de la invención a la madre y la progenie (por ejemplo, cerda adulta, cerda joven que no ha parido) y las jabalinas. En consecuencia, en poblaciones de cerdos pueden administrarse composiciones para su uso en la invención.

[0096] Los autores de la invención describen que las composiciones de vacuna e inmunógenas pueden comprender inmunógenos de más de una cepa de PCV-2. Por ejemplo, es posible combinar inmunógenos de las cepas 1121 y 1103, a partir de una o las dos de estas cepas con al menos otra cepa desvelada en la presente memoria descriptiva, o cualquier otra combinación.

[0097] Los autores de la invención describen procedimientos que permiten al experto en la materia evaluar la eficacia de las vacunas frente a PCV-2. Un primer procedimiento es un procedimiento ELISA o con seroneutralización. Un segundo procedimiento es una vacunación seguida de prueba de provocación con una cepa de PCV-2 virulenta, por ejemplo una de las cepas desveladas en la presente memoria descriptiva. En otras palabras, la invención permite verificar inmunógenos de PCV, que incluyen inmunógenos de PCV-1, susceptibles de desencadenar una respuesta inmunógena o de protección frente a PCV-2. Dichos inmunógenos de PCV son útiles entonces para prevenir o tratar a cerdos en particular frente a miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina asociados con PCV-2, así como frente a SMEP y/u otras secuelas patológicas asociadas con los mismos.

[0098] Los autores de la invención proporcionan composiciones de vacuna o inmunógenas que comprenden un inmunógeno de PCV y susceptibles de desencadenar una respuesta inmunógena o de protección frente a PCV-2. La invención se refiere también a procedimientos de inmunización o vacunación que usan dicho inmunógeno, así como al uso de dicho inmunógeno para producir dicha composición inmunógena o de vacuna.

[0099] La invención se describirá adicionalmente por medio de los siguientes Ejemplos de referencia, Ejemplo y resultados, proporcionados con fines de ilustración y que no deben considerarse una limitación de la invención.

La fig. 1 representa SEQ ID No. 1, la secuencia de ADN de PCV del genoma de la cepa Imp. 1011-48121;

la fig. 2 representa SEQ ID No. 2, la secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp. 1011-48285;

la fig. 3 representa SEQ ID No. 3, la secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp. 999;

la fig. 4 representa SEQ ID No. 4, la secuencia de ADN del genoma de la cepa Imp. 1010;

la fig. 5 representa SEQ ID No. 5, la secuencia de ADN de referencia del genoma de la cepa PK/15;

la fig. 6 representa SEQ ID No. 6, la secuencia de ADN del genoma de la cepa 1103, aislada en Alberta, Canadá. k significa g (G) o t (T), y significa c (C) o t (T). Estas variaciones de secuencia se observaron en la población vírica;

la fig. 7 representa SEQ ID No. 7, la secuencia de ADN del genoma de la cepa 1121, aislada en Saskatoon, Canadá;

las fig. 1.1 a 1.5 se describen en el Ejemplo 12;

las fig. 2.1 a 2.6 se describen en el Ejemplo de referencia 13.

EJEMPLO Y RESULTADOS

EJEMPLO DE REFERENCIA/RESULTADO 1: MIOCARDITIS, ABORTO E INFECCIÓN INTRAUTERINA ASOCIADOS CON PCV-2

[0100] Se produjeron abortos a término y partos con mortinatos y lechones momificados en una nueva instalación porcina de 450 cerdas que se puso en producción.

[0101] También se observó pseudogestación en varias cerdas jóvenes que no habían parido. Las cerdas jóvenes que no habían parido recibieron dos dosis de una vacuna inactivada que contenían parvovirus e inmunógenos de leptospiras antes de la reproducción.

[0102] Una camada recibida para examen post-mórtem consistía en nueve fetos que parecieron haber muerto en diversas fases de la gestación. Había 2 lechones momificados, 2 macerados, 3 autolíticos y 2 mortinatos recientes. Se observaron lesiones en un examen patológico general sólo en un feto autolítico parcialmente. En este feto los dos ventrículos del corazón estaban dilatados, el hígado mostraba hipercrecimiento y estaba firme y había hidrotórax y ascitis. Histopatológicamente, había áreas extensas de degeneración o necrosis miocárdica con edema y fibrosis leve, y una infiltración difusa moderada de linfocitos y macrófagos. Existía congestión hepática generalizada marcada y pérdida hepatocelular. El bazo y los riñones también estaban congestionados. No se detectaron lesiones histológicas importantes en los demás fetos.

[0103] La tinción inmunohistoquímica para PCV-2 se realizó según se ha descrito anteriormente usando un antisuero policlonal de conejo y un anticuerpo monoclonal que se produjo frente a PCV-2 en secciones de tejido procesado y embebido rutinariamente fijado en formalina (Ellis y col., 1998; Ellis y col., 1999). En el feto con cardiomiopatía dilatada había tinción extensa para antígeno de PCV-2 en todo el miocardio afectado. La tinción era más extensa en áreas de necrosis y parecía afectar principalmente a miocitos. Existía tinción citoplásmica y nuclear. En múltiples fetos había tinción extensa en el hígado. En algunas secciones parecía afectar principalmente al endotelio sinusoidal y las células de Kupfer, mientras que en otros fetos, que incluyen el de miocarditis, había también tinción nuclear y citoplásmica de hepatocitos. Las células con tinción positiva estaban dispersas en todo el pulmón, y multifocalmente en el riñón. La reacción en cadena de la polimerasa para PCV-2 se realizó según se describe anteriormente usando tejido congelado (Ellis y col., 1999). El producto de PCR del tamaño esperado para PCV-2 se amplificó a partir de tejido fetal. El PCV-2 se aisló del feto con miocarditis y una reserva de tejidos de otros fetos en la camada inoculando homogeneizados de tejido en células PK-15 libres de PCV.

[0104] Los tejidos fetales se examinaron también para otros patógenos víricos que se han asociado con lesión fetal y abortos en ganado porcino, entre ellos parvovirus porcino (PPV), virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), encefalomiocarditis (EMCV) y enterovirus. El antígeno de PPV no se detectó mediante pruebas de anticuerpos fluorescentes (FAT) en secciones congeladas de pulmón, hígado y bazo a partir de los fetos momificados o mortinatos. Los homogeneizados de hígado, pulmón y bazo de los fetos abortados se inocularon también en cultivos de células PK-15 libres de PCV, células de trompa de Falopio porcina primarias y células Vero. Los virus citopáticos no se detectaron después de tres pasadas. Los tejidos dieron resultado negativo para PPV usando PCR. El antígeno de PRRSV no se detectó por tinción inmunohistoquímica.

[0105] Así, hubo lesiones fetales y abortos asociados directamente con PCV-2. Estos resultados muestran también transmisión vertical del virus.

[0106] En un estudio anterior, se aisló PCV-1 de 2 de 160 fetos de cerdos examinados, lo que implica que este grupo de virus puede transmitirse verticalmente; sin embargo, el antígeno de PCV-1 no podría asociarse con ninguna lesión en el tejido (Allan y col., 1995). La exclusión de otros agentes que se han asociado con lesiones

fetales y abortos en ganado porcino, entre ellos, PPV (Bolt y col., 1997; Molitor y col., 1991), PRRSV (Lager y col., 1996), EMCV (Kim y col., 1989) y enterovirus (Molitor y col., 1991) indican que el PCV-2 puede causar patología fetal importante y aborto posterior.

[0107] El síndrome de emaciación asociado con infección por PCV-2 se produce con la máxima frecuencia en cerdos de 5-12 semanas de vida (Allan y col., 1998; Ellis y col., 1998). La infección experimental de ganado porcino neonatal indica un periodo prodrómico relativamente largo entre la infección y el desarrollo de signos clínicos asociados con PCV-2 (Allan y col., 1999; Ellis y col., 1999). Los hallazgos de la presente memoria descriptiva muestran que el virus se transmite verticalmente o en el periodo perinatal. No sólo la transmisión vertical intrauterina de PCV-2 puede terminar en aborto, sino que es posible que los lechones infectados subletalmente *in utero* sean animales que desarrollen posteriormente SMEP.

[0108] Además, estos resultados muestran que la inoculación de cerdas con una composición que comprende un inmunógeno de PCV-2 (la composición puede incluir también un inmunógeno de otro patógeno porcino, por ejemplo, parvovirus porcino), antes de la reproducción o la inseminación, o antes del periodo perinatal y/o durante la gestación puede prevenir miocarditis y/o aborto y/o infección intrauterina asociados con circovirus-2 porcino, así como síndrome multisistémico de emaciación posdestete y otras secuelas patológicas asociadas con PCV-2, al desencadenar una respuesta inmunológica o anticuerpos frente a PCV-2.

[0109] Los autores de la invención describen que, por supuesto, pueden usarse o aplicarse composiciones, procedimientos y otros aspectos de la invención en animales distintos de los cerdos, por ejemplo, ovejas, bisontes, ganado vacuno, jabalíes salvajes, por ejemplo, si el PCV-2 infectara a estos animales.

EJEMPLO DE REFERENCIA/RESULTADO 2: MIOCARDITIS, ABORTO E INFECCIÓN INTRAUTERINA ASOCIADOS CON PCV-2

[0110] La presencia de PCV-2 en lechones neonatales sugiere que la transmisión vertical puede ser un medio importante de transmisión vírica. Este modo de transmisión puede estar relacionado no sólo con fallo reproductivo, sino también con el desarrollo de enfermedad multisistémica más adelante en la vida. Es de interés determinar si el PCV-2 previamente indetectado (y el PCV-1) se ha transmitido verticalmente en áreas de producción porcina en las que el SMEP, y por extensión la infección por PCV-2, ha sido endémico durante al menos varios años.

[0111] Se evaluaron 38 remisiones que afectaban a un fallo reproductivo recibidas en el laboratorio de diagnóstico en el Western College of Veterinary Medicine (WCVN), Universidad de Saskatchewan, Saskatoon, Canadá, durante un periodo de cuatro años de un total de 30 rebaños de alto nivel de salud en Canadá. Cinco de las granjas de las que se obtuvieron las muestras habían diagnosticado casos de SMEP. Veintisiete de las 38 remisiones (71%) se clasificaron como abortos; cinco de ellas (13%) afectaron también a al menos un feto momificado. De los 10 casos restantes: 5 afectaron a lechones mortinatos junto con lechones no viables (13%); 2 con mortinatos y uno o más fetos momificados (5%); 2 con sólo lechones mortinatos (5%); y uno con sólo fetos momificados (2,5%). Los diagnósticos rutinarios para patógenos distintos de circovirus revelaron 4 casos (11%) en los que se determinó que la etiología era de parvovirus porcino y 2 casos (5%) en que los que se determinó que la etiología era de origen bacteriano. Se realizaron necropsias generales y se recogieron tejidos y se fijaron en formalina con tampón (tiempo de fijación 24-72 h) y, en la mayoría de los casos, se remitieron también tejidos recientes para evaluación microbiológica rutinaria. Ninguno de estos casos se sometió a prueba previamente para PCV-2.

[0112] La técnica de PCR usada para la detección de PCV-1 y PCV-2 se realizó según se describió anteriormente (Tischer y col., 1974). PCV-1 no se detectó por PCR en ninguna remisión que comprendiera fallo reproductivo del periodo de cuatro años, PCV-2 se detectó mediante PCR en dos remisiones diferentes que tenían su origen en la misma unidad de producción de cerdos multiinstalación en dos ocasiones separadas en la primavera del último año en el periodo de cuatro años. La primera de estas remisiones comprendía una camada de lechones con evidencia general de miocarditis, hipertrofia cardíaca y congestión pasiva crónica.

[0113] La identificación inmunohistoquímica de PCV-2 en tejidos se realizó según se describe anteriormente (Tischer y col., 1974). La tinción inmunohistoquímica (IHC) para PCV-2 fue positiva en los corazones de los seis lechones que fueron remitidos, mientras que 4 de 6 dieron resultados positivos por PCR de PCV-2 (véase la Tabla siguiente).

Tabla: Detección de PCV-2 en los corazones fijados con formalina de cerdos con miocarditis por PCR, IHC y aislamiento vírico en cultivo celular.

Tejidos positivos para PCV-2	PCR	IHC	Aislamiento de virus
Fijados	5/6	6/6	N/D
Congelados	4/4	N/D	2/4

[0114] La segunda remisión de la misma granja consistía en una camada de cuatro lechones en la que 2 fueron mortinatos y otros 2 murieron poco después de nacer. Los cuatro lechones también mostraron evidencia general de una miocarditis difusa grave, hipertrofia cardíaca y congestión pasiva crónica. Sólo se remitieron tejidos de corazón congelados recientes y de pulmón/bazo en reserva para su análisis. La PCR de PCV-2 fue positiva en los corazones de 2 de los 4 lechones y en los tejidos de pulmón y bazo en reserva de 4 de los 4 lechones. El aislamiento de PCV-2 de corazones afectados y/o tejido de pulmón y bazo en reserva fue positivo en 2 de los 4 casos que fueron positivos para PCV-2 por PCR. Basándose en la serología y/o en la PCR, otros agentes asociados con fallo reproductivo en ganado porcino, que incluye virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino y parvovirus porcino, estaban circulando aparentemente en el rebaño de reproducción. Sin embargo, no pudo demostrarse que estos agentes estuvieran asociados con las lesiones cardíacas graves (u otras) en los lechones afectados; pero, pueden contribuir a SMEP.

[0115] PCV-2 no se detectó mediante PCR o IHC en ningún caso representativo de fallo reproductivo remitido durante los tres primeros años del periodo de cuatro años (se detectó en casos de fallo reproductivo remitidos durante el último año del periodo de cuatro años). Con el fin de descartar daños en el ADN debidos a fijación en formalina como un posible factor adverso que limite la capacidad de detectar PCV-2 mediante PCR, la PCR se realizó en tejidos recogidos de cuatro lechones en destete con SMEP. Se amplificó el ADN de PCV-2 en todos los tejidos fijados sometidos a ensayo, entre ellos: pulmón, hígado, riñón y ganglios linfáticos bronquiales, de los cuatro individuos. Por otra parte, la sensibilidad del PCV-2 por PCR fue independiente de la duración de tiempo en la que se fijó cada tejido en formalina.

[0116] Estos resultados confirman y extienden la observación anterior (West y col., 1999) de que PCV-2 puede transmitirse verticalmente y puede estar presente en grandes cantidades dentro de lesiones de lechones infectados *in utero*. La transmisión vertical de virus PCV-2 y el daño fetal resultante, por ejemplo, miocarditis, es una manifestación de enfermedad adicional de PCV-2. Además, el fallo en la detección de PCV-2 en casos de fallo reproductivo antes del último año del periodo de cuatro años de un área endémica de infección por PCV-2 puede indicar que la transmisión vertical no fue el mecanismo primario responsable para la diseminación inicial de infección vírica. Los modos de transmisión sexual, así como la vertical, pueden atribuirse a la difusión de la infección por PCV-2 en cerdos.

EJEMPLO DE REFERENCIA/RESULTADO 3: CULTIVO Y AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DE CIRCOVIRUS PORCINO

[0117] Los virus 1103 y 1021 se aislaron respectivamente en Alberta, respectivamente en Saskatoon, Canadá, a partir de casos de abortos según el procedimiento descrito en J. Ellis y col., Can. J. Vet., 1998, vol. 39, 44-51.

[0118] El cultivo vírico se efectúa en cultivos celulares de PK/15, de los que se sabe que no están contaminados con el circovirus porcino (PCV), pestivirus, adenovirus porcinos y parvovirus porcinos (Allan G. y col., Pathogenesis of porcine circovirus experimental infections of colostrum-deprived piglets and examination of pig foetal material. Vet. Microbiol. 1995, 44, 49-64).

[0119] Las monocapas de células PK/15 se disocian por tripsinización (con una mezcla de tripsina-verseno) a partir de cultivos confluentes, y se toman en medio MEM-SA que contiene suero de ternera fetal al 15% no contaminado por pestivirus (= medio MEMG) en una concentración final de aproximadamente 400.000 células por ml. A continuación se mezclan 10 ml de fracciones alícuotas de esta suspensión celular con fracciones alícuotas de 2 ml de los inóculos descritos anteriormente, y las mezclas finales se reparten en forma alícuota en volúmenes de 6 ml en dos matraces Falcon de 25 cm². Estos cultivos se incuban a continuación a +37°C durante 18 horas en una atmósfera que contiene CO₂ al 10%.

[0120] Después de la incubación, el medio de cultivo de las monocapas semiconfluentes se trató con D-glucosamina 300 mM (Cat # G48175, Sigma-Aldrich Company Limited, Poole, RU) (Tischr I. y col., Arch. Virol., 1987 96 39-57), a continuación se prosiguió con la incubación durante un periodo adicional de 48-72 horas a +37°C. Después de esta última incubación, uno de los dos Falcons de cada inóculo se sometió a 3 ciclos sucesivos de congelación/descongelación. Las células PK/15 del Falcon restante se trataron con una solución de

tripsina-verseno, se volvió a suspender en 20 ml de medio MEM-G, y a continuación se inoculó en 75 cm² de Falcons a una concentración de 400.000 células/ml. Los matraces recién inoculados se sometieron a continuación a "superinfección" por adición de 5 ml del lisado correspondiente obtenido después de los ciclos de congelación/descongelación.

EJEMPLO DE REFERENCIA/RESULTADO 4: TÉCNICA PARA LA DETECCIÓN DE PCV POR INMUNOFLUORESCENCIA

[0121] El cribado inicial de todas las preparaciones de cultivos celulares fijadas con acetona se efectuó mediante una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IIF) usando una dilución 1/100 de una reserva de sueros de cerdos adultos. Esta reserva de sueros comprende sueros de 25 cerdas adultas de Irlanda del Norte y se sabe que contiene anticuerpos frente a una amplia variedad de virus porcinos, que incluye PCV: parvovirus porcino, adenovirus porcino y virus de SRRP. La técnica IF se realizó poniendo el suero (diluido en PBS) en contacto con los cultivos celulares durante una hora a +37°C, seguido de dos lavados en PBS. A continuación se tiñeron los cultivos celulares con una dilución 1/80 en PBS de un anticuerpo de inmunoglobulina anti-cerdo de conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína durante una hora, y a continuación se lavó con PBS y se montó en tampón de glicerol antes de la observación microscópica con luz ultravioleta.

EJEMPLO DE REFERENCIA/RESULTADO 5: PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS DE PCV POR CULTIVO *IN VITRO*

[0122] El cultivo de las células PK/15 no contaminadas y la multiplicación vírica se realizaron según los mismos procedimientos que en el Ejemplo de referencia 1. Las células infectadas se recogen después de tripsinización después de 4 días de incubación a 37°C y se enumeran. El siguiente paso se inocula con 400.000 células infectadas por ml.

[0123] Las diversas cepas de PCV desveladas en la presente memoria descriptiva, por ejemplo cepas 1103 y 1121, se cultivan así.

EJEMPLO DE REFERENCIA/RESULTADO 6: VALORACIÓN DE PCV-2

[0124] La valoración se realiza en microplacas de 96 pocillos. Primero se introduce una suspensión de células PK/15 (150.000 células por ml) (100 µl por pocillo). A continuación se realizan diluciones del cultivo vírico y se introducen 100 µl de las mismas en los pocillos. Se realiza incubación a 37°C con CO₂. Después de 24 h, se realiza un tratamiento con glucosamina media hora a 37°C (para las condiciones véase ejemplo 3). A continuación se retira el medio de cultivo y se introduce medio nuevo.

[0125] La incubación se realiza 72 h a 37°C. La revelación de los focos se realiza usando un anticuerpo monoclonal anti-PCV-2 y un conjugado de ratón marcado como FITC.

[0126] Este procedimiento puede usarse en valoración para preparar PCV-2 inactivado así como vivo atenuado.

EJEMPLO DE REFERENCIA/RESULTADO 7: INACTIVACIÓN DE LOS ANTÍGENOS VÍRICOS

[0127] Al final del cultivo vírico, las células infectadas se recogen y se lisan usando ultrasonidos (Branson Sonifier) o con la ayuda de un rotor-estator tipo molino coloidal (UltraTurrax, IKA). A continuación se centrifuga la suspensión a 3700 g durante 30 minutos. La suspensión vírica se inactiva con etilenimina al 0,1% durante 18 horas a +37°C o con beta-propiolactona al 0,5% durante 24 horas a +28°C. Si la valoración del virus antes de la inactivación es inadecuada, la suspensión vírica se concentra por ultrafiltración usando una membrana con un corte da 300 kDa (Millipore PTMK300). La suspensión vírica inactivada se almacena a +5°C.

EJEMPLO DE REFERENCIA/RESULTADO 8: PREPARACIÓN DE LA VACUNA EN FORMA DE UNA EMULSIÓN BASADA EN ACEITE MINERAL

[0128] La vacuna se prepara según la fórmula siguiente:

- suspensión de circovirus porcino inactivado: 250 ml
- Montanide® ISA 70 (SEPPIC): 750 ml

[0129] La fase acuosa y la fase oleosa se esterilizan por separado por filtración. La emulsión se prepara mezclando y homogeneizando los ingredientes con la ayuda de un emulsionante de turbina Silverson.

[0130] Una dosis de vacuna contiene aproximadamente $10^{7.5}$ DICT₅₀. El volumen de una dosis de vacuna es de 0,5 ml para administración por la vía intradérmica, y 2 ml para administración por la vía intramuscular.

5 **[0131]** Esta vacuna se usa en un programa de vacunación contra el síndrome multisistémico de emaciación en combinación con la vacuna Parvovax®.

EJEMPLO DE REFERENCIA/RESULTADO 9: PREPARACIÓN DE LA VACUNA EN FORMA DE UNA EMULSIÓN METABOLIZABLE CON BASE DE ACEITE

10

[0132] La vacuna se prepara según la fórmula siguiente:

- suspensión de circovirus porcino inactivado 200 ml
- Dehymuls HRE 7 (Henkel): 60 ml
- Radia 7204 (Oleofina): 740 ml

15

[0133] La fase acuosa y la fase oleosa se esterilizan por separado por filtración. La emulsión se prepara mezclando y homogeneizando los ingredientes con la ayuda de un emulsionante de turbina Silverson.

20

[0134] Una dosis de vacuna contiene aproximadamente $10^{7.5}$ DICT₅₀. El volumen de una dosis de vacuna es 2 ml para administración por la vía intramuscular.

[0135] Esta vacuna se usa en un programa de vacunación contra el síndrome multisistémico de emaciación en combinación con la vacuna Parvovax®.

25

EJEMPLO/RESULTADO 10: VACUNACIÓN DE LECHONES CON VECTOR (DE PLÁSMIDO) DE ADN (según la invención)

30

[0136] Los grupos de 3 o 4 lechones, alumbrados por cesárea en el día 0 se colocan en aisladores. Los lechones son vacunados en el día 2 con (A) un plásmido que comprende ORF 13 o con (B) una mezcla de este plásmido y otro plásmido que comprende ORF 4, y con una solución fisiológica para el grupo de control. Cada plásmido se diluye en solución fisiológica estéril (NaCl al 0,9%) a 250 µg/µl de concentración final. Se inyecta un volumen de 2 ml por vía intramuscular en dos puntos de 1 ml (1 punto a cada lado del cuello). Se administra una segunda inyección de vacuna o placebo en el día 14. La vacunación con ADN es bien tolerada por lechones y no se observa evidencia de reacción adversa a la vacunación. Los lechones se someten a prueba de provocación en el día 21 por administración oronasal de suspensión vírica de PCV-2, 1 ml en cada orificio nasal. Después de la prueba de provocación se pesan los lechones una vez por semana. Se registran las temperaturas rectales en los días 17, 21, 22, 24, 27, 29, 31, 34, 37, 41, 44. En el día 44 se recogen hisopos fecales de cada lechón para deposición de PCV-2. El virus se detecta y se cuantifica mediante PCR cuantitativa. En el día 45 se realizan necropsias y se recogen muestras de tejidos para aislamiento del virus.

35

40

· Síntomas clínicos:

No existen diferencias significativas en cuanto a ganancias de peso corporal medio o temperaturas corporales medias entre los grupos.

45

· Lesiones en la necropsia:

El único hallazgo general observado en cerdos en la terminación es linfadenopatía bronquial. Las lesiones se puntúan según los siguientes criterios.

50

- 0 = sin crecimiento visible de ganglios linfáticos
- 1 = crecimiento leve de ganglios linfáticos, restringido a ganglios linfáticos bronquiales
- 2 = crecimiento moderado de ganglios linfáticos, restringido a ganglios linfáticos bronquiales
- 3 = crecimiento intenso de ganglios linfáticos, extendido a ganglios linfáticos precapsulares submandibulares bronquiales e inguinales.

55

dvtp es una abreviatura de desviación típica

Grupos	Puntuaciones de linfadenopatías		
	media	dvtp	N
(A)	1,2	1,3	4
(B)	2,0	1,7	3
controles	3,0	0,0	3

N = número de lechones en cada grupo

- 5 [0137] Se observa una reducción de las lesiones en los ganglios linfáticos en 3 de los 4 lechones inmunizados con (A) y de 1 de los 3 lechones inmunizados con mezcla (B). Esta diferencia no es significativa ($p > 0,05$) debido al alto valor de las desviaciones típicas (dvtp).

· Carga viral en tejidos de ganglios linfáticos:

- 10 Se realiza reisolamiento vírico cuantitativo en homogeneizados de tejidos preparados a partir de ganglios linfáticos bronquiales y mesentéricos.

[0138] Los datos presentados corresponden a valoraciones de virus en homogeneizados de tejidos después de transformación en $\log_{10}$.

15 **Valoraciones de PCV-2**

Grupos	GL bronquiales		GL mesentéricos		N
	media	dvtp	media	dvtp	
(A)	0,9	0,8	0,9	0,8	4
(B)	0,7	0,6	0,2	0,2	3
Controles	2,0	1,1	1,8	1,1	4

[0139] Los ganglios linfáticos bronquiales parecen contener el virus más infeccioso. Se observa una reducción de la carga viral en ganglios linfáticos bronquiales y mesentéricos a partir de lechones inmunizados con mezcla (A) o (B). Esta reducción es significativa ($p \leq 0,05$ para la mezcla de plásmidos).

- 20 · Excreción vírica:

Se valoran hisopos fecales después de prueba de provocación para deposición de PCV-2 por PCR basándose en amplificación de ORF 13 de PCV-2. Cada ensayo se realiza por triplicado en 2 ml de muestra.

- 25 Los controles no vacunados son negativos para PCV-2 antes de la prueba de provocación y positivos después de la prueba de provocación, lo que confirma la validez del ensayo de PCR.

[0140] Los valores se expresan como $\log_{10}$ (número de moléculas de ADN de PCV-2 en muestra de 2 μ l).

30 **Número $\log_{10}$ de moléculas de ADN de PCV-2**

Grupos	media	dvtp	N
(A)	3,3	0,3	4
(A)	2,9	0,7	3
Controles	3,6	0,6	4

[0141] Las diferencias entre grupos no son significativas ($p > 0,05$).

35 **EJEMPLO DE REFERENCIA/RESULTADO 11: VACUNACIÓN DE LECHONES CON VECTOR VIVO DE VIRUELA DEL CANARIO Y RESULTADOS**

[0142] Los grupos de 3 ó 4 lechones, obtenidos por cesárea en el día 0 se colocan en aisladores. El día 2 los lechones son vacunados con 10^8 ufp de (C) una viruela del canario que comprende ORF 13, o (D) una viruela del canario que comprende ORF 13 y ORF 4, o una viruela del canario parental, en 1 ml de PBS, por vía intramuscular en el lateral del cuello. Se administra una segunda inyección de vacuna o placebo en el día 14. La vacunación con viruela del canario es bien tolerada por lechones y no se observa evidencia de reacción adversa a la vacunación. Los lechones se someten a prueba de provocación en el día 21 por administración oronasal de una suspensión vírica de PCV-2, 1 ml en cada orificio nasal. En el día 45 se realizan necropsias y se recogen muestras de tejidos para aislamiento de virus.

Resultados de la necropsia:

[0143] · SMEP se caracteriza generalmente por linfadenopatía y más raramente por hepatitis o nefritis. Así, se puntúan los hallazgos generales en los ganglios linfáticos para cada lechón de la siguiente forma: 0 = sin crecimiento visible de ganglios linfáticos; 1 = crecimiento leve de ganglios linfáticos, restringido a ganglios linfáticos bronquiales; 2 = crecimiento moderado de ganglios linfáticos, restringido a ganglios linfáticos bronquiales; 3 = crecimiento intenso de ganglios linfáticos, extendido a ganglios linfáticos bronquiales, submandibulares preescapulares e inguinales.

10	Grupos (C)	Puntuaciones 0,5 0,0 0,0 1,0
15	media (D)	0,38 0,0 0,5 0,5 1,0
20	media desviación típica Controles	0,5 0,41 2,0 2,5 2,5 2,5
25	media desviación típica	2,38 0,25

[0144] La linfadenopatía bronquial para PCV-2 es un hallazgo general destacado. Se observa una reducción importante de la lesión de los ganglios linfáticos en relación con el grupo de control después de inmunización con (C) y (D) ($p \leq 0,05$).

PCV vacuna ADN EJEMPLO 12

[0145] Los siguientes pasos son extractos de la solicitud provisional de EE.UU. 60/138.352.

[0146] Las secuencias de PCV-2 usadas en estos ejemplos se obtienen de Meehan y col., ver anteriormente (ORF1 nucleótidos 398-1342; ORF2 nucleótidos 1381-314; y corresponden respectivamente a ORF4 y ORF13 en el documento US-09/161.092 del 25 de septiembre de 1998 y a COL4 y COL13 en el documento WO-A-99/18.214).

[0147] La palabra plásmido pretende aquí cubrir cualquier unidad de transcripción de ADN en la forma de una secuencia de polinucleótidos que comprende la secuencia de PCV que se expresará y los elementos necesarios para su expresión *in vivo*. Se prefiere la forma de plásmido circular, superhelicoidal o de otro tipo. La forma lineal se incluye también dentro del ámbito de la invención.

[0148] Las Figuras muestran los plásmidos denominados pJP109 (que contienen el gen ORF2 de PCV-2, fig. 1.1), pJP111 (que contiene el gen ORF1 de PCV-2, fig. 1.2) y el plásmido de referencia pJP120 (que contiene el gen ORF2 de PCV-1, fig. 1.3) y el plásmido de referencia pJP121 (que contiene el gen ORF1 de PCV-1, fig. 1.4).

[0149] Cada plásmido comprende un promotor capaz de asegurar, en las células del hospedador, la expresión del gen insertado bajo su control. En general es un fuerte promotor eucariota y en particular un promotor temprano de citomegalovirus CMV-IE, de origen humano o murino, u opcionalmente de otro origen como, por ejemplo, rata o cobaya. Más generalmente, el promotor es de origen vírico o de origen celular. Como promotor vírico distinto de CMV-IE, puede mencionarse el virus promotor temprano o tardío de virus SV40 o el promotor LTR de virus de sarcoma de Rous. También puede ser un promotor del virus del cual procede el gen, por ejemplo el promotor específico para el gen. Como promotor celular, puede mencionarse el promotor de un gen de citoesqueleto, como, por ejemplo, el promotor de desmina, o alternativamente el promotor de actina. Cuando están presentes varios genes en el mismo plásmido, pueden proporcionarse en la misma unidad de transcripción o en dos unidades diferentes.

[0150] Los plásmidos pueden comprender también otros elementos de regulación de transcripción como,

por ejemplo, secuencias de estabilización del tipo intrón, preferentemente intrón II del gen β -globina de conejo (van Ooyen y col., Science, 1979,206: 337-344), secuencia de señal de la proteína codificada por el gen activador de plasminógeno de tejido (tPA; Montgomery y col., Cell. Mol. Biol. 1997, 43: 285-292), y la señal de poliadenilación (poliA), en particular del gen de la hormona de crecimiento bovino (bGH) (documento US-A-5.122.458) o del gen de β -globina de conejo.

[0151] A continuación se describen formas de realización de plásmidos ilustrativas no limitativas útiles en la invención y ejemplos, tomados con referencia a los dibujos, en los que:

Fig. 1.1: plásmido pJP109
Fig. 1.2: plásmido pJP111
Fig. 1.3: plásmido de referencia pJP120
Fig. 1.4: plásmido de referencia pJP121
Fig. 1.5: plásmido de referencia pJP058

Listado de secuencias SEQ ID

SEQ ID No. 27 oligonucleótido JP779
SEQ ID No. 28 oligonucleótido JP780
SEQ ID No. 29 oligonucleótido JP781
SEQ ID No. 30 oligonucleótido JP782
SEQ ID No. 31 oligonucleótido JP783
SEQ ID No. 32 oligonucleótido JP784
SEQ ID No. 33 oligonucleótido JP785
SEQ ID No. 34 oligonucleótido JP786

Ejemplo 12.1 Construcción del plásmido pJP109

[0152] El plásmido pGFM7Z-Imp1010 Stoon-EcoRI nº 14 que contiene el genoma del virus PCV-2 en forma de un fragmento EcoRI (B. Meehan y col., J. Gen. Virol. 1998. 79 2171-2179) fue digerido con EcoRI con el fin de aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento EcoRI-EcoRI de 1.768 pares de bases (pb). Este fragmento estaba autoligado.

[0153] El gen ORF2 del virus PCV-2 cepa 1010-Stoon (B. Meehan y col., J. Gen. Virol. 1998; 79:2171-2179; secuencia GenBank nº acceso AF055392) se amplificó, usando la plantilla consistente en el fragmento EcoRI-EcoRI autoligado, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los siguientes oligonucleótidos: JP779 (SEQ ID NO 27) (35 mer):

5'CATCATCATGTCTGACATGACGTATCCAAGGAGGCG3'
y JP780 (SEQ ID NO 28) (36 mer):

5TACTACTACAGATCTTTAGGGTTTAAGTGGGGGGTCT3'

con el fin de generar un fragmento de PCR de 730 pb Este fragmento fue digerido con Sall y BglII con el fin de aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento de restricción Sall-BglII de 715 pb A continuación, este fragmento se ligó con el plásmido pVR1012 (Hartikka J. y col., Human Gene Therapy. 1996; 7:1205-1217), digerido de antemano con Sall y BglII, para dar el plásmido pJP109 (5.567 pb) (fig. 1.1).

Ejemplo 12.2: Construcción del plásmido PJ111

[0154] Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con el plásmido pGem7Z-Imp1010-Stoon (véase Ejemplo 12.1) (B. Meehan y col., J. Gen. Virol. 1998. 79. 2171-2179), y los siguientes oligonucleótidos:

JP781 (SEQ ID NO 29) (35 mer):

5'CATCATCATGTCTGACATGCCAGCAAGAAGAATGG3'

y JP782 (SEQ ID NO 30) (36 mer):

5'TACTACTACAGATCTTCAGTAATTTATTTTCATATGG3'

con el fin de generar un fragmento de PCR de 970 pb que contenía el gen ORF1 gene del virus PCV-2. Este fragmento fue digerido con Sall y BglII con el fin de aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento de restricción Sall-BglII de 955 pb. A continuación este fragmento se ligó con el plásmido pVR1012 (Ejemplo 12.1) para dar el plásmido pJP111 (5810 pb) (fig. 1.2).

Ejemplo de referencia 12.3: Construcción del plásmido pJP120 (PCV-1 ORF2)**[0155]**

5 Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con el plásmido pPCV1 (B. Meehan y col., J. Gen. Virol. 1997, 78:221-227), y los siguientes oligonucleótidos;
 JP783 (SEQ ID NO 31) (35 mer):
 5'CATCATCATGTCGACATGACGTGGCCAAGGAGGCG3'
 y JP784 (SEQ ID NO 32) (40 mer):
 10 5'TACTACTACAGATCTTTATTTATTTAGAGGGTCTTTTAGG3'
 con el fin de generar un fragmento de PCR de 730 pb que contenía el gen ORF2 del virus PCV-1 (cepa PK-15, secuencia de GenBank nº acceso U49186). Este fragmento fue digerido con Sall y BglII con el fin de aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento de restricción Sall-BglII de 715 pb. A continuación este fragmento se ligó con el plásmido pVR1012 (Ejemplo 12.1) para dar el plásmido pJP120 (5565 pb) (fig. 1.3).

Ejemplo de referencia 12.4: Construcción del plásmido pJP121 (PCV-1 ORF1)

20 **[0156]** El plásmido pPCV1 que contenía el genoma del virus PCV-1 en forma de un fragmento PstI (B. Meehan y col., J. Gen. Virol. 19, 78:221-227) fue digerido con PstI con el fin de aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento PstI-PstI de 1.759 pares de bases (pb). Este fragmento estaba autoligado.

25 **[0157]** El gen ORF1 del virus PCV-1 cepa PK-15 (B. Meehan y col., J. Gen. Virol. 1997, 78, 221-227; secuencia de GenBank, nº acceso U49186) se amplificó, usando la plantilla consistente en el fragmento PstI-PstI autoligado, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los siguientes oligonucleótidos:

JP785 (SEQ ID NO 33) (35 mer):
 5'CATCATCATGTCGACATGCCAAGCAAGAAAAGCGG3'
 y JP786 (SEQ ID NO 34) (36 mer):
 30 5'TACTACTACAGATCTTCAGTAATTTATTTTATATGG3'
 con el fin de generar un fragmento de PCR de 965 pb que contenía el gen ORF1 del virus PCV-1 (cepa PK-15). Este fragmento fue digerido con Sall y BglII con el fin de aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento de restricción Sall-BglII de 946 pb. A continuación este fragmento se ligó con el plásmido pVR1012 (Ejemplo 12.1) para dar el plásmido pJP121 (5804 pb) (fig. 1.4).

[0158] Ejemplo de referencia 12.5: Construcción del plásmido pJP058 (que expresa GM-CSF porcino)

40 **[0159]** Se recogió sangre de cerdo en un tubo que contenía EDTA tomando sangre de la vena yugular. Se recogieron las células mononucleadas por centrifugado en un gradiente Ficoll y a continuación se cultivaron *in vitro* en medio RPMI 1640 (Gibco-BRL) y se estimularon mediante la adición de concanavalina A (Sigma) a una concentración final de aproximadamente 5 µg/ml en el medio de cultivo. Después de 72 horas de estimulación, se recogieron los linfoblastos y se extrajo el ARN total de estas células con el kit de extracción "Micro-Scale Total RNA Separator Kit" (Clontech) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó una reacción de transcripción inversa, realizada con ayuda del kit "1st-Strand cDNA Synthesis Kit" (Perkin Elmer), seguido de una
 45 reacción en cadena de la polimerasa, en el ARN total extraído a partir de estos linfoblastos porcinos con los siguientes oligonucleótidos:

RG972 (33 mer):
 5'TATGCGGCCGCGCAGCATGTGGCTGCAGAACCTG3'
 y RG973 (34 mer):
 50 5'TATGCGGCCGCTACGTATCACTTCTGGGCTGGTT3'
 con el fin de generar un fragmento de PCR de aproximadamente 450 pares de bases (pb). Este fragmento fue digerido con NotI con el fin de aislar, después de electroforesis en gel de agarosa, el fragmento NotI-NotI de 450 pb. A continuación este fragmento se ligó con el plásmido pVR1012 (Ejemplo 12.1), preferentemente digerido con NotI y desfosforilado, para dar el plásmido pJP058 (5405 pb) (fig. 1.5). Se verificó la secuencia del gen pGM-CSF clonado en el plásmido pJP058 y se encontró que era idéntica a la disponible en la base de datos GenBank (nº acceso D21074).

Ejemplo 12.6: Producción de los plásmidos purificados para la vacunación de cerdos

60 **[0160]** Se transformaron bacterias K12 de *Escherichia coli* (cepas DH10B o SCS1) con los plásmidos pJP109, pJP111, pJP058, pJP120 y pJP121 de los Ejemplos 12.1 a 12.5 anteriores. A continuación se cultivaron

por separado los cinco clones transformados obtenidos respectivamente con estos cinco plásmidos, con agitación a +37°C, en medio de cultivo Luria (LB). Se recogieron los cultivos bacterianos al final de la fase exponencial y se extrajeron los plásmidos según la técnica de lisis alcalina. A continuación se purificaron los plásmidos extraídos en un gradiente de cloruro de cesio según la técnica descrita por Sambrook y col., (Molecular Biology: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Después de extracción final de bromuro de etidio y precipitación en presencia de etanol absoluto, se volvieron a suspender los plásmidos purificados en tampón TE (Tris/EDTA 1 mM, pH 8,0) con el fin de obtener soluciones de reserva que contuvieran 2 mg de plásmido por ml. Estas soluciones de reserva se almacenan a -20°C antes de su uso.

Ejemplo 12.7: Control de la expresión de los ORF 1 y 2 del virus PCV-2

[0161] Con el fin de controlar los productos de expresión de los genes ORF2 de PCV-2 y ORF1 de PCV-2 ORF1, clonados respectivamente en los plásmidos pJP109 y pJP111, estos plásmidos se sometieron a transfección en células CHO-K1 (ovario de hámster chino) (ATCC nº CCL-61) con Lipofectamine Plus®; kit de transfección (Gibco-BRL, Catálogo 10964-013), siguiendo las recomendaciones del fabricante para su uso.

[0162] 48 horas después de la transfección, las células transfectadas se lavan y se fijan con una solución de acetona glacial al 95% durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se usaron cinco anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas ORF1 de PCV-2 (F199 1D3GA y F210 7G5GD) y proteínas ORF2 (F190 4C7CF, F190 2B1BC y F190 3A8BC) como primeros anticuerpos. Se usó un conjugado IgG antirratón, marcado con Cy3, para revelar el marcado específico. Se observó una fluorescencia específica de PCV-2 con los 3 monoclonales ORF2 de PCV-2 en las células transfectadas con el plásmido pJP109, pero no en las transfectadas con el plásmido pJP111. En cambio, se observó una fluorescencia específica de PCV-2 con los dos monoclonales ORF1 de PCV-2 en las células transfectadas con el plásmido pJP111, pero no en las transfectadas con el plásmido pJP109. No se detectó fluorescencia con los monoclonales de PCV-2 en células CHO transfectadas con el plásmido pVR1012 en solitario o en las células CHO no transfectadas.

[0163] Se obtuvo el mismo resultado de expresión con un suero policlonal específico para el virus PCV-2. En este caso, se usó un conjugado IgG anti-cerdo marcado con fluoresceína para detectar la fluorescencia específica. No se detectó fluorescencia con este suero policlonal en células CHO transfectadas con el plásmido pVR1012 en solitario o en las células CHO no transfectadas.

Ejemplo de referencia 12.8: Vacunación de cerdos con ADN desnudo

12.8.1. Lechones de un día de vida

[0164] Los grupos de lechones obtenidos por cesárea en DO del protocolo se colocan en una unidad de aislamiento. Estos lechones son vacunados a la edad de 2 días por la vía intramuscular con varias soluciones de vacuna de plásmido. Las soluciones de vacuna se preparan diluyendo las soluciones de reserva en suero salino fisiológico estéril (NaCl al 0,9%).

[0165] Los lechones son vacunados:

- con el plásmido pJP109 en solitario
- o con la mezcla de los plásmidos pJP109 y pJP111
- o con la mezcla de los plásmidos pJP109 y el plásmido de referencia pJP058
- o con la mezcla de los plásmidos pJP109, pJP111 y el plásmido de referencia pJP058

[0166] Las soluciones de vacuna comprenden 500 µg de cada plásmido. Volumen: Las soluciones de vacuna se inyectan por la vía intramuscular en un volumen total de 2 ml. En la práctica, dada la edad de los lechones en la vacunación (1-2 días), se administra 1 inyección de 1 ml en cada lado del cuello (= 2 x 1 ml).

[0167] Se aplican dos inyecciones de vacuna en un intervalo de dos semanas, es decir, en los días D2 y D14 del protocolo.

[0168] Se realiza una prueba de provocación en D21 del protocolo por administración oronasal de una suspensión vírica de una cepa virulenta de PCV-2. A continuación se vigilan los lechones durante 3 semanas para observar la aparición de signos clínicos específicos de síndrome multisistémico de emaciación posdestete en los lechones. Los signos que se vigilan son:

- temperatura rectal: medida diaria durante los primeros 14 días, y después dos medidas durante la 3ª semana después de la prueba de provocación.

Peso: se pesan los lechones justo antes de la prueba de provocación y después una vez por semana durante las 3 semanas después de la prueba de provocación.

Recogida de muestras de sangre para analizar: viremia y anticuerpos: muestras de sangre tomadas en D2, D14, D21, D28, D35 y D42.

Autopsia: en D42, se da muerte humanamente a los cerdos supervivientes y se someten a autopsia para buscar lesiones anatomopatológicas y para hacer preparados histológicos del hígado, los ganglios linfáticos, el bazo, los riñones y el timo en busca de lesiones en estos tejidos.

12.8.2. Lechones de 5-7-semanas

[0169] Se vacuna a los lechones de 5 a 7 semanas de vida, que ya no tienen anticuerpos maternos específicos para el virus PCV-2, por la vía intramuscular:

con el plásmido pJP109 en solitario,

o con la mezcla de los plásmidos pJP109 y pJP111

o con la mezcla de los plásmidos pJP109 y el plásmido de referencia pJP058

o con la mezcla de los plásmidos pJP109, pJP111 y el plásmido de referencia pJP058

las dosis de vacuna son las mismas que las indicadas en el Ejemplo 12.8.1 (500 µg por plásmido). Las soluciones de vacuna se inyectan por la vía intramuscular en un volumen de 2 ml (una única administración de 2 ml, en los músculos del cuello).

[0170] Se realizan dos vacunaciones en un intervalo de 21 días (D0 y D21). Se realiza una prueba de provocación 14 días después de la última vacunación (D35) por administración intramuscular de una suspensión vírica de una cepa virulenta de PCV-2.

[0171] A continuación se vigila a los cerdos durante 8 semanas para observar la aparición de signos clínicos específicos del síndrome multisistémico de emaciación posdestete en lechones. La vigilancia clínica de los lechones después de la prueba de provocación es idéntica a la descrita en el Ejemplo 12.8.1 con la excepción de que la duración total de observación es esta vez de 8 semanas.

Ejemplo de referencia 12.9: Vacunación de cerdos con ADN formulado con DMRIE-DOPE

[0172] Es posible usar, en lugar de las soluciones de ADN de plásmido desnudo descritas en el Ejemplo 12.8, soluciones de ADN de plásmido, formuladas con DMRIE-DOPE. Se prepara una solución de ADN (que contiene uno o más plásmidos según el Ejemplo 12.6) a 1 mg/ml en NaCl al 0,9%. Se prepara una solución DMRIE-DOPE a 0,75 mM mediante captación de un liofilizado de DMRIE-DOPE en un volumen adecuado de agua destilada estéril.

[0173] La formación de los complejos de ADN de plásmido-lípido catiónico se consigue diluyendo, en partes iguales, la solución de DMRIE-DOPE a 0,75 mM con la solución de ADN a 1 mg/ml en NaCl al 0,9%. La solución de ADN se introduce gradualmente, con la ayuda de una jeringa montada con una aguja 26G, a lo largo de la pared del vial que contiene la solución de lípido catiónico de manera que se evite la formación de espuma. Se realiza agitación suave en cuanto las dos soluciones se hayan mezclado. Finalmente se obtiene una composición que comprende DMRIE-DOPE 0,375 mM y 500 µg/ml de ADN.

[0174] Es deseable que las dos soluciones usadas estén a temperatura ambiente durante todas las operaciones descritas anteriormente. La formación de complejo ADN/DMRIE-DOPE se realiza a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la inmunización de los cerdos.

[0175] A continuación se vacuna a los cerdos según las condiciones descritas en los Ejemplos 12.8.1. y 12.8.2.

Vacuna de poxvirus de recombinante de circovirus porcino Ejemplo de referencia 13

[0176] Los siguientes pasos son extractos de la solicitud de EE.UU. nº 60/138.478.

[0177] Este ejemplo se refiere a ORF1 (Meehan y col., 1998; correspondiente a COL4 en la solicitud de patente francesa 98/03.707), que comprende nt 398-1342 (GenBank número de acceso AF055392), tiene el potencial de codificar una proteína con un peso molecular predicho de 37,7 kD. ORF2 (Meehan y col., 1998; correspondiente a COL13 en la solicitud de patente francesa 98/03.707), que comprende nt 1381-1768 unido a 1-314 (GenBank número de acceso AF055392), puede codificar una proteína con un peso molecular predicho de 27,8 kD.

[0178] Se logrará una mejor comprensión de este ejemplo haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

5 La fig. 2.1 (SEQ ID NO: 16) muestra la secuencia de nucleótidos de referencia de un fragmento de 3,7 pares de kilobases de ADN de ALVAC que contiene el marco de lectura abierta C6;
 la fig. 2.2 muestra el mapa de plásmido de donador pJP102;
 la fig. 2.3 (SEQ ID NO: 8) muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 2,5 pares de kilobases a partir del plásmido de donador pJP102 desde los sitios de restricción *KpnI* (posición 653) a *SacI* (posición 3166);
 10 la fig. 2.4 muestra el mapa de plásmido de donador pJP 105;
 la fig. 2.5 muestra el mapa de referencia de plásmido de donador pJP 107;
 la fig. 2.6 (SEQ ID NO: 11) muestra la secuencia de nucleótidos de referencia del fragmento de 3,6 pares de kilobases del plásmido de donador pJP107 desde los sitios de restricción *KpnI* (posición 653) a *SacI* (posición 4255).
 15

[0179] Los autores de la invención describen poxvirus recombinantes que contienen en sí una secuencia de ADN de PCV2 en una región no esencial del genoma del poxvirus. Los poxvirus recombinantes expresan productos génicos del gen PCV2 extraño. En particular, se aislaron genes ORF2 y ORF1 que codifican proteínas de PCV2, se caracterizaron y se insertaron en recombinantes de ALVAC (vector de virus de la viruela del canario). Las técnicas biológicas usadas son las descritas por Sambrook y col., (1989). Cell Lines and Virus Strains. La cepa de PCV2 designada como Imp. 1010-Stoon ha sido descrita anteriormente (Meehan y col., 1998). Se aisló a partir de tejidos de ganglios linfáticos mesentéricos de un cerdo enfermo originario de Canadá. La clonación del genoma de PCV2 genoma fue descrita por Meehan y col., (1998). El plásmido pGem7Z-1mp1010- Stoon-EcoRI nº 14 contiene el genoma de PCV2 como un fragmento *EcoRI* introducido en el sitio *EcoRI* del plásmido pGem-7Z (Promega, Madison, WI). La secuencia de nucleótidos completa de la cepa de PCV2 Imp. 1010-Stoon ha sido determinada por Meehan y col., (1998) y está disponible con el número de acceso de GenBank AF055392.
 20
 25

[0180] El virus de la viruela del canario parental (cepa Rentschler) es una cepa de vacuna para canarios. La cepa de vacuna se obtuvo a partir de un aislado de tipo genéticamente intacto y se atenuó a través de más de 200 pasos en serie en fibroblastos de embriones de pollo. Se sometió una semilla vírica madre a cuatro purificaciones en placa sucesivas en agar y se amplificó un clon de placa a través de cinco pasos adicionales después de los cuales el virus de reserva se usó como virus parental en pruebas de recombinación *in vitro*. El aislado de viruela del canario purificado en placa se designa como ALVAC. ALVAC se registró el 14 de noviembre de 1996 según los términos del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection, ATCC número de acceso VR-2547.
 30
 35

[0181] La generación de recombinantes de poxvirus implica diferentes pasos: (1) construcción de un plásmido de inserción que contiene secuencias ("brazos") que flanquean los locus de inserción en el genoma del poxvirus, y sitio de clonación múltiple (MCS) localizado entre los dos brazos de flaqueo (por ejemplo, véase Ejemplo de referencia 13.1); (2) construcción de plásmidos de donador consistentes en un plásmido de inserción en el MCS del que se ha insertado una casete de expresión de gen extraño (por ejemplo véase Ejemplos 13.2 a 13.5); (3) recombinación *in vitro* en cultivo celular entre los brazos del plásmido de donador y el genoma del poxvirus parental que permite la inserción de la casete de expresión del gen extraño en el locus apropiado del genoma del poxvirus, y purificación en placa del virus recombinante (por ejemplo, véase Ejemplo 13.6).
 40
 45

Ejemplo de referencia 13.2 - CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDO DE INSERCIÓN DE VIRUELA DEL CANARIO EN LOCUS C6

[0182] La fig. 2.1 (SEQ ID NO: 16) es la secuencia de un segmento de 3,7 kb de ADN de viruela del canario. El análisis de la secuencia reveló un ORF designado como C6L iniciado en la posición 377 y terminado en la posición 2254. A continuación se describe un plásmido de inserción C6 construido por delección del ORF C6 y su sustitución por un sitio de clonación múltiple (MCS) flanqueado por señales de terminación de transcripción y traducción. Se amplificó un fragmento de PCR de 380 pb a partir de ADN genómico de viruela del canario usando cebadores de oligonucleótidos C6A1 (SEQ ID NO: 21) y C6B 1 (SEQ ID NO: 22). Se amplificó un fragmento de PCR de 1155 pb a partir de ADN genómico de viruela del canario usando cebadores de oligonucleótidos C6CI (SEQ ID NO: 23) y C6D1 (SEQ ID NO: 24). Los fragmentos de 380 pb y 1155 pb se fusionaron conjuntamente mediante su adición conjunta como plantilla y amplificación de un fragmento de PCR de 1613 pb usando cebadores de oligonucleótidos C6A1 (SEQ ID NO: 21) y C6D1 (SEQ ID NO: 24). Este fragmento fue digerido con *SacI* y *KpnI*, y se ligó en pBluescript SK+ (Stratazone, La Jolla, CA, EE.UU.) digerido con *SacI/KpnI*. El plásmido resultante, pC6L fue confirmado por análisis de secuencia de ADN. Consiste en 370 pb de ADN de viruela del canario en la dirección 5' de C6 ("brazo izquierdo de C6"), señal de terminación temprana de vacuna, codones de
 50
 55
 60

terminación de traducción en seis marcos de lectura, un MCS que contiene sitios *SmaI*, *PstI*, *XhoI* y *EcoRI*, señal de terminación temprana de vacuna, codones de terminación de traducción en seis marcos de lectura y 1156 pb de secuencia de viruela del canario en la dirección 3' ("brazo derecho de C6").

5 **[0183]** El plásmido pJP099 se obtuvo de pC6L ligando una casete que contenía el promotor H6 de vacuna (descrito en Taylor y col., (1988c), Guo y col., (1989), y Perkus y col., (1989)) acoplado con un gen extraño en los sitios *SmaI*/*EcoRI* de pC6L.

10 **[0184]** Este plásmido pJP099 contiene un único sitio *EcoRV* y un único sitio *NruI* situado en el extremo 3' del promotor H6, y un único sitio *Sall* situado entre el codón de TERMINACIÓN del gen extraño y el brazo izquierdo de C6. El fragmento *EcoRV*/*Sall* o *NruI*/*Sall* de 4,5 kb de pJP099 contiene por tanto la secuencia de plásmidos (pBluescript SK+; Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.), los 2 brazos C6 y el extremo 5' del promotor H6 hasta el sitio *EcoRV* o *NruI*.

15 **[0185]** Secuencias de los cebadores:

Cebador C6A1 (SEQ ID NO: 21)
ATCATCGAGCTCGCGGCCGCCTATCAAAAGTCTTAATGAGTT

20 Cebador C6B1 (SEQ ID NO: 22)

GAATTCCTCGAGCTGCAGCCCGGGTTTTTATAGCTAATTAGTCATTTTTTC
GTAAGTAAGTATTTTTATTAA

25 Cebador G6C1 (SEQ ID NO: 23)

CCCGGGCTGCAGCTCGAGGAATTCTTTTTATTGATTAAGTCAATGAG
TATATATAATTGAAAAAGTAA

Cebador C6D1 (SEQ ID NO: 24)
30 GATGATGGTACCTTCATAAATACAAGTTTGATTAACTTAAGTTG

Ejemplo 13.2 - CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDO DE DONADOR DE ALVAC PARA ORF2 DE PCV2

[0186] El plásmido pGem7Z-Imp1010-Stoon-*EcoRI*No. 14, que contiene el genoma PCV2 como un fragmento *EcoRI* en plásmido pGem-7Z, fue digerido con *EcoRI*, y se aisló y ligó un fragmento de 1.768 pb.

35 **[0187]** Con el fin de insertar el ORF 2 de PCV2 en un vector de inserción de ALVAC apropiado: se usaron cebadores JP760 (SEQ ID NO: 25) y JP773 (SEQ ID NO: 26) para amplificar ORF 2 de PCV2 a partir del fragmento *EcoRI* ligado de 1.768 pb (véase anteriormente) que da como resultado PCR J1304. El cebador JP760 (SEQ ID NO: 25) contiene el extremo 3' del promotor H6 de *EcoRV* y el extremo 5' de ORF 2 de PCV2. El cebador JP773 (SEQ ID NO: 26) contiene el extremo 3' de ORF 2 de PCV2 seguido por un sitio *Sall*. A continuación el producto de PCR J1304 fue digerido con *EcoRV*/*Sall* y se clonó como un fragmento de 750 pb en un fragmento *EcoRV*/*Sall* de 4,5 kb de pJP099 (véase anteriormente en el Ejemplo 13.1). El plásmido resultante se confirmó por análisis de secuencias y se designó como pJP102 (véase el mapa de pJP102 en la fig. 2.2 y la secuencia (SEQ ID NO: 8) en la fig. 2.3). La secuencia de ORF2 se corresponde con la secuencia disponible en GenBank, número de acceso AF055392. El plásmido de donador pJP102 (linealizado con *NotI*) se usó en una prueba de recombinación (IVR) *in vitro* para generar recombinante de ALVAC vCP1614 (véase Ejemplo 13.6).

[0188] Secuencia de los cebadores:

50 JP760 (SEQ ID NO: 25)

CAT-CAT-CAT-GAT-ATC-CGT-TAA-GTT-TGT-ATC-GTA-ATG-ACG-TAT- CCA-
AGG-AGG-CG

JP773 (SEQ ID NO: 26)
TAC-TAC-TAC-GTC-GAC-TTA-GGG-TTT-AAG-TGG-GGG-GTC

5 **Ejemplo de referencia 13.3 - CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO DE DONADOR DE ALVAC PARA ORF2 Y ORF1 DE PCV2**

10 [0189] Se amplificó ORF 1 de PCV2 mediante PCR usando cebadores JP774 (SEQ ID NO: 9) y JP775 (SEQ ID NO: 10) en el plásmido pGem 7Z-Imp1010-Stoon-EcoRI nº 14 para dar como resultado PCR J1311. El cebador JP774 (SEQ ID NO: 9) contiene el extremo 3' del promotor H6 de *Nrul* y el extremo 5' de ORF1 de PCV2. El cebador JP775 (SEQ ID NO: 10) contiene el extremo 3' de ORF1 de PCV2 seguido por un sitio *Sall*. El producto de PCR J1311 (-1 Kb) se clonó en pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El plásmido resultante fue confirmado por análisis de secuencias y se designó como pJP104. La secuencia de ORF1 se corresponde con la secuencia disponible en GenBank, número de acceso AF055392. Se aisló un fragmento de *Nrul/Sall* de 970 pb a partir de pJP104 y se clonó en un fragmento *Nrul/Sall* de 4,5 kb a partir de pJP099 (véase Ejemplo 13.1), para dar como resultado un plásmido que se confirmó por análisis de restricción y se designó como pJP105 (véase fig. 2.4). El plásmido de donador pJP105 podría usarse en una prueba de recombinación *in vitro* (descrita en el Ejemplo 13.6) para generar recombinante de ALVAC que expresa el ORF1 de PCV2.

20 [0190] Se hizo como un *Bam*HI/*Sall* de 838 pb de pJP102 (véase Ejemplo 13.2) usando el fragmento Klenow de ADN polimerasa, y se clonó en el sitio *Eco*RI como por Klenow de pJP105. Se verificaron los clones en relación con la orientación del inserto por análisis de restricción y se escogió una orientación cabeza-cabeza. Este plásmido se confirmó por análisis de secuencias y se designó como pJP107 (véase el mapa de pJP107 en la fig. 2.5 y la secuencia (SEQ ID NO: 11) en la fig. 2.6). El plásmido de donador pJP107 (linealizado con *Not*I) se usó en una prueba de recombinación *in vitro* (IVR) para generar el recombinante de ALVAC vCP1615 (véase Ejemplo 13.6).

[0191] Secuencia de los cebadores.

30 JP774 (SEQ ID NO: 9)

CAT-CAT-CAT-TCG-CGA-TAT-CCG-TTA-AGT-TTG-TAT-CGT-AAT-GCC- CAG-
CAA-GAA-GAA-TGG

35 JP775 (SEQ ID NO: 10)
TAC-TAC-TAC-GTC-GAC-TCA-GTA-ATT-TAT-TTC-ATA-TGG

Ejemplo de referencia 13.4 - CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDO DE DONADOR DE ALVAC PARA ORF2 DE PCV1

40 [0192] El plásmido pPCV1 (B. Meehan y col., J. Gen. Virol. 1997.78.221-227), que contiene el genoma de PCV1 como un fragmento *Pst*I en plásmido pGem-7Z, se usó como plantilla para amplificar el ORF2 de PCV1.

45 [0193] Para insertar ORF 2 de PCV2 en un vector de inserción de ALVAC apropiado: se usaron cebadores JP787 (SEQ ID NO: 12) y JP788 (SEQ ID NO: 13) para amplificar ORF 2 de PCV1 del plásmido pPCV1 (véase anteriormente) para dar como resultado PCR J 131.5. El cebador JP787 (SEQ ID NO: 12) contiene el extremo 3' del promotor H6 de *Eco*RV y ORF 2 seguido por un sitio *Sall*. A continuación el producto de PCR J1315 fue digerido con *Eco*RV/*Sall* y clonado como un fragmento de 750 pb en un fragmento *Eco*RV/*Sall* de 4,5 kb de pJP099 (véase anteriormente en el Ejemplo 13.1). El plásmido resultante fue confirmado por análisis de secuencias y se designó como pJP 113. La secuencia de ORF 2 se corresponde con la secuencia disponible en GenBank, número de acceso U49186. El plásmido de donador pJP113 (linealizado con *Not*I) se usó en una prueba de recombinación *in vitro* (IVR) para generar vCP1621 recombinante de ALVAC (véase Ejemplo 13.7).

[0194] Secuencia de los cebadores.

55 JP787 (SEQ ID NO: 12)

CAT-CAT-CAT-GAT-ATC-CGT-TAA-GTT-TGT-ATC-GTA-ATG-ACG-TGG- CCA-
AGG-AGG-CG

JP788 (SEQ ID NO: 13)

TAC-TAC-TAC-GTC-GAC-TTA-TTT-ATT-TAG-AGG-GTC-TTT-TAG-G

5

Ejemplo de referencia 13.5 - CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO DE DONADOR DE ALVAC PARA ORF2 Y ORF1 DE PCV1

[0195] El plásmido pPCV1 (véase Ejemplo 13.4 anteriormente), que contenía el genoma de PCV1 como un fragmento *Pst*I en plásmido pGem-7Z, fue digerido con *Pst*I, y se aisló un fragmento de 1.759 pb y se ligó.

[0196] Se usaron los cebadores JP789 (SEQ ID NO: 14) y JP790 (SEQ ID NO: 15) para amplificar ORF1 de PCV1 del fragmento *Pst*I ligado de 1.759 pb (véase anteriormente), para dar como resultado PCR J1316. El cebador JP789 (SEQ ID NO: 14) contiene el extremo 3' del promotor H6 de *Nr*uI y el extremo 5' de ORF1 de PCV1. El cebador JP790 (SEQ ID NO: 15) contiene el extremo 3' de ORF1 de PCV1 seguido por un sitio *Sal*I. El producto de PCR J1316 (-1 Kb) se clonó en pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El plásmido resultante se confirmó mediante análisis de secuencias y se designó como pJP114. La secuencia de ORF1 se corresponde con la secuencia disponible en GenBank, número de acceso U49186. Se aisló un fragmento *Nr*uI/*Sal*I de 970 pb de pJP114 y se clonó en un fragmento *Nr*uI/*Sal*I de 4,5 kb de pJP099 (véase Ejemplo 13.1), para dar como resultado un plásmido que se confirmó por análisis de restricción y se designó como pJP115. El plásmido de donador pJP115 podría usarse en una prueba de recombinación *in vitro* (descrita en el Ejemplo 13.7) para generar recombinante de ALVAC que expresa el ORF1 de PCV1.

[0197] Se hizo como un *Bam*HI/*Sal*I de 838 pb de pJP113 (véase Ejemplo 2.4) usando fragmento de Klenow de ADN polimerasa, y se clonó en el sitio *Eco*RI como por Klenow de pJP115. Se verificaron los clones en relación con la orientación del inserto por análisis de restricción y se eligió una orientación cabeza-cabeza. Este plásmido se confirmó por análisis de secuencias y se designó como pJP117. El plásmido de donador pJP117 (linealizado con *Not*I) se usó en una prueba de recombinación *in vitro* (IVR) para generar el vCP1622 recombinante de ALVAC (véase Ejemplo 13.7).

[0198] Secuencia de los cebadores.

JP789 (SEQ ID NO: 14)

CAT-CAT-CAT-TCG-CGA-TAT-CCG-TTA-AGT-TTG-TAT-CGT-AAT-GCC- AAG-
CAA-GAA-AAG-CGG

35

JP790 (SEQ ID NO: 15)

TAC-TAC-TAC-GTC-GAC-TCA-GTA-ATT TAT-TTT-ATA-TGG

Ejemplo de referencia 2.6 - GENERACIÓN DE RECOMBINANTES DE PCV2-ALVAC

[0199] Los plásmidos pJP102 (véase Ejemplo 13.2 y fig. 2.2) y el plásmido de referencia pJP107 (véase Ejemplo 13.3 y fig. 2.5) se linealizaron con *Not*I y se sometieron a transfección en células CEF primarias infectadas con ALVAC usando el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio descrito anteriormente (Panicali y Paoletti, 1982; Piccini y col., 1987). Se seleccionaron placas positivas sobre la base de la hibridación a sondas radiomarcadas de PCV2 específicas y se sometieron a cuatro tandas en secuencia de purificación de placa hasta que se obtuvo una población pura. A continuación se amplificó una placa representativa de cada IVR y los recombinantes de ALVAC resultantes se designaron como vCP1614 y vCP1615. El virus vCP1614 es el resultado de episodios de recombinación entre ALVAC y el plásmido de donador pJP102, y contiene el ORF2 de PCV2 insertado en el locus C6 de ALVAC. El virus vCP1615 es el resultado de episodios de recombinación entre ALVAC y el plásmido de donador pJP107, y contiene los ORF2 y ORF1 de PCV2 insertados en el locus C6 de ALVAC en una orientación cabeza-cabeza.

[0200] De una forma similar, puede generarse un recombinante de ALVAC que expresa sólo ORF1 de PCV2 usando el plásmido de donador pJP105 descrito en el Ejemplo 13.3.

55

[0201] Inmunofluorescencia. Con el fin de determinar si las proteínas de PCV2 se expresaron en células Vero infectadas con recombinante de ALVAC, se realizó análisis de inmunofluorescencia (IF). Las células Vero infectadas se lavaron con PBS 24 h después de la infección (m.o.i. de aprox. 10) y se fijaron con acetona fría al 95% durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se usaron cinco preparados de anticuerpos monoclonales (AcM) (sobrenadante de hibridoma) específicos para ORF1 de PCV2 (PCV2 199 1D3GA y PCV2 210 7G5GD) u ORF2 (PCV2 190 4C7CF, PCV2 190 2B1BC y PCV2 190 3A8BC) como primer anticuerpo. Estos anticuerpos monoclonales específicos se obtuvieron de Merial-Lyon. Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse siguiendo las enseñanzas de los documentos citados en la presente memoria descriptiva, por ejemplo documentos de EE.UU. n° serie 09/082.358 y 09/161.092, incorporados en la presente memoria descriptiva como referencia. La reacción de IF se realizó según se describe en Taylor y col., (1990).

[0202] La inmunofluorescencia específica de PCV2 con los tres anticuerpos específicos de ORF2 podría detectarse en células infectadas con vCP1614 y células infectadas con vCP1615. La inmunofluorescencia específica de PCV2 con los dos anticuerpos específicos de ORF1 podrían detectarse en células infectadas sólo con vCP1615. Estos resultados indicaron que, según lo esperado, vCP1614 expresa sólo ORF2, mientras vCP1615 expresa ORF1 y ORF2. No se detectó fluorescencia en células Vero infectadas con ALVAC parentales, ni en células Vero no infectadas.

[0203] Ejemplo de referencia 13.7 - GENERACIÓN DE RECOMBINANTES DE ALVAC PCV1 Los plásmidos pJP113 (véase Ejemplo 13.4) y pJP117 (véase Ejemplo 13.5) se linealizaron con *NotI* y se sometieron a transfección en células CEF primarias infectadas con ALVAC usando el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio descrito anteriormente (Panicali y Paoletti, 1982; Piccini y col., 1987). Se seleccionaron placas positivas sobre la base de hibridación para sondas radiomarcadas con PCV1 específicas y se sometieron a cuatro tandas en secuencia de purificación de placa hasta que se obtuvo una población pura. A continuación se amplificó una placa representativa de cada IVR y los recombinantes de ALVAC resultantes se designaron como vCP1621 y vCP1622. El virus de vCP1621 es el resultado de episodios de recombinación entre ALVAC y el plásmido de donador pJP113, y contiene el ORF2 de PCV1 insertado en el locus C6 de ALVAC. El virus de vCP1622 es el resultado de episodios de recombinación entre ALVAC y el plásmido de donador pJP 117, y contiene el ORF2 y el ORF1 de PCV1 insertados en el locus C6 de ALVAC en una orientación cabeza-cabeza.

[0204] De una forma similar, puede generarse un ALVAC recombinante que expresa sólo ORF1 de PCV1 usando el plásmido de donador pJP 15 descrito en el Ejemplo 13.5.

[0205] Inmunofluorescencia. Con el fin de determinar si las proteínas de PCV1 se expresaron en células Vero infectadas con recombinante de ALVAC, se realizó un análisis de inmunofluorescencia (IF). Las células Vero infectadas se lavaron con PBS 24 h después de la infección (m.o.i. de aprox. 10) y se fijaron con acetona fría al 95% durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se usó un suero policlonal de cerdo anti-PCV1 específico (Allan G. y col., Vet Microbiol. 1999.66: 115-123) como primer anticuerpo. La reacción de IF se realizó según se describe en Taylor y col. (1990).

[0206] La inmunofluorescencia específica de PCV1 podría detectarse en células infectadas con vCP1621 y células infectadas con vCP1622. Estos resultados indicaron que, según lo esperado, vCP1621 y vCP1622 expresan productos específicos de PCV1. No se detectó fluorescencia con un suero policlonal de cerdo específico de PCV2 en células infectadas con vCP1621 y en células infectadas con vCP1622. No se detectó fluorescencia en células Vero infectadas con ALVAC parentales, ni en células Vero no infectadas.

Ejemplo de referencia 13.8: FORMULACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES DE LA VIRUELA DEL CANARIO CON CARBOPOL™ 974P

[0207] Para la preparación de vacunas, pueden combinarse los virus recombinantes de la viruela del canario vCP1614 y vCP1615 (Ejemplo 13.6) con soluciones de carbómero. De la misma forma, los virus recombinantes de la viruela del canario vCP1621 y vCP1622 (Ejemplo 13.7) pueden mezclarse con soluciones de carbómero. El componente de carbómero usado para vacunación de cerdos según la presente invención es Carbopol™ 974P fabricado por la empresa BF Goodrich (peso molecular de #3.000.000). Primero se prepara una solución de reserva de Carbopol™ 974P al 1,5% en agua destilada que contiene 1 g/l de cloruro de sodio. Esta solución de reserva se usa a continuación para fabricar 4 mg/ml de solución Carbopol™ 974P en agua fisiológica. La solución de reserva se mezcla con el volumen de agua fisiológica requerido, ya sea en una etapa o en varias etapas sucesivas, ajustando el valor de pH en cada etapa con una solución de hidróxido de sodio 1 N (o más concentrada) para obtener un valor de pH final de 7,3-7,4. Esta solución final de Carbopol™ 974P es una solución lista para usar para reconstituir un virus recombinante liofilizado o para diluir una reserva concentrada de virus recombinante. Por ejemplo, para obtener una suspensión vírica final que contiene 10⁸ ufp por dosis de 2 ml, se

puede diluir 0,1 ml de una solución de reserva de 10^9 ufp/ml en 1,9 ml de la solución lista para usar anterior de 4 mg/ml de Carbopol™ 974P. De la misma forma, pueden prepararse también soluciones listas para usar de 2 mg/ml de Carbopol™ 974P.

5 Ejemplo de referencia 13.9 - INMUNIZACIÓN DE CERDOS Y POSTERIOR PRUEBA DE PROVOCACIÓN

13.9.1. INMUNIZACIÓN DE LECHONES DE 1 DÍA

[0208] Los grupos de lechones, producidos por cesárea en el Día 0, se colocan en aisladores. Los lechones son vacunados por vía intramuscular en el Día 2 con varias soluciones de vacunas. Las suspensiones víricas de vacunas se preparan por dilución de reservas de virus recombinantes en agua fisiológica estéril (NaCl al 0,9%). Pueden determinarse empíricamente intervalos adecuados para suspensiones víricas, pero en general estarán comprendidos entre 10^6 y 10^{10} y preferentemente aproximadamente 10^{10} , ufp/dosis. Las soluciones de vacunas pueden prepararse también mezclando la suspensión del virus recombinante con una solución de Carbopol™ 974P, según se describe en el Ejemplo 13.8.

[0209] Los lechones son vacunados con:

- Virus recombinante vCP1614 (Ejemplo 13.2)
- Virus recombinante vCP1615 (Ejemplo 13.3)
- Virus recombinante vCP1614 mezclado con Carbopol (4 mg/ml de solución)
- Virus recombinante vCP1615 mezclado con Carbopol (4 mg/ml de solución).

[0210] Las suspensiones víricas contienen 10^8 unidades de formación de placas (ufp) por dosis. Cada suspensión vírica se inyecta por vía intramuscular por debajo de un volumen de 1 ml. La inyección intramuscular se administra en los músculos del cuello.

[0211] Se administran dos inyecciones de suspensiones víricas en el Día 2 y el Día 14 del experimento. Se realiza una prueba de provocación en el Día 21 mediante una administración oronasal de una suspensión vírica preparada a partir de un cultivo de cepa virulenta de PCV-2. Después de la prueba de provocación, se vigila a los lechones durante 3 semanas en busca de signos clínicos específicos del síndrome multisistémico posdestete. Se puntúan los signos siguientes:

Temperatura rectal: monitorización diaria durante 2 semanas después de la prueba de provocación, y después 2 medidas de temperatura rectal durante la tercera semana.

Peso: se pesan los lechones justo antes de la prueba de provocación, y después semanalmente durante las 3 primeras semanas después de la prueba de provocación.

Se toman muestras de sangre en el Día 2, el Día 14, el Día 21, el Día 28, el Día 35 y el Día 42 del experimento con el fin de vigilar los niveles de viremia y las valoraciones de anticuerpos específicos anti-PCV-2.

Necropsias: en el Día 42, todos los lechones supervivientes se someten humanamente a eutanasia y a necropsia en busca de lesiones macroscópicas específicas de SMEP. Se preparan muestras de tejido del hígado, los ganglios linfáticos, el bazo, los riñones y el timo con el fin de buscar lesiones histológicas específicas.

13.9.2. INMUNIZACIÓN DE LECHONES DE 5-7 SEMANAS

[0212] Se vacunan lechones de 5-7 semanas de vida, libres de anticuerpos maternos específicos anti-PCV-2, por vía intramuscular con varias soluciones de vacunas. Las suspensiones víricas de las vacunas se preparan por dilución de reservas de virus recombinantes en agua fisiológica estéril (NaCl al 0,9%). Las soluciones de vacunas pueden prepararse también mezclando la suspensión de virus recombinantes con una solución de Carbopol™ 974P, según se describe en el Ejemplo 13.8.

[0213] Los lechones se vacunan con:

- Virus recombinante vCP1614 (Ejemplo 13.2)
- Virus recombinante vCP1615 (Ejemplo 13.3)
- Virus recombinante vCP1614 mezclado con Carbopol (4 mg/ml de solución)
- Virus recombinante vCP1615 mezclado con Carbopol (4 mg/ml de solución)

[0214] Las suspensiones víricas contienen 10^8 unidades de formación de placas (ufp) por dosis. Cada suspensión vírica se inyecta por vía intramuscular por debajo de un volumen de 2 ml. La inyección intramuscular se administra en los músculos del cuello.

[0215] Se administran dos inyecciones de las suspensiones víricas en el Día 0 y el Día 21 del experimento. Se realiza una prueba de provocación en el Día 35 por una administración oronasal de una suspensión vírica preparada a partir de un cultivo de cepa virulenta de PCV-2. Después de la prueba de provocación, se vigila a los lechones durante 8 semanas en busca de signos clínicos específicos del síndrome multisistémico posdestete. La vigilancia clínica es idéntica a la descrita en el Ejemplo 13.9.1 con la salvedad de que la duración total de la vigilancia es de 8 semanas en lugar de 3 semanas.

[0216] Se realizan necropsias durante todo el experimento para lechones que mueren por la prueba de provocación y al final del experimento (Día 97) para todos los lechones supervivientes. Las muestras de tejido son las mismas que se describen en el Ejemplo 13.9.1.

REFERENCIAS

[0217]

1. Clark, E. G. Proc. Amer. Assoc. Swine Pract, pp. 499-501 (1997).
2. Edbauer, C., R. Weinberg, J. Taylor, A. Rey-Senelongue, J. F. Bouquet, P. Desmettre and E. Paoletti, Virology 179, 901-904 (1990).
3. Ellis, J., L. Hassard, E. Clark, J. Harding, G. Allan, P. Willson, J. Strakappe, K. Martin, F. McNeilly, B. Meehan, D. Todd, D. Haines, Can. Vet. J. 39, 44-51 (1998).
4. Goebel, S. J., G. P. Johnson, M. E. Perkus, S. W. Davis, J. P. Winslow, E. Paoletti, Virology 179, 247-266, 517-563 (1990).
5. Guo, P., S. Goebel, S. Davis, M. E. Perkus, B. Languet, P. Desmettre, G. Allen, and E. Paoletti, J. Virol. 63, 4189-4198 (1989).
6. Hamel, A. L., L. L. Lin and G. P. S. Nayar, J. Virol. 72, 5262-5267 (1998).
7. Harding J. C., Proc. Am. Assoc. Swine Pract 28, 503 (1997).
8. Mankertz, A., J. Mankertz, K. Wolf, H.-J. Buhk, Gen. Virol. 79, 381-384 (1998a).
9. Mankertz, J., H.-J. Buhk, G. Blaess, A. Mankertz, Virus Gene 16, 267-276 (1998b).
10. Matthews, R. E. F., Intervirology 17, 42-44 (1982).
11. Meehan, B. M., J. L. Creelan, M. S. McNulty, D. Todd, J. Gen. Virol. 78, 221-227 (1997).
12. Meehan, B. M., F. McNeilly, D. Todd, S. Kennedy, V. A. Jewhurst, J. A. Ellis, L. E. Hassard, E. G. Clark, D. M. Haines, G. M. Allan, J. Gen. Virol. 79, 2171-2179 (1998).
13. Nayar, G. P. S., A. Hamel and L. Lin. Can. Vet. J. 38, 385-386 (1997).
14. Panicali, D. and E. Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4927-4931 (1982).
15. Paoletti, E., B. R. Lipinskaks, C. Samsonoff, S. Mercer, and D. Panicali, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 193-197 (1984).
16. Perkus, M. E., K. Limbach, and E. Paoletti, J. Virol. 63, 3829-3836 (1989).
17. Piccini, A., M. E. Perkus, and E. Paoletti, In Methods in Enzymology, Vol. 153, eds. Wu, R., and Grossman, L., (Academic Press) pp. 545-563 (1987).
18. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, In Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition, (Cold Spring Harbor Press, NY) (1989).
19. Tartaglia, J., J. Winslow, S. Goebel, G. P. Johnson, J. Taylor, and E. Paoletti, J. Gen. Virol. 71, 1517-1524 (1990).

20. Tartaglia, J., Perkus ME, Taylor J, Norton EK, Audonnet JC, Cox WI, Davis SW, van der Hoeven J, Meignier B, Riviere M, and E. Paoletti, Virology 188, 217-232 (1992).

5 21. Taylor, J., R. Weinberg, B. Languet, Ph. Desmettre and E. Paoletti, Vaccine 6, 497- 503 (1988a).

22. Taylor, J. and E. Paoletti, Vaccine 6, 466-468 (1988b).

23. Taylor, J., R. Weinberg, Y. Kawaoka, R Webster and E. Paoletti, Vaccine 6, 504-508 (1988c).

10 24. Taylor, J., C. Edbauer, A. Rey-Senelongue, J. F. Bouquet, E. Norton, S. Goebel, P. Desmettre and E. Paoletti, J. Virol. 64, 1441-1450 (1990).

15 25. Taylor, J., C. Trimarchi, R. Weinberg, B. Languet, F. Guillemin, P. Desmettre and E. Paoletti, Vaccine 9, 190-193 (1991).

26. Taylor J, Weinberg R, Tartaglia J, Richardson C, Alkhatib G, Briedis D, Appel M, Norton E, Paoletti E., Virology 187, 321-328 (1992).

20 27. Todd, D., F. D. Niagro, B. W. Ritchie, W. Curran, G. M. Allan, P. D. Lukert, K. S. Latimer, W. L. Steffens, M. S. McNulty, Arch. Virol. 117, 129-135 (1991).

25 **[0218]** Habiendo descrito así en detalle formas de realización preferidas de la presente invención, debe entenderse que la invención definida por las reivindicaciones adjuntas no se limitará a los detalles particulares expuestos en la descripción anterior, ya que son posibles muchas variaciones evidentes de los mismos sin apartarse del ámbito de las reivindicaciones.

Referencias

30 **[0219]**

1. Allan GM, McNeilly F, Cassady JP, y col.: 1995, Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. Vet Microbiol 44: 49-641.

35 2. Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, y col.: 1998, Isolation of porcine circovirus-like viruses from piglets with a wasting disease in the United States of America and Europe. J Vet Diag Invest 10: 3-10.

3. Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, y col.: 1999, Experimental reproduction of wasting disease and death by coinfection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus, J Comp Path 121: 1-11 (July 1999).

40 4. Bolt DM, Hani H, Muller E, and Waldvogel AS: 1997, Nonsuppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection. J Comp Path 117: 107-118.

45 5. Ellis, JA, Hassard L, Clark EG, y col.: 1998, Isolation of circovirus from lesions of piglets with postweaning multisystemic wasting syndrome. Can Vet J 39: 44-51

6. Ellis JA, Krakowka S, Lairmore M, y col.: 1999, Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. J Vet Diag Invest 11: 3-14.

50 7. Kim HS, Jo HS and Bergeland ME: 1989, Serologic, virologic, and histopathologic observations of encephalomyocarditis virus infection in mummified and stillborn pigs- J Vet Diag Invest 1: 101-104.

8. Lager KM and Halbur PG: 1996, Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Vet Diag Invest 8: 275-282.

55 9. Meehan BM, McNeilly F. Todd D, y col.: 1998, Characterization of novel circovirus DNA's associated wasting disease syndromes in pigs. J Gen Virol 79: 2171-2179.

60 10. Mengeling WL 1992, Porcine parvovirus. In: Diseases of swine, ed. Leman AD, 7th ed-, pp. 299-31 1. Iowa State University Press, Ames, IA.

11. Molitor TW, Orveerakul K, Zhang ZZ, y col.: 1991, Polymerase chain reaction (PRC) amplification for detection

of porcine parvovirus. J Virol Meth 32: 201-211

12. Pensaert M and DeMeurichy W: 1973, A porcine enterovirus causing fetal death and mummification. Experimental infection of pregnant female pigs. Zentralbl Veterinaarmed Beih 11: 2025.

5

13. Tischer I, Rasch R and Tochtermann G: 1974, Characterization of papovavirus-and picomavirus-like particles in permanent piglet kidney cell lines. Zentralbl-Bakteriol-Org-A 226: 153-167.

14. West KH, Bystrom, JM, Wojnarowicz C, y col.: 1999, Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus-2. J Vet Diag Invest 1.

10

REIVINDICACIONES

1. Un primer vector de plásmido de ADN que comprende una primera secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF13 de cepa Imp1010 de PCV-2, para su uso en la reducción de la carga viral de PCV-2 en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo.
2. Una composición inmunógena para su uso en la reducción de la carga viral de PCV-2 en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo, en la que dicha composición comprende:
 - a) un primer vector de plásmido de ADN que comprende una primera secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF13 de cepa Imp1010 de PCV-2, y
 - b) un soporte y/o vehículo y/o excipiente y/o adyuvante aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.
3. Uso de:
 - a) un primer vector de plásmido de ADN que comprende una primera secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF13 de cepa Imp1010 de PCV-2 y
 - b) un soporte y/o vehículo y/o excipiente y/o adyuvante aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario en la preparación de una composición inmunógena para su uso en la reducción de la carga viral de PCV-2 en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo.
4. Un primer vector de plásmido de ADN que comprende una primera secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF13 de cepa Imp1010 de PCV-2, y un segundo vector de plásmido de ADN que comprende una segunda secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF4 de la cepa Imp1010 de PCV-2, para su uso en la reducción de la carga viral de PCV-2 en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo.
5. Una composición inmunógena para su uso en la reducción de la carga viral de PCV-2 en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo, en la que dicha composición comprende:
 - a) un primer vector de plásmido de ADN que comprende una primera secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF13 de cepa Imp1010 de PCV-2,
 - b) un segundo vector de plásmido de ADN que comprende una segunda secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF4 de la cepa Imp1010 de PCV-2, y
 - c) un soporte y/o vehículo y/o excipiente y/o adyuvante aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.
6. Uso de:
 - a) un primer vector de plásmido de ADN que comprende una primera secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF13 de cepa Imp1010 de PCV-2,
 - b) un segundo vector de plásmido de ADN que comprende una segunda secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95% de identidad con ORF4 de la cepa Imp1010 de PCV-2, y
 - c) un soporte y/o vehículo y/o excipiente y/o adyuvante aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario en la preparación de una composición inmunógena para su uso en la reducción de la carga viral de PCV-2 en los ganglios bronquiales y mesentéricos de un cerdo.
7. El primer plásmido para su uso según la reivindicación 1; o la composición inmunógena para su uso según la reivindicación 2; o el uso del primer plásmido según la reivindicación 3; o los plásmidos primero y segundo para su uso según la reivindicación 4; o la composición inmunógena para su uso según la reivindicación 5; o el uso de los plásmidos primero y segundo según la reivindicación 6; en el que dicha primera secuencia de nucleótidos es ORF13 de la cepa Imp1010 de PCV-2.
8. Los plásmidos primero y segundo para su uso según la reivindicación 4 ó 7; o la composición inmunógena para su uso según la reivindicación 5 ó 7; o el uso de plásmidos primero y segundo según la reivindicación 6 ó 7; en los que dicha segunda secuencia de nucleótidos es ORF4 de la cepa Imp1010 de PCV-2.

Figure 1

SEQ ID No. 1

aattcaacct	taacctttct	tattttgtag	tattcaaaagg	gcacagagcg	gggggtttgag	60
ccccctcctg	ggggaagaaa	gtcattaata	ttgaatctca	tcattgtccac	cgcccaggag	120
ggcgttctga	ctgtgggttcg	cttgacagta	latccgaagg	tgccggagag	gcgggtgttg	180
aagatgccat	ttttcettct	ccagcggtaa	cggtggcggg	ggtggacgag	ccaggggcgg	240
cgccggagga	tctggccaag	atggctgcgg	gggcgggtgc	ttcttctccg	gtaacgcttc	300
cttggatcac	tcatatctga	aaacgaaaga	agtgcgctgt	aagtattacc	agcgcacttc	360
ggcagcggca	gcacctcggc	agcacctcag	cagcaacatg	ccgagcaaga	agaatggaag	420
aagcggaccc	caaccccata	aaagggtggg	gttcactctg	aataatcctt	ccgaagacga	480
gcgcaagaaa	atacgggac	ttccaatata	cctattttgat	tatttttattg	ttggcgagga	540
gggtaatgag	gaaggacgaa	cacctcacct	ccaggggttc	gctaatttttg	tgaagaagca	600
gacttttaaat	aaagtgaagt	ggtattttggg	tgcccgtctc	cacatcgaga	aagcgaaagg	660
aacagatcac	cagaataaag	aatactgcag	taaagaaggc	aacttactga	tggagtgtgg	720
agctcctaga	tctcagggac	aaeggagtga	cctgtctact	gctgtgagta	ccttgttggg	780
gagcgggagt	ctgggtgaccg	ttgcagagca	gcacctgtta	acgtttgtca	gaaatttccg	840
cgggctggct	gaacttttga	aagttagcgg	gaaaatgcag	aagcgtgatt	ggaagactaa	900
tgtacacgtc	attgtggggc	cacctgggtg	tggtaaaagc	aatgggctg	ctaattttgc	960
agaccggaa	accacatact	ggaaaccacc	tagaaacaag	tggtgggatg	gttaccatgg	1020
tgaagaagtg	gttgttattg	atgactttta	tggctggctg	ccctgggatg	atctactcag	1080
actgtgtgat	cgatatccat	tgactgtaga	gactaaagg	ggaactgtac	cttttttggc	1140
ccgcagtatt	ctgattacca	gcaatcagac	cccgttgaa	tggtactcct	caactgctgt	1200
cccagctgta	gaagctcttt	atcggaggat	tacttccttg	gtatttttga	agaatgctac	1260
agaacaatcc	acggaggaag	ggggccagtt	cgtcaacctt	tccccccat	gccctgaatt	1320
tccatattga	ataaattact	gagtcttttt	tatcacttcg	taatggtttt	tattattcat	1380
taagggttaa	gtgggggggc	tttaagatta	aattctctga	attgtacata	catgggtaca	1440
cggatattgt	attcctgggc	gtatatactg	ttttcgaacg	cagtgcggag	gcctacgtgg	1500
tctacatttc	cagcagtttg	tagtctcagc	cacagctggg	ttcttttgtt	gtttgggttg	1560
aagtaatcaa	tagtggaatc	taggacaggt	ttgggggtaa	agtagcggga	gtggtaggag	1620
aagggctggg	ttatgggtatg	gcgggaggag	tagtttacat	aggggtcata	ggtgagggct	1680
gtggcctttg	ttacaaagtt	atcatctaga	ataacagcac	tggagcccac	tcccctgtca	1740
cctcgggtga	tccgggagca	gggccag				1767

Figura 2

SEQ ID No. 2

```

aattcaacct taacctttct tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgag 60
ccccctcctg ggggaagaaa gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag 120
ggcgtttttga ctgtggttcg cttgacagta tatccgaagg tgcgggagag gcgggtgttg 180
aagatgccat ttttcccttc ccagcggtaa cgggtggcgg ggtggacgag ccaggggagg 240
cggcgaggga tctggccaag atggctgcgg gggcgggtgc ttcttctccg gtaacgcctc 300
cttgatatac tcatatctga aaacgaaaga agtgcgctgt aagtattacc agcgcacttc 360
ggcagcggca gcacctcggc agcacctcag cagcaacatg ccagcaaga agaattggaag 420
aagcggaccc caaccccata aaaggtgggt gttcactctg aataatcctt ccgaagacga 480
gcgcaagaaa atacgggata ttccaatata cctattttgat tattttattg ttggcgagga 540
gggtaattgag gaaggacgaa cacctcacct ccaggggttc gctaattttg tgaagaagca 600
gacttttaat aaagtgaagt ggtattttgg tgcccgctgc cacatcgaga aagcgaaagg 660
aacagatcag cagaataaag aatactgcag taaagaaggc aacttactga tggagtgtgg 720
agtccttaga tctcagggac aacggagtga cctgtctact gctgtgagta ccttgttgga 780
gagcgggagt ctggtgaccg ttgcagagca gcacctgta acgtttgtca gaaatttccg 840
cgggctggct gaacttttga aagtgagcgg gaaaatgcag aagcgtgatt ggaagactaa 900
tgtacacgtc atttgtggggc cacctgggtg tggtaaaaagc aaatgggctg ctaattttgc 960
agacccgga accacatact ggaaaccacc tagaaacaag tgggtgggatg gttaccatgg 1020
tgaagaagtg gttgttattg atgactttta tggctggctg ccctgggatg atctactgag 1080
actgtgtgat cgatatccat tgactgtaga gactaaaggt ggaactgtac cttttttggc 1140
ccgcagtatt ctgattacca gcaatcagac ccggttgga tgggtactcc caactgctgt 1200
cccagctgta gaagctcttt atcggaggat tacttccctg gtattttgga agaattgctac 1260
agaacaatcc acggaggaag ggggccagtt cgtcaccctt tccccccat gccctgaatt 1320
tccatatgaa ataaattact gagtcttttt tatcacttcg taatggtttt tattattcat 1380
taagggttaa gtgggggggtc ttttaagatta aattctctga attgtacata catgggttaca 1440
cggatattgt attcctggtc gtatatactg ttttcgaacg cagtgccgag gcctacgtgg 1500
tctacatttc cagtagtttg tagtctcagc cacagctgat ttcttttgtt gtttgggttg 1560
aagtaatcaa tagtggaatc taggacaggt ttgggggtaa agtagcggga gtggtaggag 1620
aagggtggg ttatggatat gcgggaggag tagtttacat aggggtcata ggtgagggtc 1680
gtggcctttg ttacaaagtt atcatctaga ataacagcac tggagccac tcccctgtca 1740
ccctgggtga tcggggagca gggccag

```

Figura 3

SEQ ID No. 3

```

aattcaacct taaccttttt tattctgtag tattcaaagg gtatagagat tttgtttggtc 60
ccccctcccg ggggaacaaa gtcttcaata ttaaattctca tcatgtccac cgcccaggag 120
ggcgttctga ctgtggttagc cttgacagta tatccgaagg tgcgggagag gcgggtgttg 180
aagatgccat ttttcccttct ccaacggtag cggtgccggg ggtggacgag ccagggggcgg 240
cggcggagga tctggccaag atggctgcgg gggcgggtgtc ttcttctgcy gtaacgcctc 300
cttggatagc tcatagctga aaacgaaaga agtgcgctgt aagtattacc agcgcacttc 360
ggcagcggca gcacctcggc agcacctcag cagcaacatg ccagcaaga agaattggaag 420
aagcggaccc caaccacata aaagggtgggt gtccacgctg aataatcctt ccgaagacga 480
gcgcaagaaa atacgggagc tcccaatctc cctatttgat tattttattg ttggcgaggga 540
gggtaatgag gaaggacgaa cacctcacct ccaggggttc gctaattttg tgaagaagca 600
aacttttaat aaagtgaagt ggtattttggg tgcccgtctg cacatcgaga aagccaaagg 660
aactgatcag cagaataaag aatattgcag taaagaagge aacttactta ttgaatgtgg 720
agctcctcga tctcaaggac aacggagtga cctgtctact gctgtgagta ccttgttggg 780
gagcgggagt ctggtgaccg ttgcagagca gcacctgta acgtttgtca gaaatttccg 840
cgggctggct gaacttttga aagtgagcgg gaaaatgcag aagcgtgatt ggaagaccaa 900
tgtacacgtc attgtggggc cacctgggtg tggtaaaagc aaatgggctg ctaatttttg 960
agaccgggaa accacatact ggaaaccacc tagaaacaag tgggtgggatg gttaccatgg 1020
tgaagaagtg gttgttattg atgactttta tggctggctg ccgtgggatg atctactgag 1080
actgtgtgat cgatatccat tgactgtaga gactaaaggg ggaactgtac cttttttggc 1140
ccgcagtatt ctgattacca gcaatcagac ccggttggaa tgggtactcct caactgctgt 1200
ccagctgta gaagctctct atcggaggat tacttctttg gtattttgga agaattgtac 1260
agaacaatcc acggaggaag ggggccagtt cgtcacctt tccccccat gccctgaatt 1320
tccatatgaa ataaattact gagtctttt tatcacttcg taatggtttt tattattcat 1380
ttagggttta agtggggggg ctttaagatt aaattctctg aattgtacat acatggttac 1440
acggatattg tagtcctggg cgtatatact gttttcgaac gcagtgcgga ggcctacgtg 1500
gtccacattt ctagagggtt gtagcctcag ccaaagctga ttcttttggg tatttgggtg 1560
gaagtaatca atagtggagt caagaacagg tttgggtgtg aagtaacggg agtggtagga 1620
gaagggttgg gggattgtat ggcgggagga gtagtttaca tatgggtcat aggttagggc 1680
tgtggccttt gttacaaagt tatcatctag aataacagca gtggagccca ctcccctatc 1740
acctgggtg atggggggagc agggccag

```

Figura 4

SEQ ID No. 4

```

aattcaacct taacctttct tattctgtag tattcaaagg gtatagagat tttgttggtc 60
ccccctcccg ggggaacaaa gtctcaatt ttaaattcca tcatgtccac cgcccaggag 120
ggcgttggtga ctgtggtacg cttgacagta tatccgaagg tgcgggagag gcggtgtgtg 180
aagatgccat ttttccctct ccaacggtag cgggtggcggg ggtggacgag ccaggggagg 240
cgccggaggga tctggccaag atggctgcgg gggcggtgtc ttcttctgcg gtaacgcctc 300
cttggatagc tcatagctga aaacgaaga agtgcgctgt aagtattacc agcgctactc 360
ggcagcggca gcacctcggc agcacctcag cagcaacatg ccagcaaga agaattggaag 420
aagcggaccc caaccacata aaagggtgggt gttcacgctg aataatcctt ccgaagacga 480
ggcgaagaaa atacgggagc tccaatctc cctatttgat tattttattg ttggcgagga 540
gggtaattgag gaaggacgaa cacctcacct ccaggggttc gctaattttg tgaagaagca 600
aacttttaat aaagtgaagt ggtatttggg tgcctcgctc cacatcgaga aagocaaagg 660
aactgatcag cagaataaag aatattgcag taaagaaggc aacttactta ttgaatgtgg 720
agctcctcga tctcaaggac aacggagtga cctgtctact gctgtgagta ccttgttgga 780
gagcgggagt ctggtgaccg ttgcagagca gcacctgta acgtttgtca gaaatttccg 840
cggtctggct gaacttttga aagtgcggcg gaaaatgcag aagcgtgatt ggaagaccaa 900
tgtacacgtc attgtggggc cacctgggtg tggtaaaagc aaatgggctg ctaattttgc 960
agaccgggaa accacatact ggaaccacc tagaaacaag tgggtgggatg gttaccatgg 1020
tgaagaagtg gttgttattg atgactttta tggctggctg ccgtgggatg atctactgag 1080
actgtgtgat cgatatccat tgactgtaga gactaaaggc ggaactgtac cttttttggc 1140
ccgcagtatt ctgattacca gcaatcagac ccgttggaa tgggtactct caactgctgt 1200
ccagctgta gaagctctct atcggaggat tacttcttg gtattttgga agaattgctac 1260
agaacaatcc acggaggaag ggggccagtt cgtcaccctt tccccccat gccctgaatt 1320
tccatatgaa ataaattact gagtcttttt tatcacttcg taatgggttt tattattcat 1380
ttagggttta agtggggggc ctttaagatt aaattctctg aattgtacat acatgggtac 1440
acggatatat tagtcttggt cgtatttact gttttcgaac gcagcgccga ggcctacgtg 1500
gtccacattt ccagagggtt gtagtctcag ccaaagctga ttccttttgt tatttggttg 1560
gaagtaatca atagtggagt caagaacagg tttgggtgtg aagtaacggg agtggtagga 1620
gaagggttgg gggattgtat ggcgggagga gtagtttaca tatgggtcat aggttagggc 1680
tgtggccttt gttacaaagt tatcatctag aataacagca gtggagccca ctccccctac 1740
accctgggtg atgggggagc agggccag

```

Figura 5

SEQ ID No. 5

```

aattcatatt tagcctttct aatacggtag tattggaaag gtaggggtag ggggttggtg 60
ccgcctgagg gggggaggaa ctggccgatg ttgaatttga ggtagttaac attccaagat 120
ggctgogagt atcctccttt tatggtgagt acaaattctg tagaaaggcg ggaattgaag 180
ataccogtct ttccggcgca tctgtaacgg ttctggaagg cggggtgtgc caaatatggt 240
cttctccgga ggatgtttcc aagatgggtg cggggggcggg tecttcttct gcggtaacgc 300
ctccttggcc acgtcatcct ataaaagtga aagaagtgcg ctgctgtagt attaccagcg 360
cacttcggca gggcgagcac ctccggcagcg tcagtgaaaa tgccaagcaa gaaaagcggc 420
ccgcaacccc ataagagggtg ggtgttcacc ctttaataatc cttccgagga ggagaaaaac 480
aaaatacggg agcttccaat ctcccttttt gattattttg tttgcgagga ggaagggtttg 540
gaagagggtg gaactcctca cctccagggg ttgcgaatt ttgctaagaa gcagactttt 600
aacaagggtg agtgggtatt tggtgcccg tgccacatcg agaaagcgaa aggaactgac 660
cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggccacatac ttatcgagtg tggagctccg 720
cggaaccagg ggaagcgag cgacctgtct actgctgtga gtaccctttt ggagacgggg 780
tctttggtga ctgtagccga gcagtccct gtaacgtatg tgagaaattt ccgcgggctg 840
gctgaacttt tgaagtgtg cgggaagatg cagcagcggt attggaagac agctgtacac 900
gtcatagtgg gcccgcccg ttgtgggaag agccagtggg ccgtaattt tctgagcct 960
agggacacct actggaagcc tagtagaaat aagtgggtgg atggatatca tggagaagaa 1020
gttgttgttt tggatgattt ttatggctgg ttaccttggg atgacttact gagactgtgt 1080
gaccggtatc cattgactgt agagactaaa gggggtactg ttctttttt ggcccgagct 1140
attttgatta ccagcaatca ggccccccag gaatggtact cctcaactgc tgtcccagct 1200
gtagaagctc tctatcggag gattactact ttgcaatttt ggaagactgc tggagaacaa 1260
tcacacggagg taccogaagg ccgatttgaa gcagtggacc caccctgtgc ccttttccca 1320
tataaaataa attactgagt cttttttgtt atcacatcgt aatggttttt atttttattt 1380
atthagaggg tcttttagga taaattctct gaattgtaca taaatagtca gccttaccac 1440
ataattttgg gctgtggctg cattttggag cgcatagcg aggcctgtgt gctcgacatt 1500
ggtgtgggtg tttaaatgga gccacagctg gtttctttta ttatttgggt ggaaccaatc 1560
aattgtttgg tccagctcag gtttgggggt gaagtacctg gagtggtagg taaagggctg 1620
ccttatggtg tggcgggagg agtagttaat ataggggtca taggccaagt tgggtggagg 1680
ggttacaaag ttggcatcca agataaaca agtggacca acacctctt gattagaggt 1740
gatggggtct ctggggtaa

```

Figura 6

SEQ ID No. 6

```

accagcgcac  ttccggcagcg  gcagcacctc  ggcagcacct  cagcagcaac  atgccagca  60
agaagaatgg  aagaagcggg  cccaaccac  ataaaagggtg  ggtgttcacg  ctgaataatc  120
cttcgaaga  cgagcgcaag  aaaatacggg  agtcccaat  ctccctattt  gattatttta  180
ttgttggcga  ggagggtaat  gaggaaggac  gaacacctca  cctccagggg  ttccgtaatt  240
ttgtgaagaa  kcaaaccttt  aataaagtga  agtgggtattt  ggggtgccgc  tgccacatcg  300
agaaagccaa  aggaactgat  cagcagaata  aagaatattg  cagtaaagaa  ggcaacttac  360
ttattgaatg  tggagctcct  cgatctcaag  gacaacggag  tgacctgtct  actgctgtga  420
gtaccttgtt  ggagagcggg  agtctgggtga  ccgttgacga  gcagcacctc  gtaacgtttg  480
tcagaaattt  ccgcgggctg  gctgaacttt  tgaaagttag  cgggaaaatg  cagaagcgtg  540
attggaagac  caatgtacac  gtcattgttg  ggcacacttg  gtgtggtaaa  agcaaatggg  600
ctgctaattt  tgcagacccg  gaaaccacat  actggaaacc  acctagnaac  aagtgggtgg  660
atgggtacca  tgggtgaagaa  gtggttggtt  ttgatgactt  ttatggctgg  ctgccgtggg  720
atgatctact  gagactgtgt  gatcgatata  cattgactgt  agagactaaa  ggtggaactg  780
tacctttttt  ggcccgagct  attctgatta  ccagcaatca  gaccccgttg  gaatgggtact  840
cctcaactgc  tgtcccagct  gtagaagctc  tctatcggag  gattacttcc  ttggtatttt  900
ggaagaatgc  tacagaacaa  tccacggagg  aagggggcca  gttcgtcacc  cttccccccc  960
catgccctga  atttccatat  gaaataaatt  actgagtcyt  ttttatcact  tcgtaattgg  1020
ttttattatt  catttagggg  ttaagtgggg  ggtctttaag  attaaattcc  ctgaatttga  1080
catacagggg  tacacggata  ttgtagtctt  ggtcgtattt  actgttttct  aacgcagtgc  1140
cgaggcctac  gtggtccaca  tttctagagg  ttgtagcct  cagccaaagc  tgattccttt  1200
tgttattttg  ttggaagtaa  tcaatagtgg  agtcaagaac  aggtttgggt  gtgaagtaac  1260
gggagtggtg  ggagaagggt  tgggggattg  tatggcggga  ggagtagttt  acatattggg  1320
catatgtttg  ggctgtggcc  ttgggtacaa  agttatcacc  tagaataaca  gcagtggagc  1380
ccactccctt  atcaccctgg  gtgatggggg  agcagggcca  gaattcaacc  ttaacctttc  1440
ttattctgta  gtattcaaag  ggtatagaga  ttttgttggt  ccccccctcc  gggggaacaa  1500
agtctcaat  tttaaatctc  atcatgtcca  ccgccagga  gggcggtgtg  actgtggtac  1560
gcttgacagt  atatccgaag  gtgcgggaga  ggcgggtgtt  gaagatgcca  ttttctctc  1620
tccaacggta  gcggtggcgg  ggtggaaga  gccagggcg  gcggcgagg  atctggccaa  1680
gatggctgcg  gggcggtgt  ctctctctgc  ggtaacgct  ccttgatat  gtcataagctg  1740
aaaacgaaag  aagtgcgctg  taagtatt  1768

```

Figura 7

SEQ ID No. 7

accagcgac	ttcggcagcg	gcagcacctc	ggcagcacct	cagcagcaac	atgccagca	60
agaagaatgg	aagaagcggg	ccccaccac	ataaaaggtg	ggtgttcacg	ctgaataatc	120
cttcgaaga	cgagcgcaag	aaaatcacgg	agctcccaat	ctccctatct	gattatctta	180
ttgttgcgga	ggagggtaat	gagggaaggac	gaacacctca	cctccagggg	ttcgctaatt	240
ttgtgaagaa	gcaactttt	aetaaagtga	agtggatatt	gggtgccgc	tgccacatcg	300
agaaagccaa	aggaactgat	cagcagaata	aagaatattg	cagtaaagaa	ggcaacttac	360
ttattgaatg	tggagctcct	cgatctcaag	gacaacggag	tgacctgtct	actgctgtga	420
gtaccttgtt	ggagagcggg	agtctgggtg	ccgttgccaga	gcagcacctt	gtaacgtttg	480
tcagaaattt	ccgcgggctg	gctgaacttt	tgaaagttag	cgggaaaatg	cagaagcgtg	540
atrggaagac	caatgtacac	gtcattgtgg	ggccacctgg	gtgtggtaaa	agcaaatggg	600
ctgctaattt	tcagaccccg	gaaaccacat	actggaaacc	acctagaaac	aagtgggtgg	660
atggttacca	tgggtgaagaa	gtggttggtt	ttgatgactt	ttatggctgg	ctgccgtggg	720
atgatctact	gagactgtgt	gatcgatatt	cattgactgt	agagactaaa	ggtggaactg	780
tacctttttt	ggcccgcggt	attctgatta	ccagcaatca	gaccccgttg	gaatgggtact	840
cctcaactgc	tgtcccagct	gtagaagctc	tctatcggag	gattacttcc	ttggatattt	900
ggaagaatgc	tacagaacaa	tccacggagg	aagggggcca	gttcgtcacc	ctttccccc	960
catgccctga	atttccatat	gaaataaatt	actgagtctt	ttttatcact	tcgtaatggt	1020
ttttattatt	catttegggg	ttaagtgggg	ggtctttaag	attaaattct	ctgaattgta	1080
catcatgggt	tacacggata	ttgtagtctt	ggtcgtatct	actgttttcg	aacgcagtgc	1140
cgaggccctac	gtgggtccaca	tttctagagg	tttgtagect	cagccaaagc	tgattccctt	1200
tgttattttg	ttggaagttaa	tcaatagtgg	agtcaagaac	aggtttgggt	gtgaagtaac	1260
gggagtggtg	ggagaagggt	tgggggattg	tatggcggga	ggagtgtttt	acatatgggt	1320
cataggtttag	ggctgtggcc	tttggtacaa	agttatcatt	tagaataaca	gcagtggagc	1380
ccactccctt	atcacctctg	gtgatggggg	agcaggggcca	gaattcaacc	ttaacctttt	1440
ttattctgtg	gtattcaaag	ggtatagaga	ttttgttggt	ccccctccc	gggggaacaa	1500
agtcgtcaat	tttaaattct	atcatgtcca	ccgccaggga	gggcgtgtgt	actgtagtac	1560
gcttgacagr	atatccgaag	gtgcgggaga	ggcgggtggt	gaagatgcc	tttttcttcc	1620
tccaacggta	gcggtggcgg	gggtggacga	gccaggggcg	gcggcgagg	atctggccaa	1680
gatggctgcg	ggggcggtgt	cttcttctgc	ggtaacgcct	ccttggatac	gtcatagctg	1740
aaaacgaaag	aagtgcgctg	taagtatt				1768

Figura 1.1
Plásmido pJP109

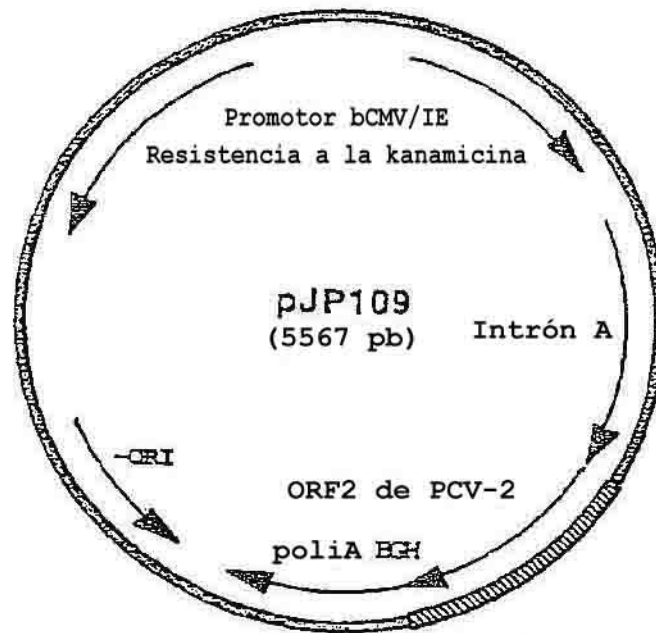


Figura 1.2
Plásmido pJP111

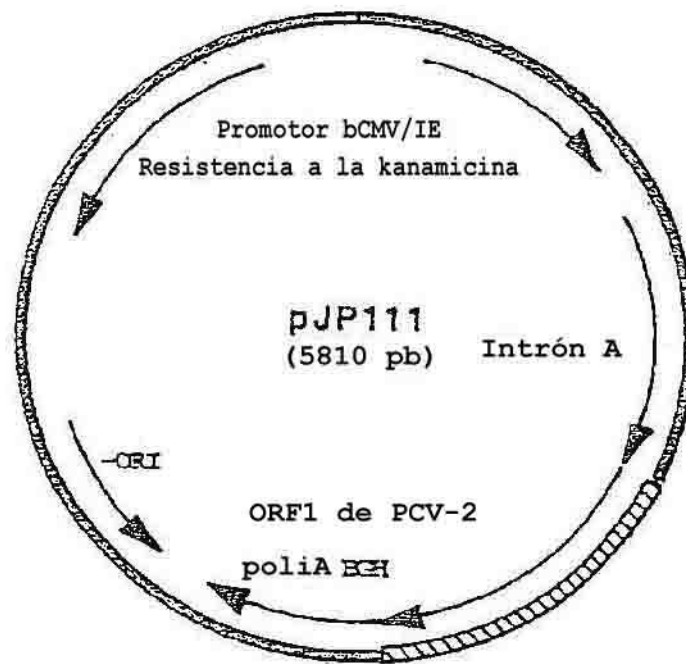


Figura 1.3
Plásmido pJP120

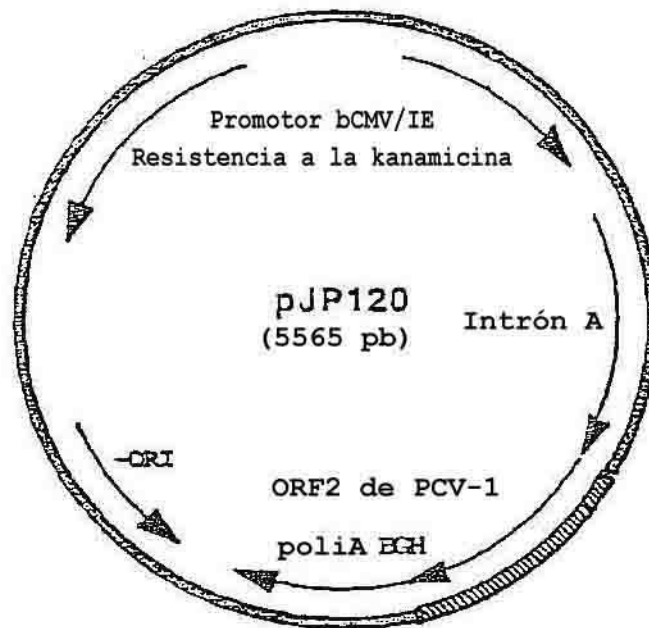


Figura 1.4
Plásmido pJP121

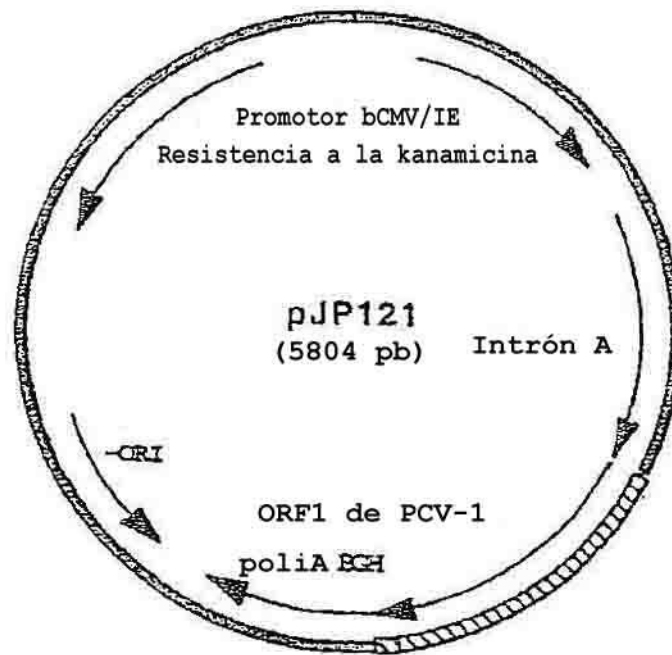


Figura 1.5
Plásmido pJP058

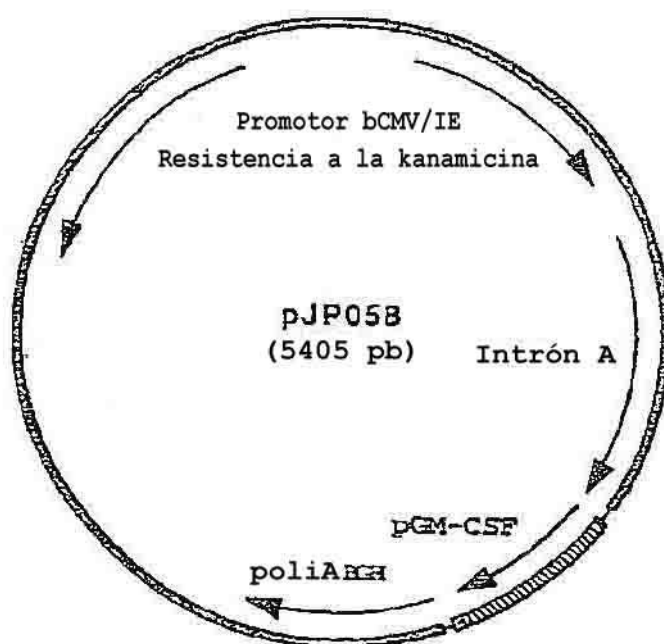


Fig. 2.1A

HindIII (1)

1 ARGCTTCATCAAAAGTCTTAATGAGTTAGGTGTAGATAGTATGATATTTACTACAAAGGTATTCATATT
71 TCCATCAATTCTAAAGTAGATGATTAATAACTCAAAGATGATGATAGTAGATAATAGATACGCTCAT
141 ATATGACTGCAAAATTTGGACGGTTACATTTTAAATCATCAAGCGTTCAAGTTTCAACTGCATAGATC
211 AAAATCTCACTAAAAGATAGCCGATGTATTTGAGAGGAGATTGECATCTAACTACGCTAAGAAATTAC
281 AGTTATAAATAATACATAATGGATTTTGTATTATCATCAGTTATATTTAACATAAGTACAATAAAAGTAAT
351 AATAAAAATACTTACTTACGAAAAATGTCATTATTACAAAACTATTTTTCAGAACAAATCTATAGT
151 Met Ser LeuLeuGlnLysLeuTyrPheThr GluGlnSer IleVal
421 AGAGTCTTTAAGAGTTATAATTTAAAGATAACCATAAATGTAATATTTACCACATCAGATGATGACT
151 GluSer PheLysSer TyrAsnLeuLysAspAsnHisAsnValIlePheThr Thr SerAspAspAspThr
491 GTGTAGTAATAAATGAAGATATGTACTGTTATCTACAAGATTATTATCAATTTGATAAAATCTGTGTTT
391 ValValValIleAsnGluAspAsnValLeuLeuSer Thr ArgLeuLeuSer PheAspLysIleLeuPheP
561 TTAAGTCTTTAATAACGGTTTATCAAAATACGAACTATTAGTGATACAATATTAGATATAGATACTCA
621 heAsnSer PheAsnAsnGlyLeuSerLysTyrGluThrIleSerAspThrIleLeuAspIleAspThrHi
631 TAATATATATATACCTAGTCTCTCTCTTTGTTAGATATCTAAAAAAGAGCGTGTGATTAGAAATTA
851 sAsnTyrTyriIleProSerSerSerSerLeuLeuAspIleLeuLysLysArgAlaCysAspLeuGluLeu
701 GAAGATCTAAATATGCGTTAATAGGAGACAAATAGTAACCTATATTATAAAGATATGACTTACATGAATA
1091 GluAspLeuAsnTyrAlaLeuIleGlyAspAsnSerAsnLeuTyrTyrLysAspMetThrTyrMetAsnA
771 ATTGCTTATTACTAAAGCATTATTAGATTACAGCTTTGTATTATTGCGCGATGTAGATAAATGTTACAA
1321 snTrpLeuPheThrLysGlyLeuLeuAspTyrLysPheValLeuLeuArgAspValAspLysCysTyriL
NruI (880) NdeI (901)
841 ACAGTATAATAAAGAACTACTATAATAGATATAATACATCCCGATACAGACAGTATACATATGGGTT
1551 sGlnTyrAsnLysLysAsnThrIleIleAspIleIleHisArgAspAsnArgGlnTyrAsnIleTrpVal
911 AAAAATGTTATAGAACTATGTTCTCTGCTATATATTATGTTTACATGATCTAAAAGCGCTGCTGAAG
1791 LysAsnValIleGluTyrCysSerProGlyTyriIleLeuTrpLeuHisAspLeuLysAlaAlaAlaGluA
981 ATGATTGGTTAAGATACGATAACCGTATAAACGAATATCTCGCGGATAAATTAACACTTTTCGAGTTTCA
2021 spAspTrpLeuArgTyrAspAsnArgIleAsnGluLeuSerAlaAspLysLeuTyrThrPheGluPheIle
1051 AGTTATATTAGAAATAATATAAAACATTACGAGTAGGTACAAATATTTGTACATCCAAACAGATAATA
2251 eValIleLeuGluAsnAsnIleLysHisLeuArgValGlyThrIleIleValHisProAsnLysIleIle
1121 GCTAATGGTACATCTAATAATATACTACTGATTTTCTATCTTACGTAGAAGAACTAATATATCATCATA
2491 AlaAsnGlyThrSerAsnAsnIleLeuThrAspPheLeuSerTyrValGluGluLeuIleTyrHisHisA
EcoRI (1223)
1191 ATTCATCTATAATATGGCCGATATTTTATAGAAATCTTTGAGACCACTATTTTATCAGAAATTTATTC
2721 snSerSerIleIleLeuAlaGlyTyrPheLeuGluPhePheGluThrThrIleLeuSerGluPheIleSe
1261 TTATCTCTCTAATGGGTAAATGATAGTAACCTGTTTAGTACACCTGAAAACAGGGTATGAAGCTATACTC
2951 rSerSerSerSerGluTrpValMetAsnSerAsnCysLeuValHisLeuLysThrGlyTyrGluAlaIleLeu
1331 TTGATGCTAGTTATTTTCCAACCTCTACTAAAAGCAATTATGTAATAATATGGACAAAAGAAACTT
3191 PheAspAlaSerLeuPhePheGlnLeuSerThrLysSerAsnTyrValLysTyrTrpThrLysLysThrL
1401 TGCAGTATAAGAACTTTTAAAGACGGTAACAGTTAGCAAAATATATAATTAAGAAGATAGTCAGGT
3421 euGlnTyrLysAsnPhePheLysAspGlyLysGlnLeuAlaLysTyriIleIleLysLysAspSerGlnVa

Fig. 2.1B

1471 GATAGATAGAGTATGTTATTACACCGAGCTGTATATAATCAGTAACTTACTTAATGGATACGTTTAA
 365 IleAspArgValCysTyrLeuHisAlaAlaValTyrAsnHisValThrTyrLeuMetAspThrPheLys
 1541 ATTCTGCTTTTTCGATTTTAAATTCCTCCGGAATGATAGATATACTACTGTTTGGAAATATGCATAGGATA
 389 IleProGlyPheAspPheLysPheSerGlyMetIleAspIleLeuLeuPheGlyIleLeuHisLysAspA
 1611 ATGAGAAATATTTTATCCGAAACGTGTTTCTGTAACATAATATATCAGAATCTATCTATGCAGATT
 412 snGluAsnIlePheTyrProLysArgValSerValThrAsnIleIleSerGluSerIleTyrAlaAspPh
 1681 TTACTTTATATCAGATGTTAATAAATTCAGTAAAAAGATAGAAATATAAACTATGTTTCTTATACCTCGCA
 435 eTyrPheIleSerAspValAsnLysPheSerLysLysIleGluTyrLysThrMetPheProIleLeuAla
 1751 GAAACTACTATCCAAAAGGAGGCCCTATTTTACACATACATCTAACGAAGATCTTCTGCTATCTGTT
 459 GluAsnTyrTyrProLysGlyArgProTyrPheThrHisThrSerAsnGluAspLeuLeuSerIleCysL
 1821 TATGCGAAGTAACAGTTTGTAAAGATATAAAAAATCCATTATTATATCTTAAAGAGATATATCAGCAAA
 482 euCysGluValThrValCysLysAspIleLysAsnProLeuLeuTyrSerLysLysAspIleSerAlaLys
 1891 ACGATTATAGGTTTATTTAGATCTGTGATATAAATACGGCTGTTGAGTTAAGAGCATATAAAATAAGA
 505 sArgPheIleGlyLeuPheThrSerValAspIleAsnThrAlaValGluLeuArgGlyTyrLysIleArg
 1961 GTAATAGGATGTTTAGAATGGCTGAAAAGATATAAAATATTTAATCTAATCTACATACATTAGATTAT
 529 ValIleGlyCysLeuGluTrpProGluLysIleLysIlePheAsnSerAsnProThrTyrIleArgLeuL
 2031 TACTAACAGAAAGACGTTTAGATATCTACATTCCCTATCTGCTTAAATTTAATATAACAGAGGATATAGC
 552 euLeuThrGluArgArgLeuAspIleLeuHisSerTyrLeuLeuLysPheAsnIleThrGluAspIleAl
 2101 TACCAGAGATGGAGTCAGAAATAATTTACCTATAATTTCTTTTATCGTCAGTTATGTAGATCGTATACT
 575 aThrArgAspGlyValArgAsnAsnLeuProIleIleSerPheIleValSerTyrCysArgSerTyrThr
 NdeI (2185)
 2171 TATAAATACTAAATGCCATATGTACAAATTCCTGTAAGATAACAAAGTGTAAATATAATCAGGTAATAT
 599 TyrLysLeuLeuAsnCysHisMetTyrAsnSerCysLysIleThrLysCysLysTyrAsnGluValIleT
 2241 ATAATCTATATAGGAGTATATATAATTCAAAAGTAAAATATAATCATATAATATGAACGAAATAT
 622 TyrAsnProIle...
 2311 CAGTAATAGACAGGAACCTGGCAGATTCTTCTCTAATGAAGTAAGTACTGCTAAATCTCCAAATTAGAT
 2381 AAAAATGATACAGCAATACAGCTTCATTCAACGAATFACCTTTTAATTTTTTCAGACACACCTTATTAC
 2451 AACTAACCTAAGTCAGATGATGAGAAAGTAATATAAATTTAACTTATGGGTATATATAATAAGATTTC
 2521 ATGATATTAAATATTTACTTAAACGATGTTAATAGACTTATTCATCAACCCCTCAAACCTTCTGGATA
 2591 TTATAAAATACCAGTTAATGATATTAAATAGATTGTTTAAAGAGATGTAAATAATTTATGGAGGTAAAG
 2661 GATATAAAATTAGTCTATCTTTCACATGGAAATGAATTACCTAATATTAAATATTATGATAGGAATTTT
 2731 TAGGATTTACAGCTGTTATATGTATCAACAATACAGGCAGATCTATGGTTATGGTAAACACTGTAAACGG
 2801 GAAGCAGATTCTATGGTAACTGGCCTATGTTTAAAGCCAGATCATTTTACTCTATAAACATTTTACCA
 BamHI (2880)
 2871 CAAATAATAGGATCTCTAGATATTTAATATTATATCTAACAACAACAAAAAATTTAACGATGTATGGC
 2941 CAGAAGTATTTTCTACTAATAAGATAAAGATAGTCTATCTTATCTACAAGATATGAAAGAGATAATCA
 HindIII (3058)
 3011 TTTAGTAGTAGCTACTAATATGGAAAGAAATGTATACAAAACGTGGAAGCTTTTATATTAAATAGCATA
 3081 TTAGTAGAAGATTAAATCTAGACTTAGTATAACAAACAGTTAAATGCCAATATCGATTCTATATTTTC

Fig. 2.1C

```

3151 ATCATAACAGTAGTACATTAAATCAGTGATATACGAAACGATCTACAGACTCAACTATGCAAGGAATAAG
3221 CAATATGCCAATTATGTCTAATAITTTAACTTTAGAACTAAAACGTTCTACCAATACTAAAAATAGGATA
3291 CGTGATAGGCTGTAAAGCTGCRATAAATAGTAAGGATGTAGAAGAAATACTTTGTTCTATACCTTCGG
3361 AGGAAAGAACTTTAGAACAACTTAAGTTTAATCAAACCTGTATTTATGAACRCTATAAAAAAATATGGA
3431 AGATACAGTAAAGAATGGATGTTGAATGTCGTAGTTTAGAACATRACTATACGGCTAACTTATATAAA
3501 GGTACGGACAAAACGAATATATGATTACTTATATACTAGCTCTCATAGTAGGATTAAATAATATTATAG
3571 AAACCTTTAAATATAATCTGGTGGGCTAGACGAATCTACAATACGTAATATAAAATTATATAATTTCACA
3641 AAGAACAACAAAAAATCAAGTTTCTAATACCTTATAGATAAACTATATTTTTTACCACCTGA
    
```

Fig 2.2

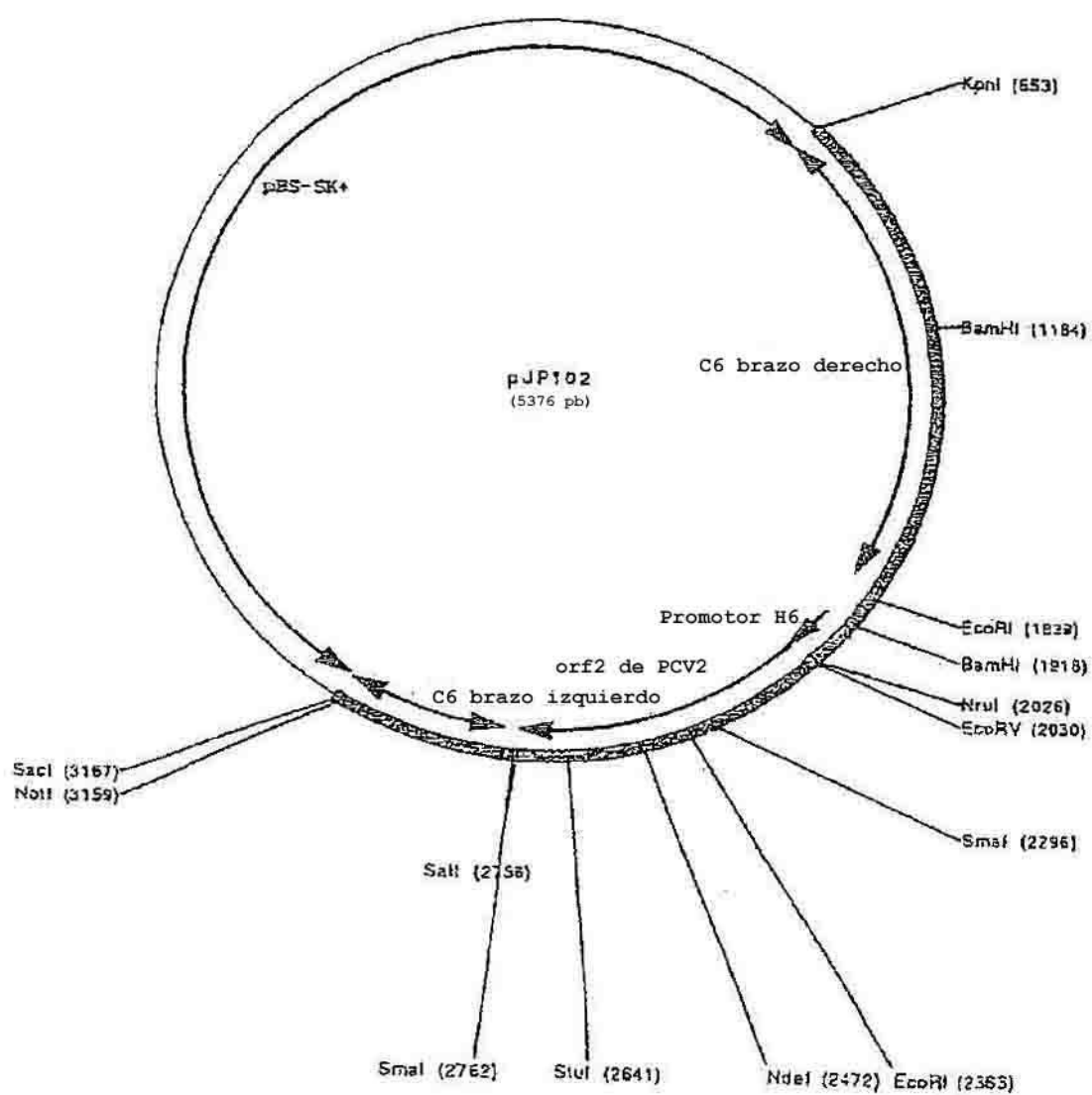


Fig. 2.3

KpnI (1)
 1 GGTACCTTCATAAAATACAAGTTTGATTAACTTAAGTTGTTCTAAAGTTCCTTCCTCCGAGGTATAGAA
 71 CAAAGTATTCTCTACATCCTTACTATTTATTGCAGCTTTAACAGCCTATCAGGTATCTTATTTTAG
 141 TATTGGTAGAACGTTTATGTTCTAAAGTTAAATATTAGCATARTTGGCATATTGCTTATTCCTTGCAT
 211 AGTTGAGTCTGTAGATCGTTTCAGTATATCACTGATTAATGTACTACTGTTATGRTGAAATATAGAATCG
 281 ATATTGGCATTAACTGTTTTGTTATATACTAAGTCTAGATTTTAAATCTTCTAGTAATATGCTATTTAATA
 351 TAAAAGCTTCCACGTTTTTGTATACATTTCTTCCATATTAGTAGCTACTACTAAATGATTATCTTCTTT
 421 CATATCTTGTAGATAAGATAGACTATCTTATCTTTATTAGTAGAAATACTTCTGGOCATACATCGTAA
 BamHI (532)
 491 AATTTTTTTTGTGTTGTTAGATATAATATTAATATCTAGAGGATCCCTATTATTTGTGGTAAATGTTTA
 561 TAGAGTAAAATGATCTGGCTATTAAACATAGGCCAGTTACCATAGAAATGCTGCTTCCCGTTACAGTGT
 631 TACCATAACCATAGATCTGCTGTATTGTTGATACATATAACAGCTGTAAATCCTAAAAATTCCTATCA
 701 TATTTATTAAATATTAGGTAAATTCATTTCCATGTTGAAGATAGACTAATTTTATACTCTTTTACCTCCAAAT
 771 AATTATTACATCTCTTAAACAATCTATTTTAATATCATTAACGGTATTTTATAATATCCAGAAAGGTT
 841 TGAAGGGGTTGATGGAATAAGTCTATTACATCTGTTAAGTAAATATTAAATATCATGAATCTTTATTATA
 911 TTATACCCATAAGTTAAATTTATATTACTTTCTCATCATCTGACTTAGTTAGTTTGTAAATAGGTGTGT
 981 CTGAAAAAATTAAAGGTAAATTCGTTGAATGAAGCTGTATTGCTGTATCATTTTTATCTAATTTTGGAG
 1051 AATTAGCAGTACTTACTTCAATTAGAGAAGAATCTGCCAGTTCTGTCTATTACTGATTTTCTTTTCAT
 EcoRI (1
 1121 TATTATATGATTTATATTTTACTTTTTCAATTATATATACTCATTTGACTAGTTAATCAATAAAAAGAT
 1191 TCCTGCAGCCCTGCAGCTAATTAATTAAGCTACAAATAGTTTCGTTTTTCACCTTGTCTAATAACTAATTA
 BamHI (1266)
 1261 ATTAAGGATCCCCCAGCTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAGGTTCCTTGAGGGTT
 EcoRV (1378)
 NruI (1374)
 1333 GTGTTAAATTGAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGT
 1401 AATGACGATCCAGGAGGCGTTACCGCAGAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCCTC
 1471 CCGCGCCGCCCTGGCTGGTCCACCTCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACA
 24p ArgArgArgProTrpLeuValHisProArgHisArgTyrArgTrpArgArgLysAsnGlyIlePheAsnT
 1541 CCGCCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTGTCAAGCGTACCACAGTCACAAAGCCCTCCTGGCGCGTGA
 47p hrArgLeuSerArgThrPheGlyTyrThrValLysArgThrThrValThrThrProSerTrpAlaValAs
 SmaI (1644)
 1611 CATGATGAGATTTAAAAATTGACGACTTTGTTCCCCCGGAGGGGGACCAACAAAATCTCTATACCCCTTT
 70p pMetIleArgPheLysIleAspAspPheValProProGlyGlyGlyThrAsnLysIleSerIleProPhe

Fig 2.4

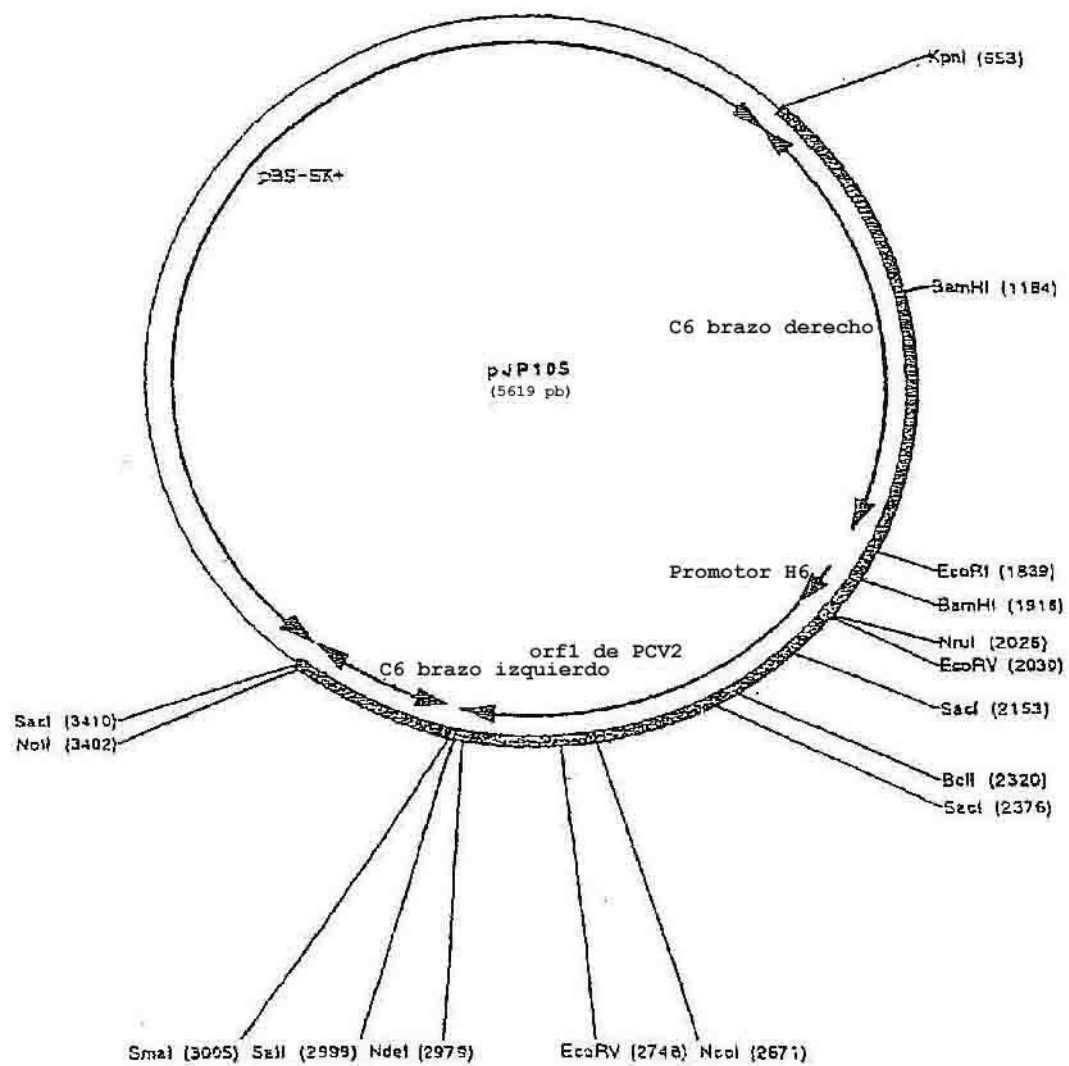


Fig 2.5

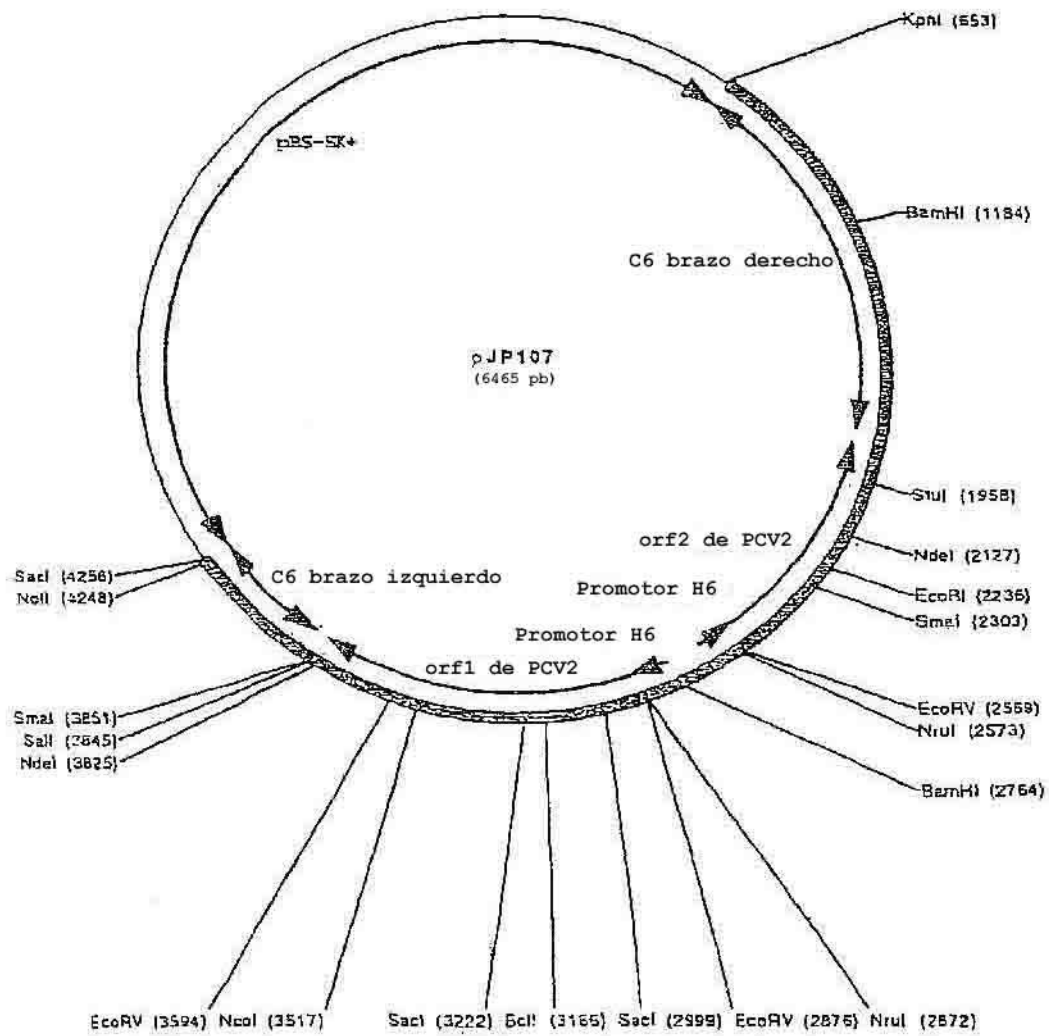


Fig. 2.6A

KpnI (1)

1 GGTACCTTCATAAAATACAAGTTTGATTAAACTTAAGTTGTTCTAAAGTTCTTCCCTCCGAAGGTATAGAA

71 CAAAGTATTTCCTCTACATCCTTACTATTATTGTCAGCTTTTAAACAGCCTATCAGGTATCCTATTTTATG

141 TATTGGTAGAAGCTTTTAGTTCTAAAGTTAAATATTAGACATTAATGGCATATTGCTTATTCTCTGCAT

211 AGTTGAGTCTGTAGATCGTTTCAGTATATCACTGATTAAATGACTACTGTTATGATGAATATAGAAATCG

281 ATATTGGCATTTAACCTGTTTGTATATAAGTCTAGATTTPAATCTTCTAGTAAATGCTATTTAATA

351 TAAAGCTTCCACGTTTGTATACATTTCCTTCATATTAGTAGCTACTACTAANTGATTAATCTCTTT

421 CATATCTGTAGATAAGATAGACTATCTTTATCTTTATTAGTAGAAAATACTTCNGCCATACATCGTAA

BamHI (532)

451 AATTTTTTGTGTGTGTAGATATAATTAATATCTAGAGGATCCATATTATTGTGGTAAATGTITTA

561 TAGAGTAAATGATCTGGCTATTAAACATAGGOCAGTTACCATAGAAATGCTGCTTCCCGTTACAGTGT

631 TACONTAACCATAGATCTGCCGTGATTGTGTATACATATAACAGCTGTAAATCTAAAAAATTCCTATCA

701 TANTTATTAATATTAGGTAAATTCATTTCATGTGAAGATAGACTAATTTTATATCTCTTACCTCCAAAT

771 AATTATTACATCTCTTAACAATCTATTTTAAATATCATTAACNGGTATTTTATAATATCCAGAAAGGT

841 TGAAGGGGTGATGGAAATAGTCTAATTAACATCGTTAAGTAAATTAATAATCATGAATCTTTATTATA

911 TTATAOCCATAAGTTAAATTTATATTTACTTTCATCATCTGACTTAGTTAGTTTGTAAATAAGGTGTGT

981 CTGAAAAAATTAAGGTAAATTCGTTGAATCAAGCTGTATTGCTGTATCATTTTATCTAATTTTGGAG

1051 AATTAGCAGTACTTACTTCAATAGAAAGAAATCTGCCAGTTCTCTGTCTATTACTGATATTTCTGTTTCAT

1121 TATTATATGATTATATTTTACTTTTCAATTATATATACTCATTTGACTAGTTAATCAATAAAAGAAAT

1191 TTGACTTTAGGGTTTAAAGTGGGGGCTTTTAAGATTAAATTCCTGAATTTGTACATACATGGTTACACGG

2334 ProLysLeuProProAspLysLeuAsnPheGluArgPheGlnValTyrMetThrValArgI

StuI (1306)

1261 ATATGTAGTCTCTGGTCTGTTTACTGTTTTOGAACGCAGCGCCGAGGCTACGTGGTCCACATTTCCAG

2124 IleAsnTyrAspGlnAspTyrLysSerAsnGluPheAlaAlaGlyLeuGlyValHisAspValAsnGlySer

1331 AGGTTGTAGTCTCAGCCAAAGCTGATTCCCTTTGTATTTGGTTGGAAAGTAATCAATAGTGGAGTCAAG

1894 ThrGlnLeuArgLeuTrpLeuGlnAsnArgLysAsnAsnProGlnPheTyrAspIleThrSerAspLeu

1401 AACAGGTTTGGGTGTGAAGTAACGGGAGTGTAGCAGAAGGTTGGGGGATGTATGGCGGCAGGAGTAG

1664 ValProLysProThrPheTyrArgSerHisTyrSerPheProGlnProIleThrHisArgSerSerTyrA

NdeI (1475)

1471 TTTACATATGGGTCAATAGGTTAGGGCTGTGGCTTTGTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCAGTGG

1424 snValTyrProAspTyrThrLeuAlaThrAlaLysThrValPheAsnAspAspLeuIleValAlaThrSe

EcoRI (1584)

1541 AGCCCACTCCCTTATCACCCTGGGTGATGGGGAGCAGGCCAGAAATCAACCTTAACCTTTCTTATTCT

1194 rGlyValGlyArgAspGlyGlnThrIleProSerCysProTrpPheGluValLysValLysArgIleArg

SmaI (1651)

1611 GTAGTATTCAAAGGTTATAGAGATTTTGTGTGTCCTCCCTCCCGGGGAACAAAGTGTCAATTTTAAAT

964 TyrTyrGluPheProIleSerIleLysAsnThrGlyGlyGlyProProValPheAspAspIleLysPheA

Fig. 2.6B

1681 CTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGTACGCTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGGG
 724 gMetMetAspValAlaT r pSer ProThr Thr Val Thr Thr ArgLysVal Thr Tyr Gl yPheThr ArgSe
 1751 AGAGGCGGGTGTGGAAGATGCCATTTTCCTTCTCCACGGTAGCGGTGGCGGGGTGGACGAGCCAGGG
 194 r LeuArgThr AsnPhel l eGlyAsnLys ArgArgT r pArgTyr ArgHisArgProHisVal LeuT r pPro
 1821 GCGGCGGCGGAGCATCTGCCAAGATGGCTGCCGGGGCGGGTGTCTTCTTCTGCGGTAAAGCCCTCCTTGGG
 254 ArgArgArgLeu l l eGlnGlyLeuHisSer ArgProArgHisArgArgArgTyr ArgArgArgProT

 NruI (1921)
 EcoRV (1917)
 1891 TACGTCAATTACGATACAACTTAACGGATATCGCGATAATGAATAATTTATGATTATTTCTCGCTTTCA
 34 y rThrMet
 1961 ATTTAACACAACCCCTCAAGAACCTTTGTATTTATTTTCACTTTTAAAGTATAGAATAAAGAAGCTGGGG
 2031 ATCAATTCTCTGCAGCCCTGCAGCTAATTAATTAAGCTACAAATAGTTTGTGTTTTCCACCTGTCTAATAAC

 BamHI (2112)
 2101 TAATTAATTAAGGATCCCCAGCTTCTTATTCTATACTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTCTCTG

 EcoRV (2224)
 NruI (2220)
 2171 AGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAAATTATTTTCATTATCGGATATCCGTTAAGTTTG
 2241 TATCGTAATGCCAGCAAGAAGTGAAGAAGCGGACCCCAACCATATAAAGGTGGGTGTTTCAAGCTG
 1 r MetProSer LysLysAsnGlyArgSer GlyProGlnProHisLysArgT r pVal PheThrLeu

 SacI (2347)
 2311 AATAATCCTTCCGAGACGAGCCGAGAAAATACGGGAGCTCCCAATCTCCTATTGTGATTATTTTATTG
 22 r AsnAsnProSer Gl uAspGluArgLysLys l l eArgGluLeuPro l l eSer LeuPheAspTyrPhel l eV
 2381 TTGCGGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACCAACCTCACTCCAGGGGTGCTAATTTTGTGAAGAAGCA
 45 r al Gl yGluGluGlu yAsnGluGluGlu yArgThr ProHisLeuGlnGlyPheAlaAsnPheValLysLysGl

 BclI (2514)
 2453 AACTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAAAGCCAAAGGAAGTGAATCAG
 68 r nThr PheAsnLysVal LysT r pTyrLeuGlyAlaArgCysHis l l eGluLysAlaLysGlyThrAspGln

 SacI (2570)
 2523 CAGAATAAAGAAATATTCAGTAAGAAGGCAACTTACTTATTGAATGTGGAGCTCCTCGATCTCAAGGAC
 92 r Gl nAsnLysGluTyrCysSer LysGluGlyAsnLeuLeu l l eGluCysGlyAlaProArgSer GlnGlyG
 2591 AACGGAGTGAACCTGTCTACTGCTGTGAGTACCTTGTGTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCA
 115 r InArgSerAspLeuSer ThrAlaVal Ser ThrLeuLeuGluSer GlySerLeuVal ThrValAlaGluGlu
 2661 GCACCTGTAAAGTTGTGACAAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACCTTTTGAAAGTGAACGGGAAAAATGCAG
 138 r nHisProVal ThrPheValArgAsnPheArgGlyLeuAlaGluLeuLeuLysVal SerGlyLysMetGln
 2731 AAGCGTGATTGGAAGACCAATGTACACCTCATTGTGGGGCCACCTGGGTGTGGTAAAACCAATGGGCTG
 162 r LysArgAspT r pLysThrAsnValHisVal l l eVal GlyProProGlyCysGlyLysSerLysT r pAlaA

 NcoI (2855)
 2801 CTAATTTTGCAGACCCGGAACCACTACTGGAAACCACTAGAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGG
 185 r l uAsnPheAlaAspProGluThr ThrTyrT r pLysProProArgAsnLysT r pT r pAspGlyTyrHisGl
 2871 TGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGATCTACTGAGACTGTGTGAT
 208 r yGluGluValValVal l l eAspAspPheTyrGlyT r pLeuProT r pAspAspLeuLeuArgLeuCysAsp

 EcoRV (2842)
 2941 CGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAGGTGGAACGTGTACCTTTTGGCCCGCAGTATTCTGATTACCA
 232 r PArgTyrProLeuThr ValGluThiLysGlyGlyThrValProPheLeuAlaArgSer l l eLeu l l eThrS

Fig. 2.6C

```

3011 GCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTCTTCAACTGCTGTCGCCAGCTGTAGAGGTCTCTATCGGACCAT
255> erAsnGlnThr ProLeuGluTrpTyrSer SerThrAlaValProAlaValGluAlaLeuTyrArgArgIle
3081 TACTTCCTTGGTATTTTGGAGAATGCTACAGAACAATCCATGGAGGAAGGGGGCCAGTTCCGTACCCCTT
278> eThrSerLeuValPheTrpLysAsnAlaThrGluGlnSerThrGluGluGlyGlnPheValThrLeu

                                NdeI (3173)          SmaI (3199)
                                Sall (3193)
3151 TCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTCGACCCCGGTTTATTATAGCTAATTA
302> SerProProCysProGluPheProTyrGluIleAsnTyr
3221 GTCATTTTTTCGTAAGTAAGTATTTTTATTAACTACTTTTTATTGTACTTATGTTAAATATAACTGATGA
3291 TAACAAAATCCATTATGTATTATTATAACTGTAATTTCTTTAGCGTAGTLAGATGTCCAATCTCTCTCA
3361 AATACATCGGCTATCTTTTGAAGTGAGATTTTGATCTATGCAGTTGAACTTATGAACGGGTGATGATTAA
3431 AATGTGAACCGTCCAAATTTGCAGTCATTATATGACCGTATCTATTATCTACTATCATCATCTTTGAGTT
3501 ATTAATATCATCTACTTTAGAATTGATAGGAAATATGAATACCTTTGTAGTAATATCTATACTATCTACA

                                SacI (3504)
                                NotI (3596)
3571 CCTAACTCATTAAACATTTTGATAGCGCGGCGCGAGCTC

```