

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 524**

51 Int. Cl.:
A61K 39/12 (2006.01)
C07K 14/08 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06253982 .0**
96 Fecha de presentación: **29.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1882478**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.01.2008**

54 Título: **Proteína de fusión del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino como vacuna contra el SRRP**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.07.2012

73 Titular/es:
HEALTHBANKS BIOTECH CO., LTD.
3F., NO. 25-1, SEC. 4, REN-AI RD. DA-AN
DISTRICT
TAIPEI CITY, TW

72 Inventor/es:
Chang, Hsiu-Kang y
Liao, Chao-Wei

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 384 524 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteína de fusión del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino como vacuna contra el SRRP

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una proteína de fusión de la vacuna de subunidades contra el SRRP que induce títulos de neutralización del VSRRP en cerdos.

2. Descripción de la técnica relacionada

El síndrome reproductor y respiratorio porcino es una enfermedad infecciosa porcina que afecta principalmente a las vías respiratorias de los cerdos en diversas edades y da como resultado cerdas que tienen disfunción reproductora. El VSRRP es un virus resistente que no tiende a provocar anticuerpos que tienen títulos de neutralización en el cerdo infectado. Además, el VSRRP es un virus de ARN y se reproduce fácilmente basándose en un sistema genético simplificado, de modo que la probabilidad de mutaciones genéticas es muy alta. Además, las infecciones y la vía patogénica del virus del SRRP pueden clasificarse en dos etapas: (A) infecciones de tejidos epiteliales de los tractos reproductores superior e inferior; y (B) infecciones de monocitos y macrófagos en tejidos que rodean los tractos reproductores. Por tanto, el huésped debe tener inmunidad de fluidos corporales así como inmunidad de la mucosa con títulos de neutralización y también una respuesta inmunitaria mediada por células para facilitar la eliminación de los virus infectados y reforzar los mecanismos de protección del huésped. Sin embargo, no resulta demasiado fácil que el cerdo infectado con VSRRP tenga títulos de neutralización en condiciones naturales, por lo que los anticuerpos típicos básicamente tienen poco efecto sobre el VSRRP, e incluso inducen mutaciones en los virus. Además, en un aumento dependiente de anticuerpo de la fagocitosis, los anticuerpos sólo podrían provocar infecciones por VSRRP más graves.

La patente taiwanesa n.º I-2289933 y la publicación de patente estadounidense n.º US 2004/0247617 dan a conocer una proteína de fusión específica de células diana, que utiliza una región y un dominio funcional de exotoxinas de *Pseudomonas aeruginosa* para fusionar un fragmento de proteína nuclear ORF7 del VSRRP, con un péptido señal KDEL añadido en el extremo carboxilo-terminal. La proteína de fusión puede producirse en gran cantidad en *E. coli*. Cuando se inmunizan cerdos con la proteína de fusión, es posible reducir o eliminar la viremia tras exponerse a VSRRP en los cerdos inmunizados. El texto completo de la patente se incorpora al presente documento.

En la heterodimerización entre ORF5 y ORF6 del VSRRP, el epítipo Cys-34 de ORF5 y el epítipo Cys-8 de ORF6 desempeñan un papel crítico en la infección viral y el ensamblaje de la envuelta del mismo. (Snijder Eric J., Jessica C. *et al.*, Journal of Virology, enero de 2003, vol. 77, n.º 1:97-104). Además, la secuencia consenso de ORF5 del VSRRP (YKNTHLDLIYNA) es un epítipo entre el aminoácido 38 y el aminoácido 44, que está ubicado en el dominio extracelular N-terminal de ORF5 del VSRRP y se ha identificado como un epítipo de neutralización (Ostrowski M., J. A. Galeota, *et al.*, Journal of Virology, mayo de 2002, vol. 76, n.º 9:4241-4250).

La técnica anterior da a conocer la construcción de antígenos de ORF5 u ORF6 del VSRRP completos entre PE y KDEL. Tras la inmunización de estas proteínas de fusión, los cerdos padecieron una inflamación intensa en sus pulmones tras exponerse al VSRRP, lo que indica que ORF5 u ORF6 del VSRRP tiene un efecto alérgico específico de antígeno. De manera manifiesta, es difícil usarlos como antígenos de vacuna contra el SRRP. Por tanto, para desarrollar una vacuna y proteger de manera eficaz los cerdos frente a infecciones por SRRP, existen un gran número de dificultades que deben superarse. Debería diseñarse para que tenga una menor inmunotoxicidad y un mayor título de neutralización.

La publicación de patente estadounidense n.º 2004/0247617 da a conocer medios para la vacunación contra el VSRRP usando una proteína de fusión que comprende a) un dominio de translocación de exotoxinas A de *Pseudomonas*, b) un péptido expresado a partir de ORF7 del VSRRP, y c) una secuencia peptídica carboxiterminal que comprende KKDELRLDELKDEL. El elemento a) se usa con el fin de translocar la proteína de fusión al citoplasma celular tras la unión celular, y el elemento c) se usa con el fin de retener la proteína en el retículo endoplásmico. En estudios de inmunización (ejemplo 2) se usaron dos proteínas, una que tenía el extremo C-terminal de tipo KDEL ("PE-DGDK") y una sin el mismo ("PE-DGD"). La mejor protección frente a la exposición viral se obtuvo con la proteína de fusión de tipo PE-DGDK.

Sumario de la invención

50 En un aspecto, la invención se refiere a una proteína de fusión del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (VSRRP), que comprende: a) un péptido de exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) que comprende un dominio de unión y un dominio de translocación, ubicado en el extremo N-terminal de la proteína de fusión; b) un péptido de fusión de ORF6-2~26 (SEQ ID NO: 11) y ORF5-31-63 (SEQ ID NO: 10) de la cepa americana de VSRRP, o un péptido de fusión de ORF6-M1-I28 (SEQ ID NO: 12) y ORF5-F31-A64 (SEQ ID NO: 13) de la cepa europea de VSRRP; y c) un dominio carboxilo-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de KDEL-KDEL-KDEL

ubicado en el extremo C-terminal de la proteína de fusión, en el que las letras mayúsculas "KDEL" representan códigos de aminoácido de una sola letra.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de una proteína de fusión tal como se mencionó anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 En otro aspecto, la invención se refiere a una proteína de fusión tal como se mencionó anteriormente para su uso en la prevención del VSRRP.

Además en otro aspecto, la invención se refiere a una composición de vacuna tal como se mencionó anteriormente para su uso en la prevención del VSRRP.

- 10 En la presente invención, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión que contiene un fragmento de ORF5 del VSRRP y un fragmento de ORF6 del VSRRP puede modificarse, y no existe limitación particular para la secuencia, pero es preferiblemente una secuencia de ácido nucleico que puede expresarse en grandes cantidades en un sistema huésped-vector de *E. coli*, y las proteínas expresadas son idénticas a las de tipo natural. Tomando como ejemplo la cepa americana del VSRRP, preferiblemente la secuencia de ácido nucleico modificada que codifica para la proteína de fusión es tal como se observa en SEQ ID NO:1. Para las cepas europeas del VSRRP, preferiblemente la secuencia de ácido nucleico modificada que codifica para la proteína de fusión es SEQ ID NO:9.

- 20 Una realización preferida del fragmento del dominio de unión y de translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas* de la proteína de fusión en la presente invención es una exotoxina de *Pseudomonas* a la que se le ha eliminado la toxicidad, que es un fragmento de la exotoxina A de *Pseudomonas* sin dominio III. Preferiblemente, el fragmento de dominio de unión y de translocación de la exotoxina A de *Pseudomonas* actúa como resto ligando que puede reaccionar con, reconocer o unirse a un receptor en la célula diana.

- 25 La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un adyuvante adecuado conocido en la técnica: dispersante, humectante (tal como Tween 80), o inyecciones estériles preparadas con suspensiones (tal como disoluciones para inyección estéril o disoluciones en aceite). Las preparaciones para inyección estéril también pueden usarse en diluyentes o disolventes de suspensiones o inyecciones estériles durante inyecciones inocuas, por ejemplo, en disoluciones de 1,3-butanodiol. Los disolventes o vehículos aceptables incluyen manitol, agua, solución de Ringer y disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, en la técnica anterior se usan aceites esterilizados y fijos como disolventes o medios de suspensión (por ejemplo, monoglicéricos o diglicéridos sintetizados). Los ácidos grasos (tales como ácidos oleicos o derivados de glicéridos) y aceites naturales farmacéuticamente aceptables (tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente derivados polioxietilados de los mismos) pueden usarse en preparaciones inyectables. Las suspensiones o disoluciones en aceite también pueden comprender dispersantes, diluyentes de alcohol de cadena larga, carboximetilcelulosa, o dispersantes similares. Otros tensioactivos usados comúnmente tales como Tweens y Spans, o emulsionantes y potenciadores de la biodisponibilidad (usados habitualmente en la fabricación de sólidos, líquidos u otras formas de dosificación de alumbre farmacéuticamente aceptables) también pueden usarse con fines preparativos.

- 35 Composiciones para administración oral pueden ser cualquier forma farmacéutica aceptable para administración oral, comprendiendo, pero sin limitarse a, cápsulas, comprimidos, emulsiones, suspensiones acuosas, dispersantes y disoluciones. En el caso de los comprimidos con fines de administración oral, los vehículos típicos incluyen lactosa y almidón de maíz. A menudo se añade un lubricante, tal como estearato de magnesio. Para la administración oral con cápsulas, los diluyentes adecuados incluyen lactosa y almidón de maíz. En el caso de la administración oral de emulsiones o dispersantes acuosos, los principios activos podrían asociarse con emulsiones o suspensiones para su suspensión o dispersión en fase de aceite. Dependiendo de las necesidades, pueden añadirse ciertos edulcorantes, agentes aromatizantes o agentes colorantes.

- 45 Una composición para inhalación o de aerosol nasal puede prepararse según técnicas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica. Por ejemplo, una composición de este tipo puede prepararse como disolución en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarburos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica. También pueden administrarse composiciones que contienen proteínas de fusión en forma de supositorios para administración rectal.

- 50 Los vehículos de la composición farmacéutica deben ser "aceptables", es decir compatibles con los principios activos en la formulación (preferiblemente, capaces de estabilizar el principio activo) y no perjudiciales para el sujeto que va a tratarse. Otros ejemplos de los vehículos incluyen dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, celobiosa, laurilsulfato de sodio, y amarillo D&C n.º 10.

- 55 La composición farmacéutica de la proteína de fusión en la presente invención comprende preferiblemente un adyuvante inmunitario. El adyuvante inmunitario usado no está limitado y puede ser uno cualquier convencional usado en vacunas conocidas en la técnica, comprendiendo Alumigel y una emulsión en aceite, tales como FIA o FCA de Freund o emulsionante de monooleato de manida (ISA720 o ISA206, SEPPIC®, Francia), preferiblemente

ISA206.

Otros objetos, ventajas y características novedosas de la invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 es una ilustración esquemática de la proteína de fusión PE-PQGAB del ejemplo 1;
la figura 2 es un diagrama de flujo de la construcción de plásmido de PE(Δ III)-PQGAB del ejemplo 1;
la figura 3 es el diagrama de electroforesis de los fragmentos de ácido nucleico sintetizados según el ejemplo 1, con cuatro fragmentos de ADN (a: 70 pb, b: 129 pb, c: 186 pb, d: 204 pb); y
la figura 4 es el mapa de plásmido de PE(Δ III)-PQGAB.
- 10 La figura 5 es el resultado de proteínas inducidas en el sistema huésped-vector en *E. coli* y extraídas de cuerpos de inclusión mediante extracción con urea 8 M. carril 0 h, 2 h: las muestras de lisis total 0 h y 2 h tras la inducción de IPTG de *E. coli* con pPE-PQGAB-K3; y carril 8 M: extracción proteica con urea 8 M de PE-PQGAB-K3.
- La figura 6 muestra la secuencia de SEQ ID NO: 1 a 23.

Descripción detallada de la realización preferida

- 15 La característica de la presente invención se basa en el hallazgo de que cuando se eliminan la mayoría de las proteínas estructurales en OR5 y ORF6, era posible dejar docenas de aminoácidos N-terminales de ORF5 y ORF6, construyendo de ese modo una cadena de péptido de fusión PQGAB, e insertar después la cadena de péptido entre PE y la secuencia K3, y se confirmó que la proteína de fusión PE-PQGAB-K3 tenía títulos de neutralización en suero mediante pruebas de inmunización en ratones y cerdos.
- 20 Se proponen los siguientes ejemplos para explicar la presente invención, pero no se exponen para limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1: Péptido de fusión PQGAB de la cepa americana del VSRRP

- 25 Se obtuvieron las secuencias proteicas de ORF5 y ORF6 del VSRRP de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, EE.UU.). Basándose en los mecanismos mencionados anteriormente de infecciones virales, las regiones del VSRRP que tienen títulos de neutralización están ubicadas en el extremo N-terminal de ORF5 y ORF6. Es decir, los residuos de aminoácido 2 a 26 de ORF6 (SEQ ID NO:11), y los residuos de aminoácido 31 a 63 de las proteínas estructurales de ORF5 (SEQ ID NO:10). La secuencia de aminoácidos que resulta de la fusión de los dos péptidos se ilustra a continuación:

GSSLDDFCYDSTAPQKVLLAFSITYASNDSSSHLQLIYNLTLCELNGTDWLANKFDWA

- 30 La secuencia del péptido de fusión ORF6-2~26-ORF5-31~63 del VSRRP era la combinación de los péptidos (ORF6)-G₂SSSLDDFCYDSTAPQKVLLAFSITY₂₆ (SEQ ID NO:11) y (ORF5)-A₃₁SNDSSSHLQLIYNLTLCELNGTDWLANKFDWA₆₃ (SEQ ID NO:10), en los que el fragmento GSSLDDFC se denomina "P", el fragmento YDSTAPQKVLLAFSITY "Q", el fragmento ASNDSSSHLQLIYNLTLC "A" y ELNGTDWLANKFDWA "B". El fragmento PQ es un fragmento de ORF6 y el fragmento AB es un fragmento de ORF5. G es el hueco o puente de los polipéptidos de PQ y AB. G puede ser el aminoácido 27 de ORF6 o cualquier fragmento de polipéptido de ORF6 desde el 27 hasta cualquier codón ligado. A la posición G también se le puede no añadir ningún aminoácido dentro de los polipéptidos de PQ y AB.
- 35

- 40 El ejemplo emplea la región del péptido de fusión PQGAB para construir una proteína clave (epítipo) que puede inducir títulos de neutralización y protección inmunitaria con el fin de obtener efectos de inducción de protección inmunitaria *in vivo*. La ilustración esquemática de la proteína de fusión PE-PQGAB-K3 y los diagramas de flujo de construcción de plásmidos de PE(Δ III)-PQGAB y PE (Δ III)-PQGAB-K3 se muestran en la figura 1 y la figura 2, respectivamente.

Ejemplo 2

- 45 La preparación de la secuencia nucleica que codifica para el péptido PQGAB se ilustra a continuación. Un aminoácido corresponde a diversos conjuntos de tripletes de nucleótidos, así que es preferible obtener los tripletes de nucleótidos correspondientes de la bibliografía (tal como <http://www.kazusa.or.jp/codon>) que es adecuado para su expresión en el sistema de *E. coli* en lugar de los tripletes de nucleótidos correspondientes que no son fáciles de reconocer y expresar por *E. coli*. De manera similar, si la secuencia que codifica para el péptido PQGAB debe expresarse en sistemas de levadura, se prefieren los tripletes de nucleótidos apropiados para su expresión sistemas de levadura (tal como *Saccharomyces pichia spp.*).
- 50

Se diseñó una secuencia correspondiente con tripletes de nucleótidos adecuados para su expresión en el sistema de *E. coli* según la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión PQGAB. Se añadieron los extremos en 5' y 3' de la secuencia correspondiente mediante sitios de restricción para su clonación posterior. Para mejorar la eficacia de la digestión y facilitar el diseño de cebadores de PCR, a ambos extremos de la secuencia se les podrían añadir tripletes de nucleótidos con bases de replicación, tales como CCC, AAA, GGG o TTT. La secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión PQGAB de la cepa americana del VSRRP se ilustra en SEQ ID NO:1.

Hay un total de 207 nucleótidos en SEQ ID NO:1, y cuando se clonó en un plásmido mediante enzimas de restricción, se cortaron algunos de los tripletes de nucleótidos, dejando 180-186 nucleótidos ligados al plásmido.

10 Cuando se identificó la secuencia de ácido nucleico diana que codifica para la proteína de fusión PQGAB, se analizó el mapa de restricción de la secuencia de ácido nucleico mediante DNA Strider antes de la síntesis, y después se ligó cada extremo de la secuencia diana a secuencias de sitio de restricción para la clonación posterior, según el mapa de restricción. El producto sintetizado de la secuencia diana debe digerirse mediante determinadas enzimas de restricción antes de la clonación, así que es preferible evitar cualquier sitio de restricción susceptible a las enzimas usadas en la región estructural de la secuencia. Si existen sitios de restricción sujetos a enzimas de clonación en la región estructural de la secuencia diana, debe volver a diseñarse la secuencia diana de modo que se usen codones diferentes de los mismos aminoácidos, para eliminar los sitios de restricción que fueran idénticos para la clonación en la región estructural de la secuencia diana.

20 Posteriormente, el método dado a conocer en la patente taiwanesa n.º I-2289933 y la publicación de la patente estadounidense n.º US 2004/0247617 se usó para modificar los codones de nucleótidos correspondientes de la secuencia de aminoácidos de tipo natural, de modo que la proteína de tipo natural se expresó en gran cantidad mediante el sistema de *E. coli*. La esencia de la modificación es modificar la secuencia de ácido nucleico de tipo natural de modo que los aminoácidos expresados normalmente no se vean afectados, y la expresión en *E. coli* se mantenga eficaz. La secuencia de ácido nucleico modificada puede sintetizarse mediante PCR usando una variedad de pares de cebadores. Los cebadores están numerados tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Los números correspondientes de cebadores para los antígenos PQGAB de la cepa americana del VSRRP

Antígeno diana	Cebador directo	SEQ. ID NO:	Cebador inverso	SEQ ID NO:
PQGAB-US	F1	2	R1	6
PQGAB-US	F2	3	R2	7
PQGAB-US	F3	4	R3	8
PQGAB-US	F4	5		

Las secuencias de los cebadores directos e inversos se muestran a continuación:

el cebador directo F1 (SEQ ID NO: 2) corresponde a los nucleótidos 79-122 de SEQ ID NO: 1, concretamente 5'-GCT TTC TCC ATC ACC TAC CGT TCC AAC GAC TCC TCC TCC CAC CT-3';

30 el cebador directo F2 (SEQ ID NO: 3) corresponde a los nucleótidos 48-95 de SEQ ID NO: 1, concretamente 5'-C GAC TCC ACC GCT CCC CAG AAA GTT CTG CTG GCT TTC TCC ATC ACC TA-3';

el cebador directo F3 (SEQ ID NO: 4) corresponde a los nucleótidos 22-65 de SEQ ID NO: 1, concretamente 5'-GGT TCC TCC CTG GAC GAC TTC TGC TAC GAC TCC ACC GCT CCC CA-3';

el cebador directo F4 (SEQ ID NO:5) corresponde a los nucleótidos 1-40 de SEQ ID NO: 1, concretamente 35 5'-CCC AAA CCC CAT ATG GAA TTC GGT TCC TCC CTG GAC GAC T-3';

el cebador inverso R1 (SEQ ID NO: 6) corresponde a los nucleótidos 148-106 de SEQ ID NO: 1, concretamente 5'-A CAG CGT CAG GTT GTA GAT CAG TTG CAG GTG GGA GGA GGA GTC-3';

el cebador inverso R2 (SEQ ID NO: 7) corresponde a los nucleótidos 176-133 de SEQ ID NO: 1, concretamente 5'-GC CAG CCA GTC GGT ACC GTT CAG TTC GCA CAG GGT CAG GTT GTA-3';

40 el cebador inverso R3 (SEQ ID NO: 8) corresponde a los nucleótidos 207-164 de SEQ ID NO:1, concretamente

5'-TTT TTT CTC GAG AGC CCA GTC GAA TTT GTT AGC CAG CCA GTC GG-3';

en los que R1, R2 y R3 eran secuencias complementarias de manera inversa de una secuencia génica.

En primer lugar se realizó el fragmento sintetizado sin molde de ADN. Se hibridaron el cebador directo F1 y el cebador inverso R1 entre sí, diseñándose 10-18 bases en los extremos 3' de cada cebador de manera complementaria entre sí, y el complejo resultante se leyó y complementó mediante polimerasa para obtener un producto de molde de ADN bicatenario.

Tras la primera ronda de PCR, se tomaron 0,01~4 µl del producto de PCR como molde de ADN de la segunda ronda de PCR, añadiendo a esto el segundo par de cebadores, es decir el cebador directo F2 y el cebador inverso R2, 0,01~4 µl en cada caso, junto con la Pfu polimerasa, reactivos y dNTP necesarios, y se realizó la segunda ronda de PCR. De manera similar, se añadió el par de cebadores F3 y R3 a esto y se realizó de nuevo la PCR; se repitieron los procedimientos con el par de cebadores F4 y R3, y de este modo se obtuvo una secuencia de ácido nucleico de PQGAB modificada que tenía 207 pb.

Los fragmentos de ácido nucleico sintetizados se sometieron a electroforesis y se confirmó que tenían los tamaños esperados. PQGAB-1(207 pb), tal como se muestra en la figura 3; PQGAB generó 4 fragmentos de ADN a, b, c y d (a: 70 pb, b: 129 pb, c: 186 pb, d: 207 pb).

Ejemplo 3: Fragmento de PQGAB de las cepas europeas del VSRRP

El diseño de la proteína de fusión en los ejemplos 1 y 2 está destinado a la cepa americana del VSRRP, pero aparte de la cepa americana del VSRRP, la cepa europea y la cepa australiana también son muy prevalentes a nivel global. La similitud de los aminoácidos estructurales no es alta, sólo del 60-80%, de modo que pueden realizarse diseños de otras proteínas de fusión ORF5&ORF6 de la misma manera que en los ejemplos 1 y 2 para diseñar y sintetizar cebadores.

Tomando como ejemplo PQGAB de la cepa europea del VSRRP, la secuencia de aminoácidos del dominio de fusión contenía ORF6-M1~I28 + (SEQ ID NO: 12), y ORF5-F31~A64 (SEQ ID NO:13) de la cepa europea del VSRRP.

Tras confirmar la secuencia, se realizó la preparación de las proteínas de fusión de la cepa europea del VSRRP de la misma manera que en los ejemplos 1-2. La secuencia de ácido nucleico modificada se sintetizó mediante PCR usando una variedad de pares de cebadores. Los cebadores están numerados tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Los números correspondientes de cebadores para los antígenos PQGAB de la cepa europea del VSRRP

Antígeno diana	Cebador directo	Seq. ID n.º	Cebador inverso	Seq. ID n.º
PQGAB-EP	F1	14	R1	18
PQGAB-EP	F2	15	R2	19
PQGAB-EP	F3	16	R3	20
PQGAB-EP	F4	17	R4	21

La secuencia de ácido nucleico diana que codifica para la proteína de fusión PQGAB-EP se sintetizó con los cebadores mostrados anteriormente *in vitro*, siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 2. Para mejorar la eficacia de la digestión y facilitar el diseño de cebadores de PCR, a ambos extremos de la secuencia se les añadieron tripletes de nucleótidos con bases de replicación, tales como CCC, AAA, GGG o TTT.

Ejemplo 4: Construcción de plásmidos que contienen la secuencia diana

Tomando como ilustración el producto del ejemplo 2, el fragmento de ADN de 207 pb sintetizado se digirió con *EcoR1* y *Xho1*, se ligó a un plásmido de *E. coli* que contenía una secuencia peptídica que tenía funciones de unión y translocación, y un péptido carboxilo-terminal, y el plásmido resultante fue pPE-PQGAB-K3.

El plásmido pET15 que tiene un promotor T7 y un marcador de resistencia antibiótica (a la ampicilina) construido en el mismo puede expresar la proteína de fusión del fragmento PQGAB del VSRRP y eliminar la toxicidad de la exotoxina de *Pseudomonas* (exotoxina A de *Pseudomonas* sin dominio III). El mapa de vectores se muestra en la figura 4.

Finalmente, se transformó el plásmido mencionado anteriormente en células o cepas bacterianas que pueden expresar las proteínas de fusión.

Ejemplo 5: Expresión y análisis de la proteína diana

Se confirmó que las cepas bacterianas que tenían el plásmido mencionado anteriormente contenían tanto el plásmido como el gen de PQGAB en el 90% de la población. Se prepararon las cepas como disoluciones madre de glicerol en alícuotas de 2 ml y se almacenaron a -70°C. En un entorno estéril, se inocularon 2 ml de las disoluciones madre almacenadas en un matraz de 500 ml esterilizado en autoclave que contenían 200 ml de LB (+500 µg/ml de Amp), se agitaron en un incubador rotatorio a 37°C, 150 rpm durante 10-12 horas, y se obtuvo un cultivo. Se cultivó el líquido hasta que la DO600 alcanzó 1,0±0,4.

En un entorno estéril, se inocularon 50 ml del líquido de cultivo en cada uno de los ocho matraces de 3000 ml que contenían 1250 ml de LB (+500 µg/ml de Amp + 50 ml de glucosa al 10%), se agitaron a 37°C, 150 rpm durante 2-3 horas hasta que la DO600 alcanzó 0,3±0,1, se añadieron 50 ppm de IPTG, se agitó el cultivo de nuevo a 37°C, 150 rpm durante 2 horas, de modo que se llevó a cabo la producción de proteína.

Entonces se disolvió la PE-PQGAB-K3 contenida en cuerpos de inclusión mediante el método de extracción con urea 8 M, las proteínas PE-PQGAB-K3 extraídas se muestran en la figura 5. Pudieron obtenerse 300-400 mg de antígeno a partir de un lote de 10 litros del líquido de cultivo. Se analizó el antígeno obtenido con inmunotransferencia de tipo Western, tinción con azul de Coomassie y electroforesis en SDS-PAGE, se midió la densidad de las bandas mediante un densitómetro para cuantificar las proteínas contenidas en las disoluciones de antígeno. Se usaron 0,2±0,02 mg de las proteínas como el componente principal de una inyección de dosificación baja con el fin de proceder a la inmunización y exposición al virus.

Ejemplo 6: Inmunización y exposición al virus en cerdos

En una granja SPF, se agruparon aleatoriamente cerdos en 3 grupos, cada uno con cinco cerdos. Se crió cada grupo en una sala de aislamiento equipada con aire acondicionado e instrumentos de circulación. A los cerdos del grupo de inmunización con PE-PQGAB-K3, con de 14 a 28 días de edad, se les inyectó por vía intramuscular una vacuna de 2 ml que contenía 1 ml de PE-PQGAB-K3 (que contenía 200 µg de proteínas/inyección) y emulsionada en 1 ml de ISA206 (SEPPIC®, Francia), y se realizó el procedimiento de inmunización dos veces. El grupo de inmunización GP5&M se inmunizó con PE-ORF5-K3 y PE-ORF6-K3 (que contenían 200 µg de proteínas/inyección), respectivamente. El grupo control se crió sin inmunización.

Dos semanas tras la última inoculación, se administraron por vía intramuscular 100 mg de disolución de ketamina para tranquilizar a los cerdos, entonces se administró gota a gota 1 ml de lidocaína al 2% en las cavidades nasales de los cerdos para inhibir actos reflejos de tos, y entonces se inoculó el virus en los cerdos por vía nasal. Se inocularon cinco cerdos de cada grupo con 1 ml de cultivos de VSRRP de la cepa MD-1 que tenían una dosificación de 1x10⁷ TCID₅₀/ml.

14 días tras la inoculación, se sacrificaron los cerdos para proceder a una autopsia completa. Se tomaron muestras de pulmón o hígado (de ambas partes de la parte central del lóbulo superior y la parte auxiliar del lóbulo caudado) y se fijaron mediante formaldehído con tampón neutro al 10% para el examen patológico tisular posterior. El examen se realizó de manera ciega y se evaluó basándose en la gravedad de la neumonitis intersticial (Opriessnig T, P.G. Halbur, *et al.*; Journal of Virology, 76 (2002):11837-11844, y Halbur, P.G., P.S. Paul, *et al.*, 1996. J. Vet. Diagn. Investig. 8:11-20) a una escala de 0 a 6, en la que la gravedad aumenta con el número.

Resultados experimentales

Dos semanas tras la segunda inmunización, se sometieron a prueba leucocitos de sangre porcina para determinar VSRRP. Los resultados indicaron que no se producía viremia en ningún cerdo antes de inocular VSRRP. Las muestras de leucocitos se sometieron a prueba con RT-PCR 3, 7 y 14 días tras inocular el virus, respectivamente, y los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Aparición de viremia por VSRRP en cerdos tras inocular VSRRP

Día	Control	PE-PQGAB-K3	PE-ORF5-K3 PE-ORF6-K3
3	3/5	3/5	2/5
7	3/4 (muerte 1*)	2/5	2/4 (muerte 2*)
14	3/4 (muerte 1*)	2/5	2/4 (muerte 2*)

*se identificó viremia por VSRRP mediante RT-PCR antes de la muerte

Se disecaron todos los cerdos, incluyendo aquéllos que se habían sacrificado y los que sobrevivieron tras el estudio de dos semanas. Los exámenes macroscópicos indicaron que los pulmones de los cerdos inoculados con virus del grupo de vacuna ORF5&ORF6 y el grupo control mostraron lesiones más extensas y neumonitis intersticial grave,

mientras que el grupo de vacuna PE-PQGAB-K3 de la presente invención no mostró lesiones tan extensas ni neumonitis intersticial tan grave. Tal como se muestra en la tabla 4, el grupo de vacuna PE-PQGABK3 de la presente invención mostró menos gravedad en cuanto a la neumonitis intersticial que el grupo control y el grupo de vacuna ORF5&ORF6.

5 Tabla 4: Comparaciones de las lesiones pulmonares macroscópicas inducidas mediante VSRRP, 14 días tras inocular VSRRP

Cerdo n.º	Grupo control Índice de lesión	Grupo de vacuna PE- PQGAB-K3 Índice de lesión	Grupo de vacuna PE- ORF5-K3, PE-ORF6-K3 Índice de lesión
1	6*	5	6
2	6	3	5
3	6	4	6
4	6	4	6
5	5	3	6
Promedio	5,75±0,50	3,80±0,84	5,80±0,45

*: índice de lesión por neumonitis intersticial

10 Tabla 5: Los índices de lesión pulmonar macroscópica mostrados por el grupo de vacuna PE-PQGAB-K3 son significativamente menores que los del grupo control y el grupo de vacuna ORF5&ORF6 en vista de la bioestadística.

Grupo	Número de individuos	Total	Promedio	Varianza
Grupo control	5	29	5,8	0,2
Grupo PE-PQGAB-K3	5	19	3,8	0,7
Grupo PE-ORF5&ORF6- K3	5	29	5,8	0,2

ANOVA

Fuente de variación	SS	Grado de libertad	MS	F	Valor de P	Valor crítico
Entre grupos	13,33333	2	6,666667	18,18182	0,000233	3,885294
Dentro de los grupos	4,4	12	0,366667			
Total	17,73333	14				

Los experimentos anteriores indican claramente que la PE-PQGAB-K3 de la presente invención no sólo puede proteger de manera eficaz a los cerdos frente a infecciones por VSRRP, sino que también provoca una neumonitis intersticial más leve que otras vacunas (tal como PEORF5-K3, PE-ORF6-K3).

15 La variación de los títulos de anticuerpo en cerdos inmunizados se muestra en la tabla 6. El grupo A tiene buenos títulos de IgG mediante ELISA, pero los títulos de IFA y NT eran menores que los del grupo C. Además, a partir de la tabla 5, se indica que VSRRP ORF5 u ORF6 tienen un efecto alérgico específico de antígeno tras la inmunización y la exposición al virus. De manera manifiesta, es difícil usarlos como antígenos de vacunas contra el SRRP.

Tabla 6: Títulos séricos

Grupo	Antígeno de recubrimiento		Títulos de IFA	Títulos de NT*
	PE(ΔIII)	PQGAB		

ES 2 384 524 T3

	Títulos de IgG mediante ELISA (S/BK)			
A PE-ABCF-K3 PE-PQGF-K3	12	80	8-16	8-16
B Negativo para CTL	1	1	<8	<8
C PE-PQG1AB-K3	17	30	32-64	16-64

*: El título de neutralización se determina mediante la inhibición del crecimiento y la proliferación del VSRRP en una muestra de dilución en serie añadida al sistema de cultivo de células MAC-10A.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> HealthBanks Biotech Co., Ltd.	
5	<120> PROTEÍNA DE FUSIÓN DEL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO COMO VACUNA CONTRA EL SRRP	
	<130> ADT35146P.EPA	
10	<140> EP06253982.0 <141> 29/07/2006	
	<160> 21	
15	<170> PatentIn versión 3.2	
	<210> 1	
	<211> 207	
	<212> ADN	
20	<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino	
	<400> 1	
	cccaaacc cc atatggaatt cggttcctcc ctggacgact tctgctacga ctccaccgct 60	
	ccccagaaag ttctgctggc ttctccatc acctacgctt ccaacgactc ctcctcccac 120	
	ctgcaactga tctacaacct gaccctgtgc gaactgaacg gtaccgactg gctggctaac 180	
	aaattcgact gggctctcga gaaaaaa 207	
25	<210> 2	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador directo para PQGAB-US.	
	<400> 2	
	gctttctcca tcacctacgc ttccaacgac tctctctccc acct 44	
35	<210> 3	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador directo para PQGAB-US.	
	<400> 3	
45	cgactccacc gctccccaga aagttctgct ggctttctcc atcaccta 48	
50	<210> 4	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador directo para PQGAB-US.	
	<400> 4	
	ggttctctcc tggacgactt ctgctacgac tccaccgctc ccca 44	
	<210> 5	
	<211> 44	

<212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Cebador directo para PQGAB-US

<400> 5
 ggttcctccc tggacgactt ctgctacgac tccaccgctc ccca 44

10 <210> 6
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador inverso para PQGAB-US.

<400> 6
 20 acagggtcag gttgtagatc agttgcaggt gggaggagga gtc 43

<210> 7
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador inverso para PQGAB-US.

<400> 7
 30 gccagccagt cgttaccggt cagttcgac agggtcaggt tgta 44

<210> 8
 <211> 44
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso para PQGAB-US.

<400> 8
 40 tttttctcg agagcccagt cgaatttgt agccagccag tccg 44

<210> 9
 <211> 219
 <212> ADN
 45 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino

<400> 9
cccgaattcc atatggtcga catgggttct ctcgacgact tttgtaacga ctctaccgct 60
gctcagaaac tggttctggc tttttctatc acctacacc caatctttgt tgctggtggt 120
tcttcttcta cctaccagta catctacaac ctccaccatct gtgaactcaa cggtaccgac 180
tggtgttcta accacttga ctgggctctc gagaaaaaa 219

50 <210> 10
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino

55 <400> 10

Ala Ser Asn Asp Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr
1 5 10 15

Leu Cys Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ala Asn Lys Phe Asp Trp
20 25 30

Ala

<210> 11
<211> 25
5 <212> PRT
<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino

<400> 11

Gly Ser Ser Leu Asp Asp Phe Cys Tyr Asp Ser Thr Ala Pro Gln Lys
1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Phe Ser Ile Thr Tyr
20 25

10 <210> 12
<211> 28
<212> PRT
<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino

15 <400> 12

Met Gly Ser Leu Asp Asp Phe Cys Asn Asp Ser Thr Ala Ala Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Leu Ala Phe Ser Ile Thr Tyr Thr Pro Ile
20 25

20 <210> 13
<211> 34
<212> PRT
<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino

<400> 13

Phe Val Ala Gly Gly Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Tyr Ile Tyr Asn Leu
1 5 10 15

Thr Ile Cys Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ser Asn His Phe Asp
20 25 30

Trp Ala

25 <210> 14
<211> 42
<212> ADN
30 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para PQGAB-EP.

	<400> 14 ctggctttt ctatcaccta cacccaatc ttgtgtctg gt	42
5	<210> 15 <211> 41 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador directo para PQGAB-EP.	
15	<400> 15 gactctaccg ctgctcagaa actggtctg gcttttcta t	41
20	<210> 16 <211> 39 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador directo para PQGAB-EP.	
30	<400> 16 ggttctctcg acgactttg taacgactct accgctgct	39
35	<210> 17 <211> 38 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador directo para PQGAB-EP.	
45	<400> 17 cccgaattcc atatggtcga catgggttct ctcgacga	38
50	<210> 18 <211> 42 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador inverso para PQGAB-EP.	
60	<400> 18 gatgtactgg tagttagaag aagaaccacc agcaacaag at	42
65	<210> 19 <211> 42 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Cebador inverso para PQGAB-EP.	
75	<400> 19 gttgagtca cagatggtga ggtgtagat gtactggtag gt	42
80	<210> 20 <211> 39 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220>	

ES 2 384 524 T3

<223> Cebador inverso para PQGAB-EP.

<400> 20
gtggtagac agccagtcgg taccgtgag ttcacagat 39

5

<210> 21
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> Cebador inverso para PQGAB-EP.

<400> 21
tttttctcg agagcccagt caaagtggtt agacagcc 38

15

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (VSRRP), que comprende:
 - a) un péptido de exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) que comprende un dominio de unión y un dominio de translocación, ubicado en el extremo N-terminal de la proteína de fusión;
 - 5 b) un péptido de fusión de ORF6-2~26 (SEQ ID NO: 11) y ORF5-31-63 (SEQ ID NO: 10) de la cepa americana de VSRRP, o un péptido de fusión de ORF6-M1-I28 (SEQ ID NO: 12) y ORF5-F31~A64 (SEQ ID NO: 13) de la cepa europea de VSRRP; y
 - c) un dominio carboxilo-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de KDEL-KDEL-KDEL ubicada en el extremo C-terminal de la proteína de fusión, en el que las letras mayúsculas "KDEL" representan códigos de aminoácido de una sola letra.
- 10 2. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión comprende un epítipo que puede inducir títulos de neutralización.
3. Composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de una proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 4. Proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en la prevención del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (VSRRP).
5. Composición de vacuna según la reivindicación 3, para su uso en la prevención del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (VSRRP).
- 20 6. Proteína de fusión según la reivindicación 1, que comprende el péptido de fusión de GSSLDDFCYDSTAPQKVLLAFSITYASNDSSSHLQLIYNLTLCELNGTDWLANKFDWA, en el que las letras mayúsculas representan códigos de aminoácido de una sola letra.
7. Proteína de fusión según la reivindicación 1, que comprende el péptido de fusión de MGSLDDFCNDSTAAQKLVLAFSITYTPIFVAGGSSSTYQYIYNLTICELNGTDWLSNHFDWA, en el que las letras mayúsculas representan códigos de aminoácido de una sola letra.
- 25 8. Proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que ORF5-31-63 está ubicado entre ORF6-2~26 y el dominio carboxilo, y ORF5-F31~A64 está ubicado entre ORF6-M1-I28 y el dominio carboxilo.

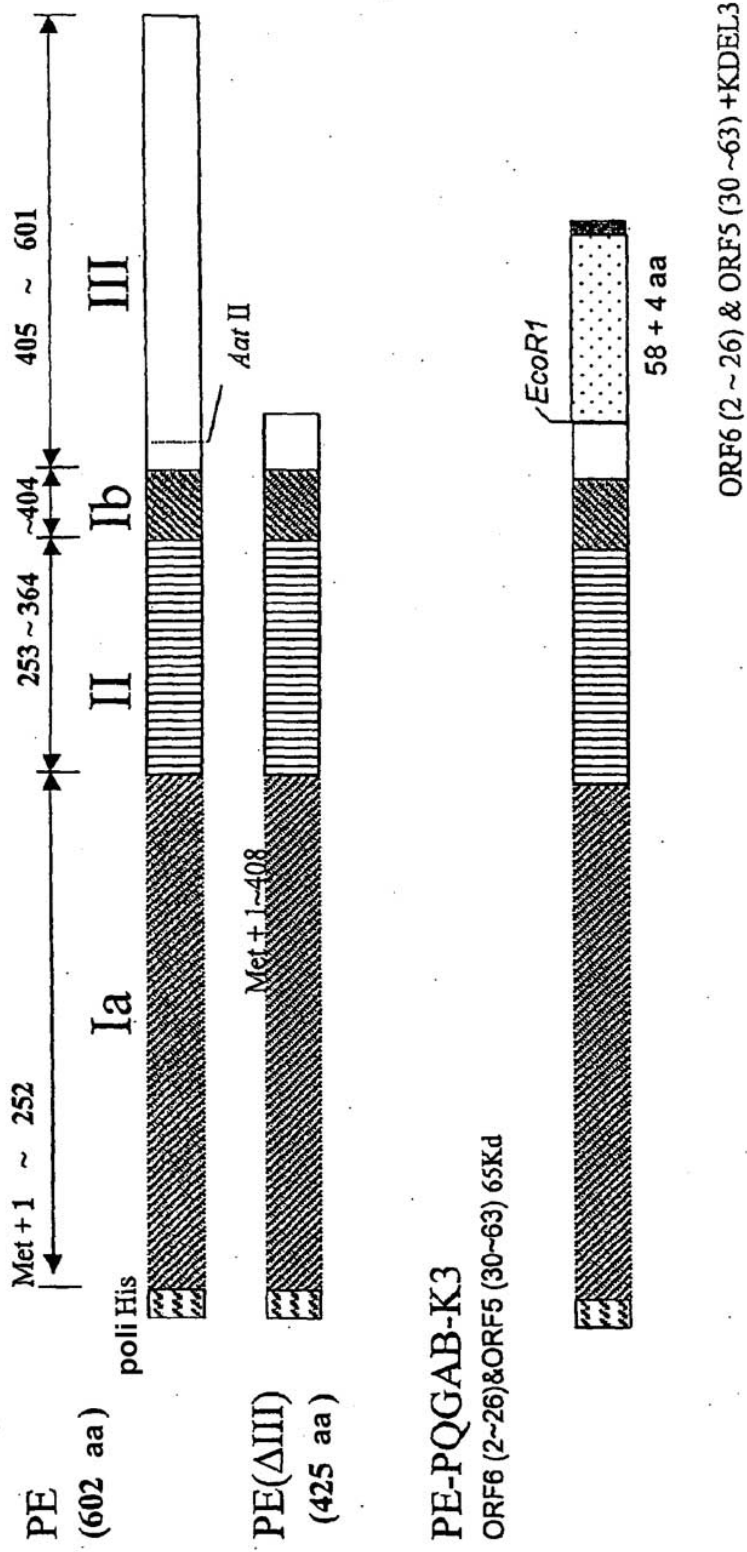


Fig. 1

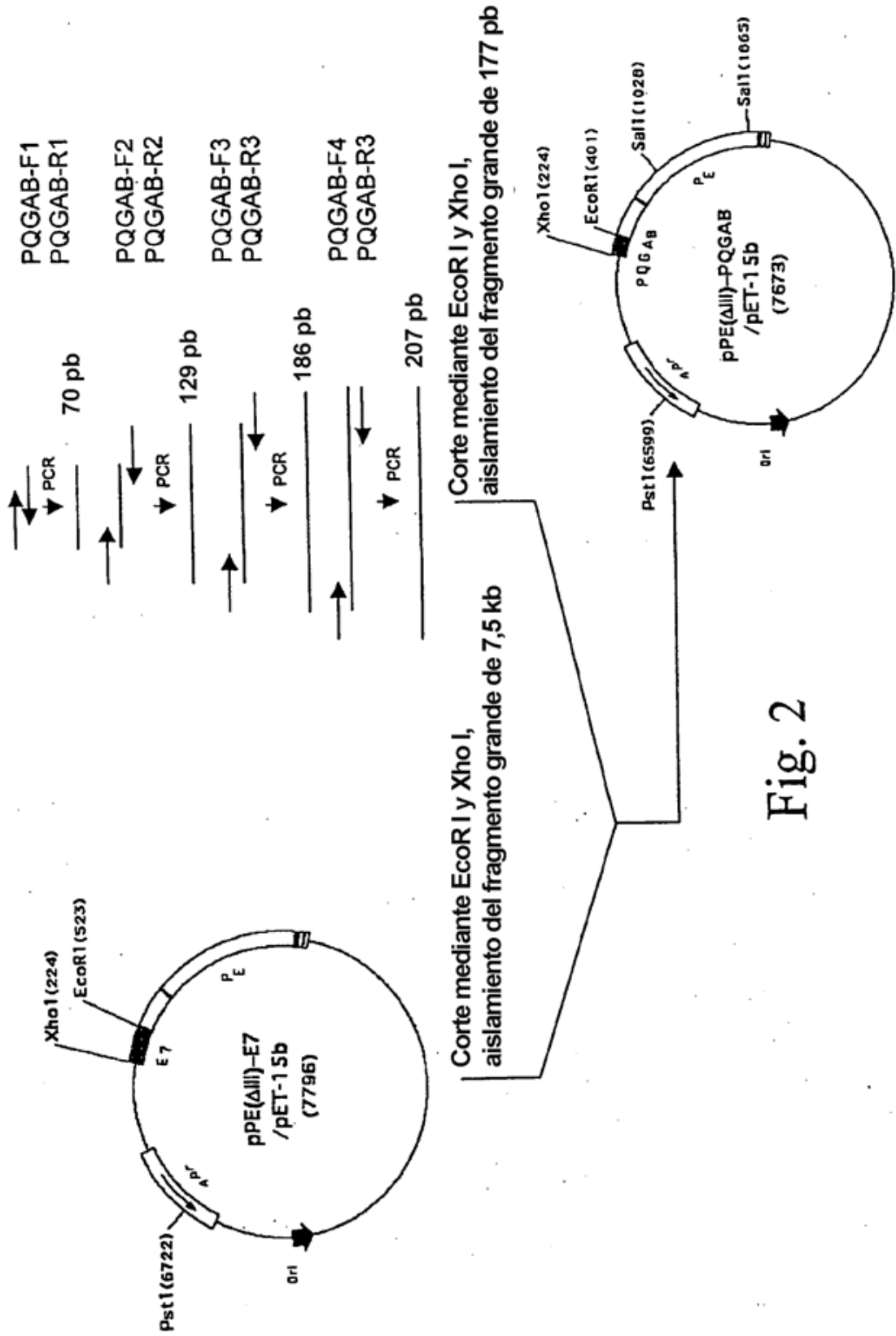


Fig. 2

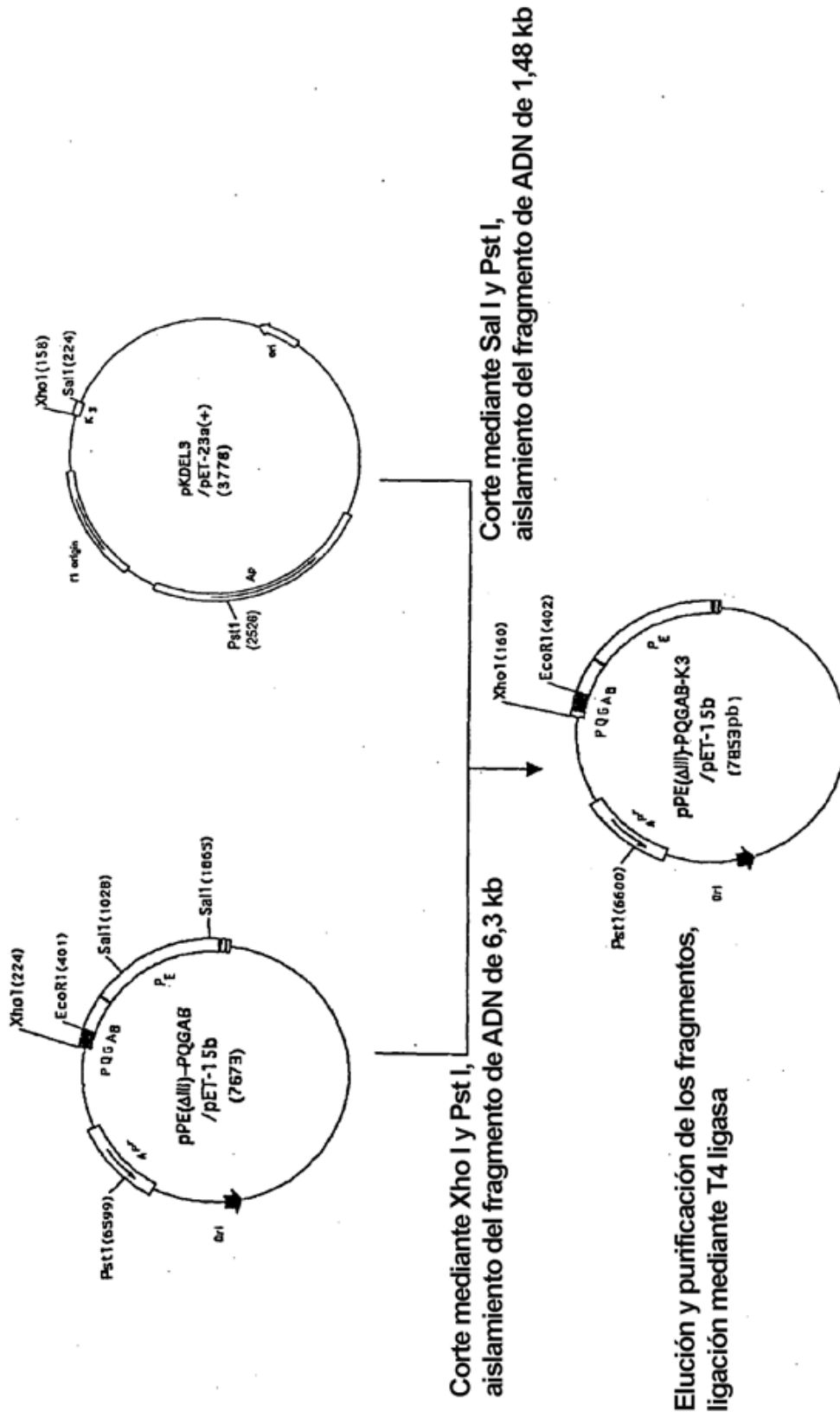


Fig. 2 (cont.)

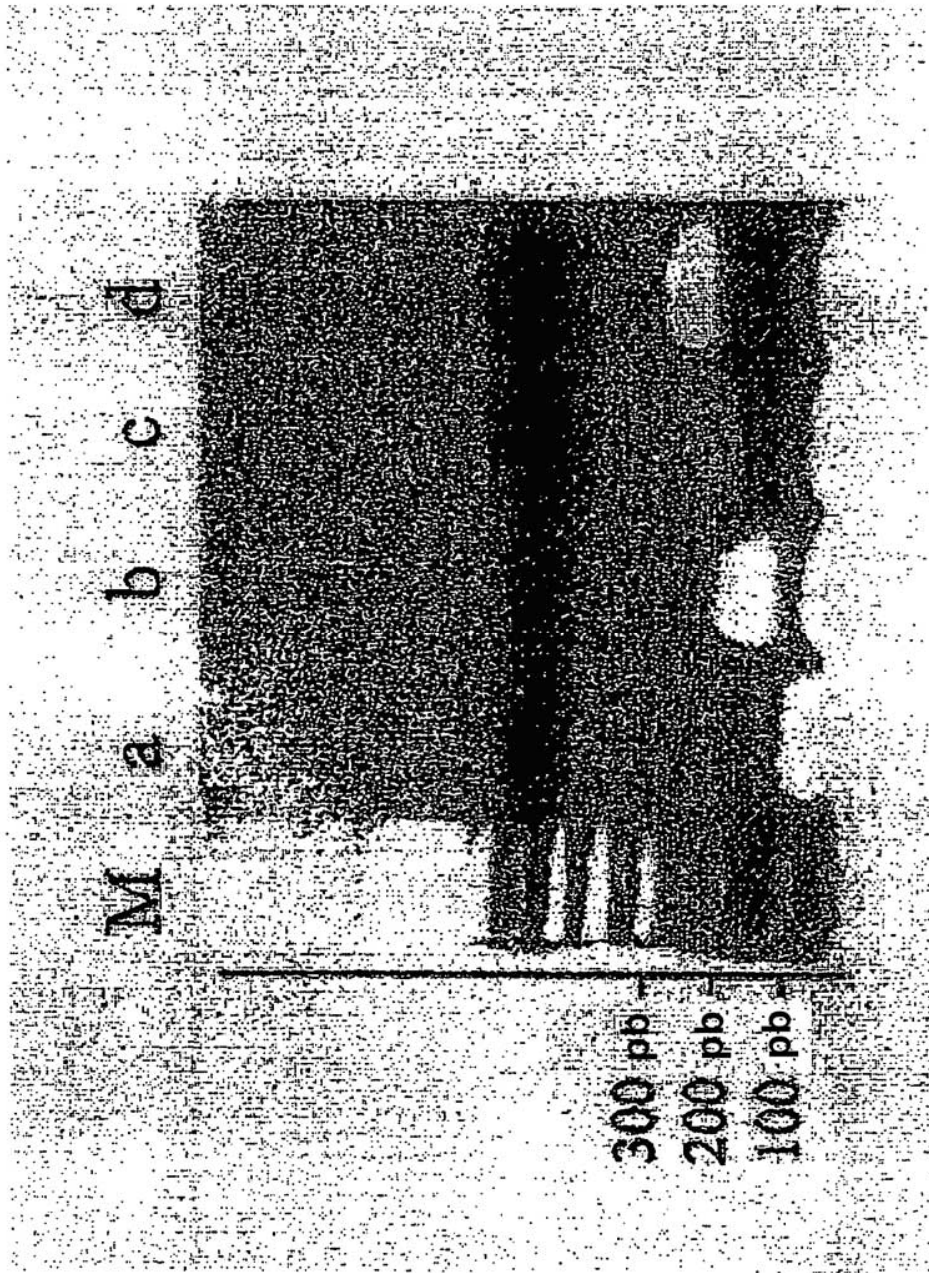


Fig. 3

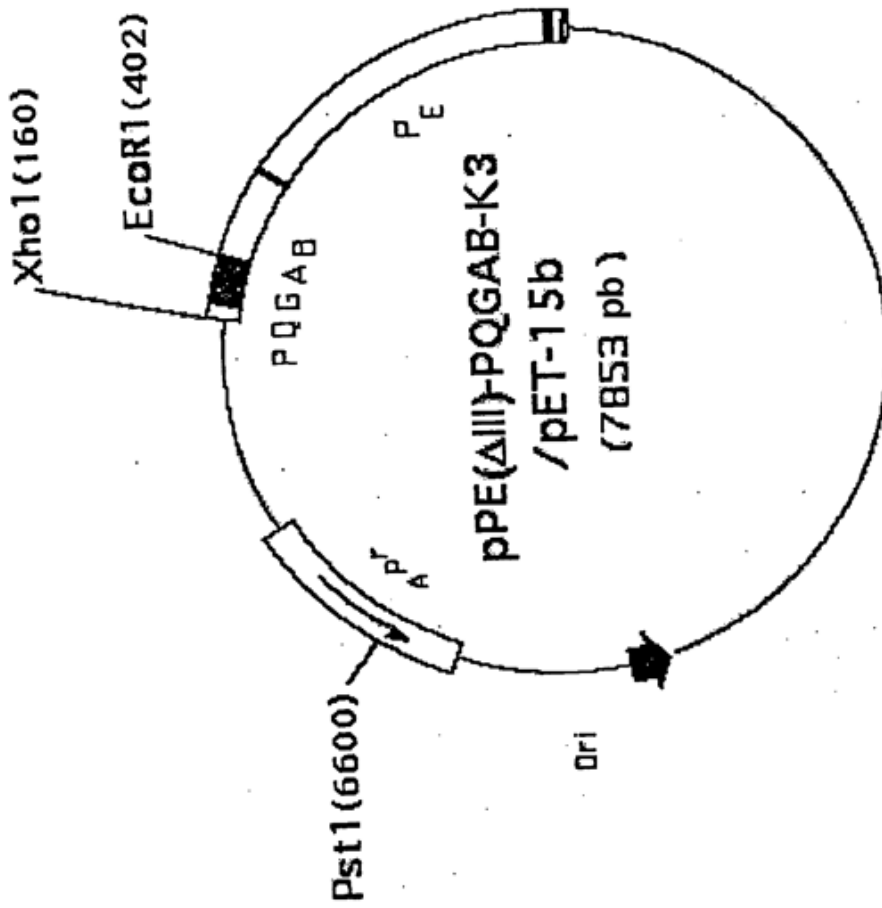


Fig. 4

M 0h 2h 8M

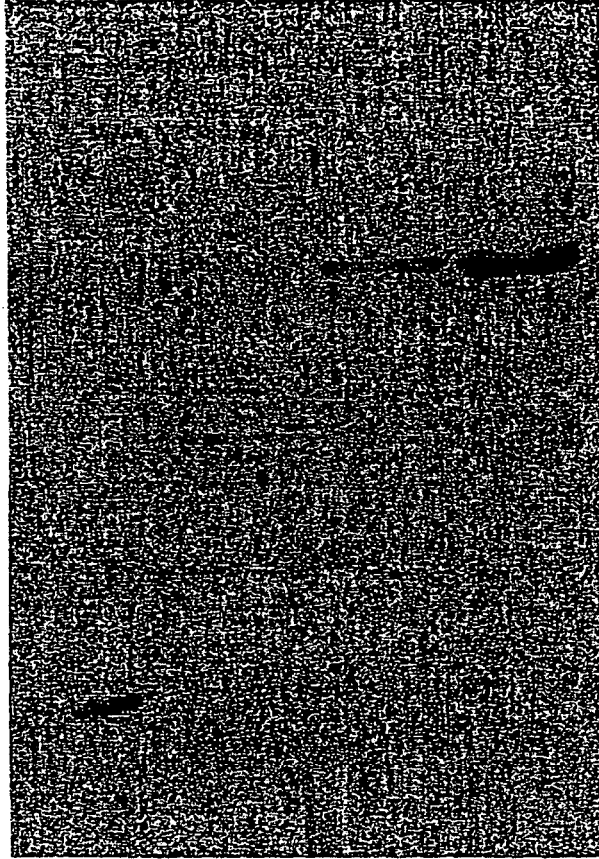


Fig. 5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> HealthBanks.Co.,Ltd
 <120> PROTEÍNA DE FUSIÓN DEL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO COMO VACUNA CONTRA EL SRRP
 <130> S0200/0613
 <160> 23
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 207
 <212> ADN
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino
 <400> 1
 cccaaacccc atatggaatt cggttcctcc ctggacgact tctgctacga ctccaccgct 60
 ccccagaag ttctgctggc ttctccatc acctacgctt ccaacgactc ctctctccac 120
 ctgcaactga tctacaacct gaccctgtgc gaactgaacg gtaccgactg gctggctaac 180
 aaattcgact gggctctcga gaaaaaa 207
 <210> 2
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para PQGAB-US.
 <400> 2
 gctttctcca tcacctacgc ttccaacgac tctctctccc acct 44
 <210> 3
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para PQGAB-US.
 <400> 3
 cgactccacc gctccccaga aagtctctgt ggctttctcc atcaccta 48
 <210> 4
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para PQGAB-US.
 <400> 4
 ggttctctcc tggacgactt ctgctacgac tccaccgctc ccca 44
 <210> 5
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para PQGAB-US.
 <400> 5
 ggttctctcc tggacgactt ctgctacgac tccaccgctc ccca 44

FIGURA 6

<210> 6
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso para PQGAB-US
 <400> 6
 acagggtcag gttgtagatc agttgcaggt gggaggagga gtc 43

<210> 7
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso para PQGAB-US
 <400> 7
 gccagccagt cggtagcgtt cagttcgcac agggtcaggt tgta 44

<210> 8
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso para PQGAB-US
 <400> 8
 ttttttctcg agagccaggt cgaatttgtt agccagccag tcgg 44

<210> 9
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino
 <400> 9
 Cys Cys Cys Ala Ala Ala Cys Cys Cys Cys Ala Thr Ala Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Thr Thr Cys Gly Gly Thr Thr Cys Cys Thr Cys Cys Cys Thr
 20 25 30
 Gly Gly Ala Cys Gly Ala Cys Thr Thr Cys Thr Gly Cys Thr Ala Cys
 35 40 45
 Gly Ala Cys Thr Cys Cys Ala Cys Cys Gly Cys Thr Cys Cys Cys Cys
 50 55 60
 Ala Gly Ala Ala Ala Gly Thr Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Cys
 65 70 75 80
 Thr Thr Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Thr Ala Cys
 85 90 95
 Gly Cys Thr Thr Cys Cys Ala Ala Cys Gly Ala Cys Thr Cys Cys Thr
 100 105 110
 Cys Cys Thr Cys Cys Cys Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Ala Cys Thr
 115 120 125

FIGURA 6 CONTINUACIÓN

Gly Ala Thr Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys
 130 135 140

Cys Thr Gly Thr Gly Cys Gly Ala Ala Cys Thr Gly Ala Ala Cys Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Cys Cys Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Gly Cys
 165 170 175

Thr Ala Ala Cys Ala Ala Ala Thr Thr Cys Gly Ala Cys Thr Gly Gly
 180 185 190

Gly Cys Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 195 200 205

<210> 10
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino

<400> 10

Cys Cys Cys Gly Ala Ala Thr Thr Cys Cys Ala Thr Ala Thr Gly Gly
 1 5 10 15

Thr Cys Gly Ala Cys Ala Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys Thr Cys Thr
 20 25 30

Cys Gly Ala Cys Gly Ala Cys Thr Thr Thr Thr Gly Thr Ala Ala Cys
 35 40 45

Gly Ala Cys Thr Cys Thr Ala Cys Cys Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys
 50 55 60

Ala Gly Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Thr Cys Thr Gly Gly Cys
 65 70 75 80

Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Ala Thr Cys Ala Cys Cys Thr Ala Cys
 85 90 95

Ala Cys Cys Cys Cys Ala Ala Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr Thr Gly
 100 105 110

Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Thr Cys Thr Thr Cys Thr Thr Cys
 115 120 125

Thr Ala Cys Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly Thr Ala Cys Ala Thr Cys
 130 135 140

Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr
 145 150 155 160

Gly Thr Gly Ala Ala Cys Thr Cys Ala Ala Cys Gly Gly Thr Ala Cys
 165 170 175

Cys Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Thr Cys Thr Ala Ala Cys
 180 185 190

FIGURA 6 CONTINUACIÓN

Cys Ala Cys Thr Thr Thr Gly Ala Cys Thr Gly Gly Gly Cys Thr Cys
 195 200 205

Thr Cys Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 210 215

<210> 11
 <211> 219
 <212> ADN
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino

<400> 11
 cccgaatgcc atatggcga catgggttct ctcgacgact ttgtaacga ctctaccgct 60
 gctcagaaac tggttctggc tttttctatc acctacaccc caatctttgt tgctgggtgt 120
 tctttctcta cctaccagta catctacaac ctcaccatct gtgaactcaa cggtagcgac 180
 tggctgtcta accacttga ctgggctctc gagaaaaaa 219

<210> 12
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino

<400> 12
 Ala Ser Asn Asp Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr
 1 5 10 15

Leu Cys Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ala Asn Lys Phe Asp Trp
 20 25 30

Ala

<210> 13
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino

<400> 13
 Gly Ser Ser Leu Asp Asp Phe Cys Tyr Asp Ser Thr Ala Pro Gln Lys
 1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Phe Ser Ile Thr Tyr
 20 25

<210> 14
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino

<400> 14
 Met Gly Ser Leu Asp Asp Phe Cys Asn Asp Ser Thr Ala Ala Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Leu Ala Phe Ser Ile Thr Tyr Thr Pro Ile
 20 25

<210> 15
 <211> 34

FIGURA 6 CONTINUACIÓN

<212> PRT
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino
 <400> 15
 Phe Val Ala Gly Gly Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Tyr Ile Tyr Asn Leu
 1 5 10 15
 Thr Ile Cys Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ser Asn His Phe Asp
 20 25 30

Trp Ala

<210> 16
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para PQGAB-EP.
 <400> 16
 ctggcttttt ctatcaccta caccccaatc tttgttgctg gt 42

<210> 17
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para PQGAB-EP.
 <400> 17
 gactctaccg ctgctcagaa actggttctg gctttttcta t 41

<210> 18
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para PQGAB-EP.
 <400> 18
 ggttctctcg acgacttttg taacgactct accgctgct 39

<210> 19
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para PQGAB-EP.
 <400> 19
 cccgaatcc atatggtcga catgggttct ctcgacga 38

<210> 20
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso para PQGAB-EP.
 <400> 20
 gatgtactgg taggtagaag aagaaccacc agcaacaaag at 42

FIGURA 6 CONTINUACIÓN

<210>	21	
<211>	42	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador inverso para PQGAB-EP.	
<400>	21	
	gttgagtcca cagatggtga ggtttagat gtactggtag gt	42
<210>	22	
<211>	39	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador inverso para PQGAB-EP.	
<400>	22	
	gtggttagac agccagtcgg taccgttag ttcacagat	39
<210>	23	
<211>	38	
<212>	ADN	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Cebador inverso para PQGAB-EP.	
<400>	23	
	ttttttctcg agagcccagt caaagtggtt agacagcc	38

FIGURA 6 CONTINUACIÓN