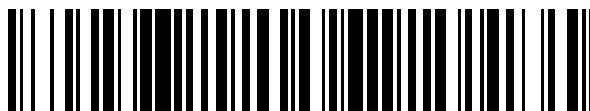


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 568**

51 Int. Cl.:

C12N 15/40 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/08 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.1999** **E 05018141 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014** **EP 1627919**

54 Título: **Clon infeccioso de ADNc del virus del Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino (SRRP) Norteamericano y usos del mismo**

30 Prioridad:

22.12.1998 US 113345 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2014

73 Titular/es:

ZOETIS P LLC (100.0%)
100 Campus Drive
Florham Park, New Jersey 07932, US

72 Inventor/es:

CALVERT, JAY GREGORY;
WELCH, SIAO-KUN WAN y
SHEPPARD, MICHAEL GEORGE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 459 568 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

Clon infeccioso de ADNc del virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (SRRP) Norteamericano y usos del mismo

Campo de la Invención

- 5 La presente invención pertenece al campo de la salud animal y se refiere a los clones de ADNc infecciosos de los ARN virus de polaridad positiva y la elaboración de vacunas, en particular, vacunas porcinas, utilizando tales clones de ADNc.

Antecedente de la Invención

- 10 El síndrome reproductor y respiratorio porcino (SRRP) es una nueva enfermedad de porcina, descrita por primera vez en 1987 en Norteamérica y en 1990 en Europa. La enfermedad se ha diseminado desde entonces a Asia y afecta a la mayoría de los países del mundo con mayor producción de cerdos. Los síntomas primarios son problemas reproductivos en cerdas de cría y lechonas de reposición, que incluyen abortos a término, mortinatos y momificados, y camadas de lechones pequeños débiles que nacen virémicos y que a menudo no consiguen sobrevivir. Además, el síndrome se manifiesta así mismo como una enfermedad respiratoria en lechones que se
- 15 disemina horizontalmente y que produce fiebre, letargia, respiración dificultosa, pérdida de apetito, crecimiento lento, y ocasionalmente muerte, a menudo asociada con otros patógenos respiratorios. La enfermedad además se puede transmitir a cerdas y lechonas de reposición a través del semen de verracos infectados, sea por monta natural o por inseminación artificial. Por estas y otras razones, se ha probado que el SRRP es una enfermedad difícil de controlar y por tanto una de las enfermedades más dañinas económicamente de la industria porcina.

- 20 El agente causal del SRRP es el virus SRRP, del que existen dos tipos genética y serológicamente distintos (Murtaugh, M.P. y col., 1995, Arch-Virol. 140, 1451-1460; Suarez, P. y col., 1996, Virus Research 42:159-165). Se cree que los dos tipos entraron por primera vez en la población porcina independientemente, uno en Norteamérica y el otro en Europa, en los 80, a partir de reservorios biológicos desconocidos, posiblemente de origen roedor o aviar. El tipo europeo, representado por el prototipo "Virus Lelystad", se aisló y secuenció en Holanda en 1991 (Terpstra, C. y col., 1991, Vet. Quart. 13:131-136; Wensvoort, G. y col., 1991, Vet. Quart. 13:121-130; Wensvoort, G. y col.,
- 25 documento WO 92/213751992 (PCT/NL92/00096), 1992; Meulenber, J.J.M. y col., 1993, Virol. 192:62-72).

- Tanto el virus SRRP norteamericano como el virus SRRP europeo se clasifican dentro de la familia *Arteriviridae*, que también incluye el virus de la arteritis equina, virus elevador de la lactato deshidrogenasa, y el virus de la fiebre hemorrágica de los simios. A su vez, los arterivirus se sitúan dentro del orden *Nidovirales*, que también incluyen los coronavirus y los torovirus. Los nidovirus son virus de envoltura que tienen genomas que consisten en una cadena sencilla de ARN con polaridad positiva. El ARN genómico de un ARN virus catenario positivo cumple con el doble papel de almacenamiento y expresión de la información genética. En los nidovirus no hay ADN que esté implicado en la replicación o la transcripción. La reproducción del ARN genómico de los nidovirus es por tanto un proceso combinado de replicación genómica y transcripción en ARNm. Además, en los nidovirus algunas proteínas se
- 30 traducen directamente del ARN genómico. La biología molecular de la familia *Arteriviridae* ha sido revisada recientemente por Snijder y Meulenber (Snijder, E.J. y Meulenber, J.J.M., 1998, Journal of General Virology 79:961-979).

- Las vacunas disponibles comercialmente en la actualidad contra el SRRP son o las convencionales de virus vivo modificado (cultivo celular, atenuadas) o las muertas convencionales (cultivos celulares de virus virulento inactivados). Varias de estas vacunas se han criticado basándose en lo que concierne a su seguridad y/o eficacia. Por tanto es muy deseable el desarrollo de una segunda generación de vacunas SRRP, que se basen en adiciones específicas, supresiones, y otras modificaciones del genoma SRRP. Sin embargo, como los virus SRRP no disponen de ADN intermedios para su replicación, tales vacunas han tenido por tanto que esperar la construcción de clones del ADNc de longitud completa de los virus SRRP por manipulación mediante técnicas de biología molecular a nivel
- 40 del ADN. Muy recientemente, se ha informado de un clon infeccioso de ADNc de longitud completa del virus SRRP europeo (Meulenber, J.J.M. y col., 1998, mencionado anteriormente; Meulenber, J.J.M. y col., 1988, J. Virol. 72, 380-387.).

Las publicaciones precedentes, así como otras referencias tratadas a continuación en esta solicitud, se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Sumario de la Invención

El objeto de la invención proporciona una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN en el que dicha secuencia de ADN es al menos un 85% idéntica a la secuencia SEC ID N° 1.

- 55 El objeto de la invención proporciona además una molécula infecciosa de ARN aislada codificada por la molécula de polinucleótido aislada mencionada anteriormente, en la que la molécula infecciosa de ARN aislada codifica un virus SRRP norteamericano.

El objeto de la invención proporciona además la molécula de polinucleótido aislada mencionada anteriormente que codifica la molécula infecciosa de ARN en forma de un vector que es un plásmido.

El objeto de la invención proporciona además una célula huésped transfectada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN, en la que dicha secuencia de ADN es al menos un 85% idéntica a la secuencia SEC ID N° 1.

El objeto de la invención proporciona además una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus SRRP norteamericano que está modificado genéticamente de forma que carece de un epítipo antigénico detectable, en el que dicha secuencia de ADN es al menos un 85% idéntica a la secuencia SEC ID N° 1 pero careciendo de una o más secuencias de ADN que codifiquen un epítipo antigénico detectable.

El objeto de la invención además proporciona un plásmido capaz de transfectar directamente una célula huésped adecuada y expresar un virus de los *Nidovirales* a partir de la célula huésped transfectada de esta manera, en el que el plásmido comprende a) una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus de los *Nidovirales* teniendo dicha secuencia de ADN una secuencia con al menos el 85% de identidad secuencial con la secuencia SEC ID N° 1 y b) un promotor capaz de transcribir dicha molécula infecciosa de ARN en dicha célula huésped adecuada.

El objeto de la invención proporciona además un procedimiento para generar un virus de los *Nidovirales*, cuyo procedimiento comprende transfectar una célula huésped adecuada con un plásmido capaz de transfectar directamente una célula huésped adecuada y expresar un virus de los *Nidovirales* a partir de la célula huésped adecuada así transfectada, en el que el plásmido comprende a) una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus de los *Nidovirales* teniendo dicha secuencia de ADN una secuencia con al menos el 85% de identidad secuencial con la secuencia SEC ID N° 1 y b) un promotor capaz de transcribir dicha molécula infecciosa de ARN en dicha célula huésped adecuada.

Una vacuna para proteger un mamífero o un ave de la infección por virus de los *Nidovirales* que comprende un virus de los *Nidovirales* modificado genéticamente generado como se describió anteriormente en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunoprotectora eficaz contra virus de los *Nidovirales* tipo silvestre en un mamífero o un ave vacunados con la misma, y un vehículo aceptable para su uso farmacéutico o veterinario.

Breve descripción de las Figuras

FIGURA 1: Estrategia de clonación para una construcción de un clon de ADNc infeccioso de longitud completa del virus SRRP norteamericano, pT7P129A. Las puntas de flecha representan las secuencias de promotor T7.

FIGURA 2: Viremia sérica después de la infección con P129A o virus SRRP recombinante rP129A-1. Determinado por el ensayo en placa sobre células MARC-145. El límite más bajo de detección es 5 ufp/ml (o 0,7 en escala logarítmica).

FIGURA 3: Anticuerpo sérico contra el virus SRRP después de la infección con P129A o virus SRRP recombinante rP129A-1. Determinado por ensayo ELISA SRRP HerdChek (IDEXX (Westbrook, Maine, EEUU)).

Descripción detallada de la Invención

La producción y manipulación de las moléculas de polinucleótidos aisladas descritas en el presente documento se encuentran en la experiencia de la técnica y se pueden llevar a cabo de acuerdo con técnicas recombinantes descritas, entre otros sitios, en Maniatis, y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, y col., 1989, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Sambrook, y col., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Innis y col. (eds), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; y Erlich (ed), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, Nueva York, todos incluidos en el presente documento por referencia.

A. Moléculas de *polinucleótidos aisladas y moléculas ARN que codifican un virus SRRP norteamericano, y moléculas de polinucleótidos aisladas y moléculas ARN que codifican virus SRRP norteamericano modificados genéticamente.*

El objeto de la invención proporciona una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN en el que dicha secuencia de ADN es al menos un 85% idéntica a la secuencia SEC ID N° 1. Una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus SRRP norteamericano como se describe en el presente documento, en el que dicha secuencia de ADN es la secuencia que comienza con y que incluye del nucleótido 1 hasta el nucleótido 15.416 incluido de la SEC ID N° 1, puede incluir la excepción de que el nucleótido correspondiente al nucleótido 12.622 de la SEC ID N° 1 sea una guanina en vez de una adenina y el nucleótido correspondiente al nucleótido 1.559 de la SEC ID N° 1 sea una timina en vez de una citosina. Dicha secuencia de ADN codifica una molécula infecciosa de ARN que es el genoma ARN del aislado SRRP norteamericano P129.

Sea entendido que las expresiones en el presente documento que se refieren a moléculas de ácidos nucleicos tales como "molécula de polinucleótido aislada", "secuencia de nucleótidos", "fase de lectura abierta (ORF)", y similares, a menos de que se indique otra cosa, incluyen tanto moléculas de ADN como de ARN e incluyen moléculas tanto de una cadena simple como de doble cadena. También, cuando se hace referencia a una secuencia en particular de la sección "Listado de Secuencias" del objeto de la presente solicitud, se pretende, a menos de que se indique otra cosa, referirse tanto al ADN del "Listado de Secuencias", como al ARN correspondiente a la secuencia de ADN, y que incluye secuencias complementarias a las secuencias de ADN y ARN. En tales contextos, en la presente solicitud, "que corresponde a" se refiere a secuencias de ADN y ARN que son idénticas una con otra excepto por el hecho de que la molécula de ARN contiene uracilo en lugar de timina y la estructura de la molécula de ARN contiene ribosa en vez de desoxirribosa.

Por ejemplo, la SEC ID N° 1 es una secuencia de ADN que corresponde al genoma ARN del virus SRRP norteamericano. Por tanto, una secuencia ADN complementaria a la secuencia ADN expuesta en la SEC ID N° 1 es un molde para, es decir es complementaria a o "codifica", el genoma ARN del virus SRRP norteamericano (es decir, el ARN que codifica el virus SRRP norteamericano). Sin embargo, una referencia a la SEC ID N° 1 en el presente documento incluye tanto la secuencia de ARN correspondiente a la SEC ID N° 1 como una secuencia ADN complementaria a la SEC ID N° 1.

Además, cuando se hace referencia en el presente documento a secuencias homólogas a una secuencia del Listado de Secuencias, se entenderá que se incluyen las secuencias homólogas a una secuencia correspondiente a la secuencia del Listado de Secuencias y también las secuencias homólogas a una secuencia complementaria de la secuencia del Listado de Secuencias.

Una "molécula infecciosa de ARN", para los fines de la presente invención, es una molécula de ARN que codifica los elementos necesarios para la replicación vírica, la transcripción y la traducción que da lugar a un virión funcional en una célula huésped adecuada, provisto, si fuera necesario, de un péptido o péptidos que compensen algunas modificaciones genéticas, por ejemplo, supresiones de secuencia, en la molécula de ARN.

Una "molécula infecciosa de ARN aislada" se refiere a una composición material que comprende la molécula infecciosa de ARN mencionada anteriormente purificada hasta un grado detectable a partir de su estado natural, incluso si tal molécula de ARN no se produce en la naturaleza. De igual manera, una "molécula de polinucleótido aislada" se refiere a una composición material que comprende una molécula de polinucleótido de la presente invención purificada hasta un grado detectable a partir de su estado natural, si se da el caso.

La secuencia de nucleótidos de una segunda molécula de polinucleótido (sea ARN o ADN) es "homóloga" con la secuencia de nucleótidos de una primera molécula de polinucleótido cuando la secuencia de nucleótidos de la segunda molécula de polinucleótido codifica el mismo poliaminoácido que la secuencia de nucleótidos de la primera molécula de polinucleótidos basándose en la degeneración del código genético, o cuando codifica un poliaminoácido que es suficientemente similar al poliaminoácido codificado por la secuencia de nucleótidos de la primera molécula de nucleótidos de forma que sea útil en la práctica de la presente invención. Para los fines de la presente invención, una molécula de polinucleótidos es útil en la práctica de la presente invención cuando se puede utilizar como una sonda diagnóstica para detectar la presencia del virus SRRP norteamericano en una muestra de fluido o tejido de un cerdo infectado, por ejemplo, por hibridación de referencia o por técnicas de amplificación. Se entiende que el poliaminoácido codificado por la secuencia de nucleótidos de la molécula de polinucleótido puede comprender un grupo de dos o más poliaminoácidos. En general, la secuencia de nucleótidos de una segunda molécula de polinucleótido es homóloga con la secuencia de nucleótidos de una primera molécula de polinucleótido si tiene al menos un 85% de identidad en la secuencia de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos de la primera molécula de polinucleótido basándose en el algoritmo de BLAST (Centro Nacional de Información Biotecnológica, también conocido como NCBI, (Bethesda, Maryland, EEUU) del Instituto Nacional de Sanidad de Estados Unidos). Como el código genético se degenera, una secuencia de nucleótidos homóloga puede incluir cualquier cantidad de cambios "silentes" de bases, es decir, sustituciones de nucleótidos, que no obstante codifica el mismo aminoácido. Una secuencia de nucleótidos homóloga puede además contener mutaciones no silentes, es decir sustituciones, supresiones, o adiciones de bases que resulten en diferencias en los aminoácidos en el poliaminoácido que codifica, siempre y cuando sea al menos un 85% idéntica al poliaminoácido codificado por la primera secuencia de nucleótidos o que sea de alguna manera útil para la práctica de la presente invención. Las secuencias de nucleótidos homólogas se pueden determinar por comparación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo utilizando el BLASTN, mencionado anteriormente. De manera alternativa se pueden determinar las secuencias de nucleótidos homólogas por hibridación bajo condiciones seleccionadas. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de una segunda molécula de polinucleótido es homóloga a la SEC ID N° 1 si se hibrida con la complementaria de la SEC ID N° 1 bajo condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo, la hibridación con un ADN unido a un filtro en NaHPO₄ 0,5 M, con un 7% de dodecil sulfato sódico (SDS), EDTA 1 mM a 65 °C, y lavando en SSCx0,2/SDS al 0,1% a 42 °C (véase Ausubel y col., mencionado anteriormente), o en condiciones que resulten de alguna manera en la hibridación de secuencias que codifiquen un virus SRRP norteamericano como se define a continuación. En otra realización una segunda secuencia de nucleótidos es homóloga a la SEC ID N° 1 si se hibrida a la complementaria de la SEC ID N° 1 bajo condiciones altamente rigurosas, por ejemplo la hibridación con un ADN unido en un filtro en NaHPO₄ 0,5 M, con un 7% de dodecil sulfato sódico (SDS), EDTA 1 mM a 65 °C, y lavando en SSC x 0,1/SDS al 0,1% a 68 °C (véase Ausubel y col., mencionado anteriormente).

Además se entiende que las moléculas de polinucleótidos aisladas y las moléculas de ARN aisladas de la presente invención incluyen tanto las moléculas sintéticas como las moléculas que se obtienen por técnicas recombinantes, tales como clonación *in vitro* y transcripción.

Como se utiliza en el presente documento, el término “SRRP” engloba síntomas de enfermedad en los cerdos causados por la infección por el virus SRRP. Ejemplos de tales síntomas incluyen, pero sin limitarse a estos, aborto en hembras preñadas, y crecimiento lento, dificultades respiratorias, pérdida de apetito, y mortalidad en lechones. Como se utiliza en el presente documento, un virus SRRP que es “incapaz de producir SRRP” se refiere a un virus que puede infectar un cerdo, pero que no produce ningún síntoma de enfermedad asociado normalmente con una infección SRRP en el cerdo, o que produce tales síntomas, pero en un grado menor, o que produce un número menor de tales síntomas, o ambos.

Los términos “porcino” y “suino” se utilizan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a cualquier animal que sea miembro de la familia Suidae tales como por ejemplo, un cerdo. Entre los “mamíferos” se incluyen cualquier vertebrado de sangre caliente de la clase Mammalia, incluyendo los seres humanos.

El término “virus SRRP”, como se utiliza en el presente documento, a menos de que se indique otra cosa, significa cualquier cepa tanto del virus SRRP norteamericano como europeo.

La expresión “virus SRRP norteamericano” significa cualquier virus SRRP que tenga características genéticas asociadas con el virus SRRP norteamericano aislado, tales como, pero sin limitarse a estos, el virus SRRP que se aisló por primera vez en Estados Unidos en los primeros años 90 (véase, por ejemplo, Collins, J.E., y col., 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126); el virus SRRP norteamericano aislado MN-1b (Kwang, J. y col., 1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296); la cepa Quebec IAF-exp91 de SRRP (Mardassi, H. y col., 1995, Arch. Virol. 140:1405-1418); y el virus SRRP norteamericano aislado VR 2385 (Meng, X.-J y col., 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801). Las características genéticas se refieren a la similitud entre la secuencia de nucleótidos genómica y la similitud de la secuencia aminoacídica que comparten las cepas del virus SRRP norteamericano. Para los fines de la presente invención, un virus SRRP norteamericano es un virus que se codifica por una secuencia de ARN que es la misma u homóloga de la SEC ID N° 1, en la que el término “homólogo” es el que se definió anteriormente. Por tanto, las cepas de virus SRRP norteamericano, tienen al menos un 85% de identidad secuencial de nucleótidos genómicos con la SEC ID N° 1.

La expresión “virus SRRP europeo” se refiere a cualquier cepa del virus SRRP que tenga características asociadas con el virus SRRP que se aisló por primera vez en Europa sobre 1.991 (véase por ejemplo, Wensvoort, G., y col., 1991, Vet. Q. 13: 121-130). El “Virus SRRP europeo” también se denomina en la técnica como “virus Lelystad”.

A menos que se indique otra cosa, un virus SRRP norteamericano es “útil en la práctica de la presente invención” si sus características están en la definición de un virus SRRP norteamericano expuesto en el presente documento. Por ejemplo, un virus codificado por una de las moléculas de polinucleótidos aisladas de la presente invención es un “virus SRRP norteamericano útil en la práctica de la presente invención” si tiene, por ejemplo, características asociadas con un virus SRRP norteamericano.

Otros poliaminoácidos son “útiles en la práctica de la presente invención”, por ejemplo, péptidos codificados por secuencias de polinucleótidos homólogas de las ORF del virus SRRP norteamericano, si pueden compensar una molécula de ARN que codifica un virus SRRP modificado genéticamente, deficiente en un gen esencial para expresar viriones SRRP funcionales en una célula huésped transfectada, de forma que los viriones SRRP funcionales se puedan generar por la célula.

La expresión “fase de lectura abierta” u “ORF”, como se utiliza en el presente documento, significa la mínima secuencia de nucleótidos que se necesita para codificar una proteína del virus SRRP sin que intervenga un codón de terminación.

Las expresiones tales como “célula huésped adecuada” y “célula huésped apropiada”, a menos de que se indique otra cosa, se refiere a células en las que las moléculas de ARN (o las moléculas de polinucleótidos aisladas o los vectores víricos que comprenden secuencias de ADN que codifican tales moléculas de ARN) de la presente invención se pueden transformar o transfectar. Las “células huésped adecuadas” para la transfección con tales moléculas de ARN, moléculas de polinucleótidos aisladas, o vectores víricos, incluyen células mamíferas, particularmente porcinas, y células aviares, y se describen a continuación con mayor detalle.

Un “virión funcional” es una partícula vírica que es capaz de penetrar en una célula capaz de albergar un virus SRRP, y expresar genes de su genoma ARN particular (sea un genoma sin modificar o un genoma modificado genéticamente como se describe en el presente documento) en la célula. Las células capaces de albergar un virus SRRP incluyen las células macrófagos alveolares porcinas y las células renales de mono MARC 145. También pueden servir como células huésped adecuadas para los viriones SRRP, otras células de mamíferos o aviares, especialmente otras células porcinas.

Las moléculas de polinucleótidos aisladas de la presente invención codifican virus SRRP norteamericano que se pueden utilizar para preparar vacunas vivas, muertas o atenuadas utilizando procedimientos reconocidos en la

técnica para proteger los cerdos de la infección por el virus SRRP, como se describe con mayor detalle a continuación. Estas moléculas de polinucleótidos aisladas también son útiles como vectores para suministrar genes heterólogos a mamíferos, incluyendo los cerdos, o a aves, como también se describe en detalle a continuación. Además, estas moléculas de polinucleótidos aisladas son útiles porque pueden mutarse utilizando técnicas de biología molecular para codificar virus SRRP norteamericano modificados genéticamente que son útiles, entre otras, para las vacunas para proteger a los cerdos de la infección SRRP. Tales virus SRRP norteamericano modificados genéticamente, así como vacunas que los comprenden, también se describen con mayor detalle a continuación.

Un procedimiento para fabricar un virus SRRP norteamericano modificado genéticamente comprende la mutación de la secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica el virus SRRP norteamericano como se describió anteriormente, y la expresión del virus SRRP norteamericano modificado genéticamente utilizando un sistema de expresión adecuado. Un virus SRRP norteamericano, sea del tipo silvestre o modificado genéticamente, se puede expresar a partir de una molécula de polinucleótido aislada utilizando sistemas de expresión conocidos generalmente en la técnica, ejemplos de los cuales se describen en esta solicitud. Por ejemplo, la molécula de polinucleótido aislada puede estar en forma de un plásmido capaz de expresar *in vitro* el virus codificado en una célula huésped adecuada, como se describe en detalle a continuación.

La expresión “modificado genéticamente”, como se utiliza en el presente documento y a menos de que se indique otra cosa, significa mutado genéticamente, es decir que tiene uno o más nucleótidos sustituidos, suprimidos y/o añadidos. Las moléculas de polinucleótidos se pueden mutar genéticamente utilizando técnicas de recombinación conocidas por los expertos habituados en la técnica, incluyendo mutagénesis dirigida al sitio, o por mutagénesis aleatoria tal como por exposición a mutágenos químicos o radiación, como se conoce en la técnica. La modificación genética del virus SRRP norteamericano da como resultado el virus incapaz de replicarse eficazmente, o reduce su capacidad de replicarse eficazmente, en un ave o mamífero en el que el virus tipo silvestre podría en todo caso replicarse. De manera alternativa, el virus SRRP norteamericano genéticamente modificado sigue siendo capaz de replicarse eficazmente en aves o mamíferos infectados con el mismo. “Replicación eficaz” significa la capacidad para multiplicarse y producir virus descendientes (viriones) en un animal infectado, es decir la capacidad para “infectar productivamente” un animal.

Una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus SRRP norteamericano modificado genéticamente que es incapaz de producir el SRRP en un animal porcino, siendo la secuencia que codifica la molécula infecciosa de ARN que codifica dicho virus SRRP norteamericano la SEC ID N° 1, o una secuencia homóloga de la misma, puede contener una o más mutaciones que incapacitan genéticamente el virus SRRP codificado en su capacidad de producir el SRRP. “Incapacitado genéticamente” significa que el virus SRRP es incapaz de producir el SRRP en un animal porcino infectado por el mismo.

El virus SRRP norteamericano modificado genéticamente incapacitado en su capacidad de causar SRRP es capaz de provocar una respuesta inmunoprotectora eficaz contra la infección por un virus SRRP en un animal porcino. Por tanto, una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus SRRP norteamericano que está modificado genéticamente tal que cuando infecta un animal porcino: a) es incapaz de producir un SRRP en el animal, y b) es capaz de provocar una respuesta inmunoprotectora eficaz contra la infección por un virus SRRP en el animal, siendo la secuencia de ADN que codifica dicho virus SRRP norteamericano la SEC ID N° 1 o una secuencia homóloga de la misma, que contiene una o más mutaciones que incapacitan genéticamente el virus SRRP codificado en su capacidad para producir SRRP.

La expresión “respuesta inmune” como se utiliza en el presente documento significa la producción de anticuerpos y/o células (tales como los linfocitos T) que se dirigen contra, o ayudan a la descomposición o inhibición de, un epítipo antigénico particular o epítopos antigénicos particulares. Las frases “una respuesta inmunoprotectora eficaz”, “inmunoprotección” y expresiones similares, significan una respuesta inmune que se dirige contra uno o más epítopos antigénicos de un agente patógeno de forma que protejan contra la infección por el agente patógeno a un animal vacunado. La protección contra la infección por un agente patógeno incluye no solo la protección absoluta de la infección, sino también cualquier reducción detectable del grado o tasa de infección por un agente patógeno, o cualquier reducción detectable en la gravedad de la enfermedad o cualquier síntoma o afección resultante de la infección por un agente patógeno en el animal vacunado cuando se compara con un animal infectado no vacunado. Una respuesta inmunoprotectora eficaz puede inducirse en animales que no han sido infectados previamente por el agente patógeno y/o no están infectados por el agente patógeno en el momento de la vacunación.

Un “epítipo antigénico” es, a menos de que se indique otra cosa, una molécula capaz de provocar una respuesta inmune en un animal o una especie particular. Los epítopos antigénicos son moléculas proteínicas, es decir, secuencias poliaminoácídicas, opcionalmente comprenden grupos no proteicos tales como restos de carbohidratos y/o lípidos.

La expresión “que infecta patológicamente” utilizada en el presente documento se refiere a la capacidad de un agente patógeno para infectar un animal y producir una enfermedad en el animal. Como un ejemplo, un virus SRRP capaz de infectar patológicamente un animal porcino puesto que puede causar un SRRP en cerdos. Sin embargo, aunque un virus SRRP puede ser capaz de infectar, sea productiva o improproductivamente, un ave u otro mamífero, tal

como un ser humano, no infecta patológicamente cualquier otro animal que no sea un animal porcino puesto que no produce enfermedad en animales que no sean animales porcinos.

Los virus SRRP norteamericano genéticamente modificados codificados por las moléculas de polinucleótidos aisladas descritas anteriormente son capaces de provocar una respuesta inmunoprotectora eficaz contra la infección por un virus SRRP. Tales virus SRRP norteamericano modificados genéticamente preferentemente son capaces de provocar una respuesta inmunoprotectora eficaz contra cualquier cepa de virus SRRP, incluyendo cepas tanto europeas como norteamericanas.

La mutación o mutaciones en la molécula de polinucleótido aislada que codifica un virus SRRP norteamericano incapacitado genéticamente preferentemente no son silentes y se producen en una o más fases de lectura abierta de la secuencia de nucleótidos que codifican el virus SRRP norteamericano; es decir, la mutación o mutaciones se producen preferentemente en una o más de las secuencias en las que la secuencia de nucleótidos que codifica el virus SRRP norteamericano son la misma y homóloga a las ORF 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 de la SEC ID N° 1. La mutación o mutaciones se producen en una o más regiones no codificantes del genoma del virus SRRP norteamericano tales como, por ejemplo, en la secuencia directora del genoma del virus SRRP norteamericano; es decir, la mutación o mutaciones se producen en la secuencia que es la misma y homóloga a la secuencia de nucleótidos 1-191 de la SEC ID N° 1. En la misma molécula de polinucleótido aislada, se pueden producir mutaciones en las regiones tanto codificantes como no codificantes.

Como se utiliza en el presente documento, a menos de que se indique otra cosa, "regiones no codificantes" de la secuencia de nucleótidos que codifica el virus SRRP norteamericano se refiere a aquellas secuencias de ARN que no se traducen en una proteína y aquellas secuencias de ADNc que codifican tales secuencias de ARN. Las regiones codificantes se refieren a aquellas secuencias de ARN a partir de las que se expresan proteínas del virus SRRP norteamericano, y también se refiere al ADNc que codifica tales secuencias de ARN. De manera similar, "ORF" se refiere tanto a secuencias de ARN que codifican proteínas del virus SRRP norteamericano como a la secuencia de ADNc que codifica tales secuencias de ARN.

Se pueden determinar las localizaciones adecuadas para una mutación o mutaciones que codificarán un virus SRRP norteamericano incapacitado genéticamente de forma que sea incapaz de producir el SRRP mientras que se mantiene capaz de provocar una respuesta inmunoprotectora eficaz contra la infección por un virus SRRP basándose en la SEC ID N° 1 que se proporciona en el presente documento. Un experto habituado en la técnica puede remitirse a la secuencia del clon de ADNc infeccioso del virus SRRP norteamericano proporcionada por la presente invención, producir los cambios de la secuencia que darán lugar a una mutación, y ensayar los virus codificados de esta manera en cuanto a su capacidad para producir el SRRP en porcinos, como para provocar una respuesta inmunoprotectora eficaz contra el virus SRRP. Para hacer esto, un experto habituado puede remitirse a las técnicas conocidas en la técnica y también las descritas y/o ejemplificadas en el presente documento.

Por ejemplo, una ORF de la secuencia que codifica la molécula infecciosa de ARN que codifica el virus de SRRP norteamericano se puede mutar y ensayar la capacidad del virus SRRP norteamericano modificado genéticamente resultante para producir el SRRP. La ORF de un virus SRRP norteamericano codifica proteínas de la siguiente manera: La ORF 1 a codifica una poliproteína que comprende una función proteasa; la ORF 2b codifica una proteína que comprende funciones de replicasa (ARN polimerasa) y helicasa; las ORF 2, 3, y 4 codifican glucoproteínas de membrana pequeñas; la ORF 5 codifica una proteína de envoltura mayor; la ORF 6 codifica una proteína de membrana integral no glucosilada; y ORF 7 codifica una proteína de nucleocápside. Las mutaciones genéticas de una o más de estas ORF se pueden utilizar en la preparación de virus SRRP norteamericano modificados genéticamente que se describen a continuación.

Una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus SRRP norteamericano que se ha modificado genéticamente tal que comprenda uno o más epítopos antigénicos, en el que la secuencia de ADN que codifica la molécula de ARN que codifica el virus SRRP norteamericano es la SEC ID N° 1 o una secuencia homóloga de la misma, puede comprender además una o más secuencias de nucleótidos adicionales que codifiquen, cada una, un epítipo antigénico heterólogo, en el que cada epítipo antigénico heterólogo es capaz de inducir una respuesta inmunoprotectora eficaz contra un agente patógeno particular en un mamífero o un ave.

Un agente patógeno contra el que se puede inducir una respuesta inmunoprotectora eficaz es cualquier agente patógeno, tal como virus, bacterias, hongos, o protozoos, capaces de producir una enfermedad en un mamífero o un ave, en que el agente patógeno comprende o tiene asociado al mismo, uno o más epítopos antigénicos que se pueden utilizar para inducir una respuesta inmunoprotectora eficaz contra el agente patógeno en el mamífero o el ave.

La expresión "epítipo antigénico heterólogo" significa un epítipo antigénico, como se ha definido anteriormente, que no se encuentra normalmente en un virus SRRP norteamericano tipo silvestre. Una secuencia de nucleótidos que codifica un epítipo antigénico heterólogo se puede insertar en el genoma del virus SRRP norteamericano utilizando técnicas recombinantes conocidas. Los epítopos antigénicos útiles como epítopos antigénicos heterólogos incluyen epítopos antigénicos del virus SRRP norteamericano adicionales, epítopos antigénicos de virus de SRRP europeos,

epítomos antigénicos de agentes patógenos de los cerdos que no sean del virus SRRP, o epítomos antigénicos de agentes patógenos que infecten patológicamente las aves o los mamíferos distintos de los cerdos, incluyendo los de seres humanos. Las secuencias que codifican tales epítomos antigénicos se conocen en la técnica o se proporcionan en el presente documento. Por ejemplo, una segunda proteína de envoltura del virus SRRP norteamericano, codificada por la ORF 5 SRRP norteamericana descrita en el presente documento, se puede insertar en una secuencia de ADN que codifica una molécula de ARN que codifica un virus SRRP norteamericano de la presente invención para generar un virus del SRRP norteamericano modificado genéticamente que comprende una proteína de envoltura adicional como un epítomo antigénico heterólogo. Tal virus SRRP norteamericano modificado genéticamente se puede utilizar para inducir una respuesta inmunoprotectora más eficaz contra virus SRRP en un animal vacunado con el mismo.

Ejemplos de un epítomo antigénico de un agente patógeno del cerdo distinto del virus SRRP norteamericano incluyen, pero sin limitarse a estos, un epítomo antigénico de un agente patógeno del cerdo seleccionado de entre el grupo que consiste en el SRRP europeo, parvovirus porcino, circovirus porcino, rotavirus porcino, influenza porcina, virus de la pseudorrabia, virus de la gastroenteritis transmisible, coronavirus respiratorio porcino, virus de la fiebre porcina clásica, virus de la fiebre porcina africana, virus de la encefalomiocarditis, paramixovirus porcino, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Haemophilus parasuis*, *Leptospira spp.*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus equismitis*, y *Streptococcus suis*. Las secuencias de nucleótidos que codifican los epítomos antigénicos de los agentes patógenos del cerdo mencionados anteriormente se conocen en la técnica y se pueden obtener en bases de datos de genes públicas tales como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank/index.html>) proporcionado por NCBI.

Si los epítomos antigénicos heterólogos son epítomos de uno o más de otros agentes patógenos porcinos, entonces la molécula de polinucleótido aislada puede contener además una o más mutaciones que incapaciten genéticamente el virus SRRP codificado de la capacidad de producir el SRRP. Tales moléculas de polinucleótidos aisladas y los virus que codifican son útiles para preparar vacunas para proteger los cerdos contra el agente patógeno o agentes patógenos de los que se derivan los epítomos antigénicos heterólogos.

El SRRP norteamericano modificado genéticamente es capaz de provocar una respuesta inmunoprotectora eficaz contra la infección por virus SRRP en un animal porcino. Tales moléculas de polinucleótidos aisladas y los virus que codifican son útiles para preparar vacunas de doble función para proteger los cerdos contra la infección tanto por virus SRRP norteamericano como por el agente patógeno o agentes patógenos de los que se derivan los epítomos antigénicos heterólogos.

Las moléculas de polinucleótidos aisladas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican epítomos antigénicos heterólogos se pueden preparar como se ha descrito anteriormente basándose en la secuencia que codifica un virus SRRP descrita en el presente documento utilizando técnicas conocidas en biología molecular.

Un epítomo antigénico heterólogo del virus SRRP norteamericano modificado genéticamente preferentemente será un epítomo antigénico detectable. Tales moléculas de polinucleótidos aisladas y los virus SRRP norteamericano que codifican son útiles entre otros, para el estudio de las infecciones SRRP en cerdos, determinar los cerdos vacunados con éxito, y/o para distinguir los cerdos vacunados de los cerdos infectados por un virus SRRP tipo silvestre. Preferentemente, tales moléculas de polinucleótidos aisladas además contienen una o más mutaciones que incapacitan genéticamente el virus SRRP codificado en su capacidad para producir un SRRP, y más preferentemente son capaces de provocar una respuesta inmunoprotectora eficaz en un animal porcino contra la infección por virus SRRP.

Los epítomos antigénicos heterólogos que son detectables, y las secuencias que los codifican, se conocen en la técnica. Las técnicas para detectar tales epítomos antigénicos también se conocen en la técnica e incluyen la detección serológica de anticuerpos específicos contra el epítomo antigénico heterólogo por medios de, por ejemplo, transferencia de Western, ELISA, o anticuerpos marcados con fluorescencia capaces de unirse a los anticuerpos específicos del epítomo antigénico heterólogo. Las técnicas para la detección útiles en la práctica de la presente invención se pueden encontrar en los textos reconocidos de la técnica, tales como Coligan, J.E., y col. (eds), 1998, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., que se incluye en el presente documento por referencia en su totalidad. De manera alternativa, se puede detectar el mismo epítomo antigénico heterólogo, por ejemplo, poniendo en contacto las muestras que comprenden potencialmente el epítomo antigénico con anticuerpos marcados con fluorescencia o anticuerpos marcados con radioactividad que se unen específicamente a los epítomos antigénicos.

La presente invención proporciona además una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus SRRP norteamericano que carece de manera detectable del epítomo antigénico del virus SRRP norteamericano, o en otras palabras que carece de un epítomo antigénico detectable, en el que la secuencia de ADN es idéntica en al menos un 85% a la SEC ID N° 1 excepto en que carece de una o más secuencias de ADN que codifican un epítomo antigénico detectable. Tales moléculas de polinucleótidos aisladas son útiles para distinguir entre cerdos infectados con un virus SRRP

norteamericano recombinante de la presente invención y un cerdo infectado con un virus SRRP tipo silvestre. Por ejemplo, los animales vacunados con virus SRRP norteamericano muerto, vivo o atenuado codificado por tal molécula de polinucleótido aislada se pueden distinguir de los animales infectados con el SRRP tipo silvestre basándose en la ausencia de anticuerpos específicos del epítipo antigénico omitido, o basándose en la ausencia del epítipo antigénico mismo: si se detectan anticuerpos específicos para el epítipo antigénico omitido, o si el epítipo antigénico mismo, se detecta en el animal, entonces el animal se expuso y se infectó por un virus SRRP tipo silvestre. Los medios para detectar los epítipos antigénicos y los anticuerpos específicos de los mismos se conocen en la técnica, como se trató anteriormente. Preferentemente, tal molécula de polinucleótido aislada además contiene una o más mutaciones que incapacitan genéticamente los virus SRRP que codifica en su capacidad para producir el SRRP. Más preferentemente, el virus codificado se mantiene capaz de provocar una respuesta inmunológicamente eficaz contra la infección por un virus SRRP.

B. Plásmidos que codifican un virus SRRP norteamericano o un virus SRRP norteamericano modificado genéticamente:

La presente invención también proporciona cualquiera de las moléculas de polinucleótidos descritas anteriormente en forma de un plásmido capaz de expresar el virus SRRP norteamericano codificado de esta forma.

Los plásmidos de la presente invención pueden expresar el virus SRRP norteamericano codificado fuera de un organismo vivo, para producir virus SRRP norteamericano de la invención que sean útiles, entre otros, para preparar vacunas. Un plásmido capaz de expresar el virus SRRP norteamericano fuera de un organismo vivo es un plásmido en el que la transcripción del ARN vírico que deriva del mismo se produce *in vitro* (es decir, extracelularmente); la molécula de ARN vírico resultante se transfecta en una célula hospedadora adecuada utilizando los mecanismos de transfección conocidos, tales como la electroporación, lipofección (en algunos casos utilizando un reactivo disponible comercialmente, tales como la Lipofectin™ (Life Technologies Inc., Rockville, Maryland, EEUU), o transfección mediada por DEAE dextrano. Se conocen otros procedimientos de transfección en la técnica y se pueden emplear en la presente invención. Un ejemplo de tal plásmido para la transcripción *in vitro* del ARN vírico del SRRP norteamericano es el plásmido pT7P129A (Nº de registro ATCC 203488). Se puede utilizar cualquier promotor que sea útil para la transcripción *in vitro* en tales plásmidos de la presente invención. El T7 es uno de tales promotores, pero se pueden utilizar otros promotores, tales como un promotor SP6 o un promotor T3. Las secuencias de tales promotores se pueden sintetizar artificialmente o clonarse de los plásmidos disponibles comercialmente. Los plásmidos adecuados para preparar tales plásmidos capaces de expresar el virus SRRP norteamericano incluyen, pero sin limitarse a estos, plásmidos vectores de clonación para usos generales tales como pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), pBR322, y pUC18. Se puede insertar una secuencia de nucleótidos de la presente invención que codifica el virus SRRP norteamericano en cualquiera de estos plásmidos utilizando técnicas recombinantes conocidas. Otros plásmidos en los que se pueda insertar las moléculas de polinucleótidos de la presente invención se reconocerán por los expertos habituados en la técnica.

Las condiciones adecuadas para la transcripción *in vitro* del ARN vírico a partir de cualquiera de los plásmidos recombinantes descritos anteriormente que comprenden una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus SRRP norteamericano depende del tipo de plásmido, por ejemplo, su promotor particular, y puede determinarlas un experto habituado en la técnica. Por ejemplo, si un plásmido de la presente invención se basa en un plásmido pCR2.1 que comprende un promotor T7, entonces un ejemplo de condiciones adecuadas para la transcripción *in vitro* incluyen hacer reaccionar el plásmido con la ARN polimerasa T7 y ribonucleótidos en un tampón de referencia e incubar la reacción a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos. En algunos casos, hay kits comerciales disponibles para transcribir ARN a partir de un plásmido particular, y se pueden utilizar tales kits en la presente invención. La mezcla de reacción siguiente a la transcripción se puede transfectar directamente a una célula huésped adecuada sin purificación, o bien el ARN vírico del SRRP norteamericano transcrito se puede purificar por técnicas de purificación de ARN conocidas, por ejemplo por extracción orgánica (por ejemplo, fenol) y precipitación en alcohol (por ejemplo, etanol o isopropanol), antes de la transfección.

Se puede transfectar prácticamente cualquier cultivo celular mamífero o aviar con el ARN vírico del SRRP norteamericano obtenido como se ha descrito anteriormente con el fin de generar una primera ronda de viriones SRRP norteamericano. Un ejemplo de células que pueden ser particularmente útiles debido a su disponibilidad rápida y facilidad de uso son las células BHK (renales de hámster recién nacido). Sin embargo, si se quiere generar un cultivo celular capaz de una producción sostenida de viriones SRRP norteamericano, entonces se prefieren las células macrófagos alveolares porcinos o MARC-145 (Kim, H. S., y col, véase anteriormente) puesto que estas células excretan altos niveles de viriones SRRP de la nueva generación a continuación a la infección con el virus SRRP. Se pueden utilizar también otras líneas celulares derivadas de la línea celular MA-104 para generar de manera sostenida viriones SRRP norteamericano. Se pueden obtener células macrófagos alveolares porcinos primarias por lavados pulmonares de cerdos, y la línea celular de riñón de mono MAR-145 se puede obtener en los Laboratorios de los Servicios Veterinarios Nacionales conocidos como NVSL (Ames, Iowa, EEUU).

Un plásmido capaz de expresar un virus SRRP norteamericano fuera de un organismo vivo es un plásmido que se transfecta en una célula huésped adecuada, por ejemplo por electroporación o lipofección, y la transcripción de la molécula infecciosa de ARN y la expresión del virus SRRP norteamericano se produce en la célula huésped

transfectada. La célula huésped transfectada genera por tanto viriones SRRP norteamericano. Tal procedimiento completamente celular nunca ha sido desvelado o sugerido antes de ahora para ningún virus del orden de los *Nidovirales*. Debido a la posibilidad de corte y empalme críptico y a las secuencias de terminación presentes en el genoma ARN de los virus del orden de los *Nidovirales*, no se creía posible un procedimiento para expresar virus *Nidovirales* completamente celular. Las secuencias crípticas incluyen un donante de secuencias del corte y empalme y un receptor de secuencias de corte y empalme, lo que podría producir un corte y empalme inapropiado del ARN transcrito, así como la poliadenilación de las secuencias, con lo que se podría producir una terminación prematura por la ARN polimerasa II. La presente invención demuestra, sin embargo, que la presencia de tales secuencias en un plásmido que comprende un clon ADNc de un Nidovirus no impide la capacidad del plásmido para expresar el Nidovirus cuando el plásmido se transfecta directamente en una célula huésped adecuada.

En consecuencia, el objeto de la invención también proporciona plásmidos para la expresión de un virus de los *Nidovirales* a partir de una célula huésped adecuada en el que el plásmido comprende: a) una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica virus de los *Nidovirales* teniendo dicha secuencia de ADN una secuencia con al menos un 85% de identidad secuencial con la secuencia SEC ID N° 1 y b) un promotor capaz de transcribir dicha molécula infecciosa de ARN en dicha célula huésped adecuada. El procedimiento comprende transfectar una célula huésped adecuada con tal plásmido, someter la célula huésped a condiciones adecuadas para la expresión de las secuencias genéticas que se le han transfectado, y recolectar los virus de los *Nidovirales* expresados por la misma. Un ejemplo de un plásmido adecuado para la expresión completamente celular del virus SRRP norteamericano fuera de un organismo vivo es el plásmido pCMV-S-P129 (N° de registro ATCC 203489). Un promotor preferido para tal plásmido es un promotor CMV. Un plásmido adecuado para el procedimiento completamente celular de expresión de un virus de los *Nidovirales* comprende un promotor eucariótico, tal como un promotor CMV, inmediatamente corriente arriba y adyacente a la secuencia de nucleótidos que codifica el virus de los *Nidovirales*. Las secuencias de nucleótidos preferidas que codifican el virus de los *Nidovirales* codifican un virus SRRP, tanto europeo como norteamericano. Otros ejemplos de virus de los *Nidovirales* que se pueden expresar por los medios descritos anteriormente del procedimiento completamente celular incluyen otros *Arterivirus* tales como, el virus de la arteritis equina, virus de la elevación de la lactato deshidrogenasa, y virus de la fiebre hemorrágica de los simios; virus que son miembros del género *Coronaviridae*, tales como, pero sin limitarse a estos, virus de la peritonitis infecciosa felina, coronavirus entéricos felinos, coronavirus caninos, coronavirus bovinos, coronavirus respiratorios porcinos, coronavirus del pavo, virus de la gastroenteritis transmisible porcina, coronavirus humanos, virus de la hepatitis murina, y virus de la bronquitis infecciosa aviar; y miembros del género *Toroviridae*, tales como, pero no limitados a estos, virus Borna, virus Breda, y torovirus humanos. Por lo tanto, los plásmidos adecuados para la expresión completamente celular que comprenden una secuencia de nucleótidos de la presente invención que codifica uno de estos virus también se engloban en la presente invención.

Los plásmidos adecuados que pueden utilizarse para preparar plásmidos recombinantes de la presente invención para la expresión completamente celular fuera de un organismo vivo de un virus de los *Nidovirales*, tales como un virus SRRP, incluyen virtualmente cualquier plásmido que sea útil para la transfección y expresión en células eucariotas. Un ejemplo de un plásmido adecuado para preparar plásmidos recombinantes de la presente invención incluyen pero sin limitarse a estos, pcDNA3.1, pRc/RSV, y pZeoSV2 (todos ellos en Invitrogen); y pCMV-Sport3 y pSV-Sport1 (ambos de Life Technologies Inc.). Aunque funcionará prácticamente cualquier vector de expresión en eucariotas. Las construcciones basadas en cósmidos también se pueden utilizar para la expresión completamente celular ex vivo de un virus de los *Nidovirales*.

Las células huésped adecuadas para el procedimiento completamente celular de la presente invención para expresar virus SRRP incluyen células macrófagos alveolares porcinas y las células MARC-145, descritas anteriormente. Los procedimientos de transfección de estas células con un plásmido son básicamente las mismas que los de los procedimientos para transfectar células con ARN vírico descrito anteriormente. Tales procedimientos incluyen, pero sin limitarse a estos, electroporación, lipofección, transfección mediada por DEAE dextrano, y coprecipitación en fosfato cálcico.

Una vez que las células huésped, tales como las células macrófagos alveolares porcinas o las células MARC-145, se han transfectado de acuerdo con el objeto de la invención, sea con ARN vírico o con un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un virus, entonces las células se pueden congelar a aproximadamente -80 °C o menos para su almacenamiento durante varios años. Para periodos más largos de tiempo, es decir, décadas, se prefiere el almacenamiento en nitrógeno líquido. Es relativamente frecuente que se planee el uso del virus codificado, entonces las células que albergan el virus se pueden mantener también (sin congelar) en un cultivo utilizando técnicas conocidas, para periodos de tiempo más cortos. La transfección de tales líneas celulares con la molécula de polinucleótido que codifica el virus se puede confirmar si se desea, por ejemplo, ensayando el antígeno vírico SRRP en el medio consumido excretado por la línea celular utilizando un ensayo de anticuerpo inmunofluorescente. Los anticuerpos específicos para los antígenos del virus SRRP se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Collins, E.J., y col., documento WO 93/03760 de 4 de marzo, 1993).

Un plásmido de la presente invención que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un virus SRRP norteamericano es adecuado para la expresión in vivo del virus SRRP norteamericano, es decir, la expresión en un organismo vivo. Los plásmidos que se pueden utilizar para preparar plásmidos recombinantes para la expresión in vivo de un virus SRRP norteamericano incluyen, pero sin limitarse a estos, plásmidos capaces de transfectar células

eucariotas descritos anteriormente, tal como pCMVbeta.

Los animales que se pueden transfectar con los plásmidos de la presente invención incluyen mamíferos y aves. Si el animal es distinto de un animal porcino, por ejemplo, un ánade real, el plásmido entonces puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un virus SRRP norteamericano que comprenda además epítopos de patógenos que son capaces de infectar patogénicamente al animal; en tal caso, el plásmido codificará un virus SRRP norteamericano que sirva como vector para transportar epítopos en el animal. Si el animal es un animal porcino, entonces el plásmido se puede utilizar para codificar cualquiera de los virus SRRP norteamericano descritos en el presente documento, incluyendo los virus SRRP norteamericano genéticamente modificados descritos en el presente documento.

C. Vectores víricos que codifican un virus SRRP norteamericano, incluyendo vectores víricos que codifican virus SRRP norteamericano modificados genéticamente:

Se describen en el presente documento los vectores víricos que comprenden una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica cualquiera de los virus SRRP norteamericano, incluyendo los virus SRRP norteamericano modificados genéticamente descritos en el presente documento. Tales vectores víricos son útiles para transfectar células eucariotas para la producción de virus SRRP fuera de un organismo vivo, o para transfectar cerdos, u otros mamíferos, o aves, con la secuencia que codifica el virus SRRP norteamericano, para la expresión in vivo del virus SRRP norteamericano en ellos.

Algunos ejemplos de virus que se pueden utilizar como vectores para preparar los vectores víricos incluyen, pero sin limitarse a estos, virus porcinos tales como, pero sin limitación, virus de la viruela porcina, virus de pseudorrabia, o virus de la fiebre porcina africana. Tales virus porcinos se pueden obtener en los Laboratorios de los Servicios Veterinarios Nacionales (Ames, Iowa, EEUU) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos; La Colección de Cultivos Tipo Americana, conocida de otra manera como ATCC (Manassas, Virginia, EEUU); y otras fuentes conocidas. Los vectores víricos recombinantes basados en virus porcinos adecuados tales como los virus porcinos mencionados anteriormente son útiles para transfectar animales porcinos con una secuencia de nucleótidos que codifica un virus SRRP norteamericano de la presente invención.

Los vectores víricos que comprenden una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus SRRP norteamericano basado en estos y otros virus como se describe en el presente documento se pueden preparar utilizando técnicas recombinantes conocidas descritas en textos tales como los citados previamente en esta solicitud.

D. Células huésped transfectadas que codifican virus SRRP norteamericano modificados genéticamente:

La presente invención también proporciona células huésped transfectadas que comprenden una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que es al menos un 85% idéntica a la secuencia SEC ID N° 1. Estas células huésped transfectadas son capaces de expresar el virus SRRP norteamericano. Tales células huésped transfectadas son útiles para producir virus SRRP norteamericano de la presente invención. Ejemplos de células transfectadas de la presente invención incluyen las células macrófago alveolares porcinas transfectadas y las células MARC-145 transfectadas descritas anteriormente.

Otras células huésped transfectadas de la invención incluyen, pero sin limitarse a estas, células MA-104 y otras derivadas de células MA-104 que se transfectan; células transfectadas de riñón de hámster recién nacido (BHK); células transfectadas de Ovario de Hámster Chino (CHO); y células de riñón de mono verde africano distintas de células MA-104 o MARC-145, tales como las células VERO; que son transfectadas.

E. Virus SRRP norteamericano, incluyendo los virus SRRP norteamericano modificados genéticamente:

Los virus SRRP norteamericano descritos en el presente documento, incluyendo los virus SRRP norteamericano modificados genéticamente como se describe en el presente documento, se expresan y/o codifican por cualquiera de las moléculas de polinucleótidos aisladas descritas anteriormente, moléculas de ARN, plásmidos, vectores víricos, o células huésped transfectadas.

En ciertas situaciones, por ejemplo cuando el virus SRRP norteamericano se va a utilizar en una vacuna para cerdos y el virus SRRP norteamericano no se ha modificado genéticamente como se describió anteriormente para que sea incapaz de producir el SRRP, es deseable tratar el virus SRRP norteamericano, por ejemplo inactivándolo o atenuándolo, de forma que sea incapaz de producir el SRRP en el animal porcino al que se le administre. Se pueden utilizar los procedimientos conocidos para inactivar un virus SRRP norteamericano de forma que sea incapaz de producir el SRRP en un animal. Ejemplos de tales procedimientos incluyen, pero sin limitarse a estos, el tratamiento con formaldehído, BEI (etilenimina binaria), o BPL (beta-propiolactona). Los procedimientos de atenuación también se conocen en la técnica, y tales procedimientos se pueden utilizar para atenuar un virus SRRP norteamericano de la presente invención. Un virus SRRP norteamericano se puede atenuar, por ejemplo, por pasaje seriado en un cultivo celular.

Si un virus SRRP norteamericano es para su uso en un animal distinto de un animal porcino, o si ha sido modificado

genéticamente como se describe en el presente documento de forma que sea incapaz de producir el SRRP en un animal porcino, entonces no es necesario tratar el virus como se describe en el párrafo anterior antes de utilizarlo en una vacuna.

F. Vacunas y Usos de las mismas:

- 5 Las vacunas pueden comprender virus SRRP norteamericano, incluyendo virus SRRP norteamericano modificados genéticamente incapaces en su capacidad para producir el SRRP en un animal porcino como se describe en el presente documento; moléculas infecciosas de ARN y plásmidos que codifican tales virus SRRP norteamericano como se describe en el presente documento; y vectores víricos que codifican tales virus SRRP norteamericano y moléculas de ARN aisladas descritas en el presente documento.
- 10 Una vacuna puede comprender un virus SRRP norteamericano modificado genéticamente que comprenda uno o más epítomos antigénicos heterólogos como se describe en el presente documento, una molécula infecciosa de ARN que codifique tal virus SRRP norteamericano modificado genéticamente, o un plásmido como se describe en el presente documento que codifique tal virus SRRP norteamericano modificado genéticamente, en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunoprotectora contra la infección por el agente patógeno o agentes patógenos a partir de los cuales se derivó el epítomo(s) antigénico heterólogo, y un vehículo aceptable para su uso farmacéutico o veterinario.

Tales vacunas se pueden utilizar para proteger de la infección a un mamífero o un ave que tenga la posibilidad de ser infectado patológicamente por el agente patógeno o agentes patógenos de los que se deriva el epítomo(s) antigénico heterólogo. Un procedimiento para proteger un mamífero o un ave de la infección por un agente patógeno que comprende la vacunación del mamífero o ave con una cantidad de vacuna descrita en el párrafo anterior efectiva para provocar una respuesta inmunoprotectora en el mamífero o ave de la infección por el agente patógeno.

La vacuna comprende un virus SRRP norteamericano modificado genéticamente, o una molécula infecciosa de ARN o un plásmido que codifica tal virus SRRP norteamericano modificado genéticamente, que comprende o codifica uno o más epítomos antigénicos heterólogos a partir de un agente patógeno porcino distinto del virus SRRP norteamericano. Estas vacunas son útiles para proteger los cerdos de la infección del agente patógeno o agentes patógenos de los que se derivan los epítomos antigénicos heterólogos. Si tal vacuna comprende el virus SRRP norteamericano modificado genéticamente, la modificación genética del virus SRRP norteamericano producirá preferentemente el virus incapaz de causar el SRRP en cerdos. El virus SRRP norteamericano modificado genéticamente en la vacuna, es preferentemente capaz de provocar una respuesta inmunoprotectora contra la infección por un virus SRRP, proporcionando de esta manera una vacuna doble para cerdos, que protege los cerdos de la infección por el agente patógeno o agentes patógenos del cerdo a partir de los que se deriva el epítomo(s) antigénico heterólogo así como de la infección por un virus SRRP. Si la vacuna comprende una molécula infecciosa de ARN o un plásmido que codifique un virus SRRP norteamericano modificado genéticamente que comprende uno o más epítomos antigénicos heterólogos de otro agente patógeno del cerdo, la secuencia que codifica entonces la molécula infecciosa de ARN que codifica el virus SRRP modificado genéticamente comprende preferentemente además una o más mutaciones que incapaciten genéticamente al virus SRRP norteamericano de forma que sea incapaz de producir el SRRP. El virus SRRP norteamericano que se ha modificado genéticamente para incapacitarlo preferentemente es capaz de provocar una respuesta inmunoprotectora contra la infección de SRRP en un animal porcino, proporcionando de esta manera una vacuna doble para cerdos, capaz de proteger los cerdos de la infección por un agente o agentes patógenos a partir de los cuales se haya derivado el epítomo antigénico heterólogo así como de la infección por un virus SRRP. Todas estas vacunas también comprenden un vehículo aceptable para su uso veterinario.

Las vacunas se pueden formular siguiendo la convención aceptada para incluir vehículos aceptables para animales, incluyendo los seres humanos (en el caso de que sea aplicable), tales como tampones, estabilizadores, diluyentes, conservantes, y/o solubilizantes de referencia, y también pueden formularse para facilitar la liberación sostenida. Los diluyentes incluyen el agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los aditivos para la isotonicidad incluyen cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina, entre otros. Otros vehículos y aditivos adecuados para vacunas, incluyendo aquellos que son particularmente útiles en la formulación de vacunas vivas modificadas, se conocen o serán aparentes para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 18ª ed., 1990, Mack Publishing, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Las vacunas además pueden comprender uno o más componentes inmunomoduladores adicionales tales como, por ejemplo, un adyuvante o citoquina, entre otros. Ejemplos no limitantes de adyuvantes que se pueden utilizar en la vacuna de la presente invención incluyen el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc., Hamilton, MT), alumbre, geles minerales tales como el gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, adyuvantes de Freund completo e incompleto, copolímero bloqueante (CytRx, Atlanta GA), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A u otra fracción saponina, monofosforil lípido A, y adyuvante aminolípido Avridina. Ejemplos sin limitación de emulsiones de aceite en agua útiles en la vacuna de la invención incluyen las formulaciones modificadas SEAM62 y SEAM1/2. El SEAM62 modificado es una emulsión de aceite en agua que contiene un 5%

(v/v) de escualeno (Sigma), un 1% de detergente SPAN® 85 (ICI Surfactants), un 2,5% (v/v) de etanol, 200 [micro]g/ml de Quil A, 100 [micro]g/ml de colesterol y un 0,5% (v/v) de lecitina. El SEAM 1/2 es una emulsión de aceite en agua que comprende un 5% (v/v) de escualeno, un 1 % (v/v) de detergente SPAN® 85, un 0,7% (v/v) de detergente Tween 80, un 2,5% (v/v) de etanol, 100 [micro]g/ml de Quil A, y 50 [micro]g/ml de colesterol. Se pueden incluir otros agentes inmunomoduladores en la vacuna que incluyen por ejemplo, una o más interleucinas, interferones, u otras citoquinas conocidas.

Las vacunas se pueden formular opcionalmente para liberar sostenidamente el virus, la molécula infecciosa de ARN, el plásmido, o el vector vírico de la presente invención. Ejemplos de tales formulaciones de liberación sostenida incluyen virus, moléculas infecciosas de ARN, plásmidos o vectores víricos en combinación con compuestos o polímeros biocompatibles, tales como, por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co- glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno y similares. La estructura, selección y uso de los polímeros degradables en los vehículos suministradores de fármacos se han revisado en varias publicaciones, incluyendo A. Domb y col., 1992, Polymers for Advanced Technologies 3: 279-292, que se incorpora en el presente documento por referencia. Una guía adicional para la selección y utilización de polímeros en formulaciones farmacéuticas se pueden encontrar en textos conocidos en la técnica, por ejemplo M. Chasin and R. Langer (eds), 1990, "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems" in: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol. 45, M. Dekker, NY, que también se incorpora en el presente documento por referencia. De manera alternativa, o adicionalmente, el virus, plásmido o vector vírico se puede microencapsular para mejorar su administración y eficacia. Los procedimientos para microencapsular antígenos se conocen bien en la técnica, e incluyen las técnicas descritas por ejemplo en Patente de Estados Unidos 3.137.631; Patente de Estados Unidos 3.959.457; Patente de Estados Unidos 4.205.060; Patente de Estados Unidos 4.606.940; Patente de Estados Unidos 4.744.933; Patente de Estados Unidos 5.132.117; y Publicación de Patente International WO 95/28227, todas ellas incorporadas en el presente documento por referencia.

Los liposomas también se pueden utilizar para proporcionar una liberación sostenida del virus, plásmido o vector vírico. Los detalles concernientes a cómo hacer y utilizar formulaciones de liposomas se pueden encontrar, entre otros lugares en Patente de Estados Unidos 4.016.100; Patente de Estados Unidos 4.452.747; Patente de Estados Unidos 4.921.706; Patente de Estados Unidos 4.927.637; Patente de Estados Unidos 4.944.948; Patente de Estados Unidos 5.008.050; y Patente de Estados Unidos 5.009.956, todas ellas incorporadas en el presente documento por referencia.

Una cantidad eficaz de cualquiera de las vacunas descritas anteriormente se puede determinar por medios convencionales, empezando con una dosis baja del virus, plásmido o vector vírico, y luego incrementando la dosificación mientras se controlan los efectos. Una cantidad eficaz se puede obtener tras la única administración de una vacuna o tras múltiples administraciones de una vacuna. Hay factores conocidos que se pueden tomar en consideración cuando se determina una dosis óptima por animal. Estos incluyen la especie, el tamaño, la edad y el estado general del animal, la presencia de otros fármacos en el animal y similares. La dosificación a administrar se elige preferentemente tras la consideración de los resultados en otros estudios con animales.

Un procedimiento para detectar si se ha conseguido una respuesta inmune adecuada es determinando la seroconversión y el título de anticuerpos en el animal tras la vacunación. El tiempo de vacunación y el número de refuerzos, si se dan, se determinará preferentemente por un doctor o veterinario basándose en los análisis de todos los factores relevantes, algunos de los cuales se han descrito anteriormente.

La cantidad eficaz de dosis de virus, molécula infecciosa de ARN, plásmido, o vector vírico, de la presente invención se puede determinar utilizando técnicas conocidas, tomando en cuenta factores que se pueden determinar por un experto habituado en la técnica tales como el peso del animal a vacunarse. La cantidad de dosis de virus de la presente invención en una vacuna de la presente invención varía preferentemente desde aproximadamente 10^1 a aproximadamente 10^9 ufp (unidades formadoras de placa), más preferentemente de aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^8 ufp, y más preferentemente de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^7 ufp. La cantidad de dosis de un plásmido de la presente invención en una vacuna de la presente invención varía preferentemente de aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 100 mg, más preferentemente de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 10 mg, incluso más preferentemente de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 1 mg. La cantidad de dosis de una molécula infecciosa de ARN de la presente invención en una vacuna de la presente invención varía preferentemente de aproximadamente de 0,1 μ g a aproximadamente 100 mg, más preferentemente de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 10 mg, incluso más preferentemente de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 1 mg. La cantidad de dosis de un vector vírico de la presente invención en una vacuna de la presente invención varía preferentemente de aproximadamente 10^1 a aproximadamente 10^9 ufp (unidades formadoras de placa), más preferentemente de aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^8 ufp, e incluso más preferentemente de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^7 ufp. Una cantidad de dosificación adecuada varía de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 10 ml, y más preferentemente de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 5 ml.

Un procedimiento para preparar una vacuna que comprende un virus SRRP norteamericano, una molécula infecciosa de ARN, un plásmido o un vector vírico descritos en el presente documento, comprende la combinación de una cantidad eficaz de uno de entre virus SRRP norteamericano, molécula infecciosa de ARN, plásmido, o vector vírico de la presente invención, con un vehículo aceptable para uso farmacéutico o veterinario.

Se entiende que la expresión “virus SRRP norteamericano de la presente invención” y expresiones similares, a menos de que se indique otra cosa, incluye cualquiera de los virus SRRP norteamericano modificados genéticamente descritos en el presente documento así como el virus SRRP norteamericano sin modificar descrito en el presente documento codificado por la SEC ID N° 1 o una secuencia homóloga de la misma.

- 5 *G. Moléculas de polinucleótidos aisladas y Células huésped transfectadas que codifican péptidos del virus SRRP norteamericano, y procedimientos para producir viriones del SRRP norteamericano funcionales:*

La presente invención proporciona una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN en la que dicha secuencia de ADN es al menos un 85% idéntica a la secuencia SEC ID N° 1. Como se utilizan en el presente documento, expresiones tales como “péptido del virus SRRP norteamericano” significan un péptido que se expresa por el virus SRRP norteamericano. Tal péptido puede ser, pero no necesariamente, específico de los virus SRRP norteamericano.

- 15 Una molécula de polinucleótido aislada de la presente invención codifica un péptido del virus SRRP norteamericano. Tales moléculas de polinucleótidos aisladas son útiles en plásmidos o para preparar vectores víricos para transfectar una célula huésped adecuada para crear una célula “auxiliar” que comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un péptido codificado por un virus SRRP norteamericano, en el que la secuencia genómica de dicho virus SRRP norteamericano es el mismo u homólogo de una secuencia de ARN que corresponde a la SEC ID N° 1, cuya célula auxiliar es útil en la preparación de viriones funcionales de los virus SRRP modificados genéticamente, cuyos virus se han modificado genéticamente como se ha descrito anteriormente de forma que ha desaparecido de su genoma ARN la secuencia(s) que codifica el péptido o péptidos codificados por la célula auxiliar.

- 20 Los plásmidos y vectores víricos pueden comprender una o más secuencias de nucleótidos que codifiquen un péptido codificado por un virus SRRP norteamericano, en el que la secuencia de dicho virus SRRP norteamericano es la misma u homóloga de una secuencia de ARN correspondiente a la SEC ID N° 1. Tales plásmidos se pueden basar en los plásmidos descritos anteriormente útiles para la preparación de plásmidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican un virus SRRP norteamericano. Tales vectores víricos se pueden basar por ejemplo, en vectores retrovirus o vectores víricos adenoasociados. Estos plásmidos y los vectores víricos son útiles para preparar las células auxiliares que se han descrito en el párrafo anterior.

- 25 Una célula auxiliar, es decir, una célula huésped transfectada comprende una o más secuencias que codifican un péptido codificado por un virus SRRP norteamericano, en el que la secuencia genómica de dicho virus SRRP norteamericano es la misma u homóloga de una secuencia de ARN correspondiente con la SEC ID N° 1. Estas células auxiliares son útiles como se describió anteriormente para proporcionar péptidos que completen las moléculas infecciosas de ARN deficientes en secuencias que codifiquen el péptido(s) codificado por la célula auxiliar de forma que se puedan generar viriones funcionales de un virus SRRP norteamericano modificado genéticamente por la célula.

- 30 Las células adecuadas para la transfección incluyen las células descritas anteriormente que son adecuadas para expresar virus SRRP norteamericano, tales como las células macrófagos alveolares porcinos y las células MARC-145. Sin embargo, se puede utilizar prácticamente cualquier célula mamífera o aviar. Como se ha tratado anteriormente, si se desea obtener una célula huésped transfectada capaz de reinfección por viriones del SRRP, y que sea por tanto capaz de generar múltiples generaciones de viriones del SRRP norteamericano modificados genéticamente, se prefieren las células macrófagos alveolares porcinos y las células MARC-145.

- 35 Un procedimiento para generar un virión funcional de un virus SRRP norteamericano modificado genéticamente codificado por una secuencia de ARN correspondiente a la SEC ID N° 1 o una secuencia homóloga de la misma que comprende una o más mutaciones que incapacitan una o más secuencias codificantes de péptidos, comprende la transfección de una célula auxiliar como se ha descrito en el párrafo anterior con una molécula infecciosa de ARN, plásmido o vector vírico que codifican el virus SRRP norteamericano, en el que la célula auxiliar comprende una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican el péptido o péptidos de la secuencia(s) codificante de péptidos incapacitada del virus SRRP norteamericano modificado genéticamente.

- 40 Un procedimiento para generar un virión funcional de un virus SRRP norteamericano modificado genéticamente codificado por una secuencia ARN correspondiente a la SEC ID N° 1 o una secuencia homóloga de la misma que comprende una o más mutaciones en una o más de las secuencias codificadoras de péptidos, comprende la transfección de una célula adecuada con una molécula infecciosa de ARN, plásmido o vector vírico que codifican el virus SRRP norteamericano modificado genéticamente y con un virus auxiliar que expresa en la célula el péptido o péptidos del virus SRRP norteamericano de la secuencia o secuencias codificantes de péptidos mutadas del virus SRRP norteamericano modificado, y la separación genética los viriones del SRRP norteamericano del virus auxiliar. Los procedimientos de separación se conocen en la técnica e incluyen el uso de virus auxiliares letales condicionales que distinguen (matan) el virus auxiliar bajo ciertas condiciones mientras que el virus SRRP norteamericano expresado no es destruido. Otros procedimientos conocidos de separación incluyen los procedimientos físicos de separación después de la expresión de ambos viriones, auxiliares y del SRRP norteamericano, por ejemplo por centrifugación de gradiente de densidad. Las células adecuadas para este procedimiento de la invención incluyen las células capaces de infectarse por un virus SRRP, tales como las células

macrófagos alveolares porcinos y las células MARC-145. Otras células que tienen la posibilidad de infectarse con un virus SRRP se describieron previamente en esta solicitud, por ejemplo la línea celular MA-104 u otras líneas celulares derivadas de la línea celular MA-104. Un ejemplo de un virus auxiliar es un virus SRRP, preferentemente un virus SRRP norteamericano aislado, tal como el P129. Cualquier virus, incluso el tipo silvestre, aislado, o recombinante, que exprese péptidos SRRP se puede utilizar como un virus auxiliar.

Las moléculas infecciosas de ARN, los plásmidos, y los vectores víricos que codifican un virus del PRRS norteamericano modificado genéticamente útil en cualquiera de los procedimientos anteriores para generar un virión funcional de un virus SRRP norteamericano genéticamente modificado son aquellas moléculas infecciosas de ARN, plásmidos y vectores víricos descritos en la presente invención.

H. Virus *Nidovirales* inmunoprotectores modificados genéticamente y Vacunas que los comprenden:

Un virus de los *Nidovirales* modificado genéticamente que es capaz de provocar una respuesta inmunoprotectora en un mamífero o un ave vacunado con el mismo, se prepara obteniendo una molécula de polinucleótidos aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus de los *Nidovirales* de tipo silvestre, mutando genéticamente la secuencia de ADN que codifica la molécula infecciosa de ARN que codifica el virus de los *Nidovirales* tipo silvestre de forma que se obtenga una molécula de polinucleótido aislada que comprenda una secuencia de ADN que codifique una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus de los *Nidovirales* modificado genéticamente, en el que el virus es capaz de provocar una respuesta inmunoprotectora eficaz contra la infección por el virus de los *Nidovirales* tipo silvestre en un mamífero o un ave, y que expresa el virus de los *Nidovirales* modificado genéticamente a partir de la molécula de polinucleótido aislada así obtenida.

El objeto de la invención proporciona además un procedimiento para generar un virus de los *Nidovirales*, en el que el procedimiento comprende la transfección de una célula huésped adecuada con un plásmido capaz de transfectar directamente una célula huésped adecuada y expresar el virus de los *Nidovirales* a partir de la célula huésped adecuada transfectada de esa manera, dicho plásmido comprende a) una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica el virus de los *Nidovirales* teniendo dicha secuencia de ADN una secuencia con al menos un 85% de identidad secuencial con la secuencia SEC ID N° 1 y b) un promotor capaz de transcribir dichas moléculas infecciosas de ARN en dicha célula huésped adecuada.

Las secuencias de ADN que codifican la molécula infecciosa de ARN que codifica virus *Nidovirales* incluyen secuencias de ADN que son la misma u homólogas de la SEC ID N° 1 descrita en el presente documento, que codifica el virus SRRP norteamericano. Las secuencias de ADN que codifican las moléculas infecciosas de ARN que codifican virus de los *Nidovirales* distinto del virus SRRP norteamericano se conocen en la técnica y se pueden obtener en las fuentes conocidas, por ejemplo, las bases de datos genéticas citadas anteriormente. Otros ejemplos de algunas secuencias de ADN que codifican moléculas infecciosas de ARN que codifican virus *Nidovirales* que se pueden utilizar en el objeto de la invención incluyen la secuencia de ADN que codifica el virus SRRP europeo descrito en Meulenbergh, J.J.M., y col., 1993, mencionado anteriormente; la secuencia de ADN que codifica el virus de la arteritis equina descrita en van Dinten, L.D., y col., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(3):991-6; y la secuencia de ADN que codifica el virus de la arteritis equina descrita en den Boon, J.A., y col., 1991, J. Virol. 65(6):2910-20, todas ellas incorporadas por referencia en su totalidad en la presente solicitud. Los virus de los *Nidovirales* que se pueden modificar genéticamente por medio de la presente invención puede ser cualquier virus de los *Nidovirales* para el que se obtenga una secuencia de ADN codificante. Algunos ejemplos de virus de los *Nidovirales* se describen en secciones anteriores de la presente solicitud.

Una vez que se obtiene una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus de los *Nidovirales*, las moléculas de polinucleótidos aisladas, por ejemplo, plásmidos, que comprenden la secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus de los *Nidovirales* puede sintetizarse utilizando las técnicas recombinantes descritas anteriormente.

Las secuencias que codifican la molécula infecciosa de ARN que codifica el virus de los *Nidovirales* puede mutarse genéticamente como se describió anteriormente para el virus SRRP norteamericano de forma que se obtengan virus de los *Nidovirales* que comprendan modificaciones genéticas tales como una incapacidad para producir enfermedad en un animal infectado por el mismo, la inclusión de epítopos antigénicos heterólogos que sean capaces de provocar una respuesta inmunoprotectora en un animal, la inclusión de epítopos antigénicos heterólogos que sean detectables y la supresión de epítopos antigénicos detectables. Tales modificaciones genéticas se describen anteriormente. Las mutaciones genéticas para que se codifiquen virus de los *Nidovirales* modificados genéticamente se pueden producir en regiones codificantes y/o no codificantes de la secuencia de ADN que codifica la molécula infecciosa de ARN que codifica el virus de los *Nidovirales*. Pueden producirse una o más mutaciones genéticas en una ORF que codifica un péptido vírico el virus de los *Nidovirales*.

"Virus de los *Nidovirales* tipo silvestre", como se utiliza en el presente documento, significa un virus de los *Nidovirales* cuyo genoma no se ha mutado genéticamente de manera intencionada; tal como un virus de los *Nidovirales* que está en la naturaleza y los aislados del mismo.

Una vacuna para proteger un mamífero o un ave de la infección por un virus de los *Nidovirales* comprende un virus de los *Nidovirales* modificado genéticamente generado como se ha descrito anteriormente en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunoprotectora eficaz contra el virus de los *Nidovirales* tipo silvestre en un mamífero o un ave vacunados con la misma, y un vehículo aceptable para su uso farmacéutico o veterinario. Estas vacunas se pueden formular utilizando las técnicas de formulación de vacunas descritas anteriormente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan simplemente para ilustrar aspectos del objeto de la invención. No pretenden y no deberían interpretarse como que limitan la invención expuesta en las reivindicaciones y descrita más completamente en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo I. Preparación de un clon infeccioso de ADNc de un virus SRRP norteamericano aislado.

Fuente de virus SRRP y células MARC-145: un virus SRRP norteamericano aislado designado como P129 se obtuvo de los Dres. Gregory W. Stevenson, William G. Van Alstine, y Charles L. Kanitz del Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades Animales de la Universidad de Purdue en West Lafayette, Indiana. El virus P129 se aisló por primera vez el otoño de 1995 de una piara de cerdos del sur de Indiana que tenía un grave brote de SRRP. Esta granja no tenía una historia previa de problemas con el SRRP ni de vacunación contra el SRRP. El P129 aislado era más virulento que varios otros aislados de campo de la misma época y la misma área geográfica, que producía una enfermedad respiratoria más grave y consistente en lechones. El virus se aisló inicialmente en macrófagos alveolares porcinos primarios (la célula huésped natural), y posteriormente se pasó a células MARC-145 (Kim, H.S. y col., 1993, Arch. Virol. 133:477-483). Se descubrió que los genes que codifican las proteínas estructurales del P129 eran homólogos a las correspondientes secuencias genéticas conocidas del SRRP norteamericano.

La línea celular MARC-145 que se utilizó para propagar los virus SRRP es un clon de la línea celular MA-104 de riñón del mono Macaco Rhesus. Las células MARC-145 se obtuvieron de los Laboratorios de los Servicios Veterinarios Nacionales (NVSL, Ames, Iowa) de la USDA. Esta células se habían ensayado y comprobado que eran negativas para micoplasmas y para los agentes extraños comunes porcinos. Las células MARC-145 se cultivaron rutinariamente a 37 °C en OptiMEM (Life Technologies Inc.) con un 2% de suero fetal bovino y antibióticos.

Se purificaron placas de cinco clones biológicos de la reserva de virus P129, y se designaron P129A a P129E. La purificación de las placas se llevó a cabo infectando monocapas de células MARC-145 con virus P129, añadiendo una cubierta de OptiMEM que contenía un 1,25% de agarosa SeaPlaque (FMC BioProducts), un 2% de suero fetal bovino, y antibióticos. Las placas eran claramente visibles después de incubarse durante 7 días, entonces se recogieron las placas aisladas de 5 pocillos y se pasaron a las MARC-145 recién preparadas en monocapa. Cuando se hizo aparente el efecto citopático (la muerte celular inducida por los virus), la descendencia de los virus de cada uno de estos cultivos se sometió a otra ronda de purificación de placa. Se recogió uno de los pocillos de cada placa aislada de cada uno de los cinco clones y se expandió para producir grandes reservas. Se ensayó la virulencia de los 5 clones en lechones, de forma individual (clones A y E) o en combinación (clones B-D, o clones A-E). En todos los casos, la placa purificada de virus se replicó bien en los cerdos y produjeron enfermedad clínica. La severidad de los síntomas clínicos fue menor que la causada por el virus P129 sin clonar, incluso cuando se utilizaban juntos los cinco clones. Se eligió el P129A para secuenciarlo, y se utilizó para manipulaciones moleculares posteriores.

Determinación de la secuencia genómica del P129A: Se utilizó la placa purificada del virus P129A para la determinación de la secuencia después de 10 pasajes seriados por el cerdo (incluyendo dos purificaciones de placa y un pasaje posterior). La SEC ID N° 1 muestra la secuencia de ADNc correspondiente al genoma ARN del P129A. El genoma tiene una longitud de 15.395 nucleótidos (excluyendo la cola de poliadenosina), comienza con ATGACGTA, y termina con CCGCAATT. Se proporciona también en la SEC ID N° 1 una cola típica de poliadenosina de 55 restos.

Se eligieron varios cebadores de PCR para los genes estructurales del P129A (ORF 2 a 7), que comprenden el 3' el 20% del genoma, basándose en varias secuencias parciales de ADNc de otros virus SRRP aislados disponibles en la base de datos pública de secuencias de ADN GenBank (por ejemplo PRU00153). El ARN vírico purificado se transcribió inversamente a ADNc utilizando una transcriptasa inversa y cebadores hexámeros aleatorios. Este ADNc se utilizó entonces en la PCR con cebadores específicos de genes. Los productos de la PCR se escindieron de los geles y se clonaron T/A en el plásmido pCR2.1 (Invitrogen). Para cada par cebador, se secuenció el ADN de múltiples plásmidos (de reacciones PCR independientes). Las secuencias se ensamblaron utilizando el programa Seqman del paquete Lasergene (DINASTAR, Inc.). Esto permitió completar la secuencia de las posiciones 11.992 a 15.347 del genoma del P129A.

También en la base de datos de GenBank hay una serie de secuencias cortas (de aproximadamente 218 nucleótidos en total) que comprenden una porción génica de la ORF 1 b de varios virus SRRP aislados. Una de estas (PPSSEQB) se utilizó para diseñar los cebadores PCR (directo 5'-ACAGTTTGGTGATCTATG-3' (SEC ID N° 10), correspondiente a las posiciones 9.030-9.080; inverso 5'-CAGATTCAGATGTTCAA-3' (SEC ID N° 11), correspondiente a las posiciones 9.252-9.268). Estos amplificaron fragmentos de 206 nucleótidos, que incluían 171

nucleótidos de la nueva secuencia génica a partir de la ORF 1b del P129A, correspondiente a las posiciones 9.081 a 9.251. Se diseñó un nuevo cebador directo en esta región (5'-ACCTCGTGCTGTATGCCGAATCTC-3' (SEC ID N° 12), posiciones 9.201-9.224), y se diseñó un cebador de combinación con la ORF 1b inmediatamente corriente arriba de la ORF2 (5'-TCAGGCCTAAAGTTGGTTCAATGA-3' (SEC ID N° 13), posiciones 12.027-12.050). Estos

cebadores se utilizaron en RT-PCR para amplificar un fragmento de 2.850 nucleótidos de la ORF 1b, correspondiente a las posiciones 9.201-12.050 del genoma del P129A.

Durante la amplificación RT-PCR de la ORF5 de otro virus SRRP norteamericano aislado de campo, se visualizó una pequeña banda, que era de menor tamaño que el esperado. Se secuenció y se descubrió que tenía una homología limitada con la ORF 1a del virus Lelystad (resultante de un cebado falso). Se eligieron nuevos cebadores con esta región para amplificar el P129A (directo 5'-GATGACTGGGCTACTGACGAGGAT-3' (SEC ID N° 14), correspondiente a las posiciones 1.587-1.610; inverso 5'-AGAGCGGCTGGGATGACACTG-3' (SEC ID N° 15), correspondiente a las posiciones 1.877-1.897). Además del producto de 311 nucleótidos (266 nucleótidos de la nueva secuencia de P129A entre los cebadores correspondientes a las posiciones 1.611-1.876), se clonó un pequeño producto PCR pero más grande de 701 nucleótidos y se secuenció (656 nucleótidos de la nueva secuencia del P129A entre los cebadores correspondientes a las posiciones 1.611-2.264). La banda más larga resultaba del cebado falso del cebador inverso en las posiciones 2.265-2.269.

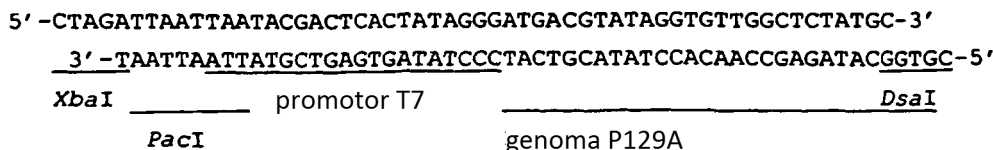
El final del extremo 5' del genoma del P129A se determinó por RACE 5' (amplificación rápida de extremos de ADNc) utilizando un kit disponible comercialmente (Life Technologies, Inc.). Se eligieron dos cebadores inversos anidados de entre las secuencias conocidas de ORF 1a ("RACE 2" 5'-CCGGGGAAGCCAGACGATTGAA-3' (SEC ID N° 16), posiciones 1.917-1.938; y "RACE 3" 5'-AGGGGGAGCAAAGAAGGGGTCATC-3' (SEC ID N° 17), posiciones 1.733-1.756). RACE 2 se utilizó para la síntesis de cebador ADNc, mientras que el RACE 3 se utilizó para la PCR. Los productos PCR resultantes se clonaron y secuenciaron. Los dos productos más largos terminaban precisamente por la misma base (posición 1 en la SEC ID N° 1).

El gran hueco entre la secuencia conocida de ORF 1a y ORF 1b se puenteó utilizando RT-PCR larga. Se utilizaron dos cebadores nuevos (directo 5'- AGCAGCTCTGGTGCAACTG-3' (SEC ID N° 18), posiciones 1.361-1.380; inverso 5'-GCCGCGGCGTAGTATTCAG-3' (SEC ID N° 19), posiciones 9.420-9.438). El producto RT-PCR de 8.078 nucleótidos se clonó y secuenció.

El final del extremo 3' del genoma del P129A se determinó ligando juntos los extremos 3' y 5' del ARN vírico y utilizando la RT-PCR para amplificar el fragmento de unión. Los fragmentos de unión resultantes se clonaron y secuenciaron. En resumen, el ARN extraído del aglomerados de viriones se trató con pirofosfatasa ácida de tabaco (para eliminar las estructuras capsulares 5'), luego se autoligaron con ARN ligasa T4 (ambas de Epicentre Technologies). Los cebadores que se utilizaron fueron 5'-CGCGTCACAGCATCACCTCAG-3' (SEC ID N° 20) (directo, posiciones 15.218-15.239) y, o bien el 5'- CGGTAGGTTGGTTAACACATGAGTT-3' (SEC ID N° 21) (inverso, posiciones 656-680) o el 5'- TGGCTCTTCGGGCCTATAAAATA-3' (SEC ID N° 22) (inverso, posiciones 337-359). Todos los clones resultantes se truncaron en el extremo 5' del genoma (el más completo se produjo con 57 nucleótidos del extremo 5' actual, como se reveló por RACE 5'), sin embargo dos de estos clones contenían el extremo 3' completo del genoma incluyendo la cola de poliadenosina (de una longitud de 42 y 55 restos de adenosina). Esto completó la secuencia del ADNc del genoma del P129A SRRP aislado de 15.450 bases, incluyendo la cola poliA, como se muestra en la SEC ID N° 1.

Creación de un clon ADNc de longitud completa del P129A: Se ensambló un clon infeccioso de ADNc del P129A de longitud completa, denominado pT7P129A, a partir del solapamiento de cuatro productos RT-PCR. Los cuatro productos RT-PCR se clonaron T/A primero en el plásmido pCR2.1 (Invitrogen) y se transfectaron en *Escherichia coli* cepa DH5-alfa. Las colonias bacterianas se seleccionaron, y se escogieron las que contenían inserciones del tamaño esperado en la orientación "T7 o M13" para secuenciación y posterior manipulación. Los cuatro productos RT-PCR clonados contenían una o más mutaciones no silentes (desviaciones de la secuencia de nucleótidos consensuados para el P129A de la SEC ID N° 1 lo que resultaría en un cambio en la secuencia de aminoácidos de las ORF codificadas). Estas mutaciones no silentes (salvo una en la posición 12.622 de la ORF2) se repararon subclonando los fragmentos a partir de otros productos clonados de la RT-PCR. Se ensamblaron los cuatro clones subgenómicos reparados en un clon de longitud completa de manera gradual, utilizando los sitios de restricción disponibles (véase la Figura 1). Los extremos 5' y 3' del ADNc correspondiente al genoma del P129A en el pT7P129A se modificaron por adición de un promotor T7 y de sitios apropiados de restricción de endonucleasas. La construcción del pT7P129A se describe con más detalle en los párrafos siguientes:

El extremo 5' del genoma (posiciones 1-1.756), generado por RACE 5' y clonado en el pCR2.1, como se describe anteriormente, se modificó para incluir un promotor T7 inmediatamente corriente arriba del ADNc correspondiente al genoma del P129A y un sitio *PacI* para la clonación futura. Se llevó a cabo la unión de 3 vías utilizando el fragmento de 1.216 pb *Dsal* - *BseRI* de este plásmido (que contenía las bases 27-1.756 del P129A), el fragmento *BseRI*-*XbaI* del mismo plásmido (que contenía las bases 1.243-1.756 del P129A y el vector completo del plásmido hasta el sitio *XbaI*), y el siguiente adaptador sintético de doble cadena (SEC ID N° 23 y 24):



La transcripción predicha del promotor T7 incluye un resto único de “G” del promotor inmediatamente corriente arriba de la primera “A” del genoma vírico. Se reparó una mutación no silente en la posición 1.230 (A *para* G) sustituyendo el fragmento *Aat*II – *Sac*II de 906 pb (bases 740-1.645) con el mismo fragmento de otro clon. Este plásmido se denominó “pT7R3A-2”.

El producto PCR de 8.078 nucleótidos descrito anteriormente se utilizó para cubrir las bases 1.361-9.438 del genoma del P129A. Se corrigieron una delección de 58 pb (posiciones 2.535-2.592) y 7 mutaciones no silentes puntuales subclonando los fragmentos con otros productos clonados de la RT-PCR, dando como resultado el plásmido “pGAP10B-4”. El fragmento *Bsu*361 – *Spe*I de 7.837 pb de este plásmido se unió al fragmento *Bsu*361 – *Spe*I de 5.482 pb del pT7R3A-2. El plásmido resultante “pT7RG” contenía las primeras 9.438 bases del genoma del P129A detrás del promotor T7.

El fragmento de 2.850 nucleótidos de la ORF 1b descrita anteriormente (posiciones del genoma 9.201 – 12.050) se corrigió para reparar las mutaciones no silentes y se designó “p1B3A-2”. El fragmento *NdeI* – *SpeI* de 2.682 pb se unió al fragmento *NdeI* – *SpeI* de 13.249 pb del pT7RG produciendo el plásmido “pT71A1B”, que contenía las primeras 12.050 bases del genoma del P129A.

El cuarto y último fragmento del genoma del P129A se derivó por RT-PCR de las ORF 2 a 7, incluyendo la región 3' no traducida y una porción de la cola poliA. El cebador directo era 5'-ACTCAGTCTAAGTGCTGGAAAGTT ATG-3' (SEC ID N° 25) (posiciones 11.504-11.530) y el cebador inverso era 5'-GGG ATTTAAATATGCATTTTTTTT TTTTTTTTTTTTAAATGCGGCCGCATGGTTCTCG-3' (SEC ID N° 26). El cebador inverso contenía las últimas 22 bases del genoma del P129A (posiciones 16.374 – 15.395), una cola poliA de 21 bases, un sitio *NsiI* (ATGCAT) y un sitio *Swal* (ATTTAAAT). Se repararon las mutaciones no silentes puntuales y una única supresión de base subclonando los fragmentos con otros clones. Se introdujo inadvertidamente una mutación no silente puntual adicional en la posición 12.622 (A *para* G) en este estadio. Esto dio lugar a un cambio de la glutamina en arginina cerca del extremo C de la proteína de la ORF 2 (resto aminoacídico 189 de los 256 aminoácidos de la ORF 2, que no afectaba al solapamiento de ORF 3). Esta mutación no tenía influencia aparente sobre el crecimiento del virus, en el cultivo ni en los cerdos, y no se reparó. Esta mutación servía como un marcador genético para distinguir el virus derivado del clon ADNc de una posible contaminación con el P129A parenteral u otros virus SRRP. El plásmido se denominó “p2_7D-4”. Los genes estructurales del P129A se añadieron al resto del genoma uniendo el fragmento *Eco47III* – *SpeI* de 3.678 pb de p2_7D-4 al fragmento *Eco47III* – *SpeI* de 15.635 pb del pT71A1B.

Esto dio como resultado la construcción final “pT7P129A”, que comprendía el ADNc correspondiente casi idénticamente al genoma completo del P129A (aunque, con una cola poliA de solo 21 bases, al contrario de la cola poliA de 55 bases) detrás del promotor T7, clonada en el vector pCR2.1 entre los únicos sitios de restricción enzimática (*PacI* y *SwaI*). La longitud total de pTP7129A es de 19.313 pb, y es estable en la cepa DH5-alfa de *E. coli*. El pTP7129A contiene una mutación puntual no silente A para G en la posición 12.622 que resulta en una arginina en la posición 189 de la ORF2 en vez de una glutamina (como se codifica por la SEC ID N° 1) y una mutación silente C para T en la posición 1.559. Ninguna de estas mutaciones afectaba al crecimiento del virus bajo las condiciones examinadas, tanto en cultivo celular como en cerdos. Por ejemplo, pTP7129A se utilizó para la transcripción *in vitro* y las transcripciones resultantes del ARN producían virus SRRP norteamericano vivo cuando se transfectaba en células MARC-145, demostrando por tanto que este clon de longitud completa es infeccioso.

Transcripción *in vitro* y transfección de las transcripciones de ARN: En el plásmido pTP7129A hay dos promotores T7 en tándem corriente arriba del genoma vírico. Uno de estos está posicionado inmediatamente corriente arriba del genoma vírico y se constituyó en el cebador PCR como se describió anteriormente. El otro está presente en el vector de clonación pCR2.1 y se localiza fuera del sitio de clonación múltiple (iniciando la transcripción 44 bases corriente arriba del genoma vírico). Se utilizó *PacI* para cortar entre estos promotores T7 antes de la transcripción *in vitro* para generar una transcripción que fuera más próxima al ARN vírico (una única G extra inmediatamente corriente arriba del genoma vírico, al contrario de las 44 bases extra del promotor T7 distal). Además el pTP7129A se cortó con *SwaI* antes de la transcripción *in vitro*. Las transcripciones resultantes de la última ronda incluyen una cola poliA de 21 bases y nueve nucleótidos no SRRP, incluyendo un sitio *NsiI* (que no se utiliza para alinear el plásmido, como el sitio que existe una vez en el genoma vírico). El plásmido digerido se purificó por extracción en fenol y precipitación en etanol antes de su uso.

Se utilizó un kit comercial (T7 Cap-Scribe, Boheringer Mannheim) para la transcripción *in vitro*. El aglomerado de ADN anterior, conteniendo aproximadamente 0,6 µg de pTP7129A *PacI*/Swal digerido, se resuspendió en 20 µl de tampón T7 Cap-Scribe/polimerasa T7 y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Una porción de la reacción se analizó por electroforesis en gel de agarosa y mostró que contenía transcripciones de ARN de longitud completa además de las bandas esperadas de ADN de 15.445 pb v 3.868 pb. La reacción de transcripción *in vitro* se utilizó reciente.

inmediatamente después de la incubación, sin purificación. Se lavaron una vez las células MARC-145 confluentes en una monocapa recientes en OptiMEM (sin suero), y se cubrieron con 1 ml por pocillo de 35 mm de OptiMEM (sin suero) que contenía 500 µg/ml de DEAE dextrano (de peso molecular aproximado de 500.000, Pharmacia Biotech). La reacción de transcripción *in vitro* (15 µl) se añadió inmediatamente. Tras 1 hora a 37 °C, se eliminó la mezcla de transfección, las monocapas se lavaron una vez con PBS y se cubrieron con agarosa SeaPlaque al 1,25% (FMC Corporation) en OptiMEM con un 2% de suero fetal bovino y antibióticos. Tras 5 días a 37 °C, era visible una única placa. El virus se denominó "rP129A-1" y se expandió en células MARC-145 y se caracterizó en el cultivo celular y en cerdos. Posteriormente las transfecciones del ARN transcrito *in vitro* a partir del pTP7129A, utilizando tanto DEAE dextrano y electroporación, habían dado como resultado muchas placas adicionales.

Caracterización de virus recombinantes rP129A-1: No hay diferencias aparentes en las cinéticas de crecimiento, rendimiento o morfología de las placas entre el ADNc derivado del virus recombinante rP129A-1 y su parental no recombinante P129A. Como se ha tratado anteriormente, hay dos diferencias en la secuencia de nucleótidos entre la secuencia codificante de pTP7129A y la secuencia consensuada de P129A (mostrada en la SEC ID N° 1). En primer lugar en la posición 1.559 el pTP7129A contiene una T, mientras que el P129A contiene una C (esta es una mutación silente). En segundo lugar, en la posición 12.622 el pTP7129A contiene una G, mientras que P129A contiene una A (este es el cambio de glutamina en arginina en la ORF2 descrito anteriormente). Con el fin de descartar la posibilidad de que rP129A-1 no sea actualmente un virus SRRP no recombinante contaminante, se llevó a cabo una RT-PCR y la secuenciación de las regiones que rodeaban estas dos diferencias. En el caso de ambos marcadores genéticos el rP129A-1 era idéntico al plásmido pTP7129A y diferentes del virus parental P129A, confirmando por lo tanto que rP129A-1 se derivaba del clon ADNc infeccioso.

Caracterización del virus rP129A-1 recombinante en cerdos: El virus rP129A-1 derivado del ADNc se comparó con su parental no recombinante P129A en cuanto a su capacidad de infectar y producir enfermedad clínica en lechones. Se infectaron tres grupos de 10 cerdos cada uno de una piara negativa al SRRP a la edad de 4 semanas con P129A, rP129A-1, o simulando la infección con medio de cultivo celular. Se controlaron los signos clínicos, las temperaturas rectales, y los pesos corporales. Se les extrajo sangre a los 0, 2, 6, 10, y 13 días postinfección para determinar la viremia sérica (por ensayo de placa sobre células MARC-145, Figura 2) y los anticuerpos séricos (por ELISA utilizando el HerdChek SRRP de IDEXX, Figura 3). Se observaron en las necropsias lesiones macro y microscópicas en el pulmón. No hubo diferencias significativas entre los dos grupos infectados con virus, indicando que el rP129-1 se replicaba en cerdos y causaba enfermedad clínica que era cualitativa y cuantitativamente similar a su virus parental no recombinante.

Ejemplo II. Supresión de ORF7 (gen de la nucleocápside) del virus SRRP norteamericano; Preparación de esta manera de una vacuna marcada negativamente, deficiente en replicación.

El gen de la nucleocápside (ORF7) se suprimió parcialmente de un clon ADNc infeccioso del virus SRRP. Se esperaba que el virus SRRP recombinante modificado fuera deficiente en replicación en los cerdos. Este virus SRRP recombinante modificado podría utilizarse como vacuna para inducir una respuesta inmune a otras proteínas del virus SRRP sin los riesgos de producir enfermedad clínica, diseminarse a animales no vacunados, o revertir la virulencia asociada con las vacunas atenuadas vivas. Además de ser muy seguro, tal virus vacunal también estaría "marcado negativamente", en el sentido de que permitiría la exposición a aislados de campo del virus SRRP que se pudieran determinar serológicamente incluso en presencia de anticuerpos para el virus vacunal. Los anticuerpos a la proteína de la ORF7 se encuentran normalmente en los cerdos infectados con el virus SRRP, mientras que los cerdos vacunados con un VSRRP con ORF7 suprimida carecerían de anticuerpos para la proteína del ORF7.

La supresión del ORF7 de un clon infeccioso se consiguió como sigue: Se utilizó el plásmido p2_7D-4 (véase Figura 1) como matriz en la PCR para amplificar las regiones que flanquean el 5' y 3' corriente arriba y corriente abajo de ORF7. El cebador directo del lado corriente arriba 5'-ATTAGATCTTGCCACCATGGTGGGGAAATGCTTG AC-3' (SEQ ID N° 27) (que se une a las posiciones del genoma 13.776-13.791 cerca del inicio de ORF7 y que contiene sitios adicionales de restricción que son irrelevantes para la presente clonación) y el cebador inverso del lado corriente arriba 5'-CTTTACGCGTTTGCTTAAGTTATTTGGCGTATTTGACAAGGTTTAC-3' (SEQ ID N° 28) (que se une en las posiciones del genoma 14.857-14.902 en la unión de ORF6 y 7) amplificaban un fragmento de 1.147 pb. El cebador inverso introducía los sitios *MluI* y *AflII* y un único cambio de base en la posición 14.874, destruyendo el codón de inicio ATG de ORF7, sin alterar la tirosina codificada en el solapamiento ORF6. En el lado corriente abajo, el cebador directo 5'-CAACACGCGTCAGCAAAAGAAAAGAAGGGG-3' (SEQ ID N° 29) (posiciones 14.884-14.914 cerca del extremo 5' de ORF7, introducía un sitio *MluI*) y el cebador inverso 5'-GCGCGTTGGCCGATTTCATT A-3' (SEQ ID N° 30) (corriente abajo del genoma viral en el plásmido pCR2.1) amplificaban un fragmento de 462 pb. Se llevó a cabo una unión en tres vías, utilizando el fragmento *BstEII-MluI* de 611 pb del producto PCR del lado corriente arriba, el fragmento *MluI-SpeI* de 575 pb del producto PCR del lado corriente abajo, y el fragmento *BstEII-SpeI* de 6.653 pb del plásmido p2_7D-4 (todos los fragmentos se purificaron en gel tras su digestión). El plásmido resultante p2_7Ddelta7+7023 tenía eliminados los primeros siete aminoácidos del ORF7, y carecía del codón de inicio ATG. Se habían insertado dos nuevos sitios de restricción que estaba ausentes tanto en el genoma vírico como en el plásmido matriz, *AflII* y *MluI*, para facilitar la clonación direccional de genes ajenos en el espacio ocupado anteriormente por el extremo 5' de ORF7.

Los cambios hechos en p2_7Ddelta7+7023 se incorporaron en un clon genómico de longitud completa uniéndolo con el fragmento *Eco47III-SpeI* con 3.683 pb de p2_7Ddelta7+7023 con el fragmento *Eco47III-SpeI* de pCMV-S-p129. El plásmido resultante pCMV-S-p129delta7+7023 se utilizó para transfectar las células.

Como la nucleocápside es esencial para el crecimiento vírico, es necesario proporcionar esta proteína con el fin de permitir la generación y replicación de un virus SRRP deficiente en ORF7. Esto se puede conseguir utilizando un virus auxiliar o una línea celular complementaria, por ejemplo se podrían crear líneas celulares MARC-145 que expresen ORF7 transfectando establemente células con un plásmido que contuviera tanto el gen ORF7 de P129A como el gen de resistencia a la neomicina. Tras seleccionar la resistencia a la neomicina utilizando el antibiótico G418, las colonias de una célula única se podrían expandir y caracterizar. Las líneas celulares clónicas derivadas de MARC-145 que sean positivas a la expresión de ORF7 tanto por inmunofluorescencia como por RT-PCR se podrían transfectar con ARN del pT7P129delta7 con el fin de generar un virus P129 deficiente en ORF7.

Se pueden utilizar estrategias similares para generar virus SRRP deficientes en otros genes estructurales (ORF 2, 3, 4, 5, o 6), o deficientes en todos o partes de genes no estructurales 1a y 1b. Además se pueden realizar múltiples supresiones manipulando genéticamente un único virus SRRP, y se pueden cultivar en células complementarias que proporcionen todas las funciones necesarias. Tales virus SRRP deficientes en genes se pueden atenuar fácilmente parcial o completamente en cerdos, haciéndolos útiles como vacunas contra el SRRP. También se pueden utilizar para distinguir animales vacunados de animales infectados con el virus SRRP tipo silvestre como se trató anteriormente y/o como vectores para vacunar animales con epítomos de otros agentes patógenos porcinos (véase el Ejemplo III, a continuación).

Ejemplo III. Inserción de genes heterólogos en el genoma del virus SRRP norteamericano; utilización del virus SRRP como un vector, y virus SRRP norteamericano marcado positivamente.

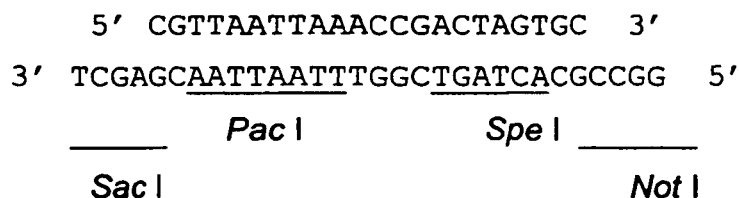
En el Ejemplo II anterior, se insertaron los sitios de restricción enzimática *AflII* y *MluI* en la región anteriormente ocupada por el extremo 5' de ORF7. Estos sitios estaban ausentes en el genoma del P129A y en los plásmidos pCR2.1 y pCMV, y se pueden utilizar en la clonación direccional de genes ajenos (heterólogos) en el genoma vírico para su expresión. Los sitios directores de la unión potenciales para la transcripción del ARN subgenómico ORF7 en las posiciones 14.774 – 14.749 (ATAACC) y 14.858 – 14.863 (TAAACC) no se afectan por la supresión de la secuencia codificante ORF7, y pueden funcionar en la transcripción de un gen ajeno. Los genes ajenos (heterólogos) pueden incluir genes de otros virus SRRP aislados o genotipos, y/o genes de otros patógenos no SRRP, ya sean agentes patógenos que infecten cerdos o patógenos que infecten mamíferos distintos de los cerdos, o aviares.

Además, estos genes ajenos (o partes de los mismos) pueden proporcionar epítomos antigénicos que no se encuentran normalmente en cerdos. Tales epítomos se pueden utilizar para "marcar positivamente" una vacuna, de manera que se puede controlar serológicamente la vacunación con éxito, incluso en presencia de anticuerpos contra cepas del virus SRRP de vacunas convencionales o de campo. Es necesario que un marcador positivo no sea un casete de expresión separado. Un epítomo antigénico se puede fusionar a un gen estructural del virus SRRP. Por ejemplo, el cebador inverso del lado corriente arriba descrito en el Ejemplo I, anterior, se puede extender de forma que se añada una fusión en el extremo carboxilo de un epítomo antigénico que no sea del virus SRRP, a la proteína de membrana ORF6. La presencia de anticuerpos para este epítomo en cerdos indicaría una vacunación con éxito.

Ejemplo IV. Expresión celular de un virus SRRP or transfección directa del ADNc en las células.

El vector de expresión en eucariotas pCMV-MC1 (SEC ID N° 31) se derivó del plásmido disponible comercialmente pCMVbeta (Clontech) sustituyendo la secuencia codificante LacZ entre dos sitios *Not I* con un engarce que contiene los sitios *Not I*, *EcoR V*, *Avr II*, *Bgl II*, *Cla I*, *Kpn I*, *Pac I*, *Nhe I*, *Swa I*, *Spe I* y *Not I*. Se consiguió la modificación del CMV humano inmediatamente antes del promotor sustituyendo la secuencia entre los sitios *Sac I* y el segundo *Not I* del pCMV-MC1 con un engarce sintético (mostrado a continuación). El engarce contiene un sitio medio para *Sac I* seguido por *Pac I* y un medio sitio para *Not I*. Después de la hibridación de los dos oligonucleótidos de cadena sencilla, el engarce se clonó en pCMV-CM1 entre el sitio *Sac I* y *Not I*, y el clon seleccionado se denominó pCMV-S1. El sitio *Spe I* del pCMV-S1 no podía cortarse, posiblemente debido a un error en la secuencia oligo. Por tanto, el fragmento entre *Pac I* e *Hind III* en el pCMV-S1 se sustituyó con el fragmento *Pac I* (en la posición 877)- *Hind III* (en la posición 1.162) del pCMV-CM1. Así, se reganó un sitio *Spe I*. Esta construcción final (pCMV-S) se utilizó para clonar el genoma de longitud completa del P129.

Secuencia de engarce (SEC ID N°s 32 y 33):



La secuencia inmediatamente corriente arriba del extremo 5' del genoma del P129 se modificó para contener el espaciado apropiado y un sitio de restricción enzimática conveniente (*Pac* I). Esto se hizo diseñando cebadores apropiados de PCR (SEC ID N^{os} 34 y 35) para la amplificación a partir del pT7P129. Después de la digestión con *Pac* I y *Aat* II, este fragmento se subclonó en los sitios *Pac* I y *Aat* II del pT7RG (Fig. 1). El plásmido resultante se denominó pT7RG-deltaT7.

La construcción final se completó subclonando las secuencias víricas de pT7RG-deltaT7 en los sitios *Pac* I y *Nde* I en pT7P129, creando el pT7P129-deltaT7. El genoma de P129 de longitud completa se digirió del pT7P129-deltaT7 en *Pac* I y *Spe* I y se transfirió en pCMV-S en los sitios *Pac* I y *Spe* I. Esta construcción se denominó pCMV-S-P129.

La secuencia de la región de modificación entre el promotor CMV TATA box y el extremo 5' de la secuencia del P129 en pCMV-S-P129 se muestra en la SEC ID N^o 36 y se presenta esquemáticamente a continuación:

5' TATATAAGCAGAGCTCGTTAATTAAACCGTCATGACGTATAGGTGTTGGC 3'

Caja TATA *Sac* I *Pac* I Inicio de P129

Para ensayar el uso del promotor CMV para iniciar la infección de las células por el virus SRRP, el ADN del plásmido pCMV-S-P129 (0,5 o 1,0 µg) se transfirió en células MARC-145 por lipofección utilizando LipofectaminaTM (Life Technologies Inc.). El efecto citopático específico del virus SRRP se observó tras la transfección y se determinó la presencia del antígeno vírico SRRP por ensayo de anticuerpo inmunofluorescente.

Los virus SRRP se generaron eficazmente a partir de pCMV-S-P129, y la descendencia del virus se podía pasar en células MARC-145. Esto demuestra que una infección por virus SRRP se puede iniciar directamente a partir de un plásmido ADNc que codifica un virus SRRP, sin que haya una etapa de transcripción *in vitro*. Además, pCMV-S-P129 generó una gran cantidad de virus descendientes al compararlo con los plásmidos en los que el extremo 3' del promotor pCMV no estaba inmediatamente enfrente del inicio de la secuencia que codificaba un virus SRRP norteamericano.

Ejemplo V. Supresión de ORF4 del virus SRRP norteamericano.; Preparación de esta manera de una vacuna deficiente en replicación.

Una porción del gen para la ORF4, que codifica una glicoproteína de membrana, se eliminó de un clon ADNc infeccioso del virus SRRP de la presente invención. El virus recombinante modificado resultante se esperaba que fuera defectuoso en la replicación en cerdos y que indujera una respuesta inmune para otras proteínas del virus SRRP sin los riesgos de producir enfermedad clínica, dispersarse a animales no vacunados, o revertir la virulencia que se asocia con las vacunas vivas.

La eliminación del ORF4 de un clon infeccioso se consiguió como sigue. El plásmido p2_7D-4 (véase Figura 1) se utilizó como matriz en la PCR para amplificar las regiones 5' y 3' que flanquean las regiones corriente arriba y corriente abajo de ORF4. El cebador directo del lado corriente arriba era 5'-AGGTGACGGCGGCAATTGGTTTCACCTAGAGTGGCTGCGTCCCTTCT-3' (SEC ID N^o 37). Este cebador se unía a las posiciones del genoma 13.194 – 13.241, cerca del comienzo de ORF4, e introduce una mutación en la posición 13.225 que destruye el codón de inicio ATG de ORF4 al alterar el solapamiento con la secuencia aminoacídica de ORF3. El cebador inverso del lado corriente arriba era 5'-TCTTAAGCATTGGCTGTGATGGTGATATAC-3' (SEC ID N^o 38). Este cebador se une a las posiciones genómicas 13.455 – 13.477 en la región codificante ORF4, corriente abajo de ORF3, e introduce un sitio *Afl* II. Para la región del lado corriente abajo, el cebador directo era 5'-CTTCTTAAGTCCACGCGTTTTCTTCTTGCCTTTTCTATGCTTCT-3' (SEC ID N^o 39). Este cebador se une a las posiciones genómicas 13.420 – 13.545 en el medio de ORF4, e introduce los sitios *Afl* II y *Mlu* I para la clonación dirigida de genes ajenos. El cebador inverso era 5'-TGCCCGGTCCCTTGCTCT3' (SEC ID N^o 40). Este cebador se une a las posiciones genómicas 14.981 – 14.999 en la secuencia codificante ORF7. Se llevó a cabo la unión de 3 vías utilizando el fragmento *Sal* I – *Bst*E II del plásmido p2_7D-4. Todos los fragmentos se purificaron en gel después de la digestión. En el plásmido resultante p2_7D-4delta4N se han borrado 42 bases de la porción central de ORF4 y se han sustituido con un sitio de clonación artificial de 15 bases. El sitio de clonación contiene dos sitios de restricción (*Afl* II y *Mlu* I) que están ausentes tanto en el genoma vírico como en la matriz del plásmido. Estos se pueden utilizar para facilitar la clonación direccional de genes ajenos en el espacio ocupado previamente por ORF4. El sitio de clonación también contiene un codón de parada (TAA) que está en fase con ORF4 y además asegura que no se produce una proteína funcional ORF4.

Se ha descubierto que se puede hacer una supresión más extensa de la secuencia codificante ORF4 sin que se interfiera la expresión del gen de envoltura ORF5 corriente abajo. En este caso una región adyacente más corta corriente abajo se amplificó por PCR utilizando la misma matriz y cebador inverso, y utilizando el cebador directo 5'-GTTTACGCGTCTGCTTGGTGGTTCG-3' (SEC ID N^o 41). Este cebador se une a las posiciones genómicas 13.654 – 13.669 cerca del extremo 3' de ORF4, y contiene un sitio *Afl* II. La unión de dos vías entre el fragmento *Afl* II-*Bst*EII del producto PCR del lado corriente abajo y el fragmento *Afl* II-*Bst*EII del plásmido p2_7D-4delta4N dio lugar al nuevo plásmido p2_7D-4delta4NS. Este plásmido tiene 176 bases eliminadas de la secuencia codificante ORF4 y

sustituidas con el sitio de clonación de 15 bases.

Los cambios realizados en p2_7D-4delta4N y p2_7D-4delta4NS se incorporaron en el clon genómico de longitud completa sustituyendo el fragmento *BsrGI-SpeI* del pCMV-S-P129 con los fragmentos modificados *BsrGI-SpeI* de p2_7D-4delta4N y p2_7D-4delta4NS. Los plásmidos resultantes pCMV-S-P129delta4N y pCMV-S-P129delta4NS se utilizaron para transfectar las células.

Al contrario que con el pCMV-S-P129, la transfección de las células MARC-145 con los plásmidos pCMV-S-P129delta4N o pCMV-S-P129delta4NS no dio como resultado placas víricas ni focos fluorescentes. Se podía ver que las células transfectadas individuales producían la proteína de la nucleocápside de ORF7, sugiriendo que el producto del gen ORF4 no necesitaba de la replicación de ARN o la expresión de los genes víricos, pero que es esencial para liberar la descendencia vírica infecciosa. Como la supresión de ORF4 es letal para la replicación del virus, es necesario proporcionar esta proteína. Esto se puede conseguir utilizando una línea celular complementaria. Nosotros creamos unas líneas celulares MARC-145 que expresaban ORF4 transfectando células estables con un plásmido que contenía tanto el gen ORF4 como el de resistencia a la neomicina. Después de la selección por la resistencia a la neomicina utilizando el antibiótico G418, las colonias celulares simples se expandieron y caracterizaron. Tras la transfección con pCMV-S-P129delta4NS, tres clones celulares que expresaban ORF4 produjeron virus vivos que se podían propagar en estas células pero no en las células MARC-145. Una de estas, MARC400E9, se caracterizó más. La tinción inmunofluorescente para la nucleocápside vírica en las células MARC400E9 transfectadas con el plásmido pCMV-S-P129delta4NS era positiva.

Ejemplo VI. Uso del virus SRRP con genes suprimidos como vector de expresión para genes ajenos.

Con el fin de determinar si los genes heterólogos se podían expresar a partir de virus SRRP con genes suprimidos, insertamos una copia de la proteína fluorescente verde (GFP) en el sitio de la supresión del ORF4 en el plásmido pCMV-S-P129delta4N. El gen GFP se amplificó a partir de un vector plásmido disponible comercialmente utilizando cebadores de PCR que introducían un sitio *AflI* en el extremo 5' del gen y un sitio *MluI* en el extremo 3' del gen. El plásmido resultante pCMV-S-P129delta4N-GFP se utilizó para transfectar células MARC-145 y MARC400E9. Como se anticipaba, las células MARC-145 no mantenían la replicación de virus con ORF4 suprimido. Las células verdes únicas que resultaron de la transfección primaria se vieron bajo escopia UV, indicando que se había expresado el GFP, pero el virus no se había diseminado a las células vecinas y no se observaba CPE. Por el contrario, se observaron grandes focos verdes en las células MARC400E9 transfectadas. Se formaron placas visibles y se fundieron, destrozando la monocapa. Estos resultados indican que los genes ajenos se pueden expresar a partir de virus SRRP con supresión de ORF4, que el incremento del genoma vírico en 692 bases (4,5%) no interfiere el envío del ARN vírico en partículas infecciosas.

Ejemplo VII. Uso de virus SRRP de replicación competente como Vector de expresión de genes ajenos.

Con el fin de determinar si los genes heterólogos se podían expresar a partir de un virus SRRP con replicación competente, insertamos una copia de GFP en la región entre ORF 1b y ORF2. Como la secuencia directora/ unión (UJ) de ORF2 se encuentra en ORF 1b, esta secuencia UJ se utilizó para dirigir la expresión del gen GFP y se insertó una copia de la secuencia ORF6 UJ corriente abajo a partir del GFP para dirigir la expresión de ORF2.

Se utilizó el plásmido p2_7D-4 (véase la Figura 1) como matriz en la PCR para amplificar las regiones adyacentes corriente arriba y corriente abajo del sitio de inserción. El cebador directo del lado corriente arriba era 5'-AACAGAAGAGTTGTCTGGGTCCAC-3' (SEC ID N° 42). Este cebador se une a las posiciones genómicas 11699-11721 en ORF1b. El cebador inverso del lado corriente arriba era 5'-GCTTTGACGCGTCCCCACTTAAGTTCAATTCAGGCCTAAAGTTGGTTCA-3' (SEC ID N° 43). Este cebador se une a las posiciones genómicas 12.031-12.055 en ORF 1b y añade los sitios *AflI* y *MluI* para la clonación direccional de genes ajenos entre ORF 1b y ORF2. El cebador directo del lado corriente abajo era 5'-GCGACGCGTGTTCGGTGGCAACCCCTTTAACCAGAGTTTCAGCGGAACAATGAAATGGGGTCTATACAAAGCCTCTTCGACA-3' (SEC ID N° 44). Este cebador se unía a las posiciones genómicas 12.056 – 12.089 en ORF2 y contenía el sitio *MluI* seguido por las 40 bases que preceden el comienzo de ORF6 (que contiene la secuencia ORF6 UJ). El cebador inverso del lado corriente abajo era 5'-AACAGAACGGCAGCAGATACACCACAAA-3' (SEC ID N° 45). Este cebador se une a las posiciones genómicas 13.819 – 13.844 en ORF5. Se llevó a cabo una unión de tres vías utilizando el fragmento *Eco47III-MluI* del producto PCR del lado corriente arriba, el fragmento *MluI-BsrGI* del producto PCR del lado corriente abajo, y el fragmento *Eco47III-BsrGI* del pCMV-S-P129. El plásmido resultante pCMV-S-P129-1bMCS2 que contiene el genoma completo P129 con un sitio de clonación y un sitio UJ adicional entre ORF1b y ORF2. El plásmido produce virus funcionalmente normales cuando se transfectan en células MARC-145.

El gen GFP de un plásmido disponible comercialmente se amplificó utilizando cebadores que añadían un sitio *AflI* en el extremo 5' y un sitio *MluI* en el extremo 3' del gen. Después de la digestión del fragmento PCR y pCMV-S-P129-1bMCS2 con *AflI* y *MluI*, la inserción se unió en el vector para producir el plásmido pCMV-S-P129-1bGFP2. Este plásmido produjo placas verdes cuando se transfectaba en células MARC-145. El virus resultante podía pasarse en células MARC-145 y seguía produciendo placas verdes cuando se observaba bajo escopia UV. Por tanto, los genes ajenos se pueden expresar a partir de virus vectores SRRP con replicación competente. El virus P129-1bGFP2 contiene un genoma que es mayor en 774 bases (el 5%) que su parental P129, pero se transporta

normalmente.

Depósito de materiales biológicos

150 Se depositó el siguiente material biológico en la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC) en el 10.801 del Blvd. University, Manassas, Virginia, 20110-2209, Estados Unidos, el 19 de noviembre de 1998 y se les asignaron los siguientes números de registro:

5

Plásmido	Nº de registro
plásmido pT7P129A	203.488
plásmido pCMV-S-P129	203.489

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Pfizer Products Inc.

10 <120> CLON INFECCIOSO DE ADNc DEL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO (SRRP) NORTEAMERICANO Y USOS DEL MISMO

<130> PC10278A

15

<140>

<141>

<160> 45

20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 15450

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADNc correspondiente al genoma del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (SRRP) norteamericano.

30

<400> 1

```

atgacgtata ggtggttggt ctatgccacg gcatttgtat tgtcaggagc tgtgaccatt 60
ggcacagccc aaaacttgct gcacggaaaa cgcccttctg tgacagcctt cttcagggga 120
gcttaggggt ctgtccctag caccttgctt ctggagttgc actgctttac ggtctctcca 180
cccctttaac catgtctggg atacttgatc ggtgcacgtg ccccccaat gccagggtgt 240
ttatggcgga gggccaagtc tactgcacac gatgtctcag tgcacggctc ctccttcctc 300
tgaatctcca agttcctgag cttgggggtg tgggcctatt ttataggccc gaagagccac 360
tccggtggac gttgccacgt gcattcccca ctgtcgagtg ctcccccgcc ggggcctgct 420
ggctttctgc gatctttcca attgcacgaa tgaccagtgg aaacctgaac tttcaacaaa 480
gaatggtgct ggttgacgct gagatttaca gagccggcca actcaccctt gcagttttga 540
aggctctaca agtttatgaa cgggggtgtc gctggtaccc cattgtcgga cctgtccctg 600
gagtggccgt tcacgccaac tccctacatg tgagtgacaa acctttcccg ggagcaactc 660
atgtgttaac caacctaccg ctcccgacga ggcccaagcc tgaagacttt tgcccttttg 720
agtgtgctat ggctgacgtc tatgacatta gccatgacgc cgtcatgtat gtggccagag 780
ggaaagtctc ctgggccctt cgtggcgggg atgaagtga atttgaaacc gtccccgaag 840
aottgaagtt gattgcgaac cgactccaca tctccttccc gccccaccac gcagtggaca 900
tgtctgagtt tgccttcata gcccttgagg gtggtgtctc cttgcgggtc gagcaccaac 960
acgggttgct tcccgctgat actgtccctg aagggaactg ctggtggtgc ttgtttgact 1020
tgctcccacc ggaagttcag aataaagaaa ttgcgcgtgc taaccaattt ggctatcaaa 1080
ccaagcatgg tgtccctggc aagtacctac agcggagggt gcaagttaat ggtctccgag 1140

```

cagtgaactga tacagatgga cctattgtcg tacagtactt ctctgttagg gagagttgga 1200
 tccgccactt cagactggcg gaagaaccta gcctccctgg gtttgaagac ctctcagaa 1260
 taagggtgga gctaatacgc tcgccattgg gtggcaaggg tgaaaaaatc ttccggtttg 1320
 gcagtcaaaa gtggtacggg gctggaaaaga gagcaaggag agcacgctct ggtgcaactg 1380
 ccacggtggc tcaactgcgc ttgcccgcgc gcgaagccca gcaggccaag aagctcgagg 1440
 ttgccagcgc caacagggtc gagcatctca agtactattc cccgcctgcc gacgggaact 1500
 gtggttgga ctgcatttcc gccattacca accggatggg gaattccaaa tttgaaacca 1560
 ctcttcccga gagagtgaga ccttcagatg actgggctac tgacgaggat cttgtgaata 1620
 ccatccaaat cctcaggctc cccgcggcct tggacaggaa cgggtgcttg gctggcgcca 1680
 agtacgtgct caagctggaa ggtgagcact ggaccgtctc tgtgacccct gggatgaccc 1740
 cttcttttgc ccccttgaa tgtgttcagg gttgttgtga gcataagagc ggtcttggtt 1800
 tcccagacgt ggtcgaagtt tccggatttg accctgcctg tcttgaccga cttgctgaga 1860
 taatgcactt acctagcagt gtcattcccag ctgctctggc cgagatgtcc gacgacttca 1920
 atcgtctggc tccccggcc gccactgtgt ggactgtttc gcaattcttt gcccgccaca 1980
 gaggaggaga gcattcctgac cagggtgtgt tagggaaaat tatcaacctt tgtcagggtga 2040
 ttgaggaatg ctgctgttcc cggaacaaag ccaaccgggc taccocggaa gaggttgagg 2100
 caaaagttga ccagtacctc cgtggtgcag caagccttgg agaattgctt gccaaagctt 2160
 agagggtcgc cccgcgcgag gcgatggaca cctcctttga ttggaatgtt gtgcttctct 2220
 ggggttgagac ggccgatcag acaaccacac agctccatgt caaccagtgc cgcgctctgg 2280
 ttcctgtcgt gactcaagag cctttggaca gagactcggg cctctgacc gccttctcgc 2340
 tgtccaattg ctactacctc gcacaagggt acgagggtccg tcaccgtgag aggctaaact 2400
 ccgtgctctc taagttagag ggggtgttgc gtgaggaata tgggtcacg ccaactggac 2460
 ctggcccgcg acccgactg ccgaacgggc tcgacgagct taaagaccag atggaggagg 2520
 atctgctgaa attagtcaac gcccaggcaa cttcagaaat gatggcctgg gcagccgagc 2580
 aggttgatct aaaagcttgg gtcaaaaatt acccaggtg gacaccgcca cccctccac 2640
 caagagttca gcctcgaaaa acgaagtctg tcaagagctt gctagagaac aagcctgtcc 2700
 ctgctccgcg caggaagggt agatctgatt atggcagccc gattttgatg ggcgacaatg 2760
 ttcctaacgg ttgggaagat tcgactgttg gtggtccctc tgaccttctg gcaccatccg 2820
 agccgatgac acctctgagt gagcctgtac ttatttccag gccagtgaca tctttgagt 2880
 tgccggcccc agttcctgca ccgcgtagag ctgtgtctcg accgatgacg cctcagagt 2940
 agccaatttt tgtgtctgca ctgcgacaca aatttcagca ggtggaaaaa gcaaatctgg 3000
 cggcagcagc gccgatgtac caggacgaac ccttagattt gtctgcatcc tcacagactg 3060
 aatatggggc ttctcccta acaccaccgc agaactggg cattctggag gtaagggggc 3120
 aagaagctga ggaagtctg agtgaaatct cggaatttct gaatgatacc aaccctgcac 3180
 ctgtgtcatc aagcagctcc ctgtcaagt ttaggatcac acgccccaaa tactcagctc 3240
 aagccattat cgaactgggc gggccctgca gtgggcacct ccaaaggga aaagaagcat 3300
 gcctccgcat catgctgag gcttgtgat cgcccaagct tagtgaccct gccacgcagg 3360
 aatggctttc tcgcatgtgg gatagggtgg acatgctgac ttggcgcaac acgtctgctt 3420
 accaggcgtt tcgcacctta gatggcagg ttgggtttct ccaaagatg atactcgaga 3480
 cgccgccgcc ctaccctgtt gggtttgtga tgttgctca caccctgca ccttccgtga 3540
 gtgcagagag cgaccttacc atcggttcag tcgccactga agatattcca cgcctcctcg 3600
 ggaaaataga aaataccggt gagatgatca accagggacc cttggcatcc tctgaggaag 3660
 aaccggtata caaccaacct gccaaagact cccgatatc gtcgcggggg tctgacgaga 3720
 gcacagcagc tccgtccgca ggtacagggt gcgccggctt atttactgat ttgccacctt 3780
 cagacggcgt agatgcggac ggtggggggc cgttgacagc ggtaagaaa aaagctgaaa 3840
 ggctcttcga ccaattgagc cgtcagggtt ttaacctcgt ctccatctc cctgttttct 3900
 tctcacacct cttcaaatct gacagtgggt attctccggg tgattggggg tttgcagctt 3960
 ttactctatt ttgcctcttt ttgtgttaca gctaccatt cttcggtttc gttccctct 4020

tgggtgtatt ttctgggtct tctcggcgtg tgcgcatggg ggtttttggc tgctggctgg 4080
 cttttgctgt tggcctgttc aagcctgtgt ccgaccaggt cggcactgct tgtgagtttg 4140
 actcgccaga gtgtaggaac gtccttcatt cttttgagct tctcaaacct tgggaccttg 4200
 ttcgcagcct tgttgtgggc cccgtcggtc tcggtcttgc cattcttggc aggttactgg 4260
 gcggggcacg ctacatctgg cattttttgc ttaggcttgg cattgttgca gattgtatct 4320
 tggctggagc ttatgtgctt tctcaaggta ggtgtaaaaa gtgctgggga tcttgataaa 4380
 gaactgctcc taatgaaatc gccttcaacg tgttcccttt tacacgtgcg accaggctcg 4440
 cactcatcga cctgtgcgat cggttttgtg cgccaaaagg catggacccc attttctctg 4500
 ccactgggtg gcgtgggtgc tggaccggcc gaagtccat tgagcaaccc tctgaaaaac 4560
 ccctgcgctt cgccagttg gatgaaaaga ggattacggc tagaactgtg gtcgctcagc 4620
 cttatgatcc taatcaagcc gtaaagtgtc tgcgggtgtt acaggcgggt ggggcgatgg 4680
 tggccgaggc agtcccaaaa gtggtcaaaag tttctgctat tccattccga gccccctttt 4740
 ttcccaccgg agtgaaagtt gatcccgagt gcaggatcgt ggtcgacccc gatactttta 4800
 ctacagccct ccggtctggt tactctacca caaacctcgt ccttggtgtg ggggactttg 4860
 ccagctgaa tggactaaag atcaggcaaa tttccaagcc ttcgggagga ggccacacc 4920
 tcattgctgc cctgcatgtt gcctgctcga tggcgttgca catgcttgct ggggtttatg 4980
 taacttcagt ggggtcttgc ggtgccggca ccaacgatcc atggtgcact aatccgtttg 5040
 ccgttctctg ctacggacca ggctctctct gcacgtccag attgtgcac tcccaacatg 5100
 gccttaccct gcccttgaca gcacttgtgg cgggattcgg tcttcaggaa atcgcttgg 5160
 tcgttttgat tttcgtttcc atcggaggca tggctcatag gttgagttgt aaggctgata 5220
 tgctgtgcat cttacttgca atcgccagct atgtttgggt accccttacc tggttgcttt 5280
 gtgtgtttcc ttgttggttg cgtggttct ctttgacccc cctcaccatc ctatggttg 5340
 tgtttttctt gattttctgta aatatgcctt cgggaatctt ggccgtggtg ttattggtt 5400
 ctctttggct tttgggacgt tatactaaca ttgctggtct tgtcaccccc tatgatattc 5460
 atcattacac cagtggcccc cgcggtgttg ccgccttagc taccgcacca gatggaacct 5520
 acttggtgc cgtccgccgc gctgcgttga ctggtcgcac catgctgttc acccgtctc 5580
 agcttgggtc ccttcttgag ggctcttca gaactcgaaa gccctcactg aacaccgtca 5640
 atgtggttg gtcctccatg ggctctggtg gagtgttcac catcgacggg aaaattaggt 5700
 gcgtgactgc cgcacatgtc cttacgggta attcggctag ggtttccgga gtcggcttca 5760
 atcaaatgct tgactttgat gtgaaagggg acttcgccat agctgattgc ccgaattggc 5820
 aaggagctgc tcccaagacc caattctgcg aggatggatg ggctggccgt gcctattggc 5880
 tgaatcctc tggcgtcgaa cccggtgtta ttgggaatgg attcgcttc tgcctcaccg 5940
 cgtgcggcga ttccgggtcc ccagtgatca ccgaagctgg tgagcttgct ggcgttcaca 6000
 caggatcaaa taaacaagga ggtggcatcg tcacgcgccc ttcaggccag ttttgtaacg 6060
 tggcaccat caagctgagc gaattaagtg aattctttgc tggacccaag gtcccgctcg 6120
 gtgatgtgaa ggttggcagc cacataatta aagatacgtg cgaagtacct tcagatcttt 6180
 gcgccttgct tgctgcaaaa cctgaactgg agggaggcct ctccacgctc caacttctgt 6240
 gtgtgttttt cctactgtgg agaatgatgg gacatgcctg gacgcccttg gttgctgtgg 6300
 ggtttttcat tctgaatgag gttctcccag ctgtcctggt tcggagtgtt ttctcctttg 6360
 ggatgtttgt gctatcttgg ctacacccat ggtctgcgca agttctgatg atcaggcttc 6420
 taacagcagc tcttaacagg aacagatggt cacttgccct ttacagcctt ggtgcggtga 6480
 ccggttttgt cgcagatctt gcggcaactc aagggcaccg gttgcaggca gtaatgaatt 6540
 tgagcaccta tgccttctg cctcggatga tgggtgtgac ctcaccagtc ccagtgattg 6600
 cgtgtggtgt tgtgcaccta cttgccatca ttttgactt gttcaagtac cgcggcctgc 6660
 acaatgttct tgttggtgat ggagcgtttt ctgcagcttt cttcttgca tactttgccg 6720
 agggaaagtt gagggaaagg gtgtcgcaat cctgcggaat gaatcatgag tcatctaactg 6780
 gtgccctcgc tatgagactc aatgacgagg acttggaact ccttacgaaa tggactgatt 6840
 ttaagtgcct tgtttctgcg tccaacatga ggaatgcagc aggccaatc atcgaggctg 6900

cctatgcaaa agcacttaga attgaacttg cccagttggt gcaggttgat aaggttcgag 6960
gtactttggc caagcttgag gcttttgctg ataccgtggc accccaactc tcgcccgggtg 7020
acattgttgt tgctcttggc catagcctg ttggcagcat cttcgacctc aaggttggtg 7080
gtaccaagca tactctccaa gtcattgaga ccagagtcct tgcgggtcc aaaatgaccg 7140
tggcgcgct cgttgacca accccacgc cccaccgc acccgtgcc atccccctcc 7200
caccgaaagt tctagagaat ggtcccaacg cctgggggga tggggaccgt ttgaataaga 7260
agaagaggcg taggatggaa accgtcggca tctttgtcat ggggtgggaag aagtaccaga 7320
aatrttggga caagaattcc ggtgatgtgt ttacgagga ggtccatgac aacacagatg 7380
cgtgggagt cctcagagtt ggtgacctg ccgactttga ccctgagaag ggaactctgt 7440
gtgggcatac tactattgaa gataaggatt acaaagtcta cgcctcccca tctggcaaga 7500
agtctctggt ccccgctcaac tcagagagcg gaagagccca atgggaagct gcaaagcttt 7560
ccgtggagca ggcccttggc atgatgaatg tcgacgggtga actgacggcc aaagaagtgg 7620
agaaactgaa aagaataatt gacaaacttc agggcctgac taaggagcag tgtttaaact 7680
gctagccgcc agcggcttga cccgctgtgg tcgcgggcg cttggttgta ctgagacagc 7740
ggtaaaaaata gtcaaatctc acaaccggac ttccacccta gggcctgtga atttaaaagt 7800
ggccagttag gttgagctga aagacgcggt cgagcacaaac caacaccggg ttgcaagacc 7860
ggttgacggg ggtgttgtgc tcctgcgttc cgcagttcct tcgcttatag atgtcctgat 7920
ctccggtgct gacgcctctc ctaagttaact cgctcgtcac gggccgggga aactgggat 7980
cgatggcacg ctttgggact ttgaggccga ggccacaaa gaggaattg cactcagtgc 8040
gcaataata caggcttgtg acattaggcg cggcgacgca cctgaaattg gtctccctta 8100
caagctgtac cctgttaggg gcaaccctga gcgggtaaaa ggagttttac agaatacaag 8160
gtttggagac ataccctaca aaacccccag tgacactgga agcccagtgc acgcggtgc 8220
ctgcctcacg cccaatgcca ctccggtgac tgatgggcgc tctgtcttg ctactaccat 8280
gccctccggt tttgaattgt atgtaccgac cattccagcg tctgtccttg attatcttga 8340
ctctaggcct gactgcccga aacagttgac agagcacggc tgtgaggatg ccgcattgag 8400
agacctctcc aagtatgact tgtccacca aggttttgtt ttacctgggg ttcttcgcct 8460
tgtgcgtaag tacctgtttg cccatgtggg taagtggcg cccgttcac ggcttccac 8520
ttacctgccc aagaattcta tggctggaat aaatgggaac aggtttccaa ccaaggacat 8580
tcagagcgct cctgaaatcg acgttctgtg cgcacaggcc gtgcgagaaa actggcaaac 8640
tgttaccctc tgtaccctca agaaacagta ttgtgggaag aagaagacta ggacaatact 8700
cggcaccaat aatttcattg cgttggccca ccgggcagcg ttgagtgggt tcacccaggg 8760
cttcatgaaa aaggcgttta actcgcccat cgccctcggg aaaaacaaat ttaaggagct 8820
acagactccg gtcttaggca ggtgccttga agctgatctt gcatcctgtg atcgatccac 8880
acctgcaatt gtccgctggt ttgcccga tcttctttat gaacttgct gtgctgaaga 8940
gcacctaccg tcgtacgtgc tgaactgctg ccacgaccta ttgggtcacgc agtccggcg 9000
agtgactaag aggggtggcc tatcgtctgg cgacccgatc acttctgtgt ctaacaccat 9060
ttacagcttg gtgatatatg cacagcacat ggtgcttagt tactttaaaa gtggtcacc 9120
tcatggcctt ctgttctac aagaccagct gaagttcgag gacatgctca aagtccaacc 9180
cctgatcgtc tattcgagcg acctcgtgct gtatgccgaa tctccacca tgccgaacta 9240
ccactgggtg gtcgaacatc tgaatttgat gctgggtttt cagacggacc caaagaagac 9300
agccataacg gactcgccat ctttctagg ctgtaggata ataatggac gccagctagt 9360
cccaaccgt gacaggatcc tcgcgccct cgcttaccat atgaaggcaa gcaatgtttc 9420
tgaatactac gccggggcg ctgcaatact catggacagc tgtgcttgt tagagtatga 9480
tcctgaatgg tttgaagagc ttgtggttg gatagcgagc tgcgcccga aggacggcta 9540
cagcttccc ggcccgcgt tcttcttctc catgtgggaa aaactcagat ccaatcatga 9600
ggggaagaag tccagaatgt gcgggtattg cggggcccg gctccgtacg cactgcctg 9660
tggcctcgac gtctgtatct accacacca cttccaccag cattgtccag tcataatctg 9720
gtgtggccac ccggctgggt ctggttcttg tagtgagtgc aaaccccc tagggaaagg 9780

cacaagccct ctagatgagg tgtagaaca agtcccgtat aagcctccac ggactgtaat 9840
 catgcatgtg gagcaggggc tcaccctct tgaccaggc agataccaga ctgcccgcg 9900
 attagtctcc gttaggcgtg gcatcagagg aaacgaagt gacctaccag acggtgatta 9960
 tgctagcacc gccctactcc ccacttgtaa agagatcaac atggctcgtg tcgcctctaa 10020
 tgtgttgccg agcaggttca tcatcgggtc gcccggtgct gggaaaacat actggctcct 10080
 tcagcaggtc caggatggtg atgtcattta cacaccgact caccagacca tgctcgacat 10140
 gattagggct ttggggacgt gccggttcaa cgtcccagca ggtacaacgc tgcaattccc 10200
 tgccccctcc cgtaccggcc cgtgggttcg catcctggcc ggcggttggt gtcttggtaa 10260
 gaattccttc ctggatgaag cagcgtattg taatcacctt gatgtcttga ggctccttag 10320
 caaaaccacc cttacctgtc tgggagactt caaacaactc caccagtggt gttttgatcc 10380
 tcattgctat gtttttgaca tcatgcctca gaccagttg aagaccatct ggagattcgg 10440
 acagaacatc tgtgatgcca tccaaccaga ttacaggagc aaacttgtgt ccatggtcaa 10500
 cacaaccctg gtaacctaca tggaaaaacc tgtcaagtat gggcaagtcc tcaccctta 10560
 ccacagggac cgagaggacg gcgccatcac aattgactcc agtcaaggcg ccacatttga 10620
 tgtggttaca ctgcatttgc ccactaaaga ttcactcaac aggcaaagag cccttggtgc 10680
 tatcaccagg gcaagacatg ctatctttgt gtatgaccca cacaggcaat tgcagagcat 10740
 gtttgatctt cctgcgaagg gcacaccctg caacctcgca gtgcaccgtg atgagcagct 10800
 gatcgtactg gatagaaata ataaagaatg cacagttgct caggctatag gcaacggaga 10860
 taaattcagg gccaccgaca agcgcgttgt agattctctc cgcgccattt gtgctgatct 10920
 ggaagggtcg agctccccgc tccccagggt cgcacacaac ttgggatttt atttctcacc 10980
 tgatttgaca cagtttgcta aactcccgtt agaccttgca cccactggc ccgtggtgac 11040
 aaccagaac aatgaaaagt ggccggtatc gctggttgcc agccttcgcc ctgtccataa 11100
 gtatagccgt gcgtgcattg gtgcccgtta tatggtgggc ccctcggtgt ttctaggcac 11160
 ccctggggtc gtgtcatact acctcacaaa atttgtcaag ggcgaggctc aagtgtctcc 11220
 ggagacagtc ttcagcaccg gccgaattga ggtggattgc cgggagatc ttgatgacag 11280
 ggagcgagaa gttgctgagt ccctcccaca tgccttcatt ggcgacgtca aaggcaccac 11340
 cgttggggga tgtcatcatg tcacctcaa ataccttcg cgttccttc ccaaggaatc 11400
 agtcgcggtg gtcggggttt cgagccccgg gaaagccgca aaagcagtgt gcacattgac 11460
 ggatgtgtac ctcccagacc ttgaggccta cctccacca gagactcagt ctaagtgtctg 11520
 gaaagtatat ttggacttca aggaagttcg actgatggtc tggaaagaca agacggccta 11580
 tttccaactt gaaggccgct atttcacctg gtatcagctt gcaagctacg cctcgtacat 11640
 ccgtgttctt gtcaactcca cgggtgtatct ggaccctgc atgggccctg ccctttgcaa 11700
 cagaagagtt gtcgggtcca cccattgggg agctgacctc gcagtcaccc cttatgatta 11760
 cgtgtctaaa atcatcttgt ctacgcctta ccatggtgaa atgcctcctg gatacaagat 11820
 tctggcgtgc gcggagttct cgtcgcacga cccagtcagg taaaaaca cctgggggtt 11880
 tgaatcggat acagcgtatc tgtatgagtt caccggaaac ggtgaggact gggaggatta 11940
 caatgatgctg tttcgtgctc gccagaaagg gaaaatttat aaggccactg ctaccagcat 12000
 gaagttttat tttccccgg gccccgtcat tgaaccaact ttaggcctga attgaaatga 12060
 aatggggtct atacaaagcc tcttcgacaa aattggccag ctttttggtg atgttttcac 12120
 ggaatttttg gtgtccattg ttgatatcat catatttttg gccattttgt ttggttcac 12180
 catcgccggt tggctggtgg tcttttgcat cagattggtt tgctccgcg tattccgtgc 12240
 gcgccctgcc attcacctg agcaattaca gaagatccta tgaggccttt ctttctcagt 12300
 gccgggtgga cattcccacc tggggggtaa aacaccctt ggggatgtt tggcaccata 12360
 aggtgtcaac cctgattgat gaaatggtgt cgcgtcgaa gtaccgcac atggaaaaag 12420
 cagggaagc tgccctgaaa cagggtggtg gcgaggctac gctgtctgc attagtagtt 12480
 tggatgtggt ggctcathtt caacatcttg ccgccattga agccgagacc tgtaaattat 12540
 tggcttctcg actgcccag ctacacaacc tgcgcagac agggtaaat gtaaccatag 12600
 tgtataatag cactttaaat cagggtgttt ctatttttcc aaccctggt tcccgccaa 12660

```

agcttcatga ttttcagcaa tggctaatag ctgtacattc ctccatattt tcctctgttg 12720
cagcttcttg tactcttttt gtgtgctgtt ggttgcggtt tccaatgcta cgtactgttt 12780
ttgggttccg ctggttaggg gcaatttttc tttcgaactc atggtgaatt acacggtgtg 12840
tccaccttgc ctcacccgac aagcagccgc tgaggtcctt gaacccggtg ggtctctttg 12900
gtgcaggata gggcatgacc gatgtgggga ggacgatcac gacgaactag ggttcatggt 12960
tccgcctggc ctctccagcg aaagccactt gaccagtgtt tacgcctggt tggcgttcct 13020
gtccttcagc tacacggccc agttccatcc cgagatattt gggatagggg acgtgagtga 13080
agtttatgtt gacatcaagc accaattcat ctgcgccgtt catgacgggc agaacaccac 13140
cttgccctgc catgacaata tttcagccgt atttcagacc tactatcaac atcaggtcga 13200
cggcggaat tggtttcacc tagaatggct gcgtcccttc ttttctctt ggttggtttt 13260
aaatgtttcg tggtttctca ggcgttcgcc tgcaagccat gtttcagttc gagtctttca 13320
gacatcaaaa ccaacactac cgcagcatca ggctttgttg tcctccagga catcagctgc 13380
cttaggcatg gcgactcgtc ctttccgacg attcgcaaaa gctctcaatg ccgcacggcg 13440
ataggagacac ccgtgtatat caccatcaca gccaatgtga cagatgagaa ttacttacat 13500
tcttctgata tcctcatgct ttcttcttgc ctttctatg cttctgagat gagtgaagaa 13560
ggattcaagg tgggtgttgg caatgtgtca ggcacgtggt ctgtgtgtgt caactttacc 13620
agctacgtcc aacatgtcaa agagtttacc caacgctcct tgggtggtcga tcatgtgcgg 13680
ctgcttcatt tcatgacacc tgagaccatg aggtgggcaa ccgttttagc ctgtcttttt 13740
gccatcctac tggcaatttg aatgttcaag tatgttgggg aaatgcttga ccgcgggctg 13800
ttgctcgcga ttgctttctt tgtggtgtat cgtgccgttc tgttttgctg tgctcggcag 13860
cgccaacagc agcagcagct ctcattttca gttgatttat aacttgacgc tatgtgagct 13920
gaatggcaca gattggctgg cagaaaaatt tgattgggca gtggagactt ttgtcatctt 13980
tcccggttg actcacattg ttctctatgg tgcactcacc accagccatt tccttgacac 14040
agttgggtctg gttactgtgt ccaccgccgg gttttatcac gggcggtatg tcttgagtag 14100
catctacgog gtctgtgtct tggctgcgtt gatttgcctt gttattagtc ttgcgaagaa 14160
ctgcatgtcc tggcgctact cttgtaccag atataccaac ttccttcttg aactaagggt 14220
cagactctat cgttggcggt cggccgttat catagaaaaa gggggtaagg ttgaggtcga 14280
aggtcacctg atcgacctca aaagagttgt gcttgatggt tccgtggcaa cccctttaac 14340
cagagtttca gcggaacaat ggggtcgtct ctagacgact tttgccatga tagcacggct 14400
ccacaaaagg tgcttttggc gttttccatt acctacacgc cagtaatgat atatgctcta 14460
aaggtaagtc gcggccgact actagggctt ctgcaccttt tgatctttct gaattgtgct 14520
tttaccttgc ggtacatgac attcgagcac tttcagagca caaatagggt cgcgctcact 14580
atgggagcag tagttgcact tctttggggg gtgtactcag ccatagaaac ctggaaattc 14640
atcacctcca gatgccgttt gtgcttgcta ggccgcaagt acattctggc ccctgcccac 14700
cacgtcgaaa gtgccgcggg ctttcatccg attgcggcaa atgataacca cgcatttgtc 14760
gtccggcgct cgggctccac tacggttaac ggcacattgg tgcccgggtt gaaaagcctc 14820
gtgttggttg gcagaaaagc tgttaaacag ggagtggtaa acctgtcaa atatgccaaa 14880
taacaacggc aagcagcaaa agaaaaagaa ggggaatggc cagccagtca atcagctgtg 14940
ccagatgctg ggtaaaaatc tcgccagca aaaccagtc agaggcaagg gaccgggcaa 15000
gaaaagtaag aagaaaaacc cggagaagcc ccattttcct ctagcgaccg aagatgacgt 15060
caggcatcac ttcacccctg gtgagcggca attgtgtctg tcgtcgatcc agactgcctt 15120
taaccagggc gctggaactt gtaccctgtc agattcaggg aggataagtt acactgtgga 15180
gttttagttt cgcacgcata atactgtgcg cctgatccgc gtcacagcat caccctcagc 15240
atgatgggct ggcatctttt aggcacctca gtgtcagaat tggaagaatg tgtggtggat 15300
ggcactgatt gacattgtgc ctctaagtca cctattcaat tagggcgacc gtgtgggggt 15360
aaaatttaat tggcgagaa catgcggccg caattaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 15420
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa      15450

```

<210> 2

<211> 7494

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADNc de la fase de lectura abierta del genoma del virus SRRP

norteamericano

<400> 2

```

atgtctggga tacttgatcg gtgcacgtgc accccaatg ccaggggtgtt tatggcggag 60
ggccaagtct actgcacacg atgtctcagt gcacgggtctc tccttcctct gaatctccaa 120
gttcctgagc ttgggggtgct gggcctatct tataggcccg aagagccact ccgggtggacg 180
ttgccacgtg cattccccac tgtcgagtgc tccccgccg gggcctgctg gctttctgcg 240
atctttccaa ttgcacgaat gaccagtggg aacctgaact ttcaacaaag aatggtgcg 300
gttgacgtcg agatttacag agccggccaa ctacccctg cagttttgaa ggctctacaa 360
gtttatgaac ggggttgctg ctggtacccc attgtcggac ctgtccctgg agtggccgtt 420
cacgccaact ccctacatgt gagtgaacaa ctttcccg gagcaactca tgtgttaacc 480
aacctaccgc tcccgagag gcccaagcct gaagactttt gcccttttga gtgtgctatg 540
gctgacgtct atgacattag ccacgacgcc gtcacgtatg tggccagagg gaaagtctcc 600
tgggccctc gtggcgggga tgaagtgaac tttgaaaccg tcccgaaga gttgaagttg 660
attgcgaacc gactccacat ctcttcccg cccaccacg cagtggacat gtctgagttt 720
gccttcatac cccctgggag tgggtgtctc ttgcgggtcg agcaccaaca cggttgcctt 780
cccgtgata ctgtccctga agggaaactgc tgggtgtgct tgtttgactt gctcccaccg 840
gaagttcaga ataaagaaat tcgccgtgct aaccaatttg gctatcaaac caagcatggt 900
gtccctggca agtacctaca gcggaggctg caagttaatg gtctccgagc agtgactgat 960
acagatggac ctattgtcgt acagtacttc tctgttaggg agagttggat ccgccacttc 1020
agactggcgg aagaacctag cctccctggg ttgaaagacc tcctcagaat aagggtagag 1080
cctaatacgt cgccattggg tggcaagggt gaaaaaatct tccggtttgg cagtcacaag 1140
tggtacgggt ctggaagag agcaaggaga gcacgctctg gtgcaactgc cacggtcgct 1200
cactgcgctt tgcccgctcg cgaagcccag caggccaaga agctcgaggt tgccagcgcc 1260
aacagggctg agcatctcaa gtactattcc ccgctgccg acgggaactg tggttggcac 1320
tgcatctccg ccattaccaa ccgatgggtg aattccaaat ttgaaaccac tcttcccgag 1380
agagtgaac cttcagatga ctgggctact gacgaggatc ttgtgaatac catccaaatc 1440
ctcaggctcc ccgcccctt ggacaggaac ggtgcttggt ctggcgccaa gtacgtgctc 1500
aagctggaag gtgagcactg gaccgtctct gtgaccctg ggatgacccc ttctttgctc 1560
ccccttgaat gtgttcaggg ttgttgtag cataagagcg gtcttggtt ccagacgtg 1620
gtcgaagttt ccgatttga ccctgcctgt cttgaccgac ttgctgagat aatgcactta 1680
cctagcagtg tcatcccagc tgcctggcc gagatgtccg acgacttcaa tcgtctggct 1740
tccccggccg cactgtgtg gactgtttcg caattctttg cccgccacag aggaggagag 1800
catcctgacc aggtgtgctt agggaaaatt atcaaccttt gtcaggtgat tgaggaatgc 1860
tgctgttccc ggaacaaagc caaccgggct acccggaag aggttgccgc aaaagttgac 1920
cgtacctcc gtggtgcagc aagccttggg gaatgcttg ccaagcttga gagggctcgc 1980
ccgccgagcg cgatggacac ctctttgat tggaatgttg tgcctcctgg ggttgagacg 2040
gcggatcaga caaccaaaca gctccatgtc aaccagtgcc gcgctctggt tcctgtcgtg 2100
actcaagagc ctttgacag agactcggtc cctctgaccg cttctcgtc gtccaattgc 2160
tactaccctg cacaagggtg cgaggctcgt caccgtgaga ggctaaactc cgtgctctct 2220

```

ES 2 459 568 T3

```

aagttggagg gggttgttcg tgaggaatat gggctcacgc caactggacc tggcccgcga 2280
cccgactgc cgaacgggct cgacgagctt aaagaccaga tggaggagga tctgctgaaa 2340
ttagtcaacg cccaggcaac ttcagaaatg atggcctggg cagccgagca ggttgatcta 2400
aaagcttggg tcaaaaatta cccacggtgg acaccgccac cccctccacc aagagttcag 2460
cctcgaaaaa cgaagtctgt caagagcttg ctagagaaca agcctgtccc tgctccgcgc 2520
aggaaggtca gatctgatta tggcagcccc attttgatgg gcgacaatgt tcctaacggg 2580
tgggaagatt cgactgttgg tggccccctt gacctttcgg caccatccga gccgatgaca 2640
cctctgagtg agcctgtact tatttccagg ccagtgcacat ctttgagtgt gccggcccca 2700
gttcctgcac cgcgtagagc tgtgtctcga ccgatgcgc cctcgagtga gccaattttt 2760
gtgtctgcac tgcgacacaa atttcagcag gtggaaaaag caaatctggc ggccagcagc 2820
ccgatgtacc aggacgaacc cttagatttg tctgcacctt cacagactga atatggggct 2880
tctcccctaa caccaccgca gaacgtgggc attctggagg taagggggca agaagctgag 2940
gaagttctga gtgaaatctc ggatattctg aatgatacca accctgcacc tgtgtcatca 3000
agcagctccc tgtcaagtgt taggatcaca cgcccaaat actcagctca agccattatc 3060
gacttgggcg ggccctgcag tgggcacctc caaagggaaa aagaagcatg cctccgcac 3120
atgctgtagg cttgtgatgc ggccaagctt agtgacctg ccacgcagga atggctttct 3180
cgcagtggg atagggtgga catgctgact tggcgcaaca cgtctgctta ccaggcggtt 3240
cgcaccttag atggcagggt tgggtttctc ccaaagatga tactcgagac gccgccgcc 3300
taccctgtg gggtttgtgat gttgcctcac acccctgcac cttccgtgag tgcagagagc 3360
gacctacca tcggttcagt cgccactgaa gatattccac gcatcctcg gaaaatagaa 3420
aataccggtg agatgatcaa ccagggacct ttggcatcct ctgaggaaga accggtatac 3480
aaccaacctg ccaaagactc ccggatatcg tcgcgggggt ctgacgagag cacagcagct 3540
ccgtccgcag gtacagggtg cgccggctta tttactgatt tgccaccttc agacggcgta 3600
gatgcggacg gtggggggcc gttgcagacg gtaagaaaga aagctgaaag gctcttcgac 3660
caattgagcc gtcagggttt taacctcgtc tcccatctcc ctgttttctt ctacacctc 3720
ttcaaactctg acagtgggta ttctccgggt gattgggggt ttgcagcttt tactctattt 3780
tgcctctttt tgtgttacag ctaccattc ttccgtttcg tcccctctt ggggtgtattt 3840
tctgggtctt ctccgctgtg gcgcatggg gtttttggct gctggctggc ttttgcgtt 3900
ggcctgttca agcctgtgtc cgaccagtc ggcactgctt gtgagtttga ctgccagag 3960
tgtaggaacg tccttcattc ttttgagctt ctcaaacctt gggacctgt tcgcagcctt 4020
gttgtgggcc ccgtcgggtc cggctctgcc attcttggca ggttactggg cggggcacgc 4080
tacatctggc attttttgct taggcttggc attgttgca attgtatctt ggctggagct 4140
tatgtgcttt ctcaaggtag gtgtaaaaag tgctggggt cttgtataag aactgctcct 4200
aatgaaatcg ccttcaacgt gttccctttt acacgtgcga ccaggctgct actcatcgac 4260
ctgtgcgacg ggttttgtgc gccaaaaggc atggaccca ttttctcgc cactgggttg 4320
cgtgggtgct ggaccggccg aagtccatt gagcaacct ctgaaaaacc catcgcttc 4380
gcccagttgg atgaaaagag gattacggct agaactgtgg tcgctcagcc ttatgatcct 4440
aatcaagccg taaagtgtt gcgggtgtta caggcgggtg gggcgatggg ggccgaggca 4500
gtcccaaaag tgggtcaaagt ttctgctatt ccattccgag cccctttttt tcccaccgga 4560
gtgaaagtgt atcccgagt caggatcgtg gtcgaccccg atacttttac tacagccctc 4620
cggctctggtt actctaccac aaacctcgtc cttggtgtgg gggactttgc ccagctgaat 4680
ggactaaaaga tcaggcaaatt ttccaagcct tcgggaggag gccacacct cattgctgcc 4740
ctgcatgttg cctgctcgat ggcgttgca atgcttgcgt gggtttatgt aacttcagt 4800
gggtcttgcg gtgcggcac caacgatcca tgggtgacta atccgtttgc cgttccctggc 4860
tacggaccag gctctctctg cacgtccaga ttgtgcatct cccaacatgg ccttaccctg 4920
cccttgacag cacttggtggc gggattcggg cttcaggaaa tcgccttggg cgttttgatt 4980
ttcgtttcca tcggaggcat ggctcatagg ttgagttgta aggctgatat gctgtgcac 5040
ttacttgcaa tcgccagcta tgtttgggta ccccttacct ggttgctttg tgtgtttcct 5100

```

```

tgttggttgc gctggttctc tttgcacccc ctcaccatcc tatggttggt gtttttcttg 5160
atctctgtaa atatgccttc gggaaatcttg gccgtggtgt tattggttct tctttggctt 5220
ttgggacgtt atactaacat tgctggtcct gtcaccccct atgatattca tcattacacc 5280
agtggccccc gcggtgttgc cgccttagct accgcaccag atggaacctt cttggctgcc 5340
gtccgcgcgc ctgctgtgac tggtcgcacc atgctgttca ccccgctca gcttgggtcc 5400
cttcttgagg gcgctttcag aactcgaaag cctcactga acaccgtcaa tgtggttggg 5460
tcctccatgg gctctggtgg agtggtcacc atcgacggga aaattagggtg cgtgactgcc 5520
gcacatgtcc ttacgggtaa ttcggctagg gtttccggag tcggcttcaa tcaaagtctt 5580
gactttgatg tgaaagggga cttcgccata gctgattgcc cgaattggca aggagctgct 5640
cccaagaccc aattctgcga ggatggatgg gctggccgtg cctattggct gacatcctct 5700
ggcgtcgaac ccggtgttat tgggaatgga ttcgccttct gcttcaccgc gtgcggcgat 5760
tccgggtccc cagtgtcac cgaagctggt gagcttgtcg gcgttcacac aggatcaaatt 5820
aaacaaggag gtggcatcgt cacgcgccct tcaggccagt tttgtaacgt ggcacccatc 5880
aagctgagcg aattaagtga attctttgct ggaccaagg tcccgctcgg tgatgtgaag 5940
gttggcagcc acataattaa agatacgtgc gaagtacctt cagatctttg cgccttgctt 6000
gctgccaaac ctgaactgga gggaggcctc tccaccgtcc aacttctgtg tgtgtttttc 6060
ctactgtgga gaatgatggg acatgcctgg acgcccttgg ttgctgtggg gtttttcatt 6120
ctgaatgagg ttctcccagc tgcctggtt cggagtgttt tctcctttgg gatgtttgtg 6180
ctatcttggc tcacaccatg gtctgcgcaa gttctgatga tcaggcttct aacagcagct 6240
cttaacagga acagatggtc acttgccctt tacagccttg gtgcggtgac cggttttgtc 6300
gcagatcttg cggcaactca agggcacccg ttgcaggcag taatgaattt gagcacctat 6360
gccttcctgc ctcggatgat ggttgtgacc tcaccagtcc cagtgttgc gtgtggtgtt 6420
gtgcacctac ttgccatcat tttgtacttg ttcaagtacc gcggcctgca caatgttctt 6480
gttgggtgat gagcgttttc tgcagctttc ttcttgcat actttgccga gggaaagtgt 6540
agggaaaggg tgtcgcaatc ctgcggaatg aatcatgagt cattaactgg tgccctcgct 6600
atgagactca atgacgagga cttggacttc cttacgaaat ggactgattt taagtgtctt 6660
gtttctgctg ccaacatgag gaatgcagca ggccaattca tcgaggctgc ctatgcaaaa 6720
gcacttagaa ttgaacttgc ccagttggtg caggttgata aggttcgagg tactttggcc 6780
aagcttgagg cttttgctga taccgtggca cccaactct cgcccgtgga cattgttgtt 6840
gctcttggcc atacgcctgt tggcagcatc ttcgacctaa aggttggtgg taccaagcat 6900
actctccaag tcattgagac cagagtccct gccgggtcca aaatgaccgt ggcgcgcgtc 6960
gttgaccaa ccccccacgc cccaccgcga cccgtgccca tccccctccc accgaaagt 7020
ctagagaatg gtcccaacgc ctgggggat ggggaccgtt tgaataagaa gaagaggcgt 7080
aggatgga cgcgcggcat ctttgtcatg ggtgggaaga agtaccagaa attttgggac 7140
aagaattccg gtgatgtgtt ttacgaggag gtccatgaca acacagatgc gtgggagtgc 7200
ctcagagttg gtgaccctgc cgactttgac cctgagaagg gaactctgtg tgggcatact 7260
actattgaag ataaggatta caaagtctac gcctcccat ctggcaagaa gttcctggtc 7320
cccgtcaact cagagagcgg aagagcccaa tgggaagctg caaagcttct cgtggagcag 7380
gcccttggca tgatgaatgt cgacggtgaa ctgacggcca aagaagtgga gaaactgaaa 7440
agaataattg acaaacttca ggcctgact aaggagcagt gtttaactg cttag 7494

```

<210> 3

<211> 4392

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADNc de la fase de lectura abierta 1b del genoma del virus SRRP norteamericano

<400> 3

ES 2 459 568 T3

ggagcagtgt ttaaactgct agccgccagc ggcttgaccc gctgtggtcg cggcggcttg 60
 gttgttactg agacagcggg aaaaatagtc aaatttcaca accggacttt caccctaggg 120
 cctgtgaatt taaaagtggc cagtgaggtt gagctgaaag acgcggtcga gcacaacca 180
 cacccggttg caagaccggg tgacgggtgg gttgtgctcc tgcgttcgc agttccttcg 240
 cttatagatg tcctgatctc cgggtgctgac gcatctccta agttactcgc tcgtcacggg 300
 ccggggaaca ctgggatcga tggcacgctt tgggactttg aggccgaggc caccaaagag 360
 gaaattgcac tcagtgcgca aataatacag gcttgtgaca ttaggcgcgg cgacgcacct 420
 gaaattgggtc tcccttataa gctgtaccct gttaggggca accctgagcg ggtaaaagga 480
 gttttacaga atacaagggt tggagacata ccttataaaa cccccagtga cactggaagc 540
 ccagtgcacg cggctgcctg cctcacgccc aatgccactc cgggtgactga tgggcgctct 600
 gtcttggtta ctaccatgcc ctccggtttt gaattgtatg taccgacctt tccagcgtct 660
 gtccttgatt atcttgactc taggcctgac tgcacaaac agttgacaga gcacggctgt 720
 gaggatgccg cattgagaga cctctccaag tatgacttgt ccaccaagg ctttgtttta 780
 cctgggggttc ttgccttgtt gcgtaagtac ctgtttgccc atgtgggtta gtgcccggcc 840
 gttcatcggc cttccactta cctgccaag aattctatgg ctggaataaa tgggaacagg 900
 tttccaacca aggacattca gagcgtccct gaaatcgacg ttctgtgctc acaggccgtg 960
 cgagaaaact ggcaaaactgt tacccttgtt accctcaaga aacagtattg tgggaagaa 1020
 aagactagga caatactcgg caccaataat ttcattgcgt tggcccaccg ggcagcgttg 1080
 agtgggtgca cccagggtct catgaaaaag gcgtttaact cgcccatcgc cctcgggaaa 1140
 aacaaattta aggagctaca gactccggtc ttaggcaggg gccttgaagc tgatcttgca 1200
 tcctgtgatc gatccacacc tgcaattgtc cgctgggttg ccgccaatct tctttatgaa 1260
 cttgcctgtg ctgaagagca cctaccgtcg tacgtgctga actgctgcca tgacctattg 1320
 gtcacgcagt ccggcgagc gactaagagg ggtggcctat cgtctggcga cccgatcact 1380
 tctgtgtcta acaccattta cagcttggtg atatatgcac agcacatggt gcttagttac 1440
 t-taaaagtg gtcaccctca tggccttctg ttcctacaag accagctgaa gttcgaggac 1500
 atgctcaaag tccaaccctt gatcgtctat tcggacgacc tcgtgctgta tgccgaatct 1560
 cccaccatgc cgaactacca ctggtgggtc gaacatctga atttgatgct gggttttcag 1620
 acggacccaa agaagacagc cataacggac tcgccatcat ttctaggctg taggataata 1680
 aatggacgcc agctagtccc caaccgtgac aggatcctcg cggccctcgc ttaccatattg 1740
 aaggcaagca atgtttctga atactacgcc gcggcggctg caatactcat ggacagctgt 1800
 gcttgttttag agtatgatcc tgaatgggtt gaagagcttg tgggtgggat agcgcagtgc 1860
 gcccgcaagg acggctacag ctttcccggc ccgccgttct tcttgtccat gtgggaaaaa 1920
 ctacagatcca atcatgaggg gaagaagtcc aāaatgtgcg ggtattgcgg gggcccggt 1980
 ccgtacgcca ctgcctgttg cctcgacgtc tgtatttacc acaccactt ccaccagcat 2040
 tgtccagtca taatctggtg tggccacccg gctggttctg gttcttgtag tgagtgaaa 2100
 cccccctag ggaaaggcac aagccctcta gatgaggtgt tagaacaagt cccgtataag 2160
 cctccacgga ctgtaatcat gcatgtggag cagggtctca cccctcttga cccaggcaga 2220
 taccagactc gccgcggatt agtctccgtt aggcgtggca tcagaggaaa cgaagttgac 2280
 ctaccagacg gtgattatgc tagcaccgcc ctactcccca cttgtaaaga gatcaacatg 2340
 gtcgctgtcg cctctaattg gttgcgcagc aggttcatca tcgggtccgc cgggtgctggg 2400
 aaaacatact ggctccttca gcagggtccag gatggtgatg tcatttacac accgactcac 2460
 cagaccatgc tcgacatgat tagggctttg gggacgtgcc ggttcaacgt cccagcaggt 2520
 acaacgtgc aattccctgc cccctcccg accggcccg gggttcgcat cctggccggc 2580
 ggttgggtgc ctggttaagaa ttccttctg gatgaagcag cgtattgtaa tcaccttgat 2640

```

gtcttgaggc tccttagcaa aaccaccctt acctgtctgg gagacttcaa acaactccac 2700
ccagtgggtt ttgattctca ttgctatgtt tttgacatca tgcctcagac ccagttgaag 2760
accatctgga gattcggaca gaacatctgt gatgccatcc aaccagatta cagggaacaaa 2820
cttgtgtcca tgggtcaacac aaccctgtga acctacatgg aaaaacctgt caagtatggg 2880
caagtcctca ccccttacca cagggaccga gaggacggcg ccatcacaat tgactccagt 2940
caaggcgcca catttgatgt ggttacactg catttgccca ctaaagattc actcaacagg 3000
caaagagccc ttgttgctat caccagggca agacatgcta tctttgtgta tgaccacac 3060
aggcaattgc agagcatgtt tgatcttcct gcgaagggca caccctgcaa cctcgcagt 3120
caccgtgatg agcagctgat cgtactggat agaaataata aagaatgcac agttgctcag 3180
gctataggca acggagataa attcagggcc accgacaagc gcgttgtaga ttctctccgc 3240
gccatttgtg ctgatctgga agggtcgagc tccccgctcc ccaaggctgc acacaacttg 3300
ggattttatt tctcacctga tttgacacag tttgctaaac tcccggtaga ccttgacccc 3360
cactggcccc tgggtgacaac ccagaacaat gaaaagtggc cgcatcggtt ggttgccagc 3420
cttcgccttg tccataagta tagcctgctg tgcattgggt ccggtatat ggtgggcccc 3480
tcgggtgttc taggcacccc tggggtcgtg tcatactacc tcacaaaatt tgtcaagggc 3540
gaggctcaag tgcttcgga gacagtcttc agcaccggcc gaattgaggt ggattgccgg 3600
gagtatcttg atgacaggga gcgagaagtt gctgagctcc tcccacatgc cttcattggc 3660
gacgtcaaag gcaccaccgt tgggggatgt catcatgtca cctccaaata ccttcgcgc 3720
ttccttccca aggaatcagt cgcggtagtc ggggtttcga gccccgggaa agccgcaaaa 3780
gcagtgtgca cattgacgga tgtgtacctc ccagacctg aggcctacct ccaccagag 3840
actcagtcta agtgctggaa agttatgttg gacttcaagg aagttcgact gatggctctg 3900
aaagacaaga cggcctatct ccäacttgaa ggccgctatt tcacctggtt tcagcttgca 3960
agctacgcct cgtacatccg tgttcctgtc aactccacgg tgatatctgga cccctgcatg 4020
ggccctgccc tttgcaacag aagagttgtc ggggtccacc attggggagc tgacctcgca 4080
gtcacccttt atgattacgg tgctaaaatc atcttgtcta gcgcttacca tgggtgaaatg 4140
cctcctggat acaagattct ggctgctgcg gagttctcgc tcgacgacct agtcaagtac 4200
aaacacacct ggggttttga atcgatata gcgtatctgt atgagttcac cggaaacgg 4260
gaggactggg aggattacaa tgatgcgttt cgtgcgcgcc agaaagggaa aatttataag 4320
gccactgcta ccagcatgaa gttttatatt cccccgggcc ccgtcattga accaacttta 4380
ggcctgaatt ga
4392

```

<210> 4

<211> 771

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADNc de la fase de lectura abierta 2 del genoma del virus SRRP
norteamericano

10

<400> 4

```

atgaaatggg gtctatacaa agcctcttcg acaaaattgg ccagcttttt gtggatgctt 60
tcacggaatt tttggtgtcc attgttgata tcatcatatt tttggccatt ttgtttggct 120
tcaccatcgc cggttggctg gtggtctttt gcatcagatt ggtttgctcc gcggtattcc 180
gtgcgcgccc tgccattcac cctgagcaat tacagaagat cctatgaggc ctttctttct 240
cagtgcgggg tggacattcc cacctggggg gtaaaacacc ctttggggat gttttggcac 300
cataagggtg caaccctgat tgatgaaatg gtgtcgcgtc gaatgtaccg catcatggaa 360
aaagcagggc aagctgcctg gaaacaggtg gtgagcgagg ctacgctgtc tcgcatagat 420
agtttgatg tgggtggctca ttttcaacat cttgccgcca ttgaagccga gacctgtaaa 480
tatttggtt ctcgactgcc catgctacac aacctgcgca tgacagggtc aaatgtaacc 540
atagtgata atagcacttt aaatcaggtg tttgctatct ttccaacccc tggttccccg 600
ccaaagcttc atgattttca gcaatggcta atagctgtac attcctccat attttcctct 660
gttgcaagct cttgtactct tttgtgtgtg ctgtgggtgc gggttccaat gctacgtact 720
gtttttggtt tccgctgggt aggggcaatt tttctttcga actcatggtg a 771

```

<210> 5
 <211> 765
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADNc de la fase de lectura abierta 3 del genoma del virus SRRP
 norteamericano

10

<400> 5

```

    atggctaata gctgtacatt cctccatatt ttcctctggt gcagcttctt gtactctttt 60
    tgttgtgctg tgggtgctgg ttccaatgct acgtactggt tttggtttcc gctgggttagg 120
    ggcaattttt ctttcgaact catggtgaat tacacggtgt gtccaccttg cctcaccoga 180
    caagcagccg ctgaggtcct tgaacccggt aggtctcttt ggtgcaggat agggcatgac 240
    cgatgtgggg aggacgatca cgacgaacta gggttcatgg ttccgccttg cctctccagc 300
    gaaagccact tgaccagtgt ttacgcctgg ttggcggttcc tgccttcag ctacacggcc 360
    cagttccatc ccgagatatt tgggataggg aacgtgagtg aagtttatgt tgacatcaag 420
    caccaattca tctgcgccgt tcatgacggg cagaacacca ccttgcctcg ccatgacaat 480
    atttcagccg tatttcagac ctactatcaa catcaggtcg acggcggaac ttggtttcac 540
    ctagaatggc tgcgtccctt cttttcctct tggttgggtt taaatgtttc gtggtttctc 600
    aggcgttcgc ctgcaagcca tgtttcagtt cgagtctttc agacatcaaa accaactacta 660
    ccgcagcatc aggttttgtt gtcctccagg acatcagctg ccttaggcat ggcgactcgt 720
    cttttccgac gattcgcaaa agctctcaat gccgcacggc gatag 765
  
```

<210> 6
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADNc de la fase de lectura abierta 4 del genoma del virus SRRP
 norteamericano

20

<400> 6

```

    atggctgctg cccttctttt cctcttggtt ggttttaaata gtttcgtggt ttctcaggcg 60
    ttcgcctgca agccatgttt cagttcgagt ctttcagaca tcaaaaccaa cactaccgca 120
    gcatcaggct ttgttgtcct ccaggacatc agctgcctta ggcatggcga ctcgctcctt 180
    ccgacgattc gcaaaagctc tcaatgccgc acggcgatag ggacaccctg gtatatcacc 240
    atcacagcca atgtgacaga tgagaattac ttacattctt ctgatctcct catgctttct 300
    tcttgccttt tctatgcttc tgagatgagt gaaaagggat tcaagggtgg gtgttggaat 360
    gtgtcaggca tcgtggctgt gtgtgtcaac tttaccagct acgtccaaca tgtcaaagag 420
    tttacccaac gctccttggt ggtcgatcat gtgcggctgc ttcatttcat gacacctgag 480
    accatgaggt gggcaaccgt tttagcctgt ctttttgcca tcctactggc aatttga 537
  
```

<210> 7
 <211> 603
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADNc de la fase de lectura abierta 5 del genoma del virus SRRP
 norteamericano

35

<400> 7

ES 2 459 568 T3

```

atgttgggga aatgcttgac cgcgggctgt tgctcgcgat tgctttcttt gtggtgtatc 60
gtgccgttct gttttgctgt gctcggcagc gccaacagca gcagcagctc tcattttcag 120
ttgatttata acttgacgct atgtgagctg aatggcacag attggctggc agaaaaattt 180
gattgggcag tggagacttt tgtcatcttt cccgtgttga ctcacattgt ttcttatggt 240
gcactcacca ccagccattt ccttgacaca gttggtctgg ttactgtgtc caccgcccgg 300
ttttatcacg ggcggtatgt cttgagtagc atctacgcgg tctgtgctct ggctgcgttg 360
atgtgcttcg ttattaggct tgcgaagaac tgcattgtcct ggcgctactc ttgtaccaga 420
tataccaact tccttctgga cactaagggc agactctatc gttggcggtc gcccgttatc 480
atagaaaaag ggggtaaggt tgaggtcgaa gggtcacctga tcgacctcaa aagagttgtg 540
cttgatgggt ccgtggcaac ccctttaacc agagtttcag cggaacaatg gggtcgtctc 600
tag 603

```

<210> 8
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADNc de la fase de lectura abierta 6 del genoma del virus SRRP
 norteamericano

<400> 8

```

atggggctgt ctctagacga cttttgccat gatagcacgg ctccacaaaa ggtgcttttg 60
gcgttttcca ttacctacac gccagtaatg atatatgctc taaaggtaag tcgcggccga 120
ctactagggc ttctgcacct tttgatcttt ctgaattgtg cttttacctt cgggtacatg 180
acattcgagc actttcagag cacaatatag gtcgcgctca ctatgggagc agtagttgca 240
cttctttggg ggggtgtactc agccatagaa acctggaaat tcatcacctc cagatgccgt 300
ttgtgcttgc taggccgcaa gtacattctg gccctgccc accacgtcga aagtgccgcg 360
ggctttcatc cgattgcggc aatatgataac .cacgcatttg tcgtccggcg tcccggctcc 420
actacggtta acggcacatt ggtgcccggg ttgaaaagcc tcgtgttggg tggcagaaaa 480

```

```

gctgttaaac agggagtggg aaaccttgct aaatatgcca aataa 525

```

<210> 9
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADNc de la fase de lectura abierta 7 del genoma del virus SRRP
 norteamericano

<400> 9

```

atgccaaata acaacggcaa gcagcaaaaag aaaaagaagg ggaatggcca gccagtcaat 60
cagctgtgcc agatgctggg taaaatcatc gccagcaaaa accagtccag aggcaaggga 120
ccgggcaaga aaagtaagaa gaaaaacccg gagaagcccc attttcctct agcgaccgaa 180
gatgacgtca ggcattcactt caccctgggt gagcggcaat tgtgtctgtc gtcgatccag 240
actgccttta accagggcgc tggaacttgt accctgtcag attcagggag gataagttac 300
actgtggagt ttagtttgcc gacgcattcat actgtgcgcc tgatccgcgt cacagcatca 360
ccctcagcat ga 372

```

<210> 10
 <211> 18
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena directa, usado para determinar el ADNc correspondiente al genoma del virus SRRP norteamericano

5

<400> 10
acagtttgt gatctatg 18

10

<210> 11
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena inversa, usado para determinar el ADNc correspondiente al genoma del virus SRRP norteamericano

20

<400> 11
cagattcaga tgttcaa 17

25

<210> 12
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, usado para determinar el ADNc correspondiente al genoma del virus SRRP norteamericano

35

<400> 12
acctcgtgct gtagccgaa tctc 24

40

<210> 13
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, usado para determinar el ADNc correspondiente al genoma del virus SRRP norteamericano

50

<400> 13
tcagggcczaa agttgggtca atga 24

55

<210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena directa, usado para determinar el ADNc correspondiente al genoma del virus SRRP norteamericano

65

<400> 14
gatgactggg ctactgacga ggat 24

60

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

65

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena inversa, usado para determinar el ADNc correspondiente al genoma del virus SRRP norteamericano

<400> 15
 agagcggctg g gatgacact g 21

 5 <210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, usado para determinar el ADNc correspondiente al
 genoma del virus SRRP norteamericano

 15 <400> 16
 ccggggaagc cagacgattg aa 22

 20 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, usado para determinar el ADNc correspondiente al
 genoma del virus SRRP norteamericano

 30 <400> 17
 agggggagca aagaaggggt catc 24

 35 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena directa, usado para determinar el ADNc
 correspondiente al genoma del virus SRRP norteamericano

 45 <400> 18
 agcacgctct ggtgcaactg 20

 50 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena inversa, usado para determinar el ADNc
 correspondiente al genoma del virus SRRP norteamericano

 60 <400> 19
 gccgcggcgt agtattcag 19

 65 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena directa, usado para determinar el ADNc
 correspondiente al genoma del virus SRRP norteamericano

 <400> 20
 cgcgtcacag catcacctc ag 22

 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena inversa, usado para determinar el ADNc correspondiente al genoma del virus SRRP norteamericano

5

<400> 21
cggtagggtg gttaacacat gagtt 25

10

<210> 22
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena inversa, usado para determinar el ADNc correspondiente al genoma del virus SRRP norteamericano

20

<400> 22
tggctcttcg ggcctataaa ata 23

25

<210> 23
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cadena del adaptador bicatenario sintético usado en pT7P129A.

30

<400> 23
ctagattaat taatacgact cactataggg atgacgtata ggtgttggtc ctatgc 56

35

<210> 24
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cadena del adaptador bicatenario sintético usado en pT7P129A.

40

<400> 24
taattaatta tgctgagtg tatccctact gcatatccac aaccgagata cgggtgc 56

45

<210> 25
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena directa, usado en la preparación de pT7P129A.

<400> 25
actcagtcta agtgctggaa agttatg 27

55

<210> 26
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena inversa, usado en la preparación de pT7P129A.

<400> 26
gggatttaaa tatgcatttt tttttttt ttttttaaat tgcggccgca tggttctcg 59

65

<210> 27

ES 2 459 568 T3

	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena directa, usado para sintetizar la región flanqueante cadena arriba de la ORF7 del virus de SRRP norteamericano.	
10	<400> 27 attagatctt gccacatgg tggggaaatg cttgac	36
	<210> 28	
	<211> 46	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena inversa, usado para sintetizar la región flanqueante cadena arriba de la ORF7 del virus de SRRP norteamericano.	
20	<400> 28 ctttacgcgt ttgcttaagt tattggcgt attgacaag gtttac	46
	<210> 29	
25	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena directa, usado para sintetizar la región flanqueante cadena abajo de la ORF7 del virus de SRRP norteamericano	
35	<400> 29 caacacgcgt cagcaaaaga aaaagaaggg g	31
	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, cadena inversa, usado para sintetizar la región flanqueante cadena abajo de la ORF7 del virus de SRRP norteamericano	
45	<400> 30 gcgcttggc cgattcatta	20
	<210> 31	
	<211> 37	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador superior usado en la preparación de pCMV-S-P129.	
	<400> 31 ctcgtaatt aaaccgtcat gacgtatagg tgttggc	37
	<210> 32	
60	<211> 3796	
	<212> ADN	
	<213> Plásmido	
	<220>	
65	<223> Descripción del plásmido: pCMV-MC1	

<400> 32

```

gaattcgagc ttgcatgcct gcaggtcggt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc 60
tgaccgcca acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg 120
ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg 180
gcagtacatc aagtgtatca tatgccagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa 240
tgccccgcct ggcatatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac 300
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg 360
cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg 420
agtttgtttt ggacacaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc 480
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta 540
gtgaaccgtc agatcgctg gagacgcat ccacgctggt ttgacctcca tagaagacac 600
cgggaccgat ccagcctccg gactctagag gatccggtac tcgaggaact gaaaaaccag 660
aaagttaact ggtaagttta gtctttttgt cttttatttc aggtcccgga tccggtggtg 720
gtgcaaatca aagaactgct cctcagtggg tggtgccttt acttctaggc ctgtacggaa 780
gtgttacttc tgctctaaaa gctgcggaat tgtaccgcg gccgcaagat atcgccctag 840
gaagatctcg atcgattggt accaatccgc gacccttaa ttaacagcta gcggatttaa 900
atcagggccc gggatactag tgagcgccg cggggatcca gacatgataa gatacattga 960
tgagtttgga caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg 1020
tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta acaacaacaa 1080
ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg gaggtttttt cggatcctct 1140
agagtcgacc tgcaggcatg caagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg 1200
aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc 1260
ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgttt 1320

```

```

ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagaggg 1380
cggtttgctg attgggcgct ctccgccttc ctgcctcact gactcgtgc gctcggctgt 1440
tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc 1500
aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 1560
aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa 1620
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 1680
ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc 1740
cgccctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag 1800
ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga 1860
ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagac acgacttatc 1920
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 1980
agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg 2040
cgctctgctg aagccagtta ccttcgga aaagagttgg agctcttgat ccggcaaaaca 2100
aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 2160
aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 2220
ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 2280
aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag 2340
ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacgcgac tgtctatttc gttcatccat 2400
agttgcctga ctcccgcgtg tgtagataac tacgatacgg gagggccttac catctggccc 2460
cagtgtctga atgataccgc gagaccacg ctaccgggt ccagatttat cagcaataaa 2520
ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca 2580
gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa 2640
cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggg gtcacgctcg tcgtttggtg tggcttcatt 2700
cagctccggt tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc 2760
ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgag tgttatcact 2820
catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc 2880
tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg 2940
ctcttgcccc gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgt 3000
catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc 3060
cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag 3120
cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaaggga taaggcgac 3180
acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg 3240
ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt 3300
tccgcgcaca ttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac 3360
attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt ctgcgcggtt tcggtgatga 3420
cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc tgtaagcggg 3480
tgccgggagc agacaagccc gtcaggggcg gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggctg 3540
gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatatgc ggtgtgaaat 3600
accgcacaga tgcgtaagga gaaaataacc catcaggcgc cattcgccat tcaggctgcg 3660
caactgttgga gaaggcgat cgggtgcggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 3720
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cagcagttg 3780
taaaacgacg gccagt
3796

```

<210> 33

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cadena de engarce sintético usada en la preparación de pCMV-S-P129.

<400> 33
 cgtaaattaa accgactagt gc 22

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

10
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cadena de engarce sintético usada en la preparación de pCMV-S-P129.

15
 <400> 34
 tcgagcaatt aatttgctg atcacgccgg 30

20
 <210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador inferior usado en la preparación de pCMV-S-P129.

30
 <400> 35
 cggggacggt tcaaatttc actt 24

35
 <210> 36
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Parte del plásmido pCMV-S-P129, en dirección 5' a 3', inmediatamente anterior al genoma P129.

45
 <400> 36
 tatataagca gagctcgta attaaaccgt catgacgtat aggtgttggc 50

50
 <210> 37
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, directo, usado para sintetizar la región flanqueante cadena arriba de la ORF4

60
 <400> 37
 aggtcgacgg cggcaattgg ttacacctag agtggctgcg tcccttct 48

65
 <210> 38
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, inverso, usado para sintetizar la región flanqueante cadena arriba de la ORF4

75
 <400> 38
 tcttaagcat tggctgtgat ggtgatatac 30

80
 <210> 39
 <211> 44
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, directo, usado para sintetizar la región flanqueante cadena abajo de la ORF4

<400> 39
cttcttaagt ccacgcgttt tcttctgcc tttctatgc ttct 44

10 <210> 40
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, inverso, usado para sintetizar la región flanqueante cadena abajo de la ORF4

20 <400> 40
tgcccgggtcc ctgcctct 19

<210> 41
<211> 26
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, directo, usado para sintetizar la región flanqueante cadena abajo de la ORF4

<400> 41
gtttacgcgt cgctccttgg tggctg 26

35 <210> 42
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, directo, usado para sintetizar la región flanqueante cadena arriba del sitio de inserción entre la ORF1b y ORF2

45 <400> 42
aacagaagag ttgtcgggtc cac 23

<210> 43
<211> 49
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, inverso, usado para sintetizar la región flanqueante cadena arriba del sitio de inserción entre la ORF1b y ORF2

55 <400> 43
gctttgacgc gtccccactt aagttcaatt caggcctaaa gttggttca 49

60 <210> 44
<211> 82
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, directo, usado para sintetizar la región flanqueante cadena abajo del sitio de inserción entre la ORF1b y ORF2

ES 2 459 568 T3

<400> 44

```
gcgacgcgtg ttccgtggca acccctttaa ccagagtttc agcggaacaa tgaaatgggg 60
tctatacaaa gcctcttcga ca 82
```

- 5 <210> 45
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador, inverso, usado para sintetizar la región flanqueante
cadena abajo del sitio de inserción entre la ORF1b y ORF2
- 15 <400> 45
aacagaacgg cacgatacac cacaaa 26

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN en la que dicha secuencia de ADN es al menos un 85% idéntica a la secuencia SEC ID N° 1.
- 5 2. Una molécula infecciosa de ARN aislada codificada por una molécula de polinucleótido aislada de acuerdo con la reivindicación 1, en que la molécula infecciosa de ARN codifica un virus SRRP norteamericano.
3. Una molécula de polinucleótido aislada de acuerdo con la reivindicación 1 en forma de plásmido.
4. Una célula huésped transfectada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN, en la que dicha secuencia de ADN es al menos un 85% idéntica a la SEC ID N° 1.
- 10 5. Un plásmido capaz de transfectar directamente una célula huésped adecuada y expresar un virus de los *Nidovirales* a partir de la célula huésped así transfectada, dicho plásmido comprende a) una secuencia de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica virus de los *Nidovirales*, teniendo dichas secuencias de ADN una secuencia con al menos un 85% de identidad secuencial con la secuencia SEC ID N° 1 y b) un promotor capaz de transcribir dicha molécula infecciosa de ARN en dicha célula huésped adecuada.
- 15 6. Un procedimiento para generar un virus de los *Nidovirales*, en el que el procedimiento comprende transfectar una célula huésped adecuada con un plásmido de acuerdo con la reivindicación 5 y obtener virus generados por la célula huésped transfectada.
- 20 7. Una molécula de polinucleótido aislada que comprende una molécula de ADN que codifica una molécula infecciosa de ARN que codifica un virus SRRP norteamericano que está modificado genéticamente, de forma que carece de epítipo antigénico detectable, en la que dicha secuencia de ADN es al menos un 85% idéntica a la SEC ID N° 1 pero carece de una o más secuencias de ADN que codifican un epítipo detectable.

FIG. 1

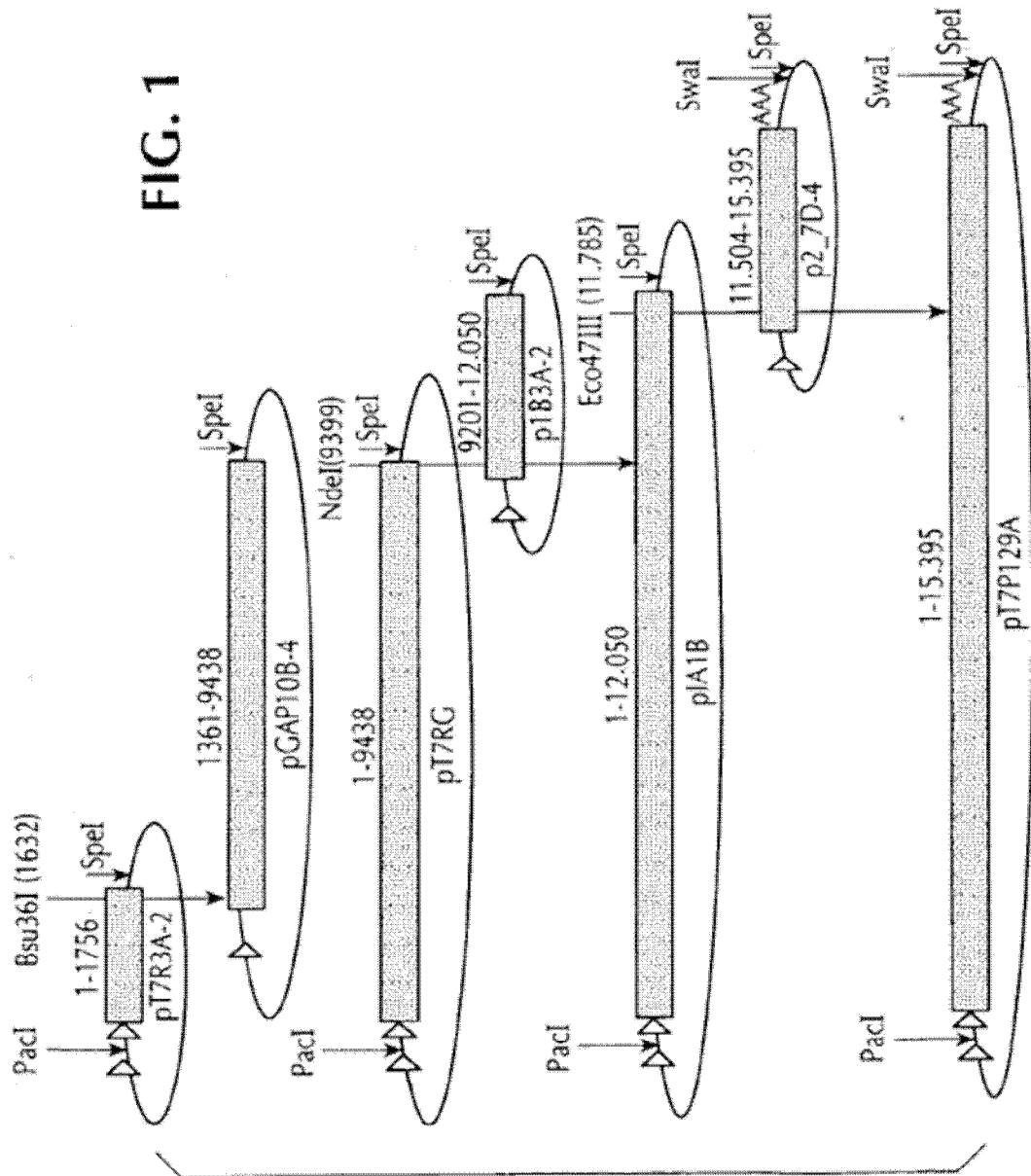


FIG. 2

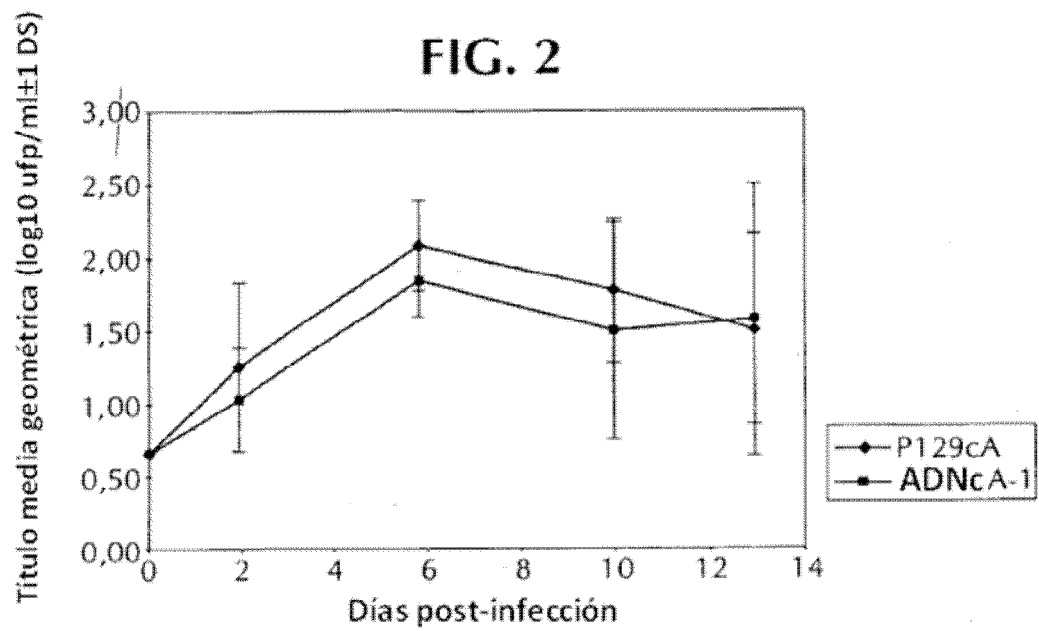


FIG. 3

