

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 760**

51 Int. Cl.:

C12N 15/34 (2006.01)
C07K 14/01 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.1998 E 10012196 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2363488**

54 Título: **Virus del síndrome del desmedro multisistémico post-destete procedente de cerdos**

30 Prioridad:

11.12.1997 US 69233 P
16.12.1997 US 69750 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.01.2015

73 Titular/es:

MERIAL (33.3%)
29, Avenue Tony Garnier
69007 Lyon, FR;
THE QUEEN'S UNIVERSITY OF BELFAST (33.3%) y
UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN (33.3%)

72 Inventor/es:

WANG, LI;
BABIUK, LORNE A.;
POTTER, ANDREW A. y
WILLSON, PHILIPP

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 526 760 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

Virus del síndrome del desmedro multisistémico post-destete procedente de cerdos

5 Campo de la técnica

La presente descripción se refiere en general a virus. Más particularmente, la presente descripción se refiere al aislamiento y caracterización de nuevos aislados de circovirus porcino (PCV) procedentes de cerdos que muestran el síndrome del desmedro multisistémico post-destete (PMWS).

10

Antecedentes de la invención

El síndrome del desmedro post-destete (PMWS) es una enfermedad de los cerdos de reciente aparición. El PMWS parece destruir el sistema inmune del huésped y provoca una elevada tasa de mortalidad en los cerdos destetados.

15

Esta enfermedad conlleva un largo período de incubación, habitualmente entre 3 y 8 semanas y afecta a muchos órganos de los cerdos infectados. Los lechones infectados por PMWS mueren como consecuencia de fallo respiratorio y neumonía intersticial con infiltración de células histiocíticas.

20

El circovirus porcino (PCV) provoca infección a nivel mundial en cerdos y resulta altamente contagioso. El PCV fue detectado inicialmente como un contaminante no citopático de líneas celulares de riñón porcino (PK15). El PCV ha sido clasificado en la nueva familia de virus Circoviridae. Estos virus son agentes no envueltos, pequeños, con un genoma de DNA circular de hebra única.

25

Se ha identificado una diversidad de circovirus en una gama de especies animales, en la cual se incluye el PCV, el virus de anemia del pollo (CAV), el virus de la enfermedad de pico y pluma (BFDV) de pájaros psittacine, virus de plantas, que incluyen el virus de atrofia del trébol subterráneo (SCSV), el virus de putrefacción foliar del coco (CFDV) y el virus superior racimoso de banana (BBTV). No parecen existir homologías de secuencia de DNA o determinantes antigénicos comunes entre los circovirus reconocidos habitualmente. Todd et al., (1991) Arch. Virol. 117: 129-135.

30

Se ha demostrado que miembros de la familia de circovirus provocan anemia, enfermedades relacionadas con inmunodeficiencia e infectan células macrófago in vitro. Tan solo recientemente se ha involucrado al PCV con la PMWS. Ver, por ejemplo, Ellis et al., (1998) Can. Vet. J. 39: 44-51 y Gopi et al., (1997) Can. Vet. J. 38: 385-386. No obstante, la asociación etiológica de PCV con PMWS ha sido cuestionada debido a la presencia omnipresente de PCV en la población porcina. Adicionalmente, infecciones experimentales de cerdos con inoculados de PCV, procedentes de cultivos celulares PK15 contaminados han fracasado en la generación de enfermedades clínicas. Ver, por ejemplo, Tischer et al. (1986) Arch. Virol.91: 271-276.

35

40

Los agentes infecciosos de cerdos, especialmente los virus, no tan solo afectan profundamente a la industria agrícola sino que representan potenciales riesgos para la salud pública para humanos, debido al creciente interés en la utilización de órganos de cerdo para xenotransplantes en humanos. El diagnóstico previa de la enfermedad PMWS ha sido basada en el examen histopatológico. Por consiguiente, existe la necesidad de mejorar procedimientos para diagnosticar la presencia de patógenos asociados a PMWS, al igual que para evitar la enfermedad PMWS.

45

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido de circovirus porcino del tipo II (PCVII) inmunogénico aislado que comprende:

50

(a) MPSKKNRSG PQPHKRWVFT LNNPSEDERK KIRELPISLF DYFIVGEEGN EEGRTPHLQG FANFVKKQTF NKVKWYLGAR CHIEKAKGTD QQNKEYCSKE GNLLIECGAP RSQQQRSDLS TAVSTLLESG ILVTVAKQHP VTFVKNFRGL AELLKVSGKM QKRDWKTNVH FIVGPPGCGK SKWAANFANP ETTYWKPPKN KWWDGYPHGEK VVVIDDFYGW LPWDDLRLC DRYPLTVKTK GGTVPFLARS ILITSNQTPL EWYSSTAVPA VEALYRRITS LVFWKNATKQ STEEGGQFVT LSPPCPEFPY EINY (ORF1); o

55

(b) un polipéptido derivado de ORF1 que tiene al menos el 98% de identidad con la longitud completa de ORF1; o (c) un polipéptido derivado de ORF1 que tiene al menos el 90% de identidad con la longitud completa de ORF1; en el que dicho polipéptido no es

60

65

MPSKKNRSGPQPHKRWVFTLNNPSEDERKKIRDLPISLFDYFIVGEEGNEEGRTPHLQG
 5 FANFVKKQTFNKVKWYLGARCHIEKAKGTDQONKEYCSKEGNLLMECGAPRSQGQSDLS
 TAVSTLLESGSLVTVAEQHPVTFVRNFRGLAELLKVS GKMQRDWKTNVHVIVGPPGCGK
 SKWAANFADPETTYWKPPRNKWW DGYHGEEVVVIDDFYGWLPWDDLLRLCDRYPLTVETK
 10 GGTVPFLARSILITSNQTPLEWYSSTAVPAVEALYRRITSLVFWKNATEQSTEEGGQFVT
 LSPPCPEFPYEINY,

o

MPSKKNRSGPQPHKRWVFTLNNPSEDERKKIRELPISLFDYFIVGEEGXEEEXRTPHLQG
 20 FANFVKKQTFNKVKWYLGARCHIEKAKGTDQONKEYCSKEGNLLIECGAPRSQGQSDLS
 TAVSTLLESGSLVTVAEQHPVTFVRNFRGLAELLKVS GKMQRDWKTNVHVIVGPPGCGK
 SKWAANFADPETTYWKPPRNKWW DGYHGEEVVVIDDFYGWLPWDDLLRLCDRYPLTVETK
 25 GGTVXXXARSILITSNQTPLEWYSSTAVPAVEALYRRITSLVFWKNATEQSTEEGGQXVT
 LSPPCPEFPYEINY;

o

30 (d) una proteína de fusión que comprende cualquiera de (a) a (c).

La presente invención, en un aspecto adicional, se refiere a un vector recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido PCVII inmunogénico de la presente invención.

35 La presente invención, en otro aspecto, se refiere a una célula huésped recombinante con el vector de la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido PCVII inmunogénico y un vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable; en la que el polipéptido PCVII
 40 inmunogénico comprende:

(a) MPSKKNRSGPQPHKRWVFTLNNPSEDERK KIRELPISLFDYFIVGEEGN EGRTPHLQG FANFVKKQTF
 NKVKWYLGAR CHIEKAKGTD QONKEYCSKE GNLLIECGAP RSQGQSDLS TAVSTLLESG ILTVAKQHP
 VTFVKNFRGL AELLKVS GKM QRDWKTNVH FIVGPPGCGK SKWAANFANP ETTYWKPPKN KWW DGYHG EK
 45 VVVIDDFYGW LPWDDLLRLC DRYPLTVKTK GGTVPFLARS ILITSNQTPL EWYSSTAVPA VEALYRRITS
 LVFWKNATKQ STEEGGQFVT LSPPCPEFPY EINY (ORF1); o

(b) un polipéptido derivado de ORF1 que tiene al menos el 98% de identidad con la longitud completa de ORF1; o

(c) un polipéptido derivado de ORF1 que tiene al menos el 90% de identidad con la longitud completa de ORF1; en el que dicho polipéptido no es

50

MPSKKNRSGPQPHKRWVFTLNNPSEDERKKIRDLPISLFDYFIVGEEGNEEGRTPHLQG
 55 FANFVKKQTFNKVKWYLGARCHIEKAKGTDQONKEYCSKEGNLLMECGAPRSQGQSDLS
 TAVSTLLESGSLVTVAEQHPVTFVRNFRGLAELLKVS GKMQRDWKTNVHVIVGPPGCGK
 SKWAANFADPETTYWKPPRNKWW DGYHGEEVVVIDDFYGWLPWDDLLRLCDRYPLTVETK
 60 GGTVPFLARSILITSNQTPLEWYSSTAVPAVEALYRRITSLVFWKNATEQSTEEGGQFVT
 LSPPCPEFPYEINY,

65

o

MPSKKNGRSGPQPHKRWFVFTLNNPSEDERKKIRELPISLFDYFIVGEEGXEE XRTPHLQG
 5 FANFVKKQTFNKVKWYLGARCHIEKAKGTDQQNKEYCSKEGNLLIECGAPRSQQRSDLS
 TAVSTLLESGLVTVAEQHPVTFVRNFRGLAELLKVSQKMRDWTNVHVIVGPPGCGK
 SKWAANFADPETTYWKPPRNKWWDGYHGEEVVVIDDFYGWLPWDDLLRLCDRYPLTVETK
 10 GGTVXXARSILITSNQTPLEWYSSTAVPAVEALYRRITSLVFWKNATEQSTEEGGQXVT
 LSPPCPEFPYEINY;

o

15 (d) una proteína de fusión que comprende cualquiera de (a) a (c).

La presente invención se basa en el descubrimiento de un nuevo virus, designado en el presente documento como "PCV Tipo II" o "PCVII", aislado a partir de tejidos homogeneizados de lechones afectados por PMWS. La caracterización del virus muestra que comparte características comunes con el circovirus porcino no patogénico
 20 obtenido a partir de células PK15 persistentemente infectadas, designadas en el presente documento como "PCV Tipo I" o "PCVI". El genoma de DNA completo de una variante de PCV nueva, PCVII 412, al igual que diversos aislados de PCVII adicionales, han sido clonados y secuenciados. Partes de estas secuencias de DNA resultan de utilidad como sondas para diagnosticar la presencia de virus en muestras clínicas y para aislar otras variantes del virus de origen natural. La comprensión de la secuencia genómica de PCVII hace también disponible las secuencias
 25 de polipéptido de las diversas proteínas codificadas dentro de los marcos de lectura abiertos del genoma vírico y permite la producción de estos péptidos o de partes de los mismos que resultan de utilidad como reactivos o patrones en pruebas de diagnóstico y como componentes de vacunas. Pueden también generarse anticuerpos protectores a partir de las proteínas y se pueden producir en forma monoclonal o policlonal.

30 La disponibilidad de la secuencia completa de PCVII permite, por tanto, el diseño y la construcción de polipéptidos que pueden servir como vacunas o como reactivos para diagnóstico, o como intermedios en la producción de preparaciones de anticuerpos monoclonales (Mab), útiles en inmunoterapia pasiva frente a PMWS o como intermedios en la producción de anticuerpos útiles como reactivos de diagnóstico.

35 Por consiguiente, en un aspecto, la descripción se refiere a polinucleótidos que resultan de utilidad para la producción de productos de diagnóstico de PCVII y vacunas derivadas del genoma PCVII. En una realización particular, los polinucleótidos son capaces de hibridarse de forma selectiva a una secuencia de nucleótidos PCVII y comprenden al menos aproximadamente 8 nucleótidos contiguos derivados de, o complementarios a, una secuencia PCVII mostrada en las Figuras 4A-4C (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:11, SEQ ID NOS: 12 & 24). En otra realización, el
 40 polinucleótido codifica un polipéptido PCVII inmunogénico que tiene al menos aproximadamente un 85% de identidad con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido derivado de (a) ORF 1 (SEQ ID NO:3), (b) ORF 2 (SEQ ID NO:9), (c) ORF (3) (SEQ ID NO:7), (d) ORF 4 (SEQ ID NO:20), (e) ORF 5 (SEQ ID NO: 21), (f) ORF 6 (SEQ ID NO:5) y (g) fragmentos inmunogénicos de (a)-(f) que comprenden al menos aproximadamente 5 aminoácidos. En una realización particularmente preferida, el polinucleótido codifica el
 45 polipéptido de ORF 6 (SEQ ID NO: 5) o fragmentos inmunogénicos del mismo.

La descripción se refiere por tanto a la utilización de estas secuencias de polinucleótido o de partes de las mismas como sondas oligómeras, para la producción de péptidos que pueden ser utilizados como reactivos de diagnóstico, o como antígenos de vacuna, a los propios péptidos y a anticuerpos monoclonales y policlonales útiles en el
 50 diagnóstico y en el tratamiento de la enfermedad.

Otros aspectos de la descripción incluyen sistemas de expresión que son capaces de realizar la producción de una proteína deseada codificada por secuencias que proceden del genoma completo, vectores recombinantes que contienen los citados sistemas o partes de los mismos, células huésped recombinantes transformadas con los
 55 citados vectores, proteínas producidas por las células transformadas y vacunas producidas a partir de dichas proteínas. Además, la descripción se refiere a secuencias de péptidos que representan epítomos codificados por el genoma, y a las citadas secuencias unidas covalentemente a marcadores o a proteínas portadoras. Quedan también englobados por la presente descripción los diversos ORF del genoma de PCVII, al igual que las proteínas codificadas mediante estos ORF y partes de las mismas.

60

La descripción también se refiere a procedimientos para la preparación de composiciones de polipéptidos, tales como vacunas y composiciones de inmunodiagnóstico e inmunoglobulinas, y a inmunoensayos y kits para ensayos que contienen los cebadores, sondas, polipéptidos y/o inmunoglobulinas. En una realización, por tanto, la descripción se refiere a un procedimiento para detectar anticuerpos PCVII en una muestra biológica, que
 65 comprende:

- (a) proporcionar una muestra biológica;
- (b) hacer reaccionar la muestra biológica con un polipéptido PCVII inmunogénico, tal y como se ha descrito anteriormente, en condiciones que permiten que los anticuerpos PCVII, cuando se encuentran presentes en la muestra biológica, se unan al polipéptido PCVII para formar un complejo anticuerpo/antígeno; y
- (c) detectar la presencia o ausencia del complejo, detectando de este modo la presencia o ausencia de anticuerpos PCVII en la muestra.

En otra realización, la descripción se refiere a un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos para detectar secuencias homólogas de PCVII en una muestra biológica, que comprende:

- (a) incubar la muestra biológica con un polinucleótido, según la reivindicación 1, en condiciones que favorecen la formación de complejos de ácido nucleico entre el polinucleótido y el ácido nucleico de PCVII presente en la muestra biológica; y
- (b) detectar los complejos que contienen el polinucleótido.

Estos y otros aspectos y características de la invención se entenderán de forma más completa cuando se lee la siguiente descripción detallada de la invención conjuntamente con las figuras de acompañamiento.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 es un diagrama de PCVII 412, que muestra la localización de los marcos de lectura abiertos.

Las Figuras 2A-2C muestran la secuencia de nucleótido para el genoma del PCVII 412 (SEQ ID NO:1). Se muestran ambos sentidos. Las secuencias de aminoácido correspondientes a los productos de traducción de los diversos ORFs se muestran también, tal como se indica: ORF 1 (SEQ ID NO: 3); ORF 2 (SEQ ID NO:9); ORF 3 (SEQ ID NO:7); ORF 4 (SEQ ID NO:20); ORF 5 (SEQ ID NO:21); y ORF 6 (SEQ ID NO:5).

Las Figuras 3A-3D son comparaciones de secuencias de aminoácido procedentes de los marcos de lectura abiertos de PCVII 412 frente a los correspondientes marcos de lectura abiertos de PCVI aislados a partir de células PK15. La Figura 3A muestra la secuencia de aminoácidos del ORF 1 de PCVII 412 (línea superior, SEQ ID NO:3), comparada con el correspondiente ORF procedente de PCVI (línea inferior, SEQ ID NO:4). La Figura 3B muestra la secuencia de aminoácidos del ORF 6 de PCVII 412 (línea superior, SEQ ID NO:5) comparada con el correspondiente ORF procedente de PCVI (línea inferior, SEQ ID NO:6). La Figura 3C muestra la secuencia de aminoácidos del ORF 3 del PCVII 412 (línea superior, SEQ ID NO:7), comparada con el correspondiente ORF procedente de PCVI (línea inferior, SEQ ID NO: 8). La Figura 3D muestra la secuencia de aminoácidos del ORF 2 de PCVII 412 (línea superior, SEQ ID NO:9), comparada con el correspondiente ORF procedente de PCVI (línea inferior, SEQ ID NO: 10).

Las Figuras 4A-4B son comparaciones de las secuencias de nucleótido de diversos aislados PCV: PCVI procedente de células PK15 (SEQ ID NO:2); PCVII 412 (SEQ ID NO:1), PCVII 9741 (SEQ ID NO: 11) y PCVII B9 (SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:24).

La Figura 5 muestra los resultados de la PCR múltiple utilizada para la detección de infección por PCV. El ensayo identificó la infección por PCV y, a la vez, distinguió entre la presencia de PCVI y PCVII. La línea 1 es un marcador de peso molecular. Las líneas 2-4 son controles en el orden de PCVII, PCVI y negativos. Las líneas 5-13 son muestras de sangre recogidas a partir de lechones procedentes de una piara afectada por PMWS.

La Figura 6 muestra los resultados de la PCR múltiple llevada a cabo en diversas muestras de tejidos procedentes de un lechón afectado por PMWS. La línea 1 en ambas filas es un marcador de peso molecular, La línea 2 en la fila superior es un control PCVII positivo, mientras que la línea 3 es un control negativo. Las restantes líneas son muestras de diversos tejidos recogidos a partir de lechones afectados por PMWS.

Descripción detallada

En la práctica de la presente descripción, se utilizarán, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de DNA recombinante e inmunología, las cuales son conocidas por el experto en la materia. Las citadas técnicas se explican con detalle en la literatura. Ver, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. I, II and III, Second Edition (1989); DNA Cloning, Vols. I & II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R.K. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, B. A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); la serie, Methods in Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); y Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds. 1986, Blackwell Scientific Publications). Antes de describir en detalle la presente descripción, debe darse por entendido que la presente descripción no queda limitada a DNA particular, secuencias de polipéptido o parámetros de proceso, dado que, los mismos pueden, naturalmente, variar. Tiene que darse por entendido que la terminología utilizada en el presente documento tiene por finalidad describir únicamente

realizaciones particulares de la descripción y no pretende resultar limitativa.

Debe destacarse que, tal y como se utiliza en esta memoria y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un(una)”, “el (la)” incluyen referencias al plural, salvo que el contenido indique claramente lo contrario. Así pues, por ejemplo, la referencia a “un antígeno” incluye una mezcla de dos o más antígenos, la referencia a “un excipiente” incluye mezclas de dos o más excipientes y similares.

A lo largo del texto se utilizan las siguientes abreviaturas de aminoácido:

Alanina: Ala (A)	Arginina: Arg (R)
10 Asparagina: Asn (N)	Acido aspártico: Asp (D)
Cisteína: Cys (C)	Glutamina: Gln (Q)
Acido glutámico: Glu (E)	Glicina: Gly (G)
Histidina: His (H)	Isoleucina: Ile (I)
Leucina: Leu (L)	Lisina: Lys (K)
15 Metionina: Met (M)	Fenilalanina: Phe (F)
Prolina: Pro (P)	Serina: Ser (S)
Treonina: Thr (T)	Triptófano: Trp(W)
Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)

20 A. Definiciones

Salvo que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente aplicado por un experto en la materia ordinario, en el campo al cual pertenece la invención. Si bien pueden utilizarse un determinado número de procedimientos y materiales similares o equivalentes a los utilizados, en la práctica de la presente descripción, los materiales y procedimientos preferidos se describen en el presente documento.

En la presente descripción, se utilizarán los siguientes términos, los cuales pretenden ser definidos según lo que se indica seguidamente.

Los términos “proteína PCVII”, “proteína PMWS” o una secuencia de nucleótido que codifica para los mismos pretenden hacer referencia a una proteína o a una secuencia de nucleótidos, respectivamente, que derivan de un aislado de PCVII nuevo, tal y como se describe en el presente documento. Las secuencias de nucleótido de diversos aislados PCVII se muestran en las Figuras 4A-4B y las secuencias de aminoácido correspondientes a los seis ORFs de PCVII identificados se muestran en las Figuras 2A-2C. No obstante, una proteína PCVII o un gen que codifica para la misma, tal y como se define en el presente documento, no queda limitada a la secuencia mostrada.

Además, tal y como se utiliza en el presente documento, una secuencia de nucleótido “derivada de” un genoma de PCVII o su complemento se refiere a una secuencia que mantiene las propiedades esenciales del polinucleótido ilustrado, representando una parte de la secuencia completa de la que procede, a los efectos pretendidos. Un ejemplo específico, pero no limitativo, de la citada derivación está representado por una secuencia que codifica para una secuencia de aminoácido idéntica o sustancialmente idéntica pero, debido a una degeneración de codón, utiliza diferentes codones específicos; otro ejemplo es una secuencia complementaria al DNA vírico. Una sonda u oligonucleótido útil en pruebas de diagnóstico necesita mantener la complementariedad de la secuencia mostrada pero puede ser más corta que la secuencia completa o puede saltar sobre partes de la misma. No obstante, para el caso de uso en manipulación o expresión, los cambios de nucleótido resultan a menudo deseables para crear o suprimir puntos de restricción, proporcionar puntos de procesado o alterar la secuencia de aminoácido codificada de tal modo que no quede afectada negativamente su funcionalidad. Los términos “secuencia de nucleótido” y “polinucleótido” hacen referencia ambos a secuencias de ribonucleótido y de desoxirribonucleótido e incluyen tanto la hebra genómica como su secuencia complementaria.

Una secuencia “derivada de” la secuencia de nucleótido que comprende el genoma de un aislado PCVII se refiere a una secuencia que comprende una secuencia correspondiente a una región de una secuencia de nucleótidos genómica (o su complemento), o una combinación de regiones de esa secuencia modificada de modo conocido en el estado de la técnica para estar en consonancia con el uso pretendido. Naturalmente, estas secuencias no tienen porque derivar necesariamente físicamente de la secuencia de nucleótidos del gen, pero se refieren a polinucleótidos generados de cualquier manera, basados en información proporcionada por la secuencia de bases en la(s) región(es) de la(s) cual(es) deriva(n) el polinucleótido. Por ejemplo, entre las regiones a partir de las cuales pueden derivarse secuencias de DNA habituales se incluyen regiones que codifican para epítomos específicos. De forma similar, un péptido “derivado de” un ORF de PCVII se refiere a una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la de estos polipéptidos o a una parte de los mismos, que tiene las mismas propiedades biológicas que esa parte.

Además, la proteína derivada o las secuencias de nucleótido no tiene que derivar físicamente de los genes descritos anteriormente, pero pueden ser generados de cualquier forma, incluyendo, por ejemplo, la síntesis

química, el aislamiento (por ejemplo, a partir de un aislado de PCVII) o mediante producción recombinante, en base a la información proporcionada en el presente documento. Adicionalmente, el término pretende hacer referencia a proteínas que tienen secuencias de aminoácido sustancialmente homólogas (tal y como se define más adelante) a secuencias de aminoácido codificadas por los genes, que despliegan actividad inmunológica.

5 Así pues, los términos pretenden hacer referencia a secuencias de longitud completa, al igual que a secuencias truncadas y parciales, y a formas análogas activas y precursores de las proteínas. Se incluyen también en el término fragmentos de nucleótido del gen particular que incluyen al menos aproximadamente 8 pares de base contiguas e incluso al menos aproximadamente entre 10 y 20 pares de base contiguas e incluso al menos entre 25 y 50 o 75 o
10 más pares de bases contiguas del gen. Los citados fragmentos resultan útiles como sondas en métodos de diagnóstico y para la producción recombinante de proteínas, tal y como se ha discutido extensamente más adelante.

Los términos incluyen también proteínas en forma neutra o en forma de sales de adición básicas o ácidas, en función del modo de preparación. Las citadas sales de adición de ácido pueden conllevar grupos amino libres y las
15 sales básicas pueden ser obtenidas con carboxilos libres. Las sales de adición ácidas y básicas farmacéuticamente aceptables se discuten más ampliamente más adelante. Además, las proteínas pueden ser modificadas mediante la combinación con otros materiales biológicos, tales como lípidos y sacáridos, o mediante modificación de la cadena lateral, tal como acetilación de grupos amino, fosforilación de cadenas laterales de hidroxilo, oxidación de grupos sulfidril, glicosilación de restos aminoácido, al igual que otras modificaciones de la secuencia primaria codificada.

20 El término pretende hacer referencia a supresiones, adiciones y sustituciones de la secuencia, en tanto en cuanto las funciones polipéptido produzcan una respuesta inmunológica, tal y como se ha definido en el presente documento. En este sentido, las sustituciones particularmente preferidas serán habitualmente conservadoras por naturaleza, a saber, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los
25 aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos — aspartato y glutamato; (2) básicos — lisina, arginina, histidina; (3) no polares — alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados — glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina son a menudo clasificados como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, resulta razonablemente predecible que una sustitución aislada de leucina por isoleucina o valina, o viceversa; un aspartato
30 con glutamato o viceversa; o una sustitución conservadora similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no ejercerá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia pero que poseen menores sustituciones de aminoácidos, las cuales no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína, quedan, por consiguiente, englobadas dentro de la definición del polipéptido de referencia.

35 Un "marco de lectura abierto" u "ORF" es una región de una secuencia de polinucleótidos que codifica para un polipéptido.

Por "síndrome de desmedro post-destete" o "PMWS" se quiere dar a entender una enfermedad de animales
40 vertebrados, en particular de los cerdos, que se caracteriza clínicamente por una progresiva pérdida de peso, taquipnea, disnea e ictericia. Entre los cambios patológicos consistentes se incluyen la neumonía intersticial de linfocítica a granulomatosa, la linfadenopatía y, menos frecuentemente, la hepatitis de linfocítica a granulomatosa y la nefritis. Ver, por ejemplo, Clark. E.G. Proc. Am. Assoc. Swine Pract. 1997: 503.

45 Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico separada y discreta del organismo completo en el que se encuentra la molécula en la naturaleza; o una molécula de ácido nucleico desprovista, en todo o en parte, de secuencias normalmente asociadas con la misma en la naturaleza; o una secuencia, tal como la misma existe en la naturaleza; pero que tiene secuencias heterólogas (tal y como se define más adelante) en asociación con las mismas.

50 El término "composición de vacuna" pretende hacer referencia a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno, la cual puede ser utilizada para prevenir o tratar una enfermedad o dolencia en un sujeto. Así pues, el término abarca tanto vacunas subunitarias, tal y como se describe más adelante, como composiciones que contienen microbios completamente aniquilados, atenuados o inactivados.

55 Por "composición de vacuna subunitaria" se quiere dar a entender una composición que contiene al menos un polipéptido inmunógeno, pero no todos los antígenos, derivados de u homólogos a, un antígeno procedente de un patógeno de interés. La citada composición está sustancialmente exenta de partículas o de células patógenas, o de lisato de las citadas células o partículas. Así pues, una "composición de vacuna subunitaria" se prepara a partir de al
60 menos polipéptidos inmunógenos purificados (preferiblemente sustancialmente purificados) procedentes del patógeno o de sus análogos recombinantes. Una composición de vacuna subunitaria puede comprender el antígeno subunitario o los antígenos de interés sustancialmente exentos de otros antígenos o polipéptidos procedentes del patógeno.

65 El término "epítipo" se refiere al punto sobre un antígeno o hapteno al cual responden de modo específico las

células B y/o las células T. El término se utiliza también de forma intercambiable con “determinante antigénico” o “punto determinante antigénico”. Los anticuerpos que reconocen al mismo epítipo pueden ser identificados en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad del anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

5 Una “respuesta inmunológica” a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmune mediada por célula y/o anticuerpo para la composición o vacuna de interés. Habitualmente, una “respuesta inmunológica” incluye, pero no queda limitada a, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células B colaboradoras, células T supresoras, y/o células T citotóxicas y/o células T $\gamma\delta$, dirigidas
 10 específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped desplegará o bien una respuesta inmunológica terapéutica o protectora, de tal modo que se reforzará la resistencia a nueva infección y/o se reducirá la gravedad de la enfermedad. La citada protección se demostrará o bien mediante una reducción o una falta de síntomas normalmente mostrados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título vírico más bajo en el huésped infectado.

15 Los términos proteína “inmunogénica” o polipéptido “inmunogénico” se refieren a una secuencia de aminoácido que genera una respuesta inmunológica, tal y como se ha descrito anteriormente. Un polipéptido o proteína “inmunogénicos”, tal y como se utiliza el término en el presente documento, incluye la secuencia completa de la proteína, de sus análogos, o de sus fragmentos inmunogénicos. Por “fragmento inmunogénico” se quiere dar a
 20 entender un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y genera por tanto la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Los citados fragmentos pueden ser identificados utilizando cualquier número de técnicas de mapeado de epítipo, bien conocidas por parte de los expertos en la materia. Ver, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, en Methods in Molecular Biology, Vol 66 (Glenn E. Morris, Ed. 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden ser determinados sintetizando, por ejemplo,
 25 concurrentemente números elevados de péptidos sobre soporte sólidos, correspondiendo los péptidos a partes de la molécula proteína y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos se encuentran todavía unidos a los soportes. Las citadas técnicas son conocidas en el estado de la técnica y descritas por ejemplo en el documento de patente US nº. 4.708.871; Geysen et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23: 709-715. De forma similar, epítopos conformacionales son identificados rápidamente
 30 mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos, tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear en dos dimensiones. Ver, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, supra.

Los antígenos sintéticos se incluyen también dentro de la definición, por ejemplo, poliepítopos, epítopos lindantes y
 35 otros antígenos recombinantes o derivados sintéticamente. Ver, por ejemplo, Bergmann et al., (1993) Eur. J. Immunol. 23: 2777-2781; Bergmann et al., (1996) J. Immunol. 157: 3242-3249; Suhrbier, A. (1997) Immunol. And Cell Biol. 75: 402-408; Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, 28 Junio-3 Julio, 1998.

40 Los fragmentos inmunogénicos, para los objetivos de la presente descripción, incluirán habitualmente al menos aproximadamente 3 aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente 5 aminoácidos, más preferiblemente al menos entre aproximadamente 10 y 15 aminoácidos y, muy preferiblemente, 25 o más aminoácidos, de la molécula. No existe límite superior crítico en lo que hace referencia a la longitud del fragmento, el cual podría casi comprender la longitud completa de la secuencia de proteína, o incluso una proteína de fusión que comprendiese
 45 dos o más epítopos de la proteína.

Por proteínas o polipéptidos de origen “natural” se hace referencia a proteínas o polipéptidos aislados a partir de la fuente en la cual las proteínas se encuentran en la forma natural. Por polipéptidos “recombinantes” se hace referencia a polipéptidos producidos mediante técnicas de DNA recombinante, a saber, producidos a partir de
 50 células transformadas mediante una construcción de DNA exógena que codifican para el polipéptido deseado. Los polipéptidos “sintéticos” son los preparados a través de síntesis química.

Un “vector” es un replicón, tal como un plásmido, fago, o cósmido, al cual puede unírsele otro segmento de DNA, con vistas a provocar la replicación del segmento unido.

55 Una “secuencia de codificación” de DNA o una “secuencia de nucleótido que codifica” para una particular proteína es una secuencia de DNA que es transcrita y traducida a un polipéptido in vitro o in vivo cuando es colocada bajo el control de los elementos reguladores adecuados. Los límites de la secuencia de codificación son determinados a través de un codón de partida en el término 5' (amino) y un codón de finalización de traducción en el término 3' (carboxi). Una secuencia de codificación puede incluir, pero no estar limitada a, secuencias procariotas, cDNA
 60 procedente de mRNA eucariota, secuencias de DNA genómico e incluso secuencias de DNA sintético. Una secuencia de terminación de transcripción estará habitualmente localizada en 3' en la secuencia de codificación.

Los “elementos de control” de DNA se refieren, colectivamente, a potenciadores, puntos de unión a ribosomas, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de transcripción, dominios reguladores aguas arriba, reforzadores, y similares, los cuales proporcionan colectivamente la transcripción y la traducción de una secuencia

de codificación en una célula huésped. No todas estas secuencias de control necesitan estar presentes en un vector recombinante, en tanto en cuanto el gen deseado sea capaz de ser transcrito y traducido.

La expresión "unido operativamente" hace referencia a una disposición de elementos en la que los componentes descritos de esta manera están configurados con vistas a llevar a cabo su función habitual. Por lo tanto, los elementos control unidos operativamente a una secuencia de codificación son capaces de efectuar la expresión de la secuencia de codificación. Los elementos de control no tienen que estar ubicados al lado de la secuencia de codificación, en tanto en cuanto los mismos funcionen para dirigir la expresión de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, secuencias transcritas intervinientes aún no traducidas pueden estar presentes entre un potenciador y la secuencia de codificación y el potenciador puede todavía ser considerado como "unido operativamente" a la secuencia de codificación.

Un elemento de control, tal como un potenciador, "dirige la transcripción" de una secuencia de codificación en una célula cuando la RNA polimerasa se une al potenciador y transcribe la secuencia de codificación a mRNA, el cual es después traducido al polipéptido codificado por la secuencia de codificación.

Una "célula huésped" es una célula que ha sido transformada o que es capaz de transformación, a través de una molécula de ácido nucleico.

Una célula ha sido "transformada" por DNA exógeno cuando el citado DNA exógeno ha sido introducido en el interior de la membrana celular. El DNA exógeno puede estar o no integrado (unido covalentemente) en el DNA cromosómico que forma parte del genoma de la célula. En procariotas y en levaduras, por ejemplo, el DNA exógeno puede ser mantenido sobre un elemento episomial, tal como un plásmido. En relación con las células eucariotas, una célula transformada de forma estable es una célula en la cual el DNA exógeno ha sido integrado en el cromosoma, a los efectos de que el mismo sea heredado por las células hijas a través de replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad que presentan las células eucariotas para estabilizar líneas celulares o clones que comprenden una población de células hijas que contienen DNA exógeno.

"Homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o dos restos polipéptido. Dos secuencias de DNA o de polipéptido son "sustancialmente homólogas" las unas con las otras cuando las secuencias muestran al menos aproximadamente entre el 80 y el 85%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, y muy preferiblemente al menos aproximadamente entre el 95 y el 98% de identidad a lo largo de una longitud definida de las moléculas. Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión sustancialmente homóloga se refiere también a secuencias que muestran una identidad completa con las secuencias de DNA o de polipéptido especificadas.

El porcentaje de identidad puede ser determinado a través de comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas, mediante alineamiento de las mismas, conteo del número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, división por la longitud de la secuencia más corta y multiplicación del resultado por 100. Como ayuda en el análisis pueden utilizarse programas de ordenador rápidamente disponibles, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed. 5; Supple. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington DC, los cuales adaptan el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Advances in Appl. Math.* 2: 482-489, para análisis de péptidos. Los Analysis Package, Version 8 (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI), por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA, y GAP, los cuales se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas son rápidamente utilizados con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el Wisconsin Sequence Analysis Package mencionado anteriormente.

Alternativamente, la homología puede ser determinada a través de hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa(s) específicas de hebra única y determinación de tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de DNA que son sustancialmente homólogas pueden ser identificadas en un experimento de hibridación Southern, bajo, por ejemplo, condiciones restrictivas, tal y como se ha definido para este sistema particular. La definición de las condiciones adecuadas de hibridación cae dentro de la habilidad del experto en la materia. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., supra: DNA cloning, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

Se considera que dos fragmentos de ácidos nucleicos son "hibridables selectivamente" a un polinucleótido PCVII si los mismos son capaces de hibridar selectivamente a un ácido nucleico de PCVII o a una de sus variantes (por ejemplo, una sonda que hibrida a un ácido nucleico de PCVII pero no a polinucleótidos procedentes de otros miembros de la familia circovirus) o específicamente cebando una reacción en cadena de polimerasa: (i) en condiciones de lavado e hibridación habituales, tal y como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., supra y en Nucleic Acid Hybridization, supra, (ii) utilizando condiciones de lavado restrictivas reducidas que permiten al menos entre aproximadamente el 25 y el 30% de desapareamiento de pares de base, por ejemplo: 2 x SSC, 0,1% SDS, dos veces la temperatura ambiente, 30 minutos en cada caso; después 2 x SSC, 0,1% SDS, 37°C una vez, 30 minutos; después 2 x SSC temperatura ambiente dos veces, 10 minutos en cada caso, o (iii) seleccionando cebadores para

su utilización en reacciones en cadena de polimerasa (PCR) habituales, en condiciones estándar (descritas, por ejemplo, en Saiki, et al., (1988) Science 239: 487-491), lo que se traduce en amplificación específica de secuencias de PCVII o sus variantes.

- 5 El término “funcionalmente equivalente” pretende indicar que la secuencia de aminoácido de una proteína es una que generará una respuesta inmunológica reforzada o sustancialmente equivalente, tal y como se ha definido anteriormente, en comparación con la respuesta generada por una secuencia de aminoácido de referencia o una parte inmunogénica de la misma.
- 10 Una región “heteróloga” de una construcción de DNA es un segmento identificable de DNA dentro o unido a otra molécula de DNA que no es encontrada en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Así pues, cuando la región heteróloga codifica para un gen vírico, el gen lindará habitualmente con DNA que no linda con el gen vírico en el genoma del virus fuente. Otro ejemplo de la secuencia de codificación heteróloga está constituido por una construcción en la que la propia secuencia de codificación no es encontrada en la naturaleza (por ejemplo,
- 15 secuencias sintéticas que tienen codones diferentes a los del gen natural). La variación alélica o los acontecimientos mutacionales de origen natural no dan lugar a una región heteróloga de DNA, tal y como se utiliza en el presente documento.

El término “tratamiento” tal y como se utiliza en el presente documento se refiere o bien a (i) la prevención de
 20 infección o re-infección (profilaxis), o (ii) la reducción o eliminación de síntomas de la enfermedad de interés (terapia).

Tal y como se utiliza en el presente documento, una “muestra biológica” hace referencia a una muestra de tejido o fluido aislado a partir de un sujeto, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, sangre, plasma, suero, materia fecal,
 25 orina, médula ósea, bilis, fluido espinal, tejido linfático y fluido linfático, muestras de la piel, secreciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal y genito-urinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias y también muestras de constituyentes de cultivo celular in vitro, incluyendo, pero no limitado a, medios acondicionados que resultan del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, por ejemplo, células recombinantes y componentes celulares.

30 Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos “marcador” y “marcador detectable” hacen referencia a una molécula capaz de detección, incluyendo, pero no limitada a, isótopos radioactivos, productos fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimas, sustratos de enzima, cofactores de enzima, inhibidores de enzima, cromóforos, colorantes, iones metálicos, soluciones metálicas, ligandos (por ejemplo, biotina o haptenos) y similares. El término
 35 “fluorescente” hace referencia a una sustancia o a una parte de la misma que es capaz de mostrar fluorescencia en la banda detectable. Entre los ejemplos particulares de marcadores que se pueden utilizar en la presente descripción se incluyen, fluoresceína, rodamina, dansilo, umbeliferona, rojo de Texas, luminol, NADPH y α - β -galactosidasa.

Por “sujeto vertebrado” se quiere dar a entender cualquier miembro de subphylum cordata, incluyendo, sin limitación,
 40 mamíferos tales como terneras, ovejas, cerdos, cabras, caballos y el hombre; animales domésticos tales como perros y gatos; y pájaros, incluyendo pájaros domésticos y de caza, tales como gallos y gallinas, incluyendo pollos, pavos y otras aves de tipo gallinácea. El término no denota ninguna edad en particular. Por lo tanto, se pretende que queden cubiertos los animales adultos y los recién nacidos, al igual que los fetos.

45 B. Procedimientos generales

De gran relevancia para la presente invención es el descubrimiento de un nuevo circovirus denominado “PCVII” en el presente documento, aislado a partir de cerdos afectados por PMWS. Los materiales y procedimientos que resultan de utilidad en el presente documento han resultado posibles a través del descubrimiento de una familia de
 50 secuencias de nucleótido, conteniendo cada uno de ellas un genoma completo de un nuevo virus PCVII. La disponibilidad de esta familia de polinucleótidos permite, primero, el aislamiento de otros miembros de la familia del genoma que difieren por pequeñas homogeneidades. En segundo lugar, la misma permite la construcción de fragmentos de DNA y de proteínas útiles en diagnóstico. Por ejemplo, oligómeros de al menos aproximadamente entre 8 y 10 nucleótidos o más, preferiblemente, oligómeros que comprenden al menos entre aproximadamente 15 y
 55 20 nucleótidos, resultan útiles como sondas de hibridación en diagnóstico de enfermedad. Las citadas sondas pueden ser utilizadas para detectar la presencia del genoma vírico en, por ejemplo, suero de sujetos sospechosos de albergar el virus. Similarmente, los genes que codifican para las proteínas pueden ser clonados y utilizados para diseñar sondas para detectar y aislar genes homólogos en otros aislados víricos.

60 Las secuencias de PCVII permiten también el diseño y la producción de polipéptidos específicos para PCVII, los cuales resultan útiles como reactivos para diagnóstico para detectar la presencia de anticuerpos generados frente a PCVII en suero o sangre. Los anticuerpos frente a estos polipéptido resultan también de utilidad como productos para diagnóstico. Dado que pueden descifrarse varios marcos de lectura abiertos en el contexto del genoma completo, las estructuras primarias de proteínas relacionadas con PCVII pueden ser deducidas. Finalmente, el
 65 conocimiento de las secuencias de genes permite también el diseño y la producción de vacunas eficaces frente a

PCVII y, por tanto, útiles para la prevención de PMWS y también para la producción de anticuerpos protectores.

El secuenciado de la información disponible procedente del genoma permite que la secuencia de aminoácidos de los diversos polipéptidos codificados por el genoma vírico pueda ser deducida e identificar los epítomos adecuados. Las proteínas de longitud completa codificadas por los diversos ORFs identificados en el genoma de PCVII, o partes adecuadas del mismo, pueden ser obtenidas utilizando fragmentos del DNA relevantes, los cuales son obtenidos y expresados independientemente, proporcionando de este modo los polipéptidos deseados utilizando técnicas recombinantes. Tanto los huéspedes eucariotas como los procariotas resultan útiles para la citada expresión. Pueden también sintetizarse fragmentos de polipéptido cortos y ser unidos a proteínas portadoras para su utilización en vacunas. Además, pueden producirse epítomos unidos a una proteína que confiere inmunogenicidad. Las proteínas obtenidas de este modo pueden, a su vez, ser utilizadas como vacunas, o pueden ser utilizadas para inducir células B inmunocompetentes en huéspedes, pudiendo ser estas células B utilizadas para producir hibridomas que secretan anticuerpos útiles en inmunoterapia pasiva.

Más particularmente, las secuencias completas para estos aislados de PCVII, PCVII 412 (SEQ ID NO:1), PCVII 9741 (SEQ ID NO:11), y PCVII B9 (SEQ ID NO:12, SEQ ID NO: 24) se muestran en las Figuras 4A-4B. Los porcentajes de homología de secuencias de nucleótido entre los diversos aislados de PCVII son superiores al 99%. El genoma vírico recién descubierto comparte aproximadamente el 76% de identidad con PCV aislado a partir de células PK15 infectadas a nivel de nucleótido (denominadas "PCVI" en el presente documento). Tal y como se describe adicionalmente en los ejemplos, en estas tres regiones han sido localizadas inserciones y supresiones (indeles) de nucleótido.

Tal y como se muestra en la Figura 1, el nuevo virus contiene al menos seis marcos de lectura abiertos (ORFs) potenciales que codifican para proteínas que comprenden más de 50 restos aminoácido, mientras que el PCVI derivado de PK15 presenta siete potenciales ORFs. Los ORFs para aislados de PCVII representativos tienen lugar en las siguientes posiciones de nucleótido, utilizando la numeración de aislados de PCVII mostrada en las Figuras 4A-4B:

30	ORF 1	51 a 992
	ORF 2	671 a 360
	ORF 3	565 a 389
	ORF 4	553 a 729
	ORF 5	1016 a 1174
35	ORF 6	1735 a 1037

Los polipéptidos codificados por los seis ORFs se muestran en las Figuras 2A-2C.

Los principales objetivos celulares para PCVII son las células mononucleares en la sangre periférica, probablemente las células macrófago, si bien el virus también se localiza en diversos tejidos y órganos en animales infectados. Los macrófagos afectados pierden su función normal, provocan daños en el sistema inmune del huésped, conduciéndolo a la muerte.

El clonado y secuenciado de los nuevos circovirus ha proporcionado información acerca del agente que provoca el PMWS. Tal y como se ha explicado anteriormente, la información de secuenciado, al igual que los clones y sus productos genéticos resultan de utilidad para diagnóstico en el desarrollo de vacunas. En particular, la PCR y los procedimientos de diagnóstico basados en anticuerpos resultan de utilidad en el diagnóstico de la enfermedad y cuando se utilizan en el presente documento para identificar y diferenciar específicamente este nuevo virus PCVII a partir de PCVI derivado de células PK15 persistentemente infectadas. La información de secuenciado resulta también de utilidad en el diseño de cebadores específicos para expresar productos genéticos específicos para virus, para estudiar la estructura vírica, para generar anticuerpos específicos y para identificar genes virulentos en enfermedades porcinas relacionadas con circovirus.

B.1. Preparación de la secuencia del gen PCVII

Los nuevos genomas víricos de PCVII fueron obtenidos a partir de virus aislados procedentes de tejidos de cerdos afectados por PMWS. El DNA vírico fue extraído a partir de fuentes variables, incluyendo pellets de células Dulac y Vero infectadas, células de capa leucocitaria de sangre periférica, tejidos procedentes de animales infectados y suero. El DNA fue extraído de las muestras utilizando técnicas discutidas más en detalle en los ejemplos.

Mediante la comparación de la secuencia y la similitud estructural entre los virus conocidos en la familia de circovirus, se diseñó un cebador único sacando partido de las secuencias complementarias de una estructura en horquilla conservada. Se llevó después a cabo una primera PCR y se clonó el producto. Dos genomas víricos de longitud completa en diferentes orientaciones insertados en un vector plásmido fueron secuenciados completamente en ambas direcciones. Se prepararon productos PCR adicionales y se secuenciaron para asegurar la fidelidad de la región cebador/horquilla.

Utilizando cebadores similares se obtuvieron otros aislados de PCVII, incluyendo PVII 9741 y PCVII B9. Parece tratarse de la primera vez que se ha clonado un circovirus a partir de partículas víricas en vez de a partir de una forma replicada de DNA.

5

La descripción del procedimiento para recuperar el genoma de PCVII tiene, naturalmente, mucho interés histórico. La secuencia resultante se proporciona en el presente documento, y la secuencia completa, o cualquier parte de la misma, podría ser preparada también utilizando procedimientos sintéticos, o a través de una combinación de procedimientos sintéticos con recuperación de secuencias parciales utilizando procedimientos similares a los aquí

10 descritos.

B.2. Producción de proteínas PCVII

La disponibilidad de secuencias genómicas de PCVII permite la construcción de vectores de expresión que codifican para polipéptidos víricos y regiones antigénicamente activas de los mismos, derivadas del genoma de PCVII. Pueden obtenerse fragmentos que codifican para las proteínas deseadas a partir de clones cDNA utilizando digestión por restricción convencional o a través de procedimientos sintéticos, y los mismos son ligados a vectores, por ejemplo, que contienen partes de secuencias de fusión, tales como β -galactosidasa. Cualquier parte deseada del genoma de PCVII que contiene un marco de lectura abierta puede ser obtenida en forma de proteína recombinante, tal como una proteína de fusión o madura, o puede ser proporcionada a través de síntesis química o de medios recombinantes generales.

Resulta rápidamente evidente que las proteínas PCVII codificadas por las secuencias de DNA descritas anteriormente, fragmentos activos, análogos y proteínas quiméricas derivadas de las mismas, pueden ser producidas a través de una diversidad de procedimientos. Los productos recombinantes pueden adoptar la forma de secuencias de proteína parciales, secuencias de longitud completa, formas precursoras que incluyen secuencias señal, formas maduras sin señales o incluso proteínas de fusión (por ejemplo, con un líder apropiado para el huésped recombinante o con otras secuencias de antígeno subunitarias para otros patógenos).

Pueden construirse librerías genéticas y los clones resultantes ser utilizados para transformar una célula huésped adecuada. Las colonias pueden ser agrupadas y cribadas utilizando suero policlonal o anticuerpos monoclonales para la proteína PCVII.

Alternativamente, una vez determinadas las secuencias de aminoácido, pueden prepararse sondas de oligonucleótidos que contienen los codones para una parte de las secuencias de aminoácido determinadas y ser utilizadas para cribar librerías genómicas o de cDNA para localizar genes que codifican para las proteínas de interés. Las estrategias básicas para la preparación de sondas de oligonucleótido y librerías de DNA, al igual que su cribado mediante hibridación de ácido nucleico resultan bien conocidas por parte de los expertos en la materia. Ver, por ejemplo, DNA Cloning: Vol I, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra; Oligonucleotide Synthesis, supra; Sambrook et al., supra. Una vez identificado un clon procedente de la librería cribada a través de hibridación positiva, puede obtenerse la confirmación, mediante análisis con enzimas de restricción y secuenciado de DNA, de que el inserto de librería particular contiene un gen de la proteína PCVII o uno de sus homólogos. Los genes pueden ser aislados de nuevo utilizando técnicas estándar y, si se desea, utilizar planteamientos con PCR o enzimas de restricción para suprimir partes de la secuencia de longitud completa.

45

Similarmente, pueden aislarse genes directamente a partir de virus utilizando técnicas conocidas, tales como extracción con fenol y manipular nuevamente la secuencia para producir cualquier alteración deseada. Ver, por ejemplo, los ejemplos del presente documento y Hamel et al., (1988) J. Virol. 72: 5262-5267, para una descripción de las técnicas utilizadas para obtener y aislar DNA vírico.

50

Alternativamente, pueden prepararse secuencias de DNA de forma sintética más que mediante clonación. Las secuencias de DNA pueden ser diseñadas con los codones adecuados para la secuencia de aminoácido particular, si las secuencias tienen que ser utilizadas para la producción de proteínas. En general, se seleccionarán codones preferidos para el huésped pretendido si la secuencia de utiliza para expresión. La secuencia completa es ensamblada a partir de oligonucleótidos que se superponen, preparados mediante procedimientos estándar y que son ensamblados formando una secuencia de codificación completa. Ver, por ejemplo, Edge (1981) Nature 292: 756; Nambair et al., (1984) Science 223: 1299; Jay et al., (1984) J. Biol. Chem. 259: 6311.

Una vez las secuencias de codificación para las proteínas deseadas han sido preparadas o aisladas, las mismas pueden ser clonadas en cualquier vector o replicón que resulte adecuado. Por parte de los expertos en la materia se tiene conocimiento de la existencia de numerosos vectores de clonación y la selección de un vector de clonación adecuado es un asunto de elección. Entre los ejemplos de vectores de DNA recombinante para clonación y de células huésped que pueden transformar se incluyen el bacteriófago λ (E. coli), pBR322 (E. coli), pACYC177 (E. coli), pKT230 (bacterias gram-negativas), pGV1106 (bacterias gram-negativas), pLAFR1 (bacterias gram-negativas), pME290 (bacterias no-E. coli gram-negativas), pHV14 (E. coli y Bacillus subtilis), pBD9 (Bacillus), pJ61

65

(*Sterptomyces*), pUC6 (*Streptomyces*), YIp5 (*Saccharomyces*), YCp19 (*Saccharomyces*) y papilomavirus bovino (células de mamífero). Ver, Sambrook et al., supra; DNA Cloning, supra; B. Perbal, supra.

El gen puede ser colocado bajo control de un potenciador, un punto de unión a ribosoma (para expresión de bacterias) y, opcionalmente, un operador (identificados colectivamente en el presente documento como elementos "control"), a los efectos de que la secuencia de DNA que codifica para a proteína deseada sea transcrita en el RNA en la célula huésped, transformada por un vector que contiene esta construcción de expresión. La secuencia de codificación puede o no contener un péptido señal o una secuencia líder. Si se incluye una secuencia señal, la misma puede ser, o bien la secuencia de origen natural, una secuencia homóloga o una secuencia heteróloga. Las secuencias líder pueden ser eliminadas por el huésped en un procesado post-traducción. Ver, por ejemplo, las patentes USA Nos. 4.431.739; 4.425.437; 4.338.397.

Puede resultar deseable utilizar otras secuencias reguladoras, que permitan la regulación de la expresión de las secuencias de proteínas en relación con el crecimiento de la célula huésped. Las secuencias reguladoras resultan conocidas por parte de los expertos en la materia y entre los ejemplos se incluyen aquellas que generan la expresión de un gen que tiene que ser activado o desactivado en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. En el vector pueden encontrarse presentes otros tipos de elementos reguladores, por ejemplo secuencias reforzadoras.

Las secuencias control y otras secuencias reguladoras pueden estar ligadas a la secuencia de codificación con anterioridad a la inserción en un vector, tal como los vectores de clonación descritos anteriormente. Alternativamente, la secuencia de codificación puede ser clonada directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias control y un punto de restricción adecuado.

En algunos casos puede resultar necesario modificar la secuencia de codificación, a los efectos de que la misma pueda ser unida a las secuencias control con la orientación adecuada; a saber, para mantener el marco de lectura propio. Puede resultar también deseable producir mutantes o análogos de la proteína PCVII deseada. Los mutantes o análogos pueden ser preparados a través de la supresión de una parte de la secuencia que codifica para la proteína, mediante inserción de una secuencia, y/o por medio de sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia. En Sambrook et al., supra, DNA cloning, supra, Nucleic Acid Hybridization, supra, se describen técnicas para modificar secuencias de nucleótido, tales como mutagénesis dirigida a un punto.

El vector de expresión se utiliza a continuación para transformar una célula huésped adecuada. En el estado de la técnica se tiene conocimiento de un determinado número de líneas celulares de mamífero y entre las mismas se incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), tales como, aunque no limitadas a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino Madin-Darbi "MDBK", entre otras. De forma similar, huéspedes bacterianos, tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp.*, podrán ser utilizados con las presentes construcciones de expresión. Entre los huéspedes de levadura que resultan de utilidad en la presente invención se incluyen, entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Entre las células de insecto para ser utilizadas con vectores de expresión baculovirus se incluyen, entre otras, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia*.

En función del sistema de expresión y huésped seleccionados, las proteínas de la presente invención son producidas mediante cultivo de células huésped transformadas por un vector de expresión descrito anteriormente, en condiciones en las cuales se expresa la proteína de interés. La proteína es después aislada a partir de las células huésped y purificada. Si el sistema de expresión secreta la proteína en el medio de crecimiento, la proteína puede ser purificada directamente a partir del medio. Si la proteína no es secretada, la misma es aislada a partir de lisatos celulares. La selección de las condiciones de crecimiento adecuadas y de los procedimientos de recuperación corresponde efectuarla al experto en la materia.

Las proteínas de la presente invención pueden ser también producidas a través de síntesis química, tal como síntesis de péptidos en fase sólida, utilizando secuencias de aminoácido conocidas o secuencias de aminoácido derivadas de la secuencia de DNA de los genes de interés. Los citados procedimientos son conocidos por los expertos en la materia. Ver, por ejemplo, J.M. Stewart y J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) y G. Barany y R.B. Merrifield, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, editors E. Gross and J. Meienhofer, VI. 2, Academic Press, New York, (1980), pp. 3-254, para técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida; y M. Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin (1984) y E. Gross and J. Meienhofer, Eds. The Peptides; Analysis, Synthesis, Biology, supra, Vol. 1, para síntesis en solución clásica. La síntesis química de péptidos puede resultar preferible si un pequeño fragmento del antígeno en cuestión es capaz de generar una respuesta inmunológica en el sujeto de interés.

El análisis del genoma muestra la presencia de al menos seis marcos de lectura abiertos, al menos uno de los

cuales codifica para el gen putativo de DNA replicasa.

B.3. Preparación de polipéptidos antigénicos y conjugación con portador.

5 La región antigénica de péptidos es generalmente relativamente pequeña -habitualmente tiene una longitud de 10 aminoácidos o inferior. Fragmentos tan pequeños como 5 aminoácidos pueden habitualmente caracterizar una región antigénica. Por consiguiente, utilizando el genoma de PCVII como base, DNAs que codifican para segmentos cortos de polipéptidos, derivados de cualquiera de los diversos ORFs de PCVII, tales como ORFs 1-6, cualquier ORF 6 particular, pueden ser expresados de forma recombinante, ya sea como proteínas de fusión o como péptidos
10 aislados. Además, las secuencias cortas de aminoácidos pueden ser sintetizadas químicamente. En circunstancias en las cuales el péptido sintetizado está correctamente configurado con vistas a proporcionar el epítipo correcto, pero no demasiado pequeño para ser inmunogénico, el péptido puede estar unido a un portador adecuado.

Se tiene conocimiento de la existencia de un determinado número de técnicas para la obtención de la citada unión,
15 incluyendo la formación de uniones disulfuro utilizando N-succinimidil-3-(2-piridil-tio)propionato (SPDP) y succinimidil-4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), obtenidos a partir de Pierce Company, Rockford, Illinois. (Si el péptido carece de un sulfidrilo, el mismo puede ser proporcionado mediante la adición de un resto cisteína). Estos reactivos crean una unión disulfuro entre ellos mismos y los restos cisteína peptídicos sobre una proteína y una unión amida a través de ε-amino sobre una lisina, u otro grupo amino libre en el otro. Se tiene
20 conocimiento de la existencia de una diversidad de los citados agentes formadores de disulfuro/amida. Ver, por ejemplo, Immun. Rev (1982) 62:185. Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter más que una unión disulfuro. Muchos de estos agentes formadores de tioéter se encuentran disponibles comercialmente e incluyen ésteres reactivos del ácido 6-maleimidocaproico, del ácido 2-bromoacético, del ácido 2-yodoacético, del ácido 4-(N-maleimido-metil)-ciclohexano-1-carboxílico y similares. Los grupos carboxilo pueden ser activados
25 mediante la combinación de los mismos con succinimida o sal sódica del ácido 1-hidroxi-2-nitro-4-sulfónico. La lista anterior no pretende resultar exhaustiva y claramente, pueden utilizarse modificaciones de los compuestos mencionados. Puede utilizarse cualquier portador, el cual no induzca de por sí la producción de anticuerpos perjudiciales para el huésped, tales como diversas sueroalbúminas, toxoides del tétanos o hemocianina de la lapa californiana (KLH).

30 Los conjugados, cuando se inyectan en los sujetos adecuados, darán lugar a la producción de antisueros que contienen inmunoglobulinas específicamente reactivas frente no tan solo los conjugados sino también frente a proteínas de fusión que soportan partes análogas de la secuencia, y frente a determinantes adecuados dentro del PCVII completo.

35 B.4. Producción de anticuerpos

Las proteínas codificadas por los nuevos virus de la presente descripción, o sus fragmentos, pueden ser utilizadas para producir anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales. Si se desea obtener anticuerpos policlonales, se
40 inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un antígeno de la presente descripción, o su fragmento, o un antígeno mutado. Se recoge suero procedente del animal inmunizado y se trata de acuerdo con procedimientos conocidos. Ver, por ejemplo, Jurgens et al., (1985) J. Chrom. 348:363-370. Si se utiliza suero que contiene anticuerpos policlonales, los anticuerpos policlonales pueden ser purificados por medio de cromatografía de afinidad, utilizando procedimientos conocidos.

45 Anticuerpos monoclonales para las proteínas y fragmentos de las mismas pueden ser rápidamente producidos por parte de los expertos en la materia. La metodología general para la preparación de anticuerpos monoclonales utilizando tecnología hibridoma es bien conocida. Pueden crearse líneas celulares productoras de anticuerpos inmortales mediante fusión celular, y también mediante otras técnicas, tales como la transformación directa de
50 linfocitos B con DNA oncogénico o transfección con virus Epstein-Barr. Ver, por ejemplo, M. Schereier et al., Hybridoma Techniques (1980); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T cell Hybridomas (1981); Kennett et al., Monoclonal Antibodies (1980); ver también las patentes US N^{os}. 4.341.761; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4.452.570; 4.466.917; 4.472.500; 4.491.632; y 4.493.890. Paneles de anticuerpos monoclonales producidos frente a la proteína deseada o fragmentos de la misma pueden ser cribados para determinar diversas propiedades, a saber,
55 isotipo, epítipo, afinidad, etc. Los anticuerpos monoclonales resultan de utilidad en la purificación, utilizando técnicas de inmunofluorescencia, de los antígenos individuales contra los cuales se dirigen. Tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales pueden ser utilizados para la inmunización pasiva o ser combinados con preparaciones de vacuna subunitarias para reforzar la respuesta inmune. Los anticuerpos policlonales y monoclonales resultan también de utilidad a los efectos de diagnóstico.

60 B.5. Formulaciones de vacuna y administración

Las nuevas proteínas víricas de la presente descripción pueden formularse en forma de composiciones para vacuna, ya sea en solitario o en combinación con otros antígenos, para ser utilizadas en la inmunización de sujetos, tal y
65 como se describe más adelante. Los procedimientos para la preparación de las citadas formulaciones se describen

en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 18 Edition, 1990. Habitualmente, las vacunas de la presente descripción son preparadas en forma de inyectables, ya sea en forma de soluciones líquidas o de suspensiones. Pueden también prepararse formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos, con anterioridad a la inyección. La preparación puede ser también emulsionada o se puede encapsular el principio activo en vehículos liposoma. El ingrediente inmunogénico activo es generalmente mezclado con un vehículo farmacéutico compatible, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, el vehículo puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes y agentes tamponadores del pH.

10

Pueden también añadirse a la formulación adyuvantes para reforzar la eficacia de la vacuna. Entre los citados adyuvantes se incluyen, sin limitación, adyuvantes formados a partir de sales de aluminio (alum), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; formulaciones de emulsión aceite-en-agua y agua-en-aceite, tales como Adyuvante Completo de Freund's (CFA), Adyuvante Incompleto de Freund's (IFA), avridina y bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA); adyuvantes formados a partir de componentes de pared de células bacterianas, tales como adyuvantes que incluyen monofosforil-lípido A (MPL) (Imoto et al., (1985) Tet. Lett. 26: 1545-1548), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS); adyuvantes derivados de toxinas bacterianas ribosiladoras de ADP, tales como derivados de toxina de difteria (por ejemplo, CRM₁₉₇, un mutante de toxina de difteria no tóxico (ver, por ejemplo, Bixler et al. (1989) Adv. Exp. Med. Biol. 251: 175; y Constantino et al., (1992) Vaccine), toxina pertussis (PT), toxina del cólera (CT), las toxinas sensibles al calor de E. coli (LT1 y LT2), Pseudomonas endotoxina A, toxinas C. botulinum C2 y C3, al igual que toxinas procedentes de C. perfringens, C. spiriforme y C. difficile; adyuvantes de saponina, tales como Quil A (patente US nº. 5.057.540), o partículas generadas a partir de saponinas tales como ISCOMs (complejos inmunoestimuladores); citoquinas tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulador de colonia de macrófago (M-SCF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc; péptidos muramilo, tales como N-acetil-muramilo-L-treonil-Disoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramilo-L-alanilo-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isogutaminilo-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc; adyuvantes derivados de la familia CpG de moléculas, dinucleótidos CpG y oligonucleótidos sintéticos que comprenden motivos CpG (ver, por ejemplo, Krieg et al. Nature (1995) 374: 546 y Davis et al. J. Immunol. (1998) 160: 870-876); y adyuvantes sintéticos tales como PCPP (Poli(di(carboxilatofenoxi)fosfazeno) (Payne et al., Vaccines (1998) 16: 92-98). Los citados adyuvantes se encuentran comercialmente disponibles en un determinado número de distribuidores, tales como Accurate Chemicals; Ribi Immunochemicals, Hamilton, MT; GIBCO; Sigma, St. Louis, MO.

35

Tal y como se ha explicado anteriormente, las proteínas pueden estar unidas a un portador, con vistas a incrementar la inmunogenicidad de las mismas. Entre los portadores adecuados se incluyen macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, incluyendo sueroalbúminas, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina u otras proteínas bien conocidas por parte de los expertos en la materia; polisacáridos, tales como sefaroza, agarosa, celulosa, bolitas de celulosa y similares; aminoácidos poliméricos, tales como ácido poliglútamico, polilisina, y similares; copolímeros de aminoácido; y partículas de virus inactivas.

40

Las proteínas pueden ser utilizadas en sus formas naturales o pueden modificarse sus grupos funcionales mediante, por ejemplo, succinilación de restos lisina o reacción con Cys-tiolactona. Puede incorporarse también un grupo sulfidrilo en el portador (o antígeno) a través de, por ejemplo, reacción de funciones amino con 2-iminotiolano o el éster N-hidroxisuccinimida de 3-(4-ditiopiridil)propionato. Los portadores adecuados pueden ser también modificados para incorporar brazos espaciadores (tales como hexametilendiamina u otras moléculas bifuncionales de tamaño similar), para su unión con los péptidos.

45

Entre otros portadores adecuados para las proteínas de la presente invención se incluyen polipéptidos VP6 de rotavirus, o fragmentos funcionales de los mismos, tal y como se describe en la patente US nº. 5.071.651. También resulta de utilidad un producto de fusión de una proteína vírica y los referidos inmunógenos preparados a través de procedimientos descritos en la patente US nº. 4.722.840. Entre otros portadores adecuados se incluyen células, tales como linfocitos, dado que la presentación en esta forma imita el modelo natural de presentación en el sujeto, lo cual da lugar al estado inmunizado. Alternativamente, las proteínas de la presente invención pueden acoplarse a eritrocitos, preferiblemente a los propios eritrocitos de los sujetos. Los procedimientos de acoplamiento de péptidos a proteínas o a células son conocidos por los expertos en la materia.

55

Además, las proteínas pueden ser formuladas en forma de composiciones para vacuna, en formas neutras o de sal. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de los polipéptidos activos) y que se obtienen con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosforico, o con ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales obtenidas a partir de grupos carboxilo libres pueden ser también derivadas de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro y a partir de bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaina y similares.

65

Las formulaciones para vacuna contendrán una “cantidad terapéuticamente eficaz” del ingrediente activo, es decir, una cantidad capaz de generar una respuesta inmune en un sujeto al que se le administra la composición. La citada respuesta se demostrará mediante, o bien una reducción o a través de ausencia de los síntomas normalmente mostrados por un huésped infectado, y/o a través de un período de recuperación más rápido

5

La cantidad exacta es determinada de forma rápida por parte de un experto en la materia, utilizando comprobaciones estándar. La concentración de proteína oscilará habitualmente entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 95% (en peso) de la composición o incluso puede ser más elevada o más baja, si ello resulta adecuado.

10

Para inmunizar un sujeto, la vacuna se administra generalmente de forma parenteral, habitualmente a través de inyección intramuscular. No obstante, resultan también aceptables otros modos de administración, tales como inyección subcutánea, intraperitoneal e inyección intravenosa. La cantidad que tiene que ser administrada dependerá del animal que tenga que ser tratado, de la capacidad que tenga el sistema inmune del animal para sintetizar anticuerpos y del grado de protección deseado. Las dosis eficaces pueden ser determinadas de forma rápida por parte de un experto en la materia, a través de ensayos rutinarios que establecen curvas de respuesta a las dosis administradas. El sujeto es inmunizado a través de la administración de la vacuna en al menos una dosis y, preferiblemente, dos dosis. Además, al animal pueden serle administradas tantas dosis como resulte necesario para mantener un estado de inmunidad frente a la infección.

20

Entre otras formulaciones de vacuna adicionales que resultan adecuadas para otros modos de administración se incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones en forma de aerosol, intranasales y orales, y formulaciones de liberación sostenida. Para el caso de supositorios, la composición vehículo incluirá habitualmente aglutinantes y portadores, tales como, glicoles polialcalinos o triglicéridos. Los citados supositorios pueden ser obtenidos a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en una banda que oscila entre aproximadamente el 0,5% y aproximadamente el 10%, preferiblemente entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 2%. Los vehículos orales incluyen los citados excipientes normalmente utilizados, tales como, por ejemplo, concentraciones farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, magnesio, estearato, celulosa, sacarina sódica, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones de vacuna orales pueden ser preparadas en forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 95% del ingrediente activo, preferiblemente entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 70%.

25

Las formulaciones intranasales incluirán habitualmente vehículos que no provocan irritación en la mucosa nasal ni alteran significativamente la función ciliar. Para obtener los efectos descritos en el presente documento, pueden utilizarse diluyentes tales como agua, solución salina acuosa u otras sustancias conocidas. Las formulaciones nasales pueden también contener conservantes tales como, aunque no limitados a, clorobutanol y cloruro de benzalconio. Para reforzar la absorción de las proteínas del sujeto a través de la mucosa nasal puede utilizarse un tensoactivo.

40

Se preparan formulaciones de liberación sostenida o controlada mediante la incorporación de la proteína en portadores o vehículos tales como liposomas, polímeros impermeables no reabsorbibles, tales como copolímeros de acetato de etilenvinilo y copolímeros HytreTM, polímeros hinchables tales como hidrogeles, o polímeros reabsorbibles tales como colágeno y determinados poliácidos o poliésteres, tales como los utilizados para preparar suturas reabsorbibles. Las proteínas pueden ser también ser suministradas utilizando mini-bombas implantadas, bien conocidas en el estado de la técnica.

45

Las proteínas de la presente invención pueden ser también administradas a través de un virus portador que exprese a las mismas. Entre los virus portadores útiles con la presente invención se incluyen, pero no están limitados a, el virus vaccinia, otros virus pox, adenovirus y virus herpes. A modo de ejemplo, los virus vaccinia recombinantes que expresan las proteínas nuevas pueden ser contruidos se acuerdo con lo que se indica seguidamente. El DNA que codifica para la proteína particular es insertado primeramente en un vector adecuado, con vistas a que se encuentre en posición adyacente a un potenciador de vaccinia y lindante con secuencias de DNA de vaccinia, tales como la secuencia que codifica para la timidina quinasa (TK). Este vector es después utilizado para transfectar células que son infectadas simultáneamente con vaccinia. La recombinación homóloga sirve para insertar el potenciador de vaccinia más el gen que codifica para la referida proteína en el genoma vírico. La TK recombinante resultante puede ser seleccionada mediante el cultivo de células en presencia de 5-bromodesoxiuridina y seleccionando placas víricas resistentes a la misma.

50

Una ruta alternativa de administración conlleva terapia genética o inmunización mediante ácido nucleico. Por lo tanto, las secuencias de nucleótido (y elementos regulatorios acompañantes) que codifican para las proteínas del sujeto pueden ser administradas directamente a un sujeto, para la traducción in vivo de las mismas. Alternativamente, la transferencia genética puede ser lograda mediante la transfección de las células o tejidos del sujeto ex vivo y la reintroducción del material transformado en el huésped. El DNA puede ser introducido directamente en el organismo del huésped, a saber, mediante inyección, ver las patentes US n.ºs. 5.580.859 y

65

5.589.466; la solicitud de patente internacional N° WO 90/11092; y Wolf et al., (1990) *Science* **247**:1465-1468). La transferencia de los genes mediada por liposomas puede ser también lograda utilizando procedimientos conocidos. Ver, por ejemplo, la patente US n°. 5.703.055; Hazinski et al., (1991) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **4**: 206-209; Brigham et al., (1989) *Am. J. Med. Sci.* **298**: 278-281; Canonico et al., (1991) *Clin. Res.* **39**: 219A; y Nabel et al., (1990) *Science* **249**: 1285-1288. Agentes para dirección a objetivos, tales como anticuerpos dirigidos frente a antígenos de superficie expresados sobre tipos de células específicos, pueden ser conjugados covalentemente con la superficie del liposoma, a los efectos de que el ácido nucleico pueda ser suministrado a células y tejidos específicos, susceptibles de infección.

10 B.6. Ensayos de diagnóstico

Tal y como se ha explicado anteriormente, las proteínas descritas de la presente invención pueden ser también utilizadas como productos de diagnóstico para detectar la presencia de anticuerpos de PCVII reactivos en una muestra biológica, con vistas a determinar la presencia de infección por PCVII. Por ejemplo, la presencia de anticuerpos reactivos con las proteínas puede ser detectada utilizando técnicas electroforéticas y de inmunodiagnóstico estándar, incluyendo inmunoensayos, tales como ensayos competitivos, de reacción directa o de tipo sándwich. Entre los citados ensayos se incluyen, pero no están limitados a, transferencias Western; ensayos de aglutinación; inmunoensayos mediados y marcados por enzimas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis, inmunoprecipitación, etc. Entre las reacciones se incluyen generalmente marcadores de revelado, tales como marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivos, o enzimáticos o moléculas colorantes u otros procedimientos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos con los que reacciona.

Los ensayos mencionados anteriormente conllevan generalmente la separación de anticuerpo no unido en una fase líquida de un soporte en fase sólida al cual están unidos los complejos antígeno-anticuerpo. Entre los soportes sólidos que pueden ser utilizados en la práctica de la descripción se incluyen sustancias, tales como nitrocelulosa por ejemplo, en forma de pocillo o de membrana de microtitulación; cloruro de polivinilo (por ejemplo, laminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, partículas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilidina; papel diazotado; membranas de nylon; partículas activadas, partículas que presentan respuesta magnética, y similares.

Habitualmente, primero se hace reaccionar un soporte sólido con un componente en fase sólida (por ejemplo, una o más proteínas PCVII), en condiciones de unión adecuadas, de tal forma que el componente esté suficientemente inmovilizado en el soporte. Algunas veces, la inmovilización del antígeno en el soporte puede ser reforzada acoplando primero el antígeno a una proteína con mejores propiedades de unión. Entre las proteínas de acoplamiento adecuadas se incluyen, si bien no están limitadas a, macromoléculas tales como sueroalbúminas, incluyendo sueroalbúmina bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana, moléculas inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina y otras proteínas que son bien conocidas por parte de los expertos en la materia. Entre otras moléculas que pueden ser utilizadas para la unión de los antígenos con el soporte se incluyen polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, ácidos amino-poliméricos, copolímeros aminoácido y similares. Las citadas moléculas y procedimientos de acoplamiento de estas moléculas con los antígenos resultan bien conocidos por parte de los expertos en la materia. Ver, por ejemplo, Brinkley, M.A. *Bioconjugate Chem.* (1992) **3**: 2-13; Hashida et al., *J. Appl. Biochem* (1984) **6**: 56-63; y Anjaneyulu and Staros, *Internacional J. of Peptide and Protein Res.* (1987) **30**: 117-124.

Una vez se ha hecho reaccionar el soporte sólido con el componente fase sólida, los componentes en fase sólida no inmovilizados son eliminados del soporte mediante lavado, y el componente unido al soporte es puesto en contacto con una muestra biológica sospechosa de contener restos ligando (por ejemplo, anticuerpos para los antígenos inmovilizados), en condiciones de unión adecuadas. Después de lavar para eliminar el ligando no unido, se añade un aglutinante secundario, en condiciones de unión adecuadas, siendo el aglutinante secundario capaz de asociarse selectivamente con el ligando unido. La presencia del aglutinante secundario puede ser entonces detectada utilizando técnicas bien conocidas por los expertos.

Más particularmente, puede utilizarse un procedimiento ELISA, en el que los pocillos de una placa de microvaloración son revestidos con una proteína deseada. Una muestra biológica que contiene, o acerca de la cual se tiene la sospecha de que pueda contener moléculas inmunoglobulina anti-proteína, es después añadida a los pocillos revestidos. Después de un período de incubación suficiente para permitir la unión del anticuerpo con el antígeno inmovilizado, la(s) placa(s) pueden ser lavadas para eliminar los restos no unidos y añadirse una molécula de unión secundaria marcada como detectable. La molécula de unión secundaria es dejada reaccionar con cualquier anticuerpo de la muestra capturada, la placa es lavada y la presencia de la molécula de unión secundaria se detecta utilizando procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica.

Así pues, en una realización particular, la presencia de ligandos anti-antígeno unidos procedentes de una muestra biológica puede ser rápidamente detectada utilizando un aglutinante secundario que comprende un anticuerpo dirigido frente a los ligandos anticuerpo. Se tiene conocimiento en el estado de la técnica de un determinado número de moléculas de inmunoglobulina (Ig) anti-porcina, las cuales pueden ser rápidamente conjugadas con una marca

enzimática detectable, tal como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o ureasa, utilizando procedimientos conocidos por parte de los expertos en la materia. Para generar una señal detectable se utiliza después un sustrato enzima apropiado. Un sustrato enzima apropiado es utilizado después para generar una señal detectable. En otros experimentos relacionados, pueden llevarse a la práctica técnicas ELISA de tipo competitivo, utilizando
5 procedimientos conocidos por parte de los expertos en la materia.

Pueden llevarse también a cabo ensayos en solución, de tal forma que las proteínas y los anticuerpos específicos para tales proteínas formen complejos en condiciones de precipitación. En una realización particular, las proteínas pueden ser unidas a una partícula en fase sólida (por ejemplo, una bolita de agarosa o similar), utilizando técnicas
10 de acoplamiento ya conocidas, tales como a través de acoplamiento químico directo o acoplamiento indirecto. La partícula revestida con antígeno es después puesta en contacto, en condiciones de unión adecuadas, con una muestra biológica sospechosa de contener anticuerpos para las proteínas. La reticulación entre anticuerpos unidos provoca la formación de agregados complejos partícula-antígeno-anticuerpo, los cuales pueden ser precipitados y separados de la muestra utilizando lavado y/o centrifugación. La mezcla de reacción puede ser analizada para
15 determinar la presencia o ausencia de complejos anticuerpo-antígeno, utilizando cualquiera de los procedimientos estándar, tales como los procedimientos de inmunodiagnóstico descritos anteriormente.

En todavía una nueva realización, puede proporcionarse una matriz de inmovilización, en la que una población policlonal de anticuerpos procedentes de una muestra biológica sospechosa de contener anticuerpos para la
20 proteína de interés, es inmovilizada a un sustrato. En este sentido, puede llevarse a cabo una purificación de la afinidad inicial de la muestra utilizando antígenos inmovilizados. La preparación de la muestra resultante contendrá pues, de este modo, tan solo restos anti-PCVII, evitando las potenciales propiedades de unión no específicas en el soporte de afinidad. En el estado de la técnica se tiene conocimiento acerca de la existencia de un determinado número de procedimientos de inmovilización de inmunoglobulinas (ya sea intactas o en fragmentos específicos), con
25 elevado rendimiento y buena retención de actividad de unión a antígeno. Sin que estén limitadas a ningún procedimiento en particular, la proteína A o la proteína G inmovilizadas pueden ser utilizadas para inmovilizar inmunoglobulinas.

Por consiguiente, una vez las moléculas de inmunoglobulina han sido inmovilizadas para proporcionar una matriz de
30 inmovilización, las proteínas marcadas son puestas en contacto con los anticuerpos unidos, en condiciones de unión adecuadas. Después de haber lavado cualquier antígeno no específicamente unido procedente del soporte de inmovilización, puede determinarse la presencia de antígeno unido mediante un ensayo de marcado, utilizando procedimientos conocidos en el estado de la técnica.

35 Adicionalmente, anticuerpos generados para las proteínas, más que las propias proteínas, pueden ser utilizados en los ensayos descritos anteriormente, con vistas a detectar la presencia de anticuerpos para las proteínas en una muestra determinada. Estos ensayos son llevados a cabo tal y como se ha descrito anteriormente y resultan bien conocidos por parte de los expertos en la materia.

40 Además, pueden llevarse también a cabo ensayos basados en ácidos nucleicos. En este sentido, utilizando como base las secuencias de ácido nucleico descritas para PCVII pueden prepararse oligómeros que resultan de utilidad como sondas de hibridación o cebadores PCR para detectar la presencia del genoma vírico en, por ejemplo, muestras biológicas procedentes de sujetos sospechosos de albergar el virus. Los oligómeros que se utilizan en esta realización de la invención tienen una longitud de aproximadamente 8 ó más nucleótidos, preferiblemente una
45 longitud de entre 10 y 12 nucleótidos, más preferiblemente al menos aproximadamente una longitud de entre aproximadamente 15 y 20 nucleótidos y hasta una longitud máxima de 50 ó más nucleótidos. Preferiblemente, los oligómeros proceden de regiones del genoma vírico que carecen de heterogeneidad.

Los oligómeros se preparan o bien mediante escisión a partir del genoma o de forma recombinante o sintética. Por
50 ejemplo, los oligómeros pueden ser preparados utilizando procedimientos rutinarios, tales como procedimientos sintéticos de oligonucleótidos automatizados.

Los oligonucleótidos pueden ser utilizados como sondas en ensayos de diagnóstico. En un ensayo representativo, la muestra biológica que tiene que ser analizada es tratada para extraer los ácidos nucleicos contenidos en la misma.
55 El ácido nucleico resultante procedente de la muestra puede ser sometido a electroforesis en gel o a otras técnicas de separación por tamaño.

Alternativamente, la muestra de ácido nucleico puede ser transferida puntualmente sin separación por tamaño. Las sondas son después marcadas con un resto informador. En el estado de la técnica se tiene conocimiento acerca de
60 la existencia de marcas adecuadas y de procedimientos para marcas sondas y entre los mismos se incluyen. Por ejemplo, marcas radioactivas incorporadas mediante traslado de mellas o fosforilación, biotina, sondas fluorescentes y sondas quimioluminiscentes. Los ácidos nucleicos extraídos de la muestra son después tratados con la sonda marcada en condiciones de hibridación de restricciones adecuadas.

65 Las sondas pueden ser obtenidas de forma totalmente complementaria a la secuencia del gen PCVII objetivo. No

obstante, cuando se utilizan sondas más largas en los ensayos de diagnóstico, la cantidad de complementariedad puede ser menor. Generalmente, en los procedimientos de ensayo se utilizan condiciones de elevada restricción, especialmente cuando las sondas son completa o altamente complementarias. No obstante, cuando el objetivo esté constituido por regiones de heterogeneidad, deben utilizarse condiciones de restricción más bajas. Los procedimientos de ajuste de la restricción son bien conocidos en el estado de la técnica. Los citados ajustes se efectúan durante la hibridación y el procedimiento de lavado e incluyen ajustes en la temperatura, concentración iónica, concentración de formamida y duración de la reacción. Estos factores son mencionados en, por ejemplo, Sambrook et al., supra.

10 En una realización más específica, el procedimiento descrito anteriormente incluye la utilización de sondas específicas para ácido nucleico de PCVII, en donde dos sondas (cebadores) definen una región interna del genoma de PCVII. En esta realización, cada una de las sondas presenta una hebra que contiene un extremo 3' interno a la región interna del ácido nucleico de PCVII. Los complejos ácido nucleico/sonda de hibridación son convertidos después en fragmentos que contienen sondas de doble hebra, a través de reacciones de extensión con cebador.

15 Los fragmentos que contienen sondas son amplificados mediante la repetición sucesiva de los pasos de (i) desnaturalizar los fragmentos de doble hebra para producir fragmentos de hebra sencilla, (ii) hibridar las hebras sencillas con las sondas para formar complejos hebra/sonda, (iii) generar fragmentos de doble hebra a partir de los complejos hebra/sonda en presencia de DNA polimerasa y los cuatro desoxirribonucleótidos, y (iv) repetir los pasos (i) a (iii) hasta que se alcance el grado de amplificación deseado. Los productos de amplificación son después

20 identificados según los procedimientos establecidos. El procedimiento de la invención puede contener adicionalmente una tercera sonda de polinucleótido, capaz de hibridarse selectivamente con la región interna descrita anteriormente pero no con las secuencias específicas sonda/cebador utilizadas para la amplificación.

Las técnicas PCR, tales como las descritas anteriormente son bien conocidos en el estado de la técnica. Ver, por ejemplo, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academia Press); PCR a Practical Approach (IRL press); Saiki et al. (1986) Nature 324: 163.

En los ensayos basados en ácido nucleico pueden también utilizarse otros procedimientos de amplificación, tales como la reacción en cadena de ligasa (LCR), PCR, Q-beta replicasa y similares.

30 Otros ensayos para ser utilizados en el presente documento incluyen el sistema "Bio-Bridge", que utiliza desoxinucleótido transferasa terminal para añadir colas 3'-poli-dT a una sonda de ácido nucleico (Enzo Biochem. Corp). La sonda con cola poli dt es hibridada con la secuencia nucleótido objetivo y después con una poli-A modificada por biotina. Adicionalmente, el documento EP 124221 describe un ensayo de hibridación de DNA en el que el analito es anillado a una sonda de DNA de hebra única que es complementaria a un oligonucleótido marcado por enzima y el dúplex con cola resultante es hibridado con un oligonucleótido marcado con enzima. El documento EP 204510 describe un ensayo de hibridación de DNA en el que DNA analito es puesto en contacto con una sonda que tiene una cola, tal como una cola poli-dT, una hebra amplificadora que tiene una secuencia que hibrida con la cola de la sonda, tal como una secuencia poli-A, y que es capaz de unirse a una diversidad de hebras marcadas. La

35 técnica puede conllevar primero la amplificación de las secuencias PCVII objetivo en suero hasta alcanzar aproximadamente 10^6 secuencias/ml, tal y como se ha descrito anteriormente. La(s) secuencia(s) amplificada(s) puede(n) ser después detectadas utilizando un ensayo de hibridación conocido en el estado de la técnica.

Además, para ensayos de hibridación in situ pueden también utilizarse secuencias de ácido nucleico derivadas del genoma vírico de PCVII. Generalmente, los citados ensayos utilizan preparaciones o tejidos de cultivo celular fijados con formalina, tales como nódulos linfáticos, bazo, amígdala, hígado, pulmón, corazón, riñón, páncreas, turbinato nasal, intestino delgado y grueso y similares. Ver, por ejemplo, Sinirarumitr et al., (1996) J. Virol. Meth. 56: 149-160, para una descripción de un ensayo de hibridación in situ adecuado.

50 Los reactivos para el ensayo descrito anteriormente, incluyendo las proteínas, los anticuerpos y los oligómeros, pueden ser proporcionados en kits, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, con vistas a llevar a cabo inmunoensayos, tal y como se ha descrito anteriormente. El kit puede contener también, en función del inmunoensayo en particular que se utilice, marcas adecuadas y otros reactivos y materiales envasados (a saber, tampones de lavado y similares). Utilizando estos kits pueden llevarse a cabo inmunoensayos estándar, tales como

55 los que se han descrito anteriormente.

C. Experimental

Materiales y procedimientos

60 Cultivos celulares.

La línea celular Dulac, un derivado PK15 exento de PCV, fue obtenida en Dr. John Ellis (University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan). La línea celular Vero fue obtenida en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Estas células fueron cultivadas en medios sugeridos por la ATCC e incubadas a 37°C con 5% CO₂.

Circovirus porcino

El PCVI clásico fue aislado a partir de células PK15 persistentemente infectadas (ATCC CCL33). Aislado de PCVII
5 142 fue obtenido a partir de nódulos linfático procedente de lechones sometidos a la acción de homogenado de
nódulo linfático procedente de lechones afectados por PMWS. A estos lechones afectados se les había
diagnosticado el PMWS. Aislado de PCVII 9741 fue obtenido a partir de la capa leucocitaria de sangre periférica
procedente de un lechón afectado por PMWS de la misma piara, después del aislamiento del PCVII 142. El aislado
de PCVII B9 fue obtenido a partir de un lechón afectado en una piara de cerdos de Estados Unidos con una
10 epidemia clínica de PMWS en el otoño de 1997.

Propagación de PCVI.

PCVI procedente de células PK15 persistentemente infectadas fue cultivado y purificado utilizando un procedimiento
15 modificado de Tischner et al., (1987) Arch. Virol. 96: 39-57. Brevemente, PCV recogido a partir de células PK15 fue
utilizado para super-infectar una monocapa de células PK15 a aproximadamente 1 moi durante dos horas, antes de
que las células fueran tratadas con D-glucosamina 300 mM. Después de lavar las células una vez, se les añadió
DMEM (Gibco, número de catálogo 21013) con 5% FBS y se incubaron durante un período adicional de cuatro días.
Las células infectadas fueron rascadas y recogidas después de centrifugación a 1500 x g durante 15 minutos. El
20 pellet celular fue tratado después con un 0,5% de Triton X-114, a 37°C durante 30 minutos. Después de otra
centrifugación a baja velocidad para eliminar los restos celulares, se añadió una cantidad igual de Freon (número de
catálogo Sigma T-5271) al sobrenadante y la mezcla fue homogeneizada durante un minuto utilizando un Polytron a
máxima velocidad. La mezcla fue después centrifugada y la capa superior recogida y mezclada con un volumen
igual de PBS 0,1M. El pellet de virus fue recogido después de ultracentrifugación en un cojín con 20% de sacarosa a
25 210.000 x g, durante 30 minutos.

Cultivo de los aislados de campo (PCVII).

El aislado de PCVII 412 fue cultivado y purificado de manera similar como PCVI, con la excepción de que se
30 utilizaron células Dulac. El aislado de PCVII B9 fue cultivado en células Vero heterogénicas, transfectadas con
productos PCR de longitud completa auto-ligados, procedentes de la epidemia de PMWS de Estados Unidos. Por
consiguiente, se eliminó la posibilidad de contaminación a partir de otros patógenos del cerdo. Las células Vero
transfectadas con B9 fueron hechas pasar de forma continua y tratadas con D-glucosamina 300 mM, tal y como se
ha descrito anteriormente.

35

Aislamiento de DNA vírico

Se extrajo DNA vírico procedente de fuentes variables, incluyendo pellets de células Vero y Dulac infectadas, células
de la capa leucocitaria de sangre periférica, tejidos procedentes de animales y de suero infectados. Las muestras de
40 tejido fueron tratadas con proteinasa K y el DNA vírico fue extraído utilizando o bien fenol/cloroformo o un kit de
tejido Qiagen (Qiagen, Santa Clarita, CA). El DNA procedente de células de la capa leucocitaria de sangre periférica
de sangre y suero heparinizados fue recogido de forma similar utilizando el kit sanguíneo Qiagen.

Infeción de lechones.

45

Los lechones fueron derivados de cerdas exentas de patógenos. El primer día de vida cada uno de los lechones
recibió aproximadamente un gramo de nódulos linfáticos recogidos a partir de lechones afectados por PMWS. El
homogenado de tejido fue distribuido igualmente entre las rutas oral e intraperitoneal. Diez lechones fueron
utilizados en cada uno de los grupos experimentales y observados diariamente durante 7 semanas. Dos grupos
50 fueron provocados y dos permanecieron como control no infectados. Dos grupos, uno provocado y otro control,
fueron también tratados con ciclosporina A (2 mg/kg) en el día 0 y el día 14. Los lechones fueron alimentados con
leche de lata (Carnation) y agua (50:50) hasta el auto-destete con alimento preparado comercialmente con nutriente
de elevada densidad.

55 PCR, clonado y secuenciado de los aislados de PCV de campo.

Para el clonado inicial del DNA genómico del aislado de PCVII 412 vírico se efectuó un planteamiento con dos
pasos. Un cebador que hibrida con las secuencias horquilla conservadas, Bucle⁻ (Tabla 1), fue diseñado para llevar
a cabo una PCR con un único cebador, sacando partido de las secuencias complementarias y de la naturaleza
60 circular del DNA genómico del PCV. La reacción PCR para la PCR con cebador único era un proceso en dos etapas.
El primer estadio consistía en 5 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, anillamiento a 37°C durante 30
segundos y extensión a 72°C durante dos minutos. El segundo estadio consistía en 25 ciclos de un programa similar,
con la excepción de que la temperatura de anillamiento se incrementaba hasta los 52°C. Los productos de la PCR
fueron clonados en un vector TA (Invitrogen, Carlsbad, CA). Ambas hebras de tres diferentes clones fueron
65 secuenciadas para asegurar la fidelidad de secuencia. En base a las secuencias obtenidas, el cebador 1000 y el

R1F fueron diseñados en la región no codificadora de las secuencias de DNA vírico y utilizados para clonar el genoma vírico de longitud completa. Las secuencias de la totalidad de cebadores utilizados en este estudio se muestran en la Tabla 1. Las secuencias de la región bucle fueron obtenidas después a partir del clon de longitud completa. Secuencias de aislado PCVII 9714 y PCVII B9 fueron obtenidas a partir de productos PCR purificados. El 5 secuenciado de DNA automatizado llevado a cabo por Plant Biotechnology Institute de NRC fue utilizado con diversos cebadores internos. Las secuencias de aislados PCVII 412 (AF085695), PCVII (AF086835) y PCVII B9 (AF086834) han sido depositadas en el nacional Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tabla 1 Las secuencias de cebadores utilizados en los estudios		
Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
Bucle	ACTACAGCAGCGCACTTC	13
1000-	AAAAAAGACTCAGTAATTTATTTTCATATGG	14
R1F	ATCACTTCGTAATGGTTTTTATT	15
1710+	TGCGGTAACGCCTCCTTG	16
850-	CTACAGCTGGGACAGCAGTTG	17
1100+	CATACATGGTTACACGGATATTG	18
1570-	CCGCACCTTCGGATATACTG	19
1230-	TCCCCTTACTTCACACCCAA	22
400+	CCTGTCTACTGCTGTGAGTA	23

10 Análisis de secuencias.

Las secuencias de otros circovirus fueron obtenidas a partir de NCBI. Para el análisis de las secuencias se utilizaron diversos dominios públicos, tales como el Workbench Biology, la investigación Blast, herramientas de análisis DNA/proteína, etc. Las alineaciones de secuencia fueron generadas utilizando el programa Clustal W (Biology 15 Workbench, dirección de Internet: <http://biology.ncsa.uiuc.edu>) y se crearon árboles filogenéticos a través del programa PAUP 3.1 (David L. Swofford, Laboratory of Molecular Systematics, MRC534, MRC at Smithsonian Institution, Washington, D.C.).

20 Multiplex PCR.

Para identificar las secuencias del grupo específico PCV y las secuencias específicas de cepa se diseñaron dos grupos de cebadores. El par cebador 1710+/850- es específico del grupo PCV y el par 1100+/1570- es el nuevo par específico para la cepa PCV, que diferencia el PCV nuevo del derivado de las células PK15. Los dos grupos de cebadores presentan temperaturas de anillamiento similares para la reacción PCR y fueron utilizados conjuntamente 25 a una concentración 0,5 µM en una reacción PCR de inicio caliente estándar. Se utilizó o bien Ampli Taq Gold (Perkin-Elmer) o Plentium Taq (Gibco).

Antisuero.

30 El anticuerpo anti-PCVI de conejo Berlin estándar fue amablemente proporcionado por el Dr. Tischer (Koch Institute, Berlin, FRG). Suero anti-PCVII 412 de conejo agrupado fue obtenido a partir de dos conejos inyectados con aislado de PCVII 412 purificado, a razón de 50 µg/dosis, en una emulsión aceite-en-agua. La inyección fue repetida 3 veces a intervalos de 21 días. Se recogió suero anti-PMWS de cerdo procedente de cerdos convalecientes procedentes de 35 pjaras afectadas por PMWS.

ELISA.

Se diluyó PCV purificado en tampón carbonato sódico (0,05 M), pH 9,6, a una concentración de 0,5 µg por 100 µl y se utilizó para revestir placas de Immulon II (Dynatech Laboratories, Inc). Las placas fueron lavadas seis veces con 40 TTBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, 0,05% de Tween 20, pH 7,5), con anterioridad a la adición de anticuerpo primario de conejo o de cerdo, diluido en serie. Después de seis lavados con TTBS, se añadieron anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (dilución 1/5000), ya sea anti-conejo o anti-cerdo (Kirkegaard & Perry). Las placas fueron reveladas con 100 µl/pocillo de fosfato de p-nitrofenilo (PNPP, 3g/L) en dietanolamina 1M, MgCl₂ 0,5, pH 9,8 y las placas fueron leídas en un lector ELISA (BioRad), a 405/490 nm.

45 Análisis FACS de marcadores superficiales de linfocitos

Se recogieron muestras de sangre procedentes de lechones afectados por PMWS en el control negativo y en el de campo. El RBC fue sometido a lisis y el WBC teñido con anticuerpos monoclonales CD3, CD4 y CD8 anti-cerdo, 50 seguido de anticuerpo secundario anti-ratón marcado fluorescente. Las células marcadas específicamente fueron fijadas con 2% formaldehído y se procedió al conteo de 5000 células utilizando el sistema FACS (Becton Dickinson).

Ejemplo 1

Reproducción de PMWS

- El PMWS no ha sido reproducido en condiciones controladas, ni se han llevado a cabo estudios de etiología. Con vistas a determinar el agente causante de esta enfermedad, se recogieron un determinado número de tejidos procedentes de cerdos afectados por PMWS, tal y como se ha descrito anteriormente en Materials and Methods, y se procedió a su estudio. Los nódulos linfáticos mostraban las lesiones macroscópicas y los cambios histopatológicos más evidentes y la infección por circovirus fue confirmada por medio de inmunoteñido. Por consiguiente, los nódulos linfáticos fueron utilizados en los experimentos de provocación descritos anteriormente.
- 10 Los experimentos de provocación, llevados a cabo tal y como se indica en Materials and Methods resultaron exitosos en la producción de PMWS en cerdos. En particular, algunos lechones murieron a causa de la infección y lechones asintómicamente infectados desarrollaron lesiones microscópicas de tipo PMWS hacia el final del ensayo.
- 15 En otro experimento de provocación, el material de partida utilizado era tejido de pulmón de cerdo con desmedro crónico y agrandamiento de nódulo linfático. Estas señales clínicas son características del PMWS. El tejido se combinó con solución salina tamponada con fosfato 0,1 M estéril (PBS) y se homogeneizó haciéndola pasar a través de un mezclador polytron. El homogenado de tejido crudo fue utilizado para provocar a los cerdos. En particular, un total de 40 lechones (de aproximadamente 1 día de edad) fueron asignados aleatoriamente (equilibrio entre piara de nacimiento, sexo y peso corporal) a grupos de tratamiento "provocación de tejido", "provocación de tejido con ciclosporina-A", "control" o "ciclosporina-A". El tratamiento con ciclosporina no generaba ningún efecto clínico o hematológico sobre los cerdos tratados, con la excepción de que se detectaba ciclosporina en la sangre de estos cerdos tres horas después de la administración del fármaco. Por lo tanto, los grupos quedaron bloqueados tras el tratamiento con ciclosporina para análisis.
- 20
- 25 En general, entre las señales post-mortem de la enfermedad PMWS en los cerdos provocados se incluían nódulos linfáticos agrandados y bloqueo incompleto del tejido pulmonar. Señales post-mortem de la enfermedad PMWS se detectaron en significativamente más cerdos en el grupo tratado ($p < 0,01$; prueba exacta de Fisher con dos colas) con extracto de tejido (siete cerdos de nueve) que en el grupo tratado con placebo (2 cerdos de 18). La ganancia diaria promedio en el grupo tratado con inyección de extracto de tejido (212 gm/d) no resultaba significativamente diferente de la del grupo al que se le había proporcionado placebo (202 gm/d).
- 30
- Se obtuvieron muestras de sangre durante el transcurso de todo el experimento y las muestras de tejidos fueron obtenidas post-mortem. Las muestras fueron objeto de comprobación para determinar el DNA vírico del PCVII mediante PCR, utilizando cebadores PCR 1230- y 400+ (Tabla 1), los cuales resultaban en un producto par base 830. Cuatro de los cerdos a los cuales se les había proporcionado el extracto de tejido pulmonar proporcionaron muestras de sangre positivas; mientras que ninguno de los cerdos a los que se había proporcionado placebo presentó detección de DNA de PCVII en su sangre. El PCVII fue detectado en uno o más tejidos de 7 de los 8 cerdos supervivientes en el grupo de tratamiento "provocación por virus", mientras que la totalidad de tejidos procedentes de cerdos en el grupo control dieron resultado negativo en lo referente a PCVII. El análisis de la tabla de contingencias mostró una diferencia significativa ($p < 0,001$; prueba exacta de Fishers de dos colas).
- 40
- En otro experimento de provocación, se recogió tejido pulmonar de cerdo con desmedro crónico y agrandamiento de nódulo linfático y el residuo tisular se eliminó por medio de centrifugación (8000 rpm, durante un período de 30 minutos). El sobrenadante fue aplicado a un gradiente gradual de cloruro de cesio y centrifugado a 100,000 x g. Aparecieron bandas entre 41% CsCl₂ (1,28 gm/ml) y 63% (1,40 gm/ml). Estas bandas fueron aplicadas a un "pie" de 30% CsCl₂ y se procedió a centrifugar durante un período de 2 horas a 100.000 x g. El pellet fue resuspendido en 15 mL de PBS estéril 0,1M.
- 45
- 50 Un total de 20 lechones destetados (de aproximadamente tres semanas de edad) fueron asignados aleatoriamente (en base a la piara de nacimiento, sexo y peso corporal) a grupos de tratamiento "control" o a grupos de "provocación por virus". Los cerdos fueron destetados en el día 0, a aproximadamente las tres semanas de edad. En general, entre las señales clínicas de la enfermedad PMWS se incluían un agrandamiento de los nódulos linfáticos y el desmedro o escaso crecimiento. El agrandamiento de los nódulos linfáticos fue detectado en un número significativamente mayor de cerdos ($p < 0,02$; prueba exacta de Fisher con dos colas) en el grupo tratado con el virus (7 cerdos) que en el grupo tratado con placebo (1 cerdo). La ganancia diaria promedio en el grupo tratado con inyección de virus (580 gm/d) tendía a resultar inferior que la detectada en el grupo que había recibido placebo (616 gm/d), pero la diferencia no resultaba significativa ($p = 0,17$; Prueba t dos colas emparejadas). No existía diferencia entre grupos en la masa relativa de los órganos internos (hígado, corazón, bazo, riñones).
- 55
- 60 Muestras de sangre que fueron obtenidas a lo largo del experimento y muestras de tejidos que fueron obtenidas post-mortem fueron objeto de comprobación para determinar el DNA vírico del PCVII, utilizando las técnicas de PCR descritas anteriormente.
- 65 La totalidad de las muestras de sangre, incluyendo las obtenidas justo antes de la eutanasia, resultaron negativas en

lo concerniente al PCVII. El PCVII fue detectado en uno o más tejidos en 8 de los 10 cerdos en el grupo de tratamiento de "provocación por virus", mientras que la totalidad de tejidos objeto de comprobación procedentes de cerdos en el grupo control dio resultado negativo en lo referente al PCVII. El análisis de la tabla de contingencia mostró que esta era una diferencia significativa ($p < 0,001$; prueba exacta de Fisher de dos colas).

5

En conclusión, estos experimentos confirman que la inyección de lechones destetados con extractos de tejido y de material vírico purificado con gradiente conteniendo PCVII, da lugar a infección de tejidos múltiples. La duración persiste durante un período de al menos ocho semanas.

10 Ejemplo 2

Aislamiento y propagación de PCVII

Para determinar la presencia de un(os) agente(s) provocador(es) de infección por PMWS, diversos tejidos procedentes de cerdo # 412, un lechón provocado experimentalmente, sacrificado 21 días después de la infección, se utilizarán para aislamiento vírico. Después del paso continuo de muestras de nódulos linfáticos procedentes de cerdo #412 en células Dulac, se observó acumulación o adaptación de virus. Inicialmente se desarrolló un único patrón de efecto citopático, seguido de título de virus incrementado, tal y como se determinó a través de ELISA, utilizando el anticuerpo anti-PCV Berlín estándar, tal y como se ha descrito anteriormente.

20

La existencia de circovirus en células Dulac infectadas con aislado de PCVII 412 fue entonces detectada a través de examen por microscopio electrónico. Después de seis pasos, pudieron ser detectadas, de forma consistente, proteínas de estructura vírica, utilizando un ensayo Western.

25 Ejemplo 3

Anticuerpos anti-PCVII específicos en lechones convalecientes e infectados asintóticamente en piaras afectadas por PMWS.

30 Dado que parecía que los circovirus porcinos poseían alguna heterogeneidad, se llevaron a cabo ELISAs utilizando suero de lechones, recogido a partir de una piara con una epidemia de PMWS, frente al PCV y el aislado de virus PCVII 412. La mayor parte de los lechones infectados por virus PCVII 412 asintóticamente y los lechones convalecientes desarrollaron anticuerpos específicos frente a PCVII, no frente a PCVI.

35 Ejemplo 4

Aislamiento, clonado y secuenciado de virus PCVII y de DNA genómico vírico

Con vistas a explorar las diferencias genéticas entre las dos cepas de circovirus porcino, se extrajo DNA vírico de células Dulac infectadas. Considerando la posible falta de relación genética entre PCVI y PCVII, el planteamiento se basaba en diseñar cebador(es) procedente(s) de la región más conservada. El análisis previo de las secuencias de DNA de PCV de PK15 (Mankertz et al., (1997) J. Gen. Virol. 71: 2562-2566; reveló una estructura en horquilla en el origen de replicación. Debido a la naturaleza altamente conservada de este importante dominio, se diseñó un cebador sencillo, dirigido a la secuencia de repetición inversa de la región horquilla, Bucle⁻. La amplificación del DNA vírico de PCVII 412 a través de PCR de cebador sencillo resultó exitosa. Después de clonado en un vector de clonado TA, se obtuvo la secuencia genómica vírica a través de secuenciado automático a partir de diversos clones y ambos sentidos, para asegurar la fidelidad. La secuencia real de la horquilla o de la región cebadora fue obtenida después a partir de un segundo clon de longitud completa generado por cebadores de 1000 y R1F, a partir de tan solo la región no codificadora del virus. La secuencia de nucleótido para el PMWS 412 se muestra en la línea superior de las Figuras 2A-2C.

Utilizando cebadores similares, se obtuvieron otros aislados de PCVII, incluyendo PCVII 9741 procedentes de la misma piara que el PCVII 412, y PCVII B9 procedentes de una epidemia de PMWS en los Estados Unidos. Estas cepas fueron secuenciadas y comparadas con PCVII 412 y PCVI. Ver las Figuras 2A-2C para una comparación de la secuencia de PCVII 412 con PCVI y las Figuras 4A-4B para una comparación de la secuencia de PCVII 412 con los diversos aislados PCV.

Los resultados de un análisis filogenético utilizando el programa PAUP 3.1 sugirieron que los nuevos aislados de PMWS estaban estrechamente relacionados y en un grupo diferente al PCVI. Estos aislados se denominaron entonces aislados "PCVII". El porcentaje de homologías de secuencias de nucleótido entre los aislados del nuevo circovirus porcino tenía una identidad superior al 99%. Por el contrario, la comparación de estas secuencias de nucleótido con el PCVI de PK15 mostró tan solo un 75,8% de homología global de secuencias de nucleótido. El análisis comparativo de las secuencias de nucleótido en diferentes regiones reveló, adicionalmente, que el gen de la proteína putativo asociado a la replicación putativo de estos dos virus compartía el 81,4% de homología, mientras que las secuencias de nucleótido de los otros ORF grandes mostraba una homología de tan solo el 67,6%.

Además, se localizaron inserciones y supresiones (indeles) de nucleótidos en tres regiones. Existen 13 inserciones de bases en los nuevos aislados entre la secuencia de PCVI 38-61 que linda con el codón de partida para la proteína putativa 35,8 kd, codificada por ORF1. El área de PCV 915-1033, conteniendo 15 indeles base, estaba situada en las terminaciones y la región de articulación de los dos ORFs más grandes (el otro ORF era antisentido) de los circovirus porcinos. La tercera región, que cubre la secuencia de PCVI entre 1529-1735 con 15 indeles base, se localiza en la terminación amino de una proteína de 27,8 kd putativa codificada por ORF 6. Las secuencias PCVI fueron también comparadas con las secuencias disponibles del resto de miembros de Circoviridae. El PCVI está más íntimamente relacionado con el virus superior racimoso de banana (BBTV), un virus de planta, que con el virus de anemia de pollo (CAV) y con el virus de pico y pluma (BFDV) (estos últimos son virus de aves).

El mapa genético del aislado PCVII 412 se muestra en la Figura 1. Hay un total de seis potenciales ORFs que codifican para proteínas mayores de 50 restos de aminoácido. Una comparación entre PCVII 412 y PCVI PK15 reveló homologías en cuatro de las ORFs (Tabla 2). La función de la proteína de 35,8 kd, a saber la proteína de replicación de DNA putativa, ha sido anticipada previamente (Meehan et al., (1997) J. Gen. Virol. 78:221-227). El análisis de estas proteínas predijo que tanto las proteínas de 35,8 kd como las proteínas antisentido de 27,8 kd eran proteínas nucleares. El análisis de la secuencia de nucleótidos indicó también que los codones de partida para las dos proteínas se encuentran dentro de las 33 bases del origen de replicación. Además, ambos ORFs terminaban en codones de finalización y en señales de cola poli A legítimas. Dado que algunas de las proteínas anticipadas (en base al tamaño) podían ser encontradas en análisis Western, estas averiguaciones sugieren que el mRNA circovirico porcino puede ser transcrito a partir de tanto formas sentido como formas replicadas. No obstante, no existe una secuencia de codificación lo suficientemente larga como para codificar para la proteína de 31 kd común y la proteína adicional de 20 kd, para el aislado de PCVII 412 detectado a través de análisis Western. Esto sugiere que la rotura post-traducciona l y/o el empalmado de RNA pueden estar involucrados en la expresión de algunas de las proteínas de circovirus porcino.

Tabla 2
Comparación de secuencia de aminoácidos putativa entre PK15 PCVI y PCVII 412

Marcos de lectura abiertos PCVI 412		% de homología de secuencia, PCVI/412	Localización anticipada y función
47-983 (ORF 1)	51-992 (ORF 1)	83,5	Núcleo, proteína Rep putativa
1723-1024 (ORF 6)	1735-1037 (ORF 6)	66,4	Núcleo
552-207 (ORF 4)	565-389 (ORF 3)	40,9	Retículo endoplásmico
658-40 (ORF 3)	671-359 (ORF 2)	29,1	Microcuerpo

Ejemplo 5

30 Purificación de PCVII utilizando un procedimiento de clonado molecular

Se averiguó que las células Dulac podían ser infectadas con retrovirus porcino, el cual es encontrado también en muchas líneas celulares originales de cerdo. Además, se averiguó que otros patógenos porcinos estaban inconsistentemente asociados con PCVII en lechones afectados por PMWS. Así pues, para obtener cultivos PCVII puros, DNA de PCVII genéticamente clonado fue transferido a las células Vero de origen no porcino susceptibles, utilizando liposomas. Después de dos pasadas, se detectaron antígenos de PCV amplificados en las células. Se observó que el PCVII se replicaba y acumulaba en los núcleos y que era liberado en el citoplasma y en otras células durante la mitosis celular.

40 Ejemplo 6

PCT multiplex en la identificación de PCVII

Con vistas a diferenciar las dos cepas de circovirus porcino, PCVI y PCVII, se diseñaron dos grupos de cebadores en base al análisis comparativo de las secuencias de DNA vírico. El par de 1710+/850, específico del grupo PCV, y el par 1100+/1750, específico para la cepa de aislado de PCVII 412, fueron utilizados en PCR multiplex para efectuar la comprobación de muestras de campo. Estos grupos de cebadores se utilizaron con tejidos congelados y células leucocitarias de sangre periférica. A juzgar por la PCR multiplex, utilizando esos grupos de cebadores, no tan solo se identificó la infección por PCVII en estas muestras sino que se determinó también la relación genética de las muestras de campo. La presencia de circovirus fue confirmada más tarde mediante microscopía electrónica.

La potencia de este procedimiento diagnóstico fue comprobada adicionalmente con otro grupo de muestras recogidas a partir de una piara afectada por PMWS (ver la Figura 5). Las secuencias de DNA de PCVII podían estar

también infectadas en casi la totalidad de los tejidos en los lechones afectados por PMWS. (Figura 6).

Ejemplo 7

5 Viremia PCVII anterior a y durante la epidemia de PMWS

El desarrollo de PCR utilizando suero nos permitió comprobar la viremia de PCVII en una piara de cerdos que mostraba el anticuerpo anti-PCVII específico. Se monitorizó un grupo de 23 lechones desde que había cumplido un día de edad hasta las siete semanas y se recogieron muestras a intervalos aproximados de dos semanas. Se observó un curso completo de viremia de PCVII y de epidemia de PMWS, tal y como indicaba la apariencia de desaparición de la viremia de PCVII, que se detectó en 9 de los 23 lechones. La mayor parte de los lechones que mostraron viremia de PCVII desarrolló PMWS, algunos de ellos exhibiendo PMWS grave. La Tabla 3 muestra la manifestación de PMWS en un cerdo típico. Se localizaron graves lesiones en la mayor parte de los órganos y tejidos (Tabla 3).

15

Tabla 3. Informe clínico, histológico, vírico e inmunológico de un lechón afectado por PMWS típico			
Cerdo PMWS	Apariencia externa	Histopatología	PCR
H254	Con espinas, peludo, desinteresado y oscilante		
Saliva	ND	ND	ND
Orina	Pálida/clara	ND	+
Bilis	Delgada, no viscosa	ND	+
Heces	Escasas, pero normales	ND	+
Suero	N	ND	+
Plasma	Amarillo	ND	+
Piel	Señales de color amarillo		+
Grasa	Escasa/inexistente		+
Músculos	N		+
Lengua	N	Glositis	+
Amígdalas	Pequeñas cavidades	Reducción de linfocitos	+
LN. Cerv.	Aumentado	Reducción de linfocitos	+
LN Med.	Muy grande, superficie oscura, centro amarillo	Reducción de linfocitos	+
LN Mesentérico	Muy ampliado, oscuro y húmedo	Reducción de linfocitos	+
LN inguinal	Grande, oscuro y húmedo	Reducción de linfocitos	+
Bazo	Pequeño y delgado	Reducción de linfocitos	+
Timo	Pequeño y difícil de localizar	ND	+
Tráquea	N	Metaplasma aenitis	+
Pulmón	A, atelectasis en 80% lóbulos M, textura firme; manchas y puntos afectando a todos los lóbulos	Intersticial Pneumonía	+
Corazón	Delgado y flojo		
Hígado	Manchas de patrón de "camuflaje"		+
Vesícula biliar	N, moderadamente llena		+
Páncreas	N		+
Suprarrenal	N	Adrenalitis focalizada	+
Cerebro	N	Meningitis	+
Ojo	N, esclerótica blanca		+
Estómago	N, lleno de comida		+
Intestino delgado	N	Parque de Peyers	+
Intestino grueso	N, contenido arenoso/arenisca	Inflamación de la submucosa	+
Riñón	Aumentado, oscuro y sin pus	Nefritis intersticial	+
Vejiga urinaria	N		+
		Ref mg x 10 ⁹ /L	
CBC	WBC: 20,1 Segs: 62% ó 12,462 Linfoc.:29% o 5,829	11,0-22,0 3,08-10,4 4,29-13,6	
FACS	CD3: 52,1%	55%	

Tabla 3. Informe clínico, histológico, vírico e inmunológico de un lechón afectado por PMWS típico			
	CD4: 9,0%	30%	
	CD8: 66,5%	15%	

Ejemplo 8

Disfunción del sistema inmunitario huésped en lechones afectados por PMWS

5 Resulta interesante mencionar que si bien se ha descubierto infiltración de linfocitos en la mayoría de los tejidos, se localizó repetidamente una reducción de linfocitos en la totalidad de tejidos linfoides (Tabla 3). Se observó también un descenso en células CD4 y un incremento en células CD8, mientras que las células CD3 permanecían relativamente estables (Tabla 4, los números promedio proceden de dos lechones afectados por PMWS y 40 lechones control negativos). Estos cambios provocaron que la relación CD4/CD8 cayera drásticamente de 1,58 a 0,13. Estas averiguaciones sugirieron que el PCVII podría provocar un mal funcionamiento en el sistema inmune del huésped y, por consiguiente, suprimir las respuestas inmunes frente al PCVII y posiblemente otros patógenos. Así pues, el PMWS parece ser una enfermedad de inmunodeficiencia en lechones.

Tabla 4 Marcadores de superficie de linfocitos de lechones afectados con PMWS y de lechones control de 6 semanas de edad				
	CD3	CD4	CD8	Elación CD4/CD8
PMWS	59,88	8,85	67,6	0,13
Control	53,46	24,02	15,18	1,58

15 Así pues, se describe el clonado, la expresión y la caracterización de nuevos aislados de PCVII, al igual que procedimientos para su utilización.

20 **PÁRRAFOS RESUMEN**

La presente invención se define en las reivindicaciones y la descripción que se acompaña. Por conveniencia otros aspectos de la descripción se presentan en el presente documento mediante párrafos numerados.

25 1. Polinucleótido aislado capaz de hibridarse de manera selectiva a una secuencia de nucleótidos de circovirus porcino de tipo II (PCVII), en el que el polinucleótido comprende al menos aproximadamente 8 nucleótidos contiguos derivados de, o complementarios a, una secuencia de PCVII representada en las figuras 4A-4C (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NOS: 12 y 24).

30 2. Polinucleótido, según el párrafo 1, en el que dicho polinucleótido tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos.

3. Polinucleótido, según el párrafo 1, en el que dicho polinucleótido tiene una longitud de al menos 15 nucleótidos.

35 4. Polinucleótido, según el párrafo 1, en el que dicho polinucleótido tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos.

5. Polinucleótido, según el párrafo 1, en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente el 85% de identidad con una secuencia de PCVII representada en las figuras 4A-4C (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NOS: 12 y 24) o un fragmento de las mismas, que comprende al menos aproximadamente 75 nucleótidos contiguos.

40 6. Polinucleótido, según el párrafo 5, en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia de PCVII seleccionada del grupo que consiste en PCVII 412 (SEQ ID NO: 1), PCVII 9741 (SEQ ID NO: 11) y PCVII B9 (SEQ ID Nos: 12 y 24).

45 7. Polinucleótido que codifica un polipéptido de circovirus porcino del tipo II (PCVII) inmunogénico que tiene al menos aproximadamente el 85% de identidad con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido derivado de (a) marco de lectura abierto (ORF) 1 (SEQ ID NO: 3), (b) ORF 2 (SEQ ID NO: 9), (c) ORF 3 (SEQ ID NO: 7), (d) ORF 4 (SEQ ID NO: 20), (e) ORF 5 (SEQ ID NO: 21), (f) ORF 6 (SEQ ID NO: 5), y (g) fragmentos inmunogénicos de (a)-(f) que comprenden al menos aproximadamente 5 aminoácidos.

50 8. Polinucleótido, según el párrafo 7, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido PCVII inmunogénico que tiene al menos aproximadamente el 85% de identidad con un polipéptido derivado de ORF 6 (SEQ ID NO: 5) o fragmentos inmunogénicos del mismo que comprenden al menos aproximadamente 5 aminoácidos.

55 9. Polinucleótido, según el párrafo 5, en el que el polinucleótido codifica el polipéptido de ORF 6 (SEQ ID NO: 5).

10. Vector recombinante, que comprende:
(a) un polinucleótido, según cualquiera de los párrafos 1-9; y
(b) elementos de control que están unidos de manera funcional con dicho polinucleótido, mediante lo cual una secuencia codificante en dicho polinucleótido se puede transcribir y traducir en una célula huésped, y al menos uno de dichos elementos de control es heterólogo a dicha secuencia codificante.
11. Célula huésped transformada con el vector recombinante según el párrafo 10.
12. Procedimiento de producción de un polipéptido PCVII recombinante, que comprende:
(a) proporcionar una población de células huésped según el párrafo 11; y
(b) cultivar dicha población de células en condiciones mediante las cuales se expresa el polipéptido PCVII codificado por la secuencia codificante presente en dicho vector recombinante
13. Proteína producida por el procedimiento del párrafo 12.
14. Polipéptido de circovirus porcino de tipo II (PCVII) inmunogénico que tiene al menos aproximadamente el 85% de identidad con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido derivado de (a) marco de lectura abierto (ORF) 1 (SEQ ID NO: 3), (b) ORF 2 (SEQ ID NO: 9), (c) ORF 3 (SEQ ID NO: 7), (d) ORF 4 (SEQ ID NO: 20), (e) ORF 5 (SEQ ID NO: 21), (f) ORF 6 (SEQ ID NO: 5), y (g) fragmentos inmunogénicos de (a)-(f) que comprenden al menos aproximadamente 5 aminoácidos.
15. Polipéptido, según el párrafo 14, en el que el polipéptido tiene al menos aproximadamente el 85% de identidad con un polipéptido derivado de ORF 6 (SEQ ID NO: 5) o fragmentos inmunogénicos del mismo que comprenden al menos aproximadamente 5 aminoácidos.
16. Polipéptido, según el párrafo 15, en el que el polipéptido tiene la secuencia del polipéptido codificado por ORF 6 (SEQ ID NO: 5).
17. Anticuerpos desarrollados por el polipéptido según cualquiera de los párrafos 14-16.
18. Composición que comprende un polipéptido PCVII inmunogénico, según cualquiera de los párrafos 14-16, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
19. Composición, según el párrafo 18, que comprende además un adyuvante.
20. Procedimiento de producción de una composición que comprende proporcionar un polipéptido PCVII inmunogénico, según cualquiera de los párrafos 14-16, y combinar dicho polipéptido con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
21. Uso de un polipéptido PCVII inmunogénico, según cualquiera de los párrafos 14-16, en la fabricación de una composición para tratar o prevenir una infección por PCVII en un sujeto invertebrado.
22. Uso de un polipéptido PCVII inmunogénico, según cualquiera de los párrafos 14-16, en la fabricación de una composición para detectar la presencia de anticuerpos de PCVII en una muestra biológica.
23. Kit de prueba de inmunodiagnóstico para detectar la infección por PCVII en un sujeto vertebrado, comprendiendo dicho kit de prueba un polinucleótido PCVII inmunogénico, según cualquiera de los párrafos 14-16, e instrucciones para llevar a cabo la prueba de inmunodiagnóstico.
24. Uso de un polinucleótido, según cualquiera de los párrafos 1-6, en la fabricación de una composición para detectar la presencia de secuencias homólogas de PCVII en una muestra biológica.
25. Kit de prueba de inmunodiagnóstico para detectar la infección por PCVII en un sujeto vertebrado, comprendiendo dicho kit de prueba un polinucleótido, según el párrafo 1, e instrucciones para llevar a cabo la prueba de inmunodiagnóstico.
26. Procedimiento de tratamiento o prevención de una infección por PCVII en un sujeto invertebrado, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición, según los párrafos 18 ó 19.
27. Procedimiento para detectar anticuerpos de circovirus porcino tipo II (PCVII) en una muestra biológica, que comprende:
(a) proporcionar una muestra biológica;
(b) hacer reaccionar dicha muestra biológica con un polipéptido PCVII inmunogénico, según cualquiera de los párrafos 14-16, bajo condiciones que permiten a los anticuerpos de PCVII, cuando están presentes en la muestra

biológica, unirse a dicho polipéptido PCVII para formar un complejo anticuerpo/antígeno; y
 (c) detectar la presencia o ausencia de dicho complejo,
 detectando así la presencia o ausencia de anticuerpos de PCVII en dicha muestra.

- 5 28. Ensayo de hibridación de ácido nucleico para detectar secuencias homólogas de PCVII en una muestra biológica, que comprende:
- (a) incubar la muestra biológica con un polinucleótido, según cualquiera de los párrafos 1-6, bajo condiciones que favorecen la formación de complejos de ácido nucleico entre el polinucleótido y el ácido nucleico de PCVII presente en la muestra biológica; y
- 10 (b) detectar los complejos que contienen el polinucleótido.
29. Ensayo, según el párrafo 28, en el que dicho polinucleótido está marcado, y los complejos son detectados mediante la detección de la presencia del marcador.
- 15 30. Ensayo, según el párrafo 28, en el que dicha detección comprende la utilizar dos sondas específicas de ácido nucleico de PCVII, en el que las dos sondas definen una región interna del ácido nucleico de PCVII y cada una de las sondas tiene una cadena que contiene un extremo 3' interno a la región, convertir los complejos de hibridación de ácido nucleico/sonda en fragmentos que contienen una sonda de doble cadena mediante reacciones de extensión con cebadores,
- 20 amplificar el número de fragmentos que contienen sondas mediante la repetición sucesiva de las etapas (i) desnaturalizar los fragmentos de doble cadena para producir fragmentos de cadena única, (ii) hibridar las cadenas únicas con las sondas para formar complejos cadena/sonda, (iii) generar fragmentos de doble cadena a partir de los complejos de cadena/sonda, en presencia de DNA polimerasa y de los cuatro desoxirribonucleótidos y (iv) repetir las etapas (i) a (iii) hasta lograr el grado de amplificación deseado,
- 25 identificar los productos de amplificación.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> UNIVERSIDAD DE SASKATCHEWAN
- 30 <120> Virus del síndrome de desmedro multisistémico post-destete procedente de cerdos
- <130> P009166EPA
- <150> 60/069,233
- <151> 1997-12-11
- <150> 60/069,750
- 35 <151> 1997-12-16
- <160> 24
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- <211> 1768
- 40 <212> DNA
- <213> Circovirus porcino tipo II
- <400> 1

45

50

55

60

65

ES 2 526 760 T3

```

5  accagcgcac  ttccggcagcg  gcagcacctc  ggcagcacct  cagcagcaac  atgcccagca  60
   agaagaatgg  aagaagcggg  ccccaaccac  ataaaagggtg  ggtgttcacg  ctgaataatc  120
   cttccgaaga  cgagcgcgaag  aaaatacggg  agtccccaat  ctcctattt  gattatttta  180
   ttgttggcga  ggagggtaat  gaggaaggac  gaacacctca  cctccagggg  ttcgctaatt  240
   ttgtgaagaa  gcaaaactttt  aataaagtga  agtgggtattt  gggtgcccgc  tgccacatcg  300
10  agaaagccaa  aggaactgat  cagcagaata  aagaatattg  cagtaaagaa  ggcaacttac  360
   ttattgaatg  tggagctcct  cgatctcaag  gacaacggag  tgacctgtct  actgctgtga  420
   gtaccttgtt  ggagagcggg  attctgggtg  ccggtgcaaa  gcagcacctc  gtaacgtttg  480
   tcaaaaatth  ccgcgggctg  gctgaacttt  tgaaagtgag  cgggaaaatg  caaaagcgtg  540
   attggaaaac  caatgtacac  ttcattgtgg  ggccacctgg  gtgtggtaaa  agcaaatggg  600
   ctgctaattt  tgcaaacccg  gaaaccacat  actggaaacc  acctaaaaac  aagtgggtgg  660
15  atggttacc  tgggtgaaaa  gtggttgta  ttgatgactt  ttatggctgg  ctgccgtggg  720
   atgatctact  gagactgtgt  gatcgatata  cattgactgt  aaaaactaaa  ggtggaactg  780
   tacctttttt  ggccccagct  attctgatta  ccagcaatca  gacccccgtg  gaatgggtact  840
   cctcaactgc  tgtcccagct  gtagaagctc  tctatcggag  gattacttcc  ttgggtattt  900
   ggaagaatgc  taaaaaacia  tccacggagg  aagggggcca  gtctgtcacc  ctttcccccc  960
20  atgcacctga  atttccatat  gaaataaatt  actgagtctt  ttttatcact  tcgtaatggt  1020
   ttttattatt  catttagggg  tcaagtgggg  ggtctttaag  attaaattct  ctgaattgta  1080
   catacatggt  tacacggata  ttgtagtctt  ggtcgtatth  actgttttcg  aacgcagtgc  1140
   cgaggcctac  gtgggtccaca  tttccagagg  tttgtagcct  cagccaaagc  tgattccttt  1200
   tgttatttgg  ttggaagtaa  tcaatagtgg  agtcaagaac  aggtttgggt  gtgaagtaac  1260
   gggagtggta  ggagaagggt  tgggggattg  tatggcggga  ggagtgttt  acatatgggt  1320
25  cataggttag  ggctgtggcc  tttgttacia  agttatcacc  taaaataaca  gcagtggagc  1380
   ccactcccc  atcaccctgg  gtgatggggg  agcaaggcca  gaattcaacc  ttaacctttc  1440
   ttattctgta  gtattcaaa  ggtatagaga  ttttgttgg  cccccctccc  gggggaacia  1500
   agtcgtcaat  tttaaatctc  atcatgtcca  ccgccagga  gggcgttgtg  actgtggtac  1560
   gcttgacagt  atatecgaag  gtgcgggaga  ggcgggtgtt  gaagatgcca  ttttctctc  1620
30  tccaacggta  gcggtggcgg  ggggtggacga  gccaggggag  gcggcggagg  atctggccaa  1680
   gatggctgag  ggggctgtgt  cttctctctg  ggtaacgctc  ccttggatac  gtcatagctg  1740
   aaaaacgaa  aagtgcgctg  taagtatt  1768

```

```

35 <210> 2
   <211> 1759
   <212> DNA
   <213> Circovirus porcino tipo I
   <400> 2

```

40

45

50

55

60

65

ES 2 526 760 T3

```

accagcgcac tteggcagcg gcagcacctc ggcagcgtca gtgaaaatgc caagcaagaa 60
aagcggcccc caaccccata agaggtgggt gttcaccctt aataatcctt ccgaggagga 120
5 gaaaaacaaa atacgggagc ttccaatctc cctttttgat tattttggtt gcggagagga 180
aggtttgaa gagggtagaa ctctcacct ccaggggttt gogaattttg ctaagaagca 240
gacttttaac aaggtgaagt ggtattttgg tgcccgtgc cacatcgaga aagcgaagg 300
aaccgaccag cagaataaag aatactgcag taaagaaggc cacatactta tcgagtgtgg 360
agctccgchg aaccagggga agcgcagcga cctgtctact gctgtgagta cccttttgg 420
10 gacggggtct ttggtgactg tagccgagca gttccctgta acgtatgtga gaaatctccg 480
cgggctggct gaacttttga aagtgcgagg gaagatgcag cagcgtgatt ggaagacagc 540
tgtacacgct atagtgggccc cgcccgggtg tgggaagagc cagtggggccc gtaattttgc 600
tgagcctagg gacacctact ggaagcctag tagaaataag tgggtgggatg gatcatcatg 660
agaagaagtt gttgttttgg atgattttta tggctgggta ccttgggatg atctactgag 720
15 actgtgtgac cggatccat tgactgtaga gactaaaggg ggtactgttc cttttttggc 780
ccgcagtatt ttgattacca gcaatcaggc ccccaggaa tggactcct caactgctgt 840
cccagctgta gaagctctct atcggaggat tactactttg caattttgga agactgctgg 900
agaacaatcc acggaggtag ccgaaggccg atttgaagca gtggaccac cctgtgccct 960
20 tttcccatat aaaataaatt actgagtctt ttttgttate acatcgtaat ggtttttatt 1020
ttattttatt tagagggtct tttaggataa attctctgaa ttgtacataa atagtcagcc 1080
ttaccacata attttgggct gtggctgcat tttggagcgc atageccagg cctgtgtgct 1140
cgacattggt gtgggtattt aaatggagcc acagctgggt tcttttatta tttgggtgga 1200
accaatcaat tgtttgggtc agctcaggtt tgggggtgaa gtacctggag tggtaggtaa 1260
agggctgcct tatggtgtgg cgggaggagt agttaatata ggggtcatag gccaaagtgg 1320
25 tggaggggggt tacaagttg gcatccaaga taacaacagt ggacccaaca cctctttgat 1380
tagaggtgat ggggtctctg gggtaaaatt catatttage ctttctaata cggtagtatt 1440
ggaaaggtag gggtaggggg ttggtgccgc ctgagggggg gaggaactgg ccgatgttga 1500
atltgaggtg gttaacattc caagatggct gcgagtatcc tcttttatg gtgagtacaa 1560
attctgtaga aaggcgggaa ttgaagatc ccgtctttcg gcgccatctg taacggtttc 1620
30 tgaagggggg gtgtgccaaa tatggtcttc tccggaggat gtttccaaga tggctgcggg 1680
ggcgggtcct tcttctcggg taacgcctcc ttggccacgt cactctataa aagtgaagaa 1740
agtgcgctgc tgtagtatt 1759

```

35 <210> 3
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino tipo II

40 <400> 3

```

Met Pro Ser Lys Lys Asn Gly Arg Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg
  1                5                10                15

Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro Ser Glu Asp Glu Arg Lys Lys Ile
                20                25                30

Arg Glu Leu Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr Phe Ile Val Gly Glu Glu
                35                40                45

Gly Asn Glu Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe
  50                55                60

Val Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Leu Gly Ala Arg
  65                70                75                80

```

ES 2 526 760 T3

Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr
 85 90 95
 5 Cys Ser Lys Glu Gly Asn Leu Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Ser
 100 105 110
 Gln Gly Gln Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu
 115 120 125
 10 Ser Gly Ile Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val
 130 135 140
 15 Lys Asn Phe Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met
 145 150 155 160
 Gln Lys Arg Asp Trp Lys Thr Asn Val His Phe Ile Val Gly Pro Pro
 165 170 175
 20 Gly Cys Gly Lys Ser Lys Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asn Pro Glu Thr
 180 185 190
 25 Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Lys Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly
 195 200 205
 Glu Lys Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp
 210 215 220
 30 Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Lys Thr Lys
 225 230 235 240
 35 Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn
 245 250 255
 Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu
 260 265 270
 40 Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr
 275 280 285
 45 Lys Gln Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro
 290 295 300
 50 Cys Pro Glu Phe Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr
 305 310

<210> 4
 <211> 312
 <212> PRT

55 <213> Circovirus porcino tipo I
 <400> 4

60 Met Pro Ser Lys Lys Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe
 1 5 10 15
 Thr Leu Asn Asn Pro Ser Glu Glu Glu Lys Asn Lys Ile Arg Glu Leu
 20 25 30

Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr Phe Val Cys Gly Glu Glu Gly Leu Glu
 35 40 45
 Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe Ala Lys Lys
 50 55 60
 Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly Ala Arg Cys His Ile
 65 70 75 80
 Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr Cys Ser Lys
 85 90 95
 Glu Gly His Ile Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Asn Gln Gly Lys
 100 105 110
 Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu Thr Gly Ser
 115 120 125
 Leu Val Thr Val Ala Glu Gln Phe Pro Val Thr Tyr Val Arg Asn Phe
 130 135 140
 Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Gln Arg
 145 150 155 160
 Asp Trp Lys Thr Ala Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly
 165 170 175
 Lys Ser Gln Trp Ala Arg Asn Phe Ala Glu Pro Arg Asp Thr Tyr Trp
 180 185 190
 Lys Pro Ser Arg Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly Glu Glu Val
 195 200 205
 Val Val Leu Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp Asp Leu Leu
 210 215 220
 Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys Gly Gly Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn Gln Ala Pro
 245 250 255
 Gln Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu Ala Leu Tyr
 260 265 270
 Arg Arg Ile Thr Thr Leu Gln Phe Trp Lys Thr Ala Gly Glu Gln Ser
 275 280 285
 Thr Glu Val Pro Glu Gly Arg Phe Glu Ala Val Asp Pro Pro Cys Ala
 290 295 300
 Leu Phe Pro Tyr Lys Ile Asn Tyr
 305 310

ES 2 526 760 T3

<210> 5
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino tipo II

5

<400> 5

```

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
  1           5           10           15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
          20           25           30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
          35           40           45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Arg Thr Thr Val Thr Thr
          50           55           60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Lys Ile Asp Asp Phe Val
          65           70           75           80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
          85           90           95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
          100          105          110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
          115          120          125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
          130          135          140

Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
          145          150          155          160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
          165          170          175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Gly Asn
          180          185          190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
          195          200          205

Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
          210          215          220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
          225          230
    
```

ES 2 526 760 T3

<210> 6
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino tipo I

5

<400> 6

```

Met Thr Trp Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg Thr Arg Pro Arg
 1           5           10           15

Ser His Leu Gly Asn Ile Leu Arg Arg Arg Pro Tyr Leu Ala His Pro
      20           25           30

Ala Phe Arg Asn Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Thr Gly Ile Phe Asn
      35           40           45

Ser Arg Leu Ser Thr Glu Phe Val Leu Thr Ile Lys Gly Gly Tyr Ser
      50           55           60

Gln Pro Ser Trp Asn Val Asn Tyr Leu Lys Phe Asn Ile Gly Gln Phe
      65           70           75           80

Leu Pro Pro Ser Gly Gly Thr Asn Pro Leu Pro Leu Pro Phe Gln Tyr
      85           90           95

Tyr Arg Ile Arg Lys Ala Lys Tyr Glu Phe Tyr Pro Arg Asp Pro Ile
      100          105          110

Thr Ser Asn Gln Arg Gly Val Gly Ser Thr Val Val Ile Leu Asp Ala
      115          120          125

Asn Phe Val Thr Pro Ser Thr Asn Leu Ala Tyr Asp Pro Tyr Ile Asn
      130          135          140

Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Arg Gln Pro Phe Thr Tyr His Ser Arg
      145          150          155          160

Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Glu Leu Asp Gln Thr Ile Asp Trp Phe His
      165          170          175

Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu His Leu Asn Thr His Thr
      180          185          190

Asn Val Glu His Thr Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Gln Asn Ala Ala Thr
      195          200          205

Ala Gln Asn Tyr Val Val Arg Leu Thr Ile Tyr Val Gln Phe Arg Glu
      210          215          220

Phe Ile Leu Lys Asp Pro Leu Asn Lys
      225          230
    
```

ES 2 526 760 T3

<210> 7
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino tipo II

5

<400> 7

```

10  Met Lys Cys Thr Leu Val Phe Gln Ser Arg Phe Cys Ile Phe Pro Leu
      1          5          10          15
    Thr Phe Lys Ser Ser Ala Ser Pro Arg Lys Phe Leu Thr Asn Val Thr
      20          25          30
15  Gly Cys Cys Phe Ala Thr Val Thr Arg Ile Pro Leu Ser Asn Lys Val
      35          40          45
20  Leu Thr Ala Val Asp Arg Ser Leu Arg Cys Pro
      50          55
    
```

<210> 8
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino tipo I

25

<400> 8

```

    Met Thr Cys Thr Ala Val Phe Gln Ser Arg Cys Cys Ile Phe Pro Leu
      1          5          10          15
    Thr Phe Lys Ser Ser Ala Ser Pro Arg Lys Phe Leu Thr Tyr Val Thr
      20          25          30
    Gly Asn Cys Ser Ala Thr Val Thr Lys Asp Pro Val Ser Lys Arg Val
      35          40          45
    Leu Thr Ala Val Asp Arg Ser Leu Arg Phe Pro Trp Phe Arg Gly Ala
      50          55          60
    Pro His Ser Ile Ser Met Trp Pro Ser Leu Leu Gln Tyr Ser Leu Phe
      65          70          75          80
    Cys Trp Ser Val Pro Phe Ala Phe Ser Met Trp Gln Arg Ala Pro Lys
      85          90          95
    Tyr His Phe Thr Leu Leu Lys Val Cys Phe Leu Ala Lys Phe Ala Asn
      100          105          110
    Pro Trp Arg
      115
    
```

ES 2 526 760 T3

<210> 9
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino tipo II

5

<400> 9

```

10  Met Val Thr Ile Pro Pro Leu Val Phe Arg Trp Phe Pro Val Cys Gly
      1           5           10           15
      Phe Arg Val Cys Lys Ile Ser Ser Pro Phe Ala Phe Thr Thr Pro Arg
      20           25           30
15  Trp Pro His Asn Glu Val Tyr Ile Gly Phe Pro Ile Thr Leu Leu His
      35           40           45
      Phe Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Phe Asp
      50           55           60
      Lys Arg Tyr Arg Val Leu Leu Cys Asn Gly His Gln Asn Pro Ala Leu
      65           70           75
25  Gln Gln Gly Thr His Ser Ser Arg Gln Val Thr Pro Leu Ser Leu Arg
      85           90           95
30  Ser Arg Ser Ser Thr Phe Asn Lys
      100
    
```

<210> 10
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Circovirus porcino tipo I

35

<400> 10

40

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

45 <210> 11
 <211> 1768
 <212> DNA
 <213> Circovirus porcino tipo II
 50 <400> 11

accagcgcac ttccggcagcg gcagcacctc ggcagcaoct cagcagcaac atgccagca 60
 55 agaagaatgg aagaagcggg cccaaccac ataaaagggtg ggtgttcacg ctgaataatc 120
 ctccgaaga caagcgcgaag aaaatacggg agctcccaat ctccctattt gattatattta 180
 ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttccgctaatt 240
 ttgtgaagaa gcaaactttt aataaagtga agtgggtattt ggggtgcccgc tgc-cacatcg 300
 agaaagccaa aggaactgat cagcagaata aagaatattg cagtaaagaa ggcaacttac 360
 ttattgaatg tggagctcct cgatctcaag gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420

ES 2 526 760 T3

```

gtaccttggt ggagagcggg attctgggtga ccggtgcaaa gcagcacctt gtaacgtttg 480
tcaaaaaatt ccgcgggctg gctgaacttt tgaagtgag cgggaaaatg caaaagcgtg 540
attggaaaac caatgtacac ttcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcaaacccg gaaaccacat actggaaacc acctaaaaac aagtgggtggg 660
atggttacca tggtgaaaaa gtggttgtta ttgatgactt ttatggctgg ctgccgtggg 720
atgatctact gaaactgtgt gatcgatata cattgactgt aaaaactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccgttg gaatggtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tctatcggag gattacttcc ttggtatttt 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gtttgtcacc ctttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtctt ttttatcact tcgtaatggt 1020
ttttattatt catttagggg ttaagtgggg ggtctttaag attaaattct ctgaattgta 1080
catacatggt tacacggata ttgtagctct ggtcgtatth actgthtttcg aacgcagtgc 1140
cgaggcctac gtggtccaca tttccagagg tttgtagcct cagccaaagc tgattccttt 1200
tgttatthgg ttggaagtaa tcaatagtgg agtcaagaac aggtttgggt gtgaagtaac 1260
gggagtggta ggagaagggt tgggggattg tatggcggga ggagtgttt acatatgggt 1320
cataggthtag ggtgtgthgc tthgtthcaa agthtatcath taaaataaca gcagthggagc 1380
ccactcccc atcacctgg gtgatggggg agcagggcca gaattcaacc ttaacctthc 1440
ttattctgta gtattcaaag ggtatagaga tthgtthggg cccccctccc gggggaacaa 1500
agthgtcaat tthaaatctc atcatgtcca ccgccagga gggcgtthgt actgtggtac 1560
gcttgacagt atatccgaag gtgcgggaga ggcgggtgtt gaagatgcca tththcttc 1620
tccaacggta ggggtggcg ggggtggaca gccaggggag cggcgggagg atctggccaa 1680
gatggctgcg gggcggtgt cthctctgc ggtaacgctt cthgggatac gthcatagctg 1740
aaaaagaaag aagtgcgctg taagtatt 1768

```

30

- <210> 12
- <211> 240
- <212> DNA
- <213> Circovirus porcino tipo II

35

<400> 12

```

accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcaacaac atgcccagca 60
agaagaatgg aagaagcggg cccaaccac ataaaagggtg ggtgttcacg ctgaataatc 120
40 cttecegaaga caagcgcgaag aaaatacggg agctcccaat cctccattt gattatttta 180
ttgttgcgga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240

```

- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial

45

- <220>
- <223> Descripción de Secuencia artificial: Loop cebador

<400> 13

50 actacagcag gcacttc 18

- <210> 14
- <211> 30
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial

55

- <220>
- <223> Descripción de Secuencia artificial: 1000_(-) cebador

60 <400> 14

aaaaagact cagtaattta tthcatatgg 30

- <210> 15
- <211> 23
- <212> DNA

65

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: RIF_(-) cebador

5

<400> 15

atcacttcgt aatggtttt att 23

<210> 16

10 <211> 18

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia artificial: 1710_(+) cebador

<400> 16

tgcgtaacg cctcctg 18

20 <210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: 850_(-) cebador

<400> 17

ctacagctgg gacagcagt g 21

30

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: 1100_(+) cebador

<400> 18

catacatggt tacacggata ttg 23

40

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: 1570_(-) cebador

<400> 19

50 ccgcaccttc ggatatactg 20

<210> 20

<211> 59

<212> PRT

55 <213> Circovirus porcino tipo II

<400> 20

60

65

ES 2 526 760 T3

5 Met Tyr Thr Ser Leu Trp Gly His Leu Gly Val Val Lys Ala Asn Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Ile Leu Gln Thr Arg Lys Pro His Thr Gly Asn His Leu Lys
 20 25 30
 10 Thr Ser Gly Gly Met Val Thr Met Val Lys Lys Trp Leu Leu Leu Met
 35 40 45
 Thr Phe Met Ala Gly Cys Arg Gly Met Ile Tyr
 15 50 55

20

<210> 21
 <211> 53
 <212> PRT

25 <213> Circovirus porcino tipo II

<400> 21

Met Val Phe Ile Ile His Leu Gly Phe Lys Trp Gly Val Phe Lys Ile
 1 5 10 15
 Lys Phe Ser Glu Leu Tyr Ile His Gly Tyr Thr Asp Ile Val Val Leu
 20 25 30
 Val Val Phe Thr Val Phe Glu Arg Ser Ala Glu Ala Tyr Val Val His
 35 40 45
 Ile Ser Arg Gly Leu
 50

ES 2 526 760 T3

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: 1230_(-) cebador

<400> 22
 10 tcccgttact tcacacccaa 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: 400_(+) cebador

20 <400> 23
 cctgttact gctgtgagta 20

<210> 24
 <211> 1343
 25 <212> DNA
 <213> Circovirus porcino tipo II

<400> 24

```

ttgttgagaga gcgggattct ggtgaccgtt gcaaagcagc accctgtaac gtttgtcaaa 60
aatttcgcgcg ggetggctga acttttgaaa gtgagcggga aaatgcaaaa gcgtgattgg 120
aaaaccaatg tacacttcat tgtggggcca cctgggtgtg gtaaaagcaa atgggctgct 180
aattttgcaa acccggaac cacatactgg aaaccaccta aaaacaagtg gtgggatggt 240
taccatgggtg aaaaagtggg tgttattgat gacttttatg gctggctgcc gtgggatgat 300
ctactgaaac tgtgtgatcg atatccattg actgtaaaaa ctaaagggtg aactgtacct 360
tttttgcccc gcagtattct gattaccagc aatcaaaccg cgttggaatg gtactcctca 420
actgctgtcc cagctgtaga agctctctat cggaggatta ctctcttggg attttggaag 480
aatggttacag aacaatecac ggaggaaggg ggccagtttg tcacccttc cccccatgc 540
cctgaatttc catatgaaat aaattactga gtctttttta tcaactcgta atgggtttta 600
ttattcattt agggtttaag tgggggggtct ttaagattaa attctctgaa ttgtacatac 660
atgggttacac ggatattgta gtctgtgtcg tatttactgt ttctgaacgc agtgccgagg 720
cctacgtggg ccacatttct agaggtttgt agcctcagcc aaagctgatt ccttttgta 780
tttggttgga agtaatcaat agtggagtca agaacagggt tgggtgtgaa gtaacgggag 840
tggtaggaga agggttgggg gattgtatgg cgggaggagt agtttacata tgggtcatag 900
gttagggctg tggcctttgt taciaagtta tcatctagaa taacagcagt ggagcccact 960
cccctatcac cctgggtgat gggggagcag ggccagaatt caacctaac ctttcttatt 1020
ctgtagtatt caaaggggat agagattttg ttgggtcccc ctcccggggg aacaaagtgc 1080
tcaatattaa atctcatcat gtccaccgcc caggagggcg ttgtgactgt ggtagccttg 1140
acagtatatc cgaagggtgc ggagaggcgg gtgttgaaga tgccattttt ccttctccaa 1200
cggtagcggg ggcgggggtg gacgagccag gggcggcggc ggaggatctg gccaaagtgg 1260
ctgcgggggc ggtgtcttct tctgcggtaa cgctccttg gatagctcat agctgaaaac 1320
gaaagaagtg cgctgtaagt att 1343
    
```

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de circovirus porcino tipo II (PCVII) inmunogénico aislado, que comprende:

- (a) MPSKKNRSG QPHKRWVFT LNNPSEDERK KIRELPISLF DYFIVGEEGN EEGRTPHLQG FANFVKKQTF
5 NKVKWYLGAR CHIEKAKGTD QQNKEYCSKE GNLLIECGAP RSQGQRSDLS TAVSTLLESG ILVTVAHQHP
VTFVKNFRGL AELLKVSQGM QKRDWKTNVH FIVGPPGCGK SKWAANFANP ETTYWKPPKN KWWDGYHGEK
VVVIDDFYGW LPWDDLRLC DRYPLTVKTK GGTVPFLARS ILITSNQTPL EWYSSTAVPA VEALYRRITS
LVFWKNATKQ STEEGGFVT LSPPCFEPY EINY (ORF1); o
- (b) un polipéptido derivado de ORF1 que tiene al menos el 98% de identidad con la longitud completa de ORF1; o
- 10 (c) un polipéptido derivado de ORF1 que tiene al menos el 90% de identidad con la longitud completa de ORF1; en el que dicho polipéptido no es

15 **MPSKKNRSGPQPHKRWVFTLNNPSEDERKKIRDLPISLFDYFIVGEEGNEEGRTPHLQG**
FANFVKKQTFNKVKWYLGARCHIEKAKGTDQQNKEYCSKEGNLLMECGAPRSQGQRSDLS
TAVSTLLESGSLVTVAEQHPVTFVRNFRGLAELLKVSQGMQKRDWKTNVHVIVGPPGCGK
20 **SKWAANFADPETTYWKPPRNKWWDGYHGEVVVIDDFYGWLPWDDLRLCDRYPLTVETK**
GGTVPFLARSILITSNQTPLEWYSSTAVPAVEALYRRITSLVFWKNATEQSTEEGGFVT
LSPPCFEPYEINY,

25
o

30 **MPSKKNRSGPQPHKRWVFTLNNPSEDERKKIRELPISLFDYFIVGEEGXEXRTPHLQG**
FANFVKKQTFNKVKWYLGARCHIEKAKGTDQQNKEYCSKEGNLLIECGAPRSQGQRSDLS
TAVSTLLESGSLVTVAEQHPVTFVRNFRGLAELLKVSQGMQKRDWKTNVHVIVGPPGCGK
SKWAANFADPETTYWKPPRNKWWDGYHGEVVVIDDFYGWLPWDDLRLCDRYPLTVETK
35 **GGTVXXARSILITSNQTPLEWYSSTAVPAVEALYRRITSLVFWKNATEQSTEEGGXVT**
LSPPCFEPYEINY;

o
40

(d) una proteína de fusión que comprende cualquiera de (a) a (c).

2. Polipéptido aislado, según la reivindicación 1, en el que el polipéptido se genera mediante síntesis química.

3. Polipéptido aislado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el polipéptido se genera mediante
45 producción recombinante.

4. Polipéptido aislado, según la reivindicación 3, en el que el polipéptido se expresa utilizando baculovirus.

5. Vector recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido PCVII inmunogénico tal como
50 se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Vector recombinante, según la reivindicación 5, en el que el vector recombinante comprende un polinucleótido que
codifica el polipéptido inmunogénico MPSKKNRSG QPHKRWVFT LNNPSEDERK KIRELPISLF DYFIVGEEGN
EEGRTPHLQG FANFVKKQTF NKVKWYLGAR CHIEKAKGTD QQNKEYCSKE GNLLIECGAP RSQGQRSDLS
55 TAVSTLLESG ILVTVAHQHP VTFVKNFRGL AELLKVSQGM QKRDWKTNVH FIVGPPGCGK SKWAANFANP
ETTYWKPPKN KWWDGYHGEK VVVIDDFYGW LPWDDLRLC DRYPLTVKTK GGTVPFLARS ILITSNQTPL
EWYSSTAVPA VEALYRRITS LVFWKNATKQ STEEGGFVT LSPPCFEPY EINY (ORF1).

7. Célula huésped recombinante transformada con el vector según las reivindicaciones 5 ó 6.

60

8. Célula huésped recombinante, según la reivindicación 7, en la que dicha célula huésped recombinante es una
célula de mamífero.

9. Célula huésped recombinante, según la reivindicación 7, en la que dicha célula huésped recombinante es una
65 célula bacteriana.

10. Célula huésped recombinante, según la reivindicación 7, en la que dicha célula huésped recombinante es una célula de levadura.

5 11. Célula huésped recombinante, según la reivindicación 7, en la que dicha célula huésped recombinante es una célula de insecto.

12. Composición que comprende un polipéptido PCVII inmunogénico y un vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable; en el que el polipéptido PCVII inmunogénico comprende:

10

(a) MPSKKNRSG PQPHKRWFVFTLNNPSEDERK KIRELPISLFDYFIVGEEGN EEGRTPHLQG FANFVKKQTF NKVKWYLGAR CHIEKAKGTD QQNKEYCSKE GNLLIECGAP RSQGQRSDLS TAVSTLLESG ILVTVAHQHP VTFVKNFRGL AELLKVSQGM QKRDWKTNVH FIVGPPGCGK SKWAANFANP ETTYWKPPKN KWWDGYHGEK VVVIDDFYGW LPWDDLRLC DRYPLTVKTK GGTVPFLARS ILITSNQTPL EWYSSTAVPA VEALYRRITS

15

LFWKRNATKQ STEEGGQFVT LSPPCFEPFY EINY (ORF1); o

(b) un polipéptido derivado de ORF1 que tiene al menos el 98% de identidad con la longitud completa de ORF1; o

(c) un polipéptido derivado de ORF1 que tiene al menos el 90% de identidad con la longitud completa de ORF1; en el que dicho polipéptido no es

20

MPSKKNRSGPQPHKRWFVFTLNNPSEDERKKIRDLPISLFDYFIVGEEGNEEGRTPHLQG

FANFVKKQTFNKVKWYLGARCHIEKAKGTDQQNKEYCSKEGNLLMECGAPRSQGQRSDLS

25

TAVSTLLESGSLVTVAEQHPVTFVRNFRGLAELLKVSQGMQKRDWKTNVHVIVGPPGCGK

SKWAANFADPETTYWKPPRNKWWDGYHGEEVVVIDDFYGWLPWDDLRLCDRYPLTVETK

30

GGTVPFLARSILITSNQTPLEWYSSTAVPAVEALYRRITSLVFWKNATEQSTEEGGQFVT

LSPPCFEPFYEINY,

35 o

MPSKKNRSGPQPHKRWFVFTLNNPSEDERKKIRELPISLFDYFIVGEEGXEEEXRTPHLQG

FANFVKKQTFNKVKWYLGARCHIEKAKGTDQQNKEYCSKEGNLLIECGAPRSQGQRSDLS

40

TAVSTLLESGSLVTVAEQHPVTFVRNFRGLAELLKVSQGMQKRDWKTNVHVIVGPPGCGK

SKWAANFADPETTYWKPPRNKWWDGYHGEEVVVIDDFYGWLPWDDLRLCDRYPLTVETK

45

GGTVXXXARSILITSNQTPLEWYSSTAVPAVEALYRRITSLVFWKNATEQSTEEGGXVT

LSPPCFEPFYEINY;

o

(d) una proteína de fusión que comprende cualquiera de (a) a (c).

50

13. Composición, según la reivindicación 12, que comprende además un adyuvante.

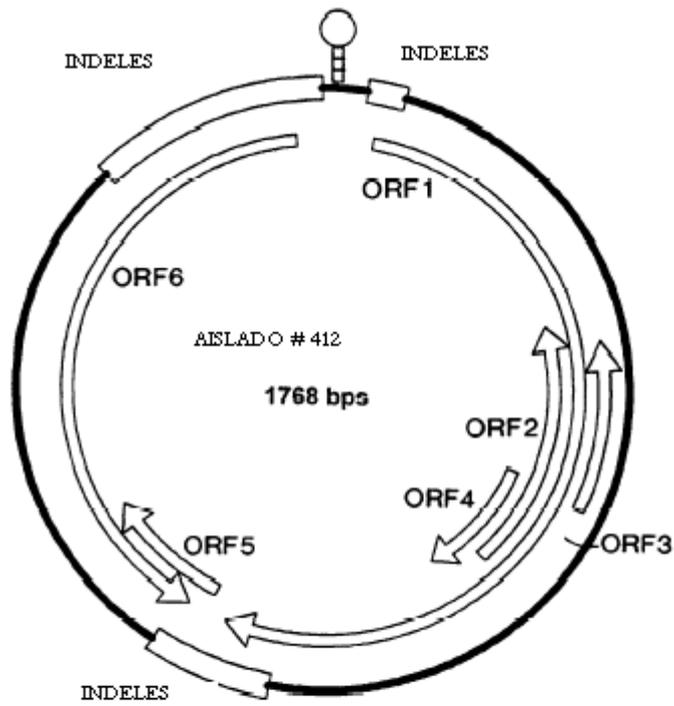


FIG. 1

1	accagcgcacttcggcagcggcagcacctcagcagcaacatgccagca tggtcgcgtgaagccgtcgcctcgtggagccgtcgtggagtcgtcgttgtaacgggtcgt	60
1	M P S K	
1	agaagaatggaagaagcggaccccaaccacataaaaaggtgggtgttcacgctgaataatc tcttcttaaccttctcgcctcgggttggtgtatctccaccacaagtgcgacttattag	120
1	K N G R S G P Q P H K R W V F T L N N P	
1	cttccgaagcagcagcaagaaaatacgggagctcccaatctccctatttgattatctta gaaggcttctcgtcgcgttctctttatgcctcaggggttagaggataaactaataaaat	180
1	S E D E R K K I R E L P I S L F D Y F I	
1	ttgttggcagggagggtaatgaggaaggacgaacacctcactccaggggttcgctaatt aacaaccgctcctccattactcctcctcgttggagtgagggtccccaagcgattaa	240
1	V G E E G N E E G R T P H L Q G F A N F	
1	ttgtgaagaagcaaaccttttaataaagtgaagtggattttgggtgcccgtgccacateg aacacttcttgcgttgaaaattatctcacttcaccataaaacccacgggagcggtgtagc	300
1	V K K Q T F N K V K W Y L G A R C H I E	
1	agaaagccaaaggaactgatcagcagaataaagaatattgtagtaagaaggcaacttac tctttcggtttcccttgactagtcgtcttatttctataacatcatttcttccgttgaatg	360
2	K A K G T D Q Q N K E Y C S K E G N L L	
2	*	
1	ttattgaatgtggagctcctcagatctcaaggacaacggagtgacctgtctactgctgtga aataacttacacctcagggagctagagttcctgctgctcactggacagatgacgacact	420
1	I E C G A P R S Q G Q R S D L S T A V S	
2	K N F T S S R S R L S L P T V Q R S S H	
3	* P C R L S R D V A T	
1	gtaccttgttggagcgggagctcgttgaccgttgcagagcagcacctgtaacgtttg catggaacaaacctctcgcctcagaccactggcaacgtctcgtcgtgggacattgcaaac	480
1	T L L E S G S L V T V A E Q H P V T F V	
2	T G Q Q L A P T Q H G N C L L V R Y R K	
3	L V K N S L P L R T V T A S C C G T V N	
1	tcagaaatctcggcgggctggctgaacttttgaaagtgagcgggaaaatgcagaagcgtg agtctttaaaggcgcgcgaccgacttgaaaactttcactcgccttttaegtcttcgcac	540
1	R N F R G L A E L L K V S G K M Q K R D	
2	D S I E A P Q S F K Q F H A P F H L L T	
3	T L F K R P S A S S K F T L P F I C F R	
1	attggaagaccaatgtacacgtcattgtggggccacctgggtgtggtaaaagcaaatggg taaccttctggttacatgtgcagtaacaccccggtggaccacaccattttcgtttacc,	600
4	M Y T S L W G H L G V V K A N G	
1	W K T N V H V I V G P P G C G K S K W A	
2	I P L G I Y V D N H P W R P T T F A F P	
3	S Q F V L T C T M	
1	ctgctaattttgcagaccggaaaccacataactggaaccacctagaacaagtgggtggg gacgattaaaaacgtctgggcctttgggtgatgacctttgggtggatctttgttcaccacc	660
4	L L I L Q T R K P H T G N H L E T S G G	
1	A N F A D P E T T Y W K P P R N K W W D	
2	S S I K C V R F G C V P F W R S V L P P	

FIG. 2A

661	atggttaccatggtgaagaagtgggtggttattgatgacttttatgggtgggtgcegtggg	720
	taccaatggtaccacttcttcaccaacaataactactgaaaataccgaccgacggcacc	
4	M V T M V K K W L L L M T F M A G C R G	
1	G Y H G E E V V V I D D F Y G W L P W D	
2	I T V M	
721	atgatctactgagactgtgtgatcgatatccattgactgtagagactaaaggtggaactg	780
	tactagatgactctgacacactagctataggttaactgacatctctgatttccacettgac	
4	M I Y *	
1	D L L R L C D R Y P L T V E T K G G T V	
781	taccttttttggccccgagatattctgattaccagcaatcagacccccgttggaaatggta	840
	atggaaaaaacccggcgctcataagactaatggctgtagtctggggcaaccttaccatga	
1	P F L A R S I L I T S N Q T P L E W Y S	
841	cctcaactgctgtceccagctgtagaagetctctatcggaggattacttcccttggat	900
	ggagttgacgacagggctcgacatcttcgagagatagcctcctaataaggaaccataaaa	
1	S T A V P A V E A L Y R R I T S L V F W	
901	ggaagaatgctacaaaaacaatccacggaggaagggggccagtctctcaccctttcccc	960
	ccttcttaagatgttttggtaggtgcctccttccccgggtcaagcagtggaagggggg	
1	K N A T K Q S T E E G G Q F V T L S P P	
961	catgcectgaatctccatgatgaaataaattactgagctttttttatcaacttctgtaatggt	1020
	gtacgggacttaagggtatacttttatttaatgactcagaaaaaatagtggaagcattacca	
5		M V
1	C P E F P Y E I N Y *	
1021	ttttattattcatttagggttcaagtggggggctctttaaagattaaattctctgaattgta	1080
	aaaataataagtaaatcccaagttcacccccagaaattctaatttaagagacttaacat	
5	F I I H L G F K W G V F K I K F S E L Y	
6	* P E L P P D K L N F E R F Q	
1081	catacatggttacacggatattgtagctcctggtcgtatttactggttttcgaacgcagtc	1140
	gtatgtaaccaatgtgectataacatcaggaccagcataaatgacaaaaagcttgcgtcacg	
5	I H G Y T D I V V L V V F T V F E R S A	
6	V Y M T V R I N Y D Q D Y K S N E F A T	
1141	cgaggcctacgtgggtccacatttccagaggtttgtagcctcagccaaagctgattccttt	1200
	gctccggatgcaccaggtgtaaaggctctccaaacatcggagtcgggttcgactaaggaaa	
5	E A Y V V H I S R G L *	
6	G L G V H D V N G S T Q L R L M L Q N R	
1201	tgttatttgggttggaaagtaataatagtgagggtcaagaacaggtttgggtgtgaagtaac	1260
	acaataaaccaaccttcattagttatcacctcagttcttctgccaacccacacttcattg	
6	K N N P Q F Y D I T S D L V P K P T F Y	
1261	gggagtggttaggagaaggggttgggggattgtatggcgggaggagtagttacatatgggt	1320
	ccctaccatcctcttcccaaccccataacatacggcctcctcatcaaatgtataccca	
6	R S H Y S F P Q P I T H R S S Y N V Y P	
1321	catagggttagggctgtggccttgttacaaaagttatcatctaaaataacagcagtgaggc	1380
	gtatccaatcccagacaccggaacaatgtttcaatagtagatttttattgtcgtcaccteg	
6	D Y T L A T A K T V F N D D L I V A T S	

FIG. 2B

1381 ccactcccctatcacctgggtgatgggggagcaaggccagaattcaaccttaacccttc 1440
6 ggtgaggggatagtggaacccactaccctcctcgttcgggtccttaagttggaaattggaaag
G V G R D G Q T I P S C P W F E V K V K

1441 ttattctgtattccaagggtatagagattttgttggtcccccctcccccgggggaaacaa 1500
6 aataagacatcataagttcccatactctctaaaaaacaccagggggggggcccccttgtt
R I R Y Y E F P I S I K N T G G G P P V

1501 agtcgtcaatttlaaatctcatcgtccaccgcccaggagggcggttgtaactgtgttac 1560
6 tcagcagtttaaaatttagagtagtacaggtggcggtcctcccgaacactgacaccatg
F D D I K F R M H D V A W S P T V T T

1561 gcttgacagtatatccgaaaggtcggggagagggcggtgttgaaagatgccattttccttc 1620
6 cgaactgtcatataggttccacgcccctctccgcccacaacttctacggttaaaaagggaag
R K V T Y G F T R S L R T N F I G N K R

1621 tccaacggttagcgggtggcggggtggacagcccaggggcgggcgaggatctggcccaa 1680
6 aggttgccatcgccaccgcccacactgctcgggtcccccggccctcctagaccggtt
R W R Y R H R P H V L W P R R R L I Q G

1681 gatggctgccccgggtgttcttcttcttctgctggtaaccgcccctcttgatcacgtcatagctg 1740
6 ctaccgaagccccccacacagaagaagagccattggcggaggaaacctatgcaagtatcgac
L H S R P R H R R R R Y R R R R P Y T M

1741 aaaacgaaagaagtgcgctgtaagtatt 1800
6 ttttgctttcttcaogcgacattcataa

FIG. 2C

```

      10      20      30      40      50      60
MPSKKNGRSGPQPHKRWVFTLNNPSEDERKKIRELPISLFDYFIVGEEGNEEGRTPHLQG
-  :::::  :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::  :::::  :::::::::::
MPSKK---SGPQPHKRWVFTLNNPSEEEKNKIRELPISLFDYFVCGEEGLEEGRTPHLQG
      10      20      30      40      50

      70      80      90      100     110     120
FANFVKKQTFNKVKWYLGARCHIEKAKGTDQONKEYCSKEGNLLIECGAPRSQGQRSDLS
-  :::::  :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::  :::::  :::::::::::
FANFAKKQTFNKVKWYFGARCHIEKAKGTDQONKEYCSKEGHILIECGAPRNQGRSDLS
      60      70      80      90      100     110

      130     140     150     160     170     180
TAVSTLLESGILVTVAKQHFPVTFVKNFRGLAELLKVSQKMQKRDWKTNVHFIVGPPGCGK
-  :::::  :::::  :::::  :::::::::::::::::::::::::::::::  ::  :::::::::::
TAVSTLLETGSLVTVAEQFPVTVYVRNFRGLAELLKVSQKMQQRDWTAVHVIVGPPGCGK
      120     130     140     150     160     170

      190     200     210     220     230     240
SKWAANFANPETTYWKPPKNKWDGYHGEKVVVIDDFYGWLPWDDLRLCDRYPLTVKTK
-  ::::  :::::  :::::  :::::::::::::::::::::::::::::::  :::::  :::::::::::
SQWARNFAEPRDTYWKPSRNKWDGYHGEVVLDDFYGWLPWDDLRLCDRYPLTVETK
      180     190     200     210     220     230

      250     260     270     280     290
GGTVPFLARSILITSNQTPLEWYSSTAVPAVEALYRRITSLVFWKNATKQSTE-EGGQFV
-  :::::  :::::::::::  :::::::::::  :::::::::::  :::::  :::::  :::
GGTVPFLARSILITSNQAPQEWYSSTAVPAVEALYRRITTLQFWKTAGEQSTEVEPEGRFE
      240     250     260     270     280     290

300      310
TLSPPCPEFPYEINY
-  ..:::  :::::
AVDPPCALFPYKINY
      300      310

```

FIG. 3A

```

      10      20      30      40      50      60
MLLLRCCRGAAAAEVRWYSSALLSFSAMTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHP
      :
-----W-----PRRRYRRRRTRPRSHLGNILRRRPYLAHP
      10      20      30

      70      80      90      100     110
--RHRYRWRKNGIFNTRLRSTFGYTVKRTTVTTPSWAVDMRFKIDDFVPPGGGTNKIS
      :
AFRNRYRWRKGTGIFNSRLSTEFVLTIK-GGYSQPSWVNYLKFNIGQFLPPSGGTNPLP
      40      50      60      70      80

120      130      140      150      160      170
IPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTI
      :
LPFQYYRIRKAKYEFYPRDPITSNQRGVGSTVVILDANFVTPSTNLAYDPYINYSSRHTI
90      100      110      120      130      140

180      190      200      210      220      230
PQPFYHSRYFTPKPVL DSTIDYFQPNKRNQLWLRQLTSGNVDHVGLGTAFENSKYDQD
      :
RQPFYHSRYFTPKPELDQIDWFHPNKNRNQLWLHLNHTNVEHTGLGYALQNAATAQN
150      160      170      180      190      200

240      250      260
YNIRVTMYVQFREFNLKDPPEP
      :
YVVRTIYVQFREFILKDP-LNK
210      220      230

```

FIG. 3B


```

      10      20      30      40      50      60
MVTIPPLVFRWFPVCGFRVCKISSPFAFTTFRWPHNEVYIGFPITLLHFP AHFQKFSQPA
:..... :. :. :..... : :. :. :.....:.....:
- MISIPPLISTRLPVGVFRLSKITGPLALPTTGRAHYDVYSCLPITLLHLP AHFQKFSQPA
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100
EIFDKRYRVLLCNGHQNPALQQGTHSSRQVTPLSLRSRSTFNK-----
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
- EISHIRYRELLGYSHQRPRLQKGTSSRQVAALPLVFRSSTLDKYVAFFTA VFFILLVGS
      70      80      90      100      110      120

-----

- FRFLDVAAGTKIPLHLVKSLLSKIRKPLEVRSSTLFTFLSANKI IKKGDWKL PYFVFL
      130      140      150      160      170      180

-----

- LLGRIIKGEHPPLMGLRAAFLAWFH
      190      200

```

FIG. 3D


```

PCV      ATTGTACATAAATATGTCAGCCCTTACCAATATTTTGGGCTGTGGCTGCA - TTTTGGAGCGCATAGCCGGGCGCTGTGCTCCGACATGCTGTGGGATTTTAAATGAGGCCACAGCTGG
412      C G T CA GG TATTG G CC T - ATT A TG C A GT AC G C TCCAGA T G GCCTC A A
9741    C G T CA GG TATTG G CC T - ATT A TG C A GT AC G C TCCAGA T G GCCTC A A
B9      C G T CA GG TATTG G CC T - ATT A TG C A GT AC G C TC AGA T G GCCTC A A

PCV      TTTCTTTTATTATTGGGTGGAAACCANTCAATGTTTGTCCAGCTGAGCTTTGGGGTGAAAGTACCTGGAGCTGAGGTAAAGGGCTGCCCTTATGGTGTGCTGGCGGAGGAGTCTTAAATA
412      C G T GT A GGA A AA T A G AG T GGG T A T C
9741    C G T GT A GGA A AA T A G AG T GGG T A T C
B9      C G T GT A GGA A AA T A G AG T GGG T A T C

PCV      TAGGGGTCAATAGGCCAAGTTGGGAGGGGTTTACAAAGTTGGCATCCAAAGATACACAGCTGGACCCCAACACCTCTTTGATTAGAGGTGATGGGGTCTCTGGGGTAAAJATTCATATTTA
412      T TT G OCT CCTTT AT T A G G C T C A C CCCTG GAG AA CC G ACC
9741    T TT G OCT CCTTT AT T A G G C T C A C CCCTG GAG A CC G ACC
B9      T TT G OCT CCTTT AT T GA G G C T C A C CCCTG GAG A CC G ACC

PCV      GCCTTTCTAATACGGTAGTATTGGAAAGGTAGGGGTAGGGGCTGTGGCCGCTGAGGGGGGAGGAGACTGGCCGATGTTGAAATTTGAGGTAGTTAMCAATCCAAAGATGGC - T TCGAGGT
412      A T T T CA G TA AG TTTT C C CCC A CA G C T A T A C C TCAT CC CCG G G GT T C
9741    A T T T CA G TA AG TTTT C C CCC A CA G C T A T A C C TCAT CC CCG G G GT T C
B9      A T T T CA G TA AG TTTT C C CCC A CA G C T A T A C C TCAT CC CCG G G GT T C

PCV      ATCTCCCTTTT - ATGGTGGTACAAATTCGTGTAGAAAGCCCGCAATTTGAAAGTATACCCGCTTTTGGGCGCCATCTGTAAAGCGTGTTCGTAAGCGCGGGG - TGTGCGCAATATGGTCTCTCGG
412      G GG A GC G CA ATA C G GGTGCGG G TG G AT T C TT T A G G G GA G GCC G G GG GG
9741    G GG A GC G CA ATA C G GGTGCGG G TG G AT T C TT T A G G G GA G GCC G G GG GG
B9      G GG ACC G CA ATA C G GGTGCGG G TG G AT T C TT T A G G G GA G GCC G G GG GG

PCV      GAGGATGTTCCAAAGTGGCTGGGGGGCGGTCCTCTCTCTGGGTTACCGCCCTGCTGGGACAGTCATCTATAAAGTGAAGGAGTGGTCCCTGCTGTA - GTATTT
412      C GG TGT AT AGCTG C- ... A
9741    C GG TGT AT AGCTG C- ... A
B9      C GG TGT AT AGCTG C- ... A

```

FIG. 4B

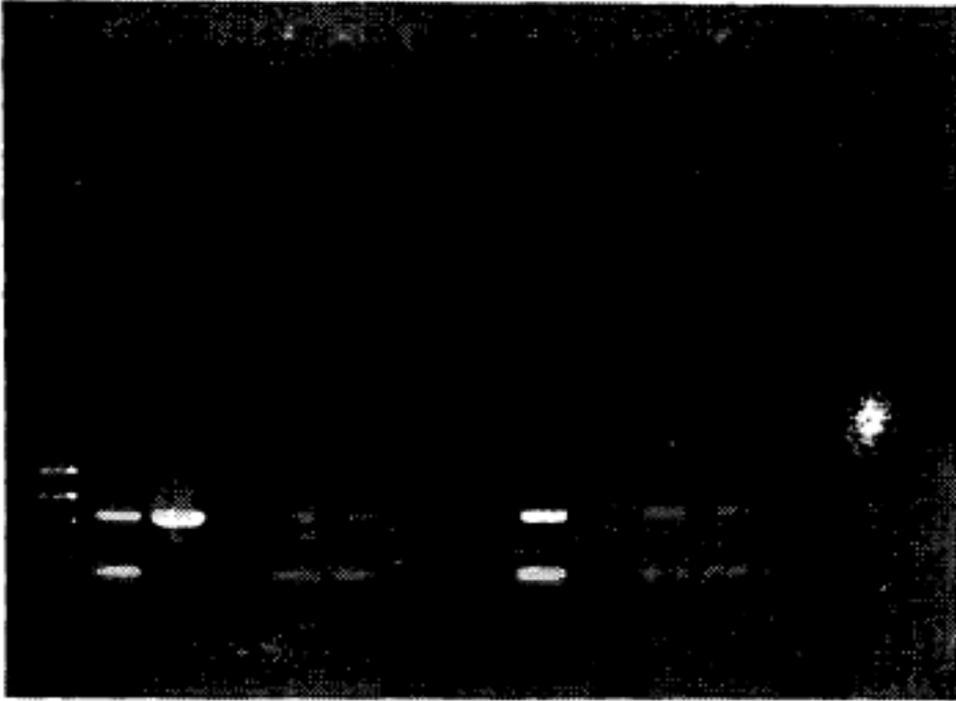


FIG. 5

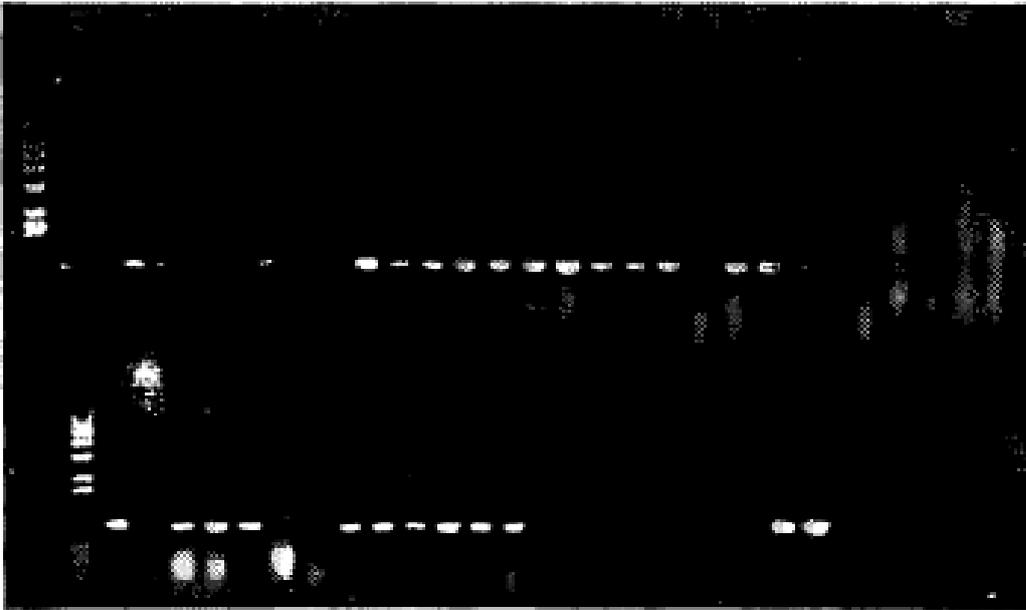


FIG. 6