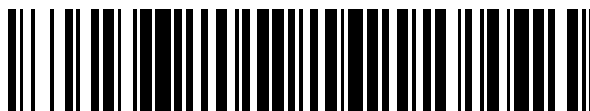


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 146**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
C07K 14/01 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.1998 E 10184626 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2330188**

54 Título: **Secuencias de circovirus asociado con la enfermedad del adelgazamiento del lechón (MAP)**

30 Prioridad:

05.12.1997 FR 9715396

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

14.10.2015

73 Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)
100 Campus Drive
Florham Park, NJ 07932, US**

72 Inventor/es:

**JESTIN, ANDRÉ;
ALBINA, EMMANUEL;
LE CANN, PIERRE;
BLANCHARD, PHILIPPE;
HUTET, EVELYNE;
ARNAUD, CLAIRE;
TRUONG, CATHERINE;
MAHE, DOMINIQUE;
CARIOLET, ROLAND y
MADEC, FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 548 146 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

Secuencias de circovirus asociado con la enfermedad del adelgazamiento del lechón (MAP)

La invención se refiere a procedimientos de detección de polipéptidos, a kits de diagnóstico de infecciones por el circovirus MAP de tipo B. La descripción tiene por objeto la secuencia genómica y las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos del circovirus MAP, tales como los polipéptidos estructurales y no estructurales de dicho circovirus, así como los vectores que incluyen dichas secuencias y células o animales transformados con dichos vectores. La descripción se refiere a procedimientos de detección de dichos ácidos nucleicos. La invención se refiere finalmente a anticuerpos monoclonales y policlonales que pueden reconocer de forma específica los polipéptidos aislados que tienen las secuencias SEC. ID N° 17-20.

La invención se refiere a los procedimientos de detección y/o identificación de un circovirus MAP de tipo B en una muestra biológica, que comprende un polipéptido aislado codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia SEC. ID N° 12 y que corresponde a un ORF'2 de un circovirus de tipo B, comprendiendo dicho polipéptido un epítipo específico de un circovirus MAP de tipo B presentado por al menos un polipéptido seleccionado entre SEC. ID N° 17, SEC. ID N° 18, SEC. ID N° 19, y SEC. ID N° 20, y la detección de los complejos antígeno-anticuerpo eventualmente formados.

La invención se refiere además a kits de diagnóstico de una infección por circovirus MAP de tipo B es una muestra biológica, que comprende un polipéptido aislado codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia SEC. ID N° 12 y que corresponde a un ORF'2 de un circovirus de tipo B, comprendiendo dicho polipéptido un epítipo específico de un circovirus MAP de tipo B presentado por al menos un polipéptido seleccionado entre SEC. ID N° 17, SEC. ID N° 18, SEC. ID N° 19, y SEC. ID N° 20, y la detección de los complejos antígeno-anticuerpo eventualmente formados

La memoria descriptiva se refiere también a un método de selección de compuestos que puedan modular la infección vírica. La memoria descriptiva comprende finalmente composiciones farmacéuticas, especialmente vacunales, para la prevención y/o el tratamiento de infecciones víricas por circovirus MAP así como el uso de un vector de acuerdo con la descripción para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades mediante terapia génica.

Se ha descrito ampliamente la enfermedad del adelgazamiento del lechón (MAP) o también denominada decaimiento fatal del lechón (DFP) en América del Norte (Harding, J.C., 1997), y unos autores han relatado la existencia de una relación entre esta patología y la presencia de circovirus porcino (Daft, B. *et al.*, 1996; Clark, E.G., 1997; Harding, J.C., 1997; Harding, J.C. y Clark, E.G., 1997; Nayar, G.P. *et al.*, 1997). Ya se ha demostrado un circovirus porcino en unos cultivos celulares derivados del cerdo establecidos en línea e infectados crónicamente (Tischer, I., 1986, 1988, 1995; Dulac, G.C., 1989; Edwards, S., 1994; Allan, G.M., 1995 y McNeilly, F., 1996). Este virus, durante una infección experimental de lechones, no resultaba ser patógeno para el cerdo (Tischer, I., 1986; Homer, G.W., 1991) y se ha determinado y caracterizado su secuencia nucleotídica (Tischer, I., 1982; Meehan, B. M. *et al.*, 1997; Mankertz, A., 1997). El circovirus porcino, denominado virus PCV, pertenece al género circovirus de la familia de los circoviridae (Murphy, F.A. *et al.*, 1995) cuyo virión posee un ADN circular de tamaño comprendido entre 1,7 y 2,3 kb, ADN que comprende 3 marcos abiertos de lectura (ORF1 a ORF3), que codifica para una proteína de replicación REP implicada en la fase de iniciación y de terminación de la replicación circular desarrolladora (RCR) (Heyraud-Nitschke, F., *et al.*, 1995; Harding, M.R. *et al.*, 1993; Hanson, S.F. *et al.*, 1995; Fontes, E.P.B. *et al.*, 1994), que codifica para una proteína de cápside (Boulton, L.H. *et al.*, 1997; Hackland, A.F. *et al.*, 1994; Chu P.W.G. *et al.*, 1993) y que codifica para una proteína no estructural denominada de diseminación (Lazarowitz, S.G. *et al.*, 1989).

Los autores de la presente invención han observado que las manifestaciones clínicas perceptibles en el cerdo y relacionadas con la infección por el circovirus MAP, están muy individualizadas. Estas manifestaciones aparecen en general en unos cerdos de 8 a 12 semanas de edad, destetados desde 4 a 8 semanas. Las primeras señales son la hipotonía sin que se llegue a hablar de postración. Rápidamente (48 horas) los flancos se ahuecan, se marca la línea de la espalda, los cerdos "blanquean". Estas señales se acompañan en general de hipertermia, de anorexia y lo más frecuentemente de manifestaciones respiratorias (tos, disnea, polipnea). Pueden aparecer asimismo unas diarreas transitorias. La fase de estado de la enfermedad tarda aproximadamente un mes al final del cual los porcentajes de mortalidad varían de 5 a 20%. A estas mortalidades conviene añadir una proporción variable (5-10%) de animales cadavéricos que ya no pueden presentar ningún futuro económico. Se debe observar que fuera de este estado crítico de fin de post-destetado, no aparece ninguna anomalía en las ganaderías. En particular, la función de reproducción se mantiene perfectamente.

En el plano epidemiológico, las primeras manifestaciones de esta patología han aparecido a principios de 1995 en el Este del departamento de las Côtes d'Armor en Francia, y las ganaderías afectadas se han acantonado sobre todo en esta zona del departamento. En diciembre de 1996, no se puede evaluar con precisión el número de ganaderías afectadas debido a la ausencia de un método de diagnóstico específico en laboratorio ni un dispositivo de epidemiovigilancia del ganado. Basándose en los hechos clínicos así como en los resultados de exámenes necrópsicos suministrados por los veterinarios, se puede estimar este número en varias decenas (80-100). La contagiosidad de la enfermedad es baja a moderada. Se han señalado unos casos fuera de la zona inicial y son el

resultado en su mayoría de la transferencia de animales procedentes de ganaderías que conocen el problema. Sin embargo, una particularidad de la afección es su alta persistencia. Así, unas ganaderías afectadas desde hace un año están todavía afectadas a pesar de la aplicación masiva de terapéuticos. Las ganaderías con expresión clínica se reclutan en las diferentes categorías de especialización (crías-cebadores, post-destetados-cebadores) y diferentes estructuras económicas están afectadas. Por otro lado, los trastornos aparecen incluso en unas ganaderías en las que se respetan las reglas de zootecnia.

Se han realizado numerosos exámenes necrópsicos o bien en las ganaderías o bien en el laboratorio. Los elementos de la tabla relativa a las lesiones son disparatados. Las lesiones macroscópicas más constantes son la neumonía que se presenta a veces en cuadrícula, así como una hipertrofia de los ganglios linfáticos. Las demás lesiones se refieren sobre todo a las vísceras torácicas incluyendo en particular la pericarditis y la pleuresía. Pero se observan asimismo unas artritis y unas úlceras gástricas. Las lesiones reveladas en el examen histológico se sitúan esencialmente a nivel pulmonar (neumonía intersticial), ganglionar (depleción linfocítica de los nudos linfáticos, células gigantes) y renal (glomerulonefritis, vascularitis). Los agentes infecciosos han sido objeto de amplias investigaciones. Se ha podido excluir la intervención de los pestivirus y de la enfermedad de Aujeszky. Los trastornos aparecen en los ganados SDRP (síndrome disgenésico y respiratorio porcino, infección relacionada con un arteriovirus) seropositivos, pero no se ha podido establecer la función de este último en la génesis de los trastornos (la mayoría de las ganaderías de Bretaña son SDRP seropositivas).

Los autores de la presente invención, con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable de la MAP, han realizado unas pruebas de "contacto" entre lechones manifiestamente "enfermos" y unos cerdos EOPS (Exentos de Organismos Patógenos Específicos) del CNEVA (Centro Nacional de Estudios Veterinarios y Alimenticios, Francia). Estas pruebas han permitido observar el desarrollo en los animalarios protegidos de las manifestaciones comparables con las observadas en ganaderías. Las manifestaciones discretas tales como la hipertermia moderada, la anorexia y la diarrea intermitente, han aparecido después de una semana de contacto. Se debe observar que el virus SDRP únicamente se ha difundido posteriormente a las manifestaciones clínicas. Por otro lado, unas inoculaciones de triturados de órganos de animales enfermos a unos cerdos sanos ha permitido reproducir unas manifestaciones parecidas a las observadas en las ganaderías, con, sin embargo, una incidencia menos fuerte relacionada con las condiciones favorables de mantenimiento de los animales en las instalaciones experimentales.

Así, los autores de la presente invención han podido demostrar que las manifestaciones patológicas se presentan como una entidad bien definida que afecta al cerdo en un estadio particular de su crecimiento.

No se ha descrito nunca esta patología en Francia. Sin embargo, unas informaciones dispersas en particular canadienses relatan unos hechos parecidos.

Los trastornos no se pueden controlar mediante las terapias existentes.

Los datos recogidos tanto en ganaderías como en experimentaciones han permitido resaltar los siguientes puntos:

- la enfermedad MAP es transmisible pero su contagiosidad es poco elevada,
- su origen etiológico es de naturaleza infecciosa y probablemente vírica,
- la enfermedad MAP presenta un carácter persistente en las ganaderías afectadas.

Se desprenden de ello unas consecuencias económicas considerables para las ganaderías.

Así, una necesidad importante en la actualidad se refiere a un diagnóstico específico y sensible, de realización práctica y rápida, que permite la detección precoz de la infección. Se desea, por lo tanto, una prueba fiable, sensible y práctica, que permita la distinción entre las cepas de circovirus porcino (PCV).

Por otro lado, una necesidad de tratamiento eficaz, y bien tolerado de las infecciones por circovirus MAP sigue siendo asimismo deseado, al no estar disponible en la actualidad ninguna vacuna contra el circovirus MAP.

Tratándose del circovirus MAP, se necesitará probablemente comprender el papel de la defensa inmunitaria en la fisiología y la patología de la enfermedad para desarrollar unas vacunas satisfactorias.

Una información más amplia referente a la biología de estas cepas, sus interacciones con sus hospedadoras, los fenómenos de infectividad asociados y los de escapatoria a las defensas inmunitarias del hospedador en particular, y por último su implicación en el desarrollo de las patologías asociadas, permitirá una mejor comprensión de estos mecanismos. Teniendo en cuenta lo anterior, y que muestra en particular las limitaciones de los medios de lucha contra la infección por el circovirus MAP, es por lo tanto primordial en la actualidad por un lado desarrollar unas herramientas moleculares, en particular a partir de un mejor conocimiento genético del circovirus MAP, pero también elaborar nuevos tratamientos preventivos y terapéuticos, nuevos métodos de diagnóstico y nuevas estrategias vacunales específicas, eficaces y toleradas. Esto constituye precisamente el objetivo de la presente invención.

La presente descripción tiene por objeto las secuencias nucleotídicas del genoma de circovirus MAP seleccionadas de entre las secuencias SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, o uno de sus fragmentos.

Las secuencias nucleotídicas de secuencias SEC ID nº 1 y SEC ID nº 2 corresponden respectivamente a la secuencia genómica nucleotídica de la Hebra de polaridad (+) y de la Hebra de polaridad (-) del circovirus MAP de tipo A (o PCVA), estando la secuencia SEC ID nº 2 representada según la orientación 5' → 3'.

5 Las secuencias nucleotídicas de secuencias SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10 corresponden respectivamente a la secuencia genómica de la Hebra de polaridad (+) y de la Hebra de polaridad (-) del circovirus MAP de tipo B (PCVB), estando la secuencia SEC ID nº 10 representada según la orientación 5' → 3'.

La presente descripción tiene asimismo por objeto unas secuencias nucleotídicas caracterizadas porque se seleccionan de entre:

- 10 a) una secuencia nucleotídica de fragmento específico de una secuencia SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10 o uno de sus fragmentos;
- b) una secuencia nucleotídica homóloga a una secuencia nucleotídica tal como la definida en a);
- c) una secuencia nucleotídica complementaria de una secuencia nucleotídica tal como la definida en a) o b), y una secuencia nucleotídica de su ARN correspondiente;
- 15 d) una secuencia nucleotídica capaz de hibridarse en unas condiciones rigurosas con una secuencia tal como la definida en a), b) o c);
- e) una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia tal como la definida en a), b), c) o d); y
- f) una secuencia nucleotídica modificada de una secuencia nucleotídica tal como la definida en a), b), c), d) o e).

20 Mediante la expresión "secuencia nucleotídica, polinucleótido o ácido nucleico" se entiende, según la presente descripción, tanto un ADN bicatenario como monocatenario en unas formas monoméricas y diméricas (denominadas en tándem) como unos productos de transcripción de dichos ADN.

25 Se debe comprender que la presente descripción no se refiere a las secuencias nucleotídicas genómicas consideradas en su ambiente natural, es decir en el estado natural. Se trata de secuencias que han podido ser aisladas, purificadas o parcialmente purificadas, a partir de métodos de separación tales como por ejemplo la cromatografía por intercambio de iones, por exclusión basada en el tamaño molecular, o por afinidad, o también las técnicas de fraccionamiento basadas en la solubilidad en diferentes disolventes, o a partir de métodos de ingeniería genética tales como la amplificación, la clonación y la sub-clonación, pudiendo las secuencias de la descripción estar llevadas por vectores.

Las secuencias nucleotídicas SEC ID nº 1 y SEC ID nº 9 han sido obtenidas mediante secuenciación del genoma por el método de Sanger.

30 Mediante la expresión "fragmento de secuencia nucleotídica" según la descripción, se entenderá designar cualquier fragmento nucleotídico del circovirus MAP, de tipo A o B, de longitud de por lo menos 8 nucleótidos, preferentemente por lo menos 12 nucleótidos, y más preferentemente por lo menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de la cual procede.

35 Mediante la expresión "fragmento específico de secuencia nucleotídica" según la descripción, se entenderá designar cualquier fragmento nucleotídico del circovirus MAP, de tipo A o B, que presenta, después de la alineación y de la comparación con los fragmentos correspondientes del circovirus porcino conocido, por lo menos un nucleótido o base de naturaleza diferente. Por ejemplo, los fragmentos nucleotídicos específicos de circovirus MAP de tipo A se pueden determinar fácilmente haciendo referencia a la figura 3 de la presente descripción en la que se ponen en evidencia los nucleótidos o bases de la secuencia SEC ID nº 1 (circopordfp) que son de naturaleza diferente,

40 después de la alineación de dicha secuencia SEC ID nº 1 con las otras dos secuencias de circovirus porcino conocidas (circopormeeh y circopormank).

45 Mediante la expresión "secuencia nucleotídica homóloga" en el sentido de la presente descripción, se entiende una secuencia nucleotídica que presenta por lo menos un porcentaje de identidad con las bases de una secuencia nucleotídica según la descripción de por lo menos 80%, preferentemente 90% y 95%, siendo este porcentaje puramente estadístico y pudiendo las diferencias entre las dos secuencias nucleotídicas ser repartidas al azar y sobre toda su longitud.

50 Mediante la expresión "secuencia nucleotídica homóloga específica" en el sentido de la presente descripción, se entiende una secuencia nucleotídica homóloga que presenta por lo menos una secuencia nucleotídica de fragmento específico, tal como se ha definido anteriormente. Dichas secuencias homólogas "específicas" pueden comprender, por ejemplo, las secuencias que corresponden a la secuencia genómica o a las secuencias de sus fragmentos representativos de variantes de circovirus MAP de tipo A o B. Así, estas secuencias homólogas específicas pueden corresponder a unas variaciones relacionadas con unas mutaciones en el seno de las cepas de circovirus MAP de tipo A o B, y corresponder en particular a unos truncamientos, a unas sustituciones, a unas delecciones y/o a unas adiciones de por lo menos un nucleótido. Dichas secuencias homólogas pueden corresponder asimismo a unas

55 variaciones relacionadas con la degeneración del código genético.

En la presente descripción, se entenderá designar mediante circovirus MAP, los circovirus asociados con la enfermedad del adelgazamiento del lechón (MAP) de tipo A (PCVA) o de tipo B (PCVB), definidos a continuación por

su secuencia genómica, así como los circovirus cuyas secuencias nucleicas son homólogas a las secuencias de los circovirus MAP de tipo A o B, tales como en particular los circovirus que corresponden a unas variantes de tipo A o de tipo B.

- 5 Mediante la expresión “secuencia nucleotídica complementaria de una secuencia de la descripción”, se entiende cualquier ADN cuyos nucleótidos son complementarios de los de la secuencia de la descripción, y cuya orientación está invertida (secuencia antiparalela).

Mediante la expresión “hibridación en unas condiciones de rigor con una secuencia nucleotídica según la descripción”, se entiende una hibridación en unas condiciones de temperatura y de fuerza iónica elegidas de tal manera que permiten el mantenimiento de la hibridación entre dos fragmentos de ADN complementarios.

- 10 A título ilustrativo, unas condiciones de fuerte rigor de la etapa de hibridación con el fin de definir los fragmentos nucleotídicos descritos anteriormente, son ventajosamente las siguientes.

La hibridación se realiza a una temperatura preferida de 65°C en presencia de tampón SSC, 1 x SSC que corresponde a 0,15 M de NaCl y 0,05 M de citrato de Na. Las etapas de lavado pueden ser por ejemplo las siguientes:

- 15 - 2 x SSC, a temperatura ambiente seguido de 2 lavados a 2 x SSC, 0,5% SDS a 65°C; 2 x 0,5 x SSC, 0,5% SDS; a 65°C durante 10 minutos cada uno.

Las condiciones de rigor intermedia, usando por ejemplo una temperatura de 42°C en presencia de un tampón 2 x SSC, o de baja rigor, por ejemplo una temperatura de 37°C en presencia de un tampón 2 x SSC, requieren respectivamente para la hibridación entre las dos secuencias una complementariedad global lo menos importante.

- 20 Las condiciones rigurosas de hibridación descritas anteriormente para un polinucleótido de tamaño de aproximadamente 350 bases, serán adaptadas por el experto en la materia para unos oligonucleótidos de tamaño más grande o más pequeño, según las enseñanzas de Sambrook *et al*, 1989.

- 25 Entre las secuencias nucleotídicas según la descripción, se prefieren asimismo las que se pueden utilizar como cebador o sonda en unos métodos que permiten obtener las secuencias homólogas según la descripción, siendo estos métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la clonación y la secuenciación de ácido nucleotídico bien conocidos por el experto en la materia.

Entre dichas secuencias nucleotídicas según la descripción, se prefieren también las que se pueden utilizar como cebador o sonda en unos métodos que permiten diagnosticar la presencia de circovirus MAP o una de sus variantes tales como las definidas a continuación.

- 30 Se prefieren asimismo las secuencias nucleotídicas según la descripción capaces de modular, de inhibir o de inducir la expresión de gen de circovirus MAP, y/o capaces de modular el ciclo de replicación de circovirus MAP en la célula y/o el organismo hospedadora. Se entenderá designar por ciclo de replicación, la invasión, la multiplicación de circovirus MAP, y su propagación células hospedadoras a células hospedadoras en el organismo hospedadora.

- 35 De entre dichas secuencias nucleotídicas según la descripción, se prefieren por último las que corresponden a unos marcos abiertos de lectura, denominados secuencias ORF (ORF por “open reading frame”), y que codifican para unos polipéptidos, tales como, por ejemplo, las secuencias SEC ID nº 3 (ORF1), SEC ID nº 4 (ORF2) y SEC ID nº 5 (ORF3), que corresponden respectivamente a las secuencias nucleotídicas comprendidas entre las posiciones 47 a 985 determinadas con respecto a la posición de los nucleótidos en la secuencia SEC ID nº 1, las posiciones 1723 a 1022 y las posiciones 658 a 38 con respecto a la posición de los nucleótidos en la secuencia SEC ID nº 2 (representada según la orientación 3' → 5'), estando incluidos los extremos, o también las secuencias SEC ID nº 11 (ORF'1), SEC ID nº 12 (ORF'2) y SEC ID nº 13 (ORF'3), que corresponden respectivamente a las secuencias comprendidas entre las posiciones 51 a 995 determinadas con respecto a la posición de los nucleótidos en la secuencia SEC ID nº 9, las posiciones 1734 a 1033 y las posiciones 670 a 357, estando las posiciones determinadas con respecto a la posición de los nucleótidos en la secuencia SEC ID nº 10 (representada según la orientación 3' → 5'), estando incluidos los extremos.

- 45 Los fragmentos de secuencia nucleotídica según la descripción se pueden obtener, por ejemplo, mediante amplificación específica, tal como la PCR, o después de la digestión mediante unas enzimas de restricción apropiadas de secuencias nucleotídicas según la descripción; estos métodos se describen en particular en los trabajos de Sambrook *et al.*, 1989. Dichos fragmentos representativos se pueden obtener asimismo mediante síntesis química cuando su tamaño no es demasiado importante y según unos métodos bien conocidos por el experto en la materia.

- 50 Mediante la expresión secuencia nucleotídica modificada se entenderá cualquier secuencia nucleotídica obtenida mediante mutagénesis según unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia, y que comprenden unas modificaciones con relación a las secuencias normales según la descripción, por ejemplo unas mutaciones en las secuencias reguladoras y/o promotoras de la expresión de polipéptido, que conducen en particular a una

modificación del porcentaje de expresión de dicho polipéptido o a una modulación del ciclo replicativo.

Mediante la expresión “secuencia nucleotídica modificada” se entenderá asimismo cualquier secuencia nucleotídica que codifica para un polipéptido modificado tal como se definirá a continuación.

- 5 La presente descripción tiene por objeto unas secuencias nucleotídicas de circovirus MAP, caracterizadas porque se seleccionan de entre las secuencias SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, o uno de sus fragmentos.

La descripción se refiere asimismo a las secuencias nucleotídicas caracterizadas porque comprenden una secuencia nucleotídica seleccionada de entre:

- 10 a) una secuencia nucleotídica SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13 o uno de sus fragmentos;
 b) una secuencia nucleotídica de fragmento específico de una secuencia tal como la definida en a);
 c) una secuencia nucleotídica homóloga que comprende por lo menos el 80% de identidad con una secuencia tal como la definida en a) o b)
 15 d) una secuencia nucleotídica complementaria o de ARN que corresponde a una secuencia tal como la definida en a), b) o c); y
 e) una secuencia nucleotídica modificada de una secuencia tal como la definida en a), b), c), o d).

- 20 En lo que se refiere a la homología con las secuencias nucleotídicas SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, o uno de sus fragmentos, se prefieren las secuencias homólogas, en particular específicas, que presentan un porcentaje de identidad con una de las secuencias SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, o uno de sus fragmentos de por lo menos 80%, preferentemente de 90% y de 95%. Dichas secuencias homólogas específicas pueden comprender, por ejemplo, las secuencias que corresponden a las secuencias ORF1, ORF2, ORF3, ORF'1, ORF'2 y ORF'3 de variante de circovirus MAP de tipo A o de tipo B. Estas secuencias homólogas específicas pueden corresponder de la misma manera a unas variaciones relacionadas con unas mutaciones en el seno de las cepas de circovirus MAP de tipo A o de tipo B, y corresponder en particular a truncamientos, sustituciones, delecciones y/o adiciones de por lo menos un nucleótido.

- 25 De entre las secuencias nucleotídicas según la descripción, se prefiere en particular la secuencia SEC ID nº 11 que presenta una homología que comprende más del 90% de identidad con la secuencia SEC ID nº 3, así como la secuencia SEC ID nº 12.

- 30 De manera preferida, la descripción se refiere a las secuencias nucleotídicas según la descripción, caracterizadas porque comprenden una secuencia nucleotídica seleccionada de entre las secuencias siguientes:

- 35 a) 170 5'TGTGGCGA 3';
 b) 450 5' AGTTTCCT 3';
 c) 1026 5' TCATTTAGAGGGTCTTTCAG 3';
 d) 1074 5' GTC AACCT 3';
 e) 1101 5' GTGGTTGC 3';
 f) 1123 5' AGCCCAGG 3';
 g) 1192 5' TTGGCTGG 3';
 h) 1218 5' TCTAGCTCTGGT 3';
 i) 1501 5' ATCTCAGCTCGT 3';
 40 j) 1536 5' TGTCCTCCTCTT 3';
 k) 1563 5' TCTCTAGA 3';
 l) 1632 5' TGTACCAA 3';
 m) 1686 5' TCCGTCTT 3'; y su secuencia complementaria.

- 45 En la lista de las secuencias nucleotídicas a)-m) anterior, los nucleótidos subrayados están mutados con respecto a las dos secuencias conocidas de circovirus no patógenos para el cerdo. El número que precede a la secuencia nucleotídica representa la posición del primer nucleótido de dicha secuencia en dicha SEC ID nº 1.

- 50 La descripción comprende los polipéptidos codificados por una secuencia nucleotídica según la invención, preferentemente un polipéptido cuya secuencia está representada por un fragmento, en particular específico, de una de las 6 secuencias de aminoácidos representadas en la figura 2, correspondiendo estas 6 secuencias de aminoácidos a los polipéptidos que pueden ser codificados según unos de los 3 marcos de lectura posibles de la secuencia SEC ID nº 1 o de la secuencia SEC ID nº 2, o un polipéptido cuya secuencia está representada por un fragmento, en particular específico, de una de las 6 secuencias de aminoácidos representadas en la figura 8, correspondiendo estas 6 secuencias de aminoácidos a los polipéptidos que pueden ser codificados según uno de los 3 marcos de lectura posibles de la secuencia SEC ID nº 9 o de la secuencia SEC ID nº 10.

- 55 La descripción se refiere también a los polipéptidos caracterizados porque comprenden un polipéptido seleccionado de entre las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 14, SEC ID nº 16, o uno de sus fragmentos.

De entre los polipéptidos según la descripción, se prefiere en particular el polipéptido de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 14 que presenta una homología que comprende más del 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 6, así como el polipéptido de secuencia SEC ID nº 15.

La descripción se refiere también a los polipéptidos caracterizados porque comprenden un polipéptido seleccionado de entre:

- a) un fragmento específico de por lo menos 5 aminoácidos de un polipéptido de secuencia de aminoácidos según la descripción;
- b) un polipéptido homólogo a un polipéptido tal como el definido en a);
- c) un fragmento específico biológicamente activo de polipéptido tal como el definido en a) o b); y
- d) un polipéptido modificado de un polipéptido tal como el definido en a), b) o c).

El término "polipéptidos", como se usa en la presente memoria, designa preferiblemente los polipéptidos de secuencias de aminoácidos SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19 y SEC ID nº 20, siendo estos polipéptidos en particular capaces de reconocer de manera específica los anticuerpos producidos durante la infección por el circovirus MAP de tipo B. Estos polipéptidos presentan así unos epítomos específicos del circovirus MAP de tipo B y pueden, por lo tanto, ser usados en particular en el campo del diagnóstico o como agente inmunógeno para conferir una protección en el cerdo contra la infección por el circovirus MAP, en particular de tipo B.

En la presente descripción, los términos polipéptido, péptido y proteína son intercambiables.

Se debe entender que la invención no se refiere a los polipéptidos en forma natural, es decir, que no se recogen en su entorno natural sino que se han podido aislar u obtener mediante purificación a partir de fuentes naturales, o bien obtenidos mediante recombinación genética, o también mediante síntesis química, y que pueden comprender entonces unos aminoácidos no naturales, tal como se describirá a continuación.

Mediante la expresión "fragmento de polipéptido" según la descripción, se entiende designar un polipéptido que comprende como mínimo 5 aminoácidos, preferentemente 10 aminoácidos y 15 aminoácidos.

Mediante la expresión "fragmento específico de polipéptido", se entiende designar, en la presente descripción, un fragmento de polipéptido codificado por una secuencia nucleotídica de fragmento específico según la descripción.

Mediante la expresión polipéptido homólogo se entenderá designar los polipéptidos que presentan, con relación al polipéptido natural, ciertas modificaciones como en particular una delección, una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido, un truncamiento, un alargamiento, una fusión quimérica y/o una mutación. Entre los polipéptidos homólogos, se prefieren aquéllos cuya secuencia de aminoácidos presenta por lo menos 80%, preferentemente 90%, de homología con las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos según la descripción.

Mediante la expresión polipéptido homólogo específico se entenderá designar los polipéptidos homólogos tales como se han definido anteriormente y que presentan un fragmento específico de polipéptido según la descripción.

En el caso de una sustitución, se sustituyen uno o varios aminoácidos consecutivos o no consecutivos por unos aminoácidos "equivalentes". La expresión aminoácido "equivalente" tiende aquí a designar cualquier aminoácido susceptible de ser sustituido con uno de los aminoácidos de la estructura de base sin modificar sin embargo esencialmente las actividades biológicas de los péptidos correspondientes y tales como se definirán a continuación.

Estos aminoácidos equivalentes pueden ser determinados o bien apoyándose en su homología de estructura con los aminoácidos con los que se sustituyen, o bien en unos resultados de ensayos comparativos de actividad biológica entre los diferentes polipéptidos susceptibles de ser efectuados.

A título de ejemplo, se mencionarán las posibilidades de sustituciones susceptibles de ser efectuadas sin que resulte de ello ninguna modificación profunda de la actividad biológica de los polipéptidos modificados correspondientes, las sustituciones, por ejemplo, de la leucina por la valina o la isoleucina, del ácido aspártico por el ácido glutámico, de la glutamina por la asparagina, de la arginina por la lisina, etc., siendo las sustituciones inversas naturalmente factibles en las mismas condiciones.

Los polipéptidos homólogos específicos corresponden asimismo a los polipéptidos codificados por las secuencias nucleotídicas homólogas específicas tales como se han definido anteriormente y comprenden así en la presente definición los polipéptidos mutados o que corresponden a unas variantes, que pueden existir en circovirus MAP, y que corresponden en particular a truncamientos, sustituciones, delecciones y/o unas adiciones de por lo menos un residuo de aminoácido.

Mediante la expresión fragmento específico biológicamente activo de un polipéptido según la invención, se entenderá designar en particular un fragmento específico de polipéptido, tal como se ha definido anteriormente, que presenta por lo menos una de las características de los polipéptidos según la invención, en particular porque es:

- capaz de inducir una reacción de inmunogenicidad dirigida contra un circovirus MAP; y/o
- capaz de ser reconocido por un anticuerpo específico de un polipéptido según la descripción; y/o

- capaz de unirse a un polipéptido o a una secuencia nucleotídica de circovirus MAP; y/o
- capaz de ejercer una actividad fisiológica, incluso parcial, tal como, por ejemplo, una actividad de diseminación o estructural (cápside); y/o
- capaz de modular, inducir o inhibir la expresión de gen de circovirus MAP o una de sus variantes, y/o capaz de modular el ciclo de replicación de circovirus MAP en la célula y/o el organismo hospedadora.

Los fragmentos de polipéptido según la descripción pueden corresponder a unos fragmentos aislados o purificados naturalmente presentes en un circovirus MAP o corresponder a unos fragmentos que se pueden obtener mediante escisión de dicho polipéptido por una enzima proteolítica tal como la tripsina o la quimiotripsina o la collagenasa, o mediante un reactivo químico, tal como el bromuro de cianógeno (CNBr) o también disponiendo dicho polipéptido en un entorno muy ácido, por ejemplo a pH 2,5. Dichos fragmentos polipeptídicos se puede preparar asimismo indiferentemente mediante síntesis química, a partir de hospedadores transformados por un vector de expresión según la invención que contienen un ácido nucleico que permite la expresión de dichos fragmentos, dispuesto bajo el control de los elementos de regulación y/o de expresión apropiados.

Mediante la expresión "polipéptido modificado" de un polipéptido según la invención, se entiende designar un polipéptido obtenido mediante recombinación genética o mediante síntesis química tal como se describirá a continuación, que presenta por lo menos una modificación con relación a la secuencia normal. Estas modificaciones podrán apoyarse asimismo sobre unos aminoácidos en el origen de una especificidad, de la patología y/o de virulencia, o en el origen de la conformación estructural, y de la capacidad de inserción membranaria del polipéptido según la invención. Así, se podrán crear unos polipéptidos de actividad equivalente, aumentada o disminuida, y de especificidad equivalente, más estrecha, o más ancha. Entre los polipéptidos modificados, se deben citar los polipéptidos en los que se pueden modificar hasta 5 aminoácidos, truncados en el extremo N- o C-terminal, o bien deletados, o bien añadidos.

Tal como se indica, las modificaciones del polipéptido tendrán como objetivo en particular:

- hacer que sea capaz de modular, inhibir o inducir la expresión de gen de circovirus MAP y/o capaz de modular el ciclo de replicación de circovirus MAP en la célula y/o el organismo hospedadora,
- permitir su incorporación en unas composiciones vacunales,
- modificar su biodisponibilidad como compuesto de uso terapéutico.

Los métodos que permiten demostrar dichas modulaciones sobre unas células eucariotas o procariotas son bien conocidos por el experto en la materia. Se entiende asimismo que las secuencias nucleotídicas que codifican para dichos polipéptidos modificados se podrán usar para dichas modulaciones, por ejemplo por medio de vectores según la descripción y descritos a continuación, con el fin, por ejemplo, de prevenir o tratar las patologías relacionadas con la infección.

Los polipéptidos modificados anteriores se pueden obtener usando la química combinatoria, en la que es posible hacer variar sistemáticamente unas partes de polipéptido antes de ensayarlas sobre unos modelos, cultivos celulares o microorganismos por ejemplo, para seleccionar los compuestos más activos o que presentan las propiedades buscadas.

La síntesis química presenta asimismo la ventaja de poder usar:

- unos aminoácidos no naturales, o
- unas uniones no peptídicas.

Así, con el fin de mejorar la duración de vida de los polipéptidos según la invención, podrá ser interesante usar unos aminoácidos no naturales, por ejemplo en forma D, o bien unos análogos de aminoácidos, en particular unas formas azufradas por ejemplo.

Por último, la estructura de los polipéptidos según la invención, sus formas homólogas específicas o modificadas, se podrá integrar en unas estructuras químicas de tipo polipeptídica u otras. Así, puede ser interesante prever en los extremos N y C-terminales unos compuestos no reconocidos por las proteasas.

Asimismo, forman parte de la descripción las secuencias nucleotídicas que codifican para un polipéptido según la invención.

La descripción se refiere asimismo a las secuencias nucleotídicas que se pueden utilizar como cebador o sonda, caracterizadas porque dichas secuencias se seleccionan de entre las secuencias nucleotídicas según la descripción.

De entre los pares de secuencias nucleotídicas que se pueden utilizar como par de cebadores según la descripción, se prefieren los pares de cebadores seleccionados de entre los pares siguientes:

- a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', y 5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3';
- b) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', y 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3';
- c) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', y 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';

- d) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', y 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3'; y
e) 5' CCT GTC TAC TGC TGT GAG TAC CTT GT 3', y 5' GCA GTA GAC AGG TCA CTC CGT TGT CC 3'.

La clonación y la secuenciación del circovirus MAP, de tipo A y B, ha permitido identificar, tras el análisis comparativo con las secuencias nucleotídicas de los otros circovirus porcinos, cuáles eran de entre las secuencias de fragmentos de estos ácidos nucleicos, las que son estrictamente específicas del circovirus MAP de tipo A, de tipo B o de tipo A y B, y las que corresponden a una secuencia consenso de circovirus porcinos diferentes de los circovirus MAP de tipo A y/o B.

Existe asimismo una gran necesidad para poder disponer de secuencias nucleotídicas que se pueden utilizar como cebador o sonda específicos del conjunto de circovirus porcinos diferentes conocidos y no patógenos.

- 10 Dichas secuencias nucleotídicas consenso específicas del conjunto de circovirus, diferentes de los circovirus MAP de tipo A y B, son fácilmente identificables a partir de la figura 3 y de la secuencia SEC ID nº 9, y forman parte de la descripción.

De entre dichas secuencias nucleotídicas consenso, se prefiere la caracterizada porque forma parte del par de cebadores siguiente:

- 15 a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', y
5' TGG AAT GTT AAC TAC CTC AA 3'.

La descripción comprende asimismo una secuencia nucleotídica según la descripción, caracterizada porque dicha secuencia es una secuencia consenso específica de circovirus porcino diferente del circovirus MAP de tipo B y porque es uno de los cebadores del par de cebadores siguiente:

- 20 a) 5' GGC GGC GCC ATC TGT AAC GGT TT 3', y
5' GAT GGC GCC GAA AGA CGG GTA TC 3'.

- 25 Se entiende que la presente invención tiene asimismo por objeto los polipéptidos específicos de circovirus porcinos conocidos diferentes de los circovirus MAP, codificados por dichas secuencias nucleotídicas consenso, susceptibles de ser obtenidos por purificación a partir de los polipéptidos naturales, por recombinación genética o por síntesis química mediante procedimientos bien conocidos por el experto en la materia y tales como los descritos en particular a continuación. Del mismo modo, los anticuerpos mono o policlonales, marcados o no marcados dirigidos contra dichos polipéptidos específicos codificados por dichas secuencias nucleotídicas consenso, forman parte también de la descripción.

- 30 Dichas secuencias nucleotídicas consenso, dichos polipéptidos correspondientes, así como dichos anticuerpos dirigidos contra dichos polipéptidos, se podrán utilizar en procedimientos o estuches de detección y/o de identificación tales como los descritos a continuación, en lugar o además de las secuencias nucleotídicas, de los polipéptidos o de los anticuerpos según la descripción, específicos de circovirus MAP de tipo A y/o B.

- 35 Estos protocolos se han mejorado para detectar de manera diferencial las formas monoméricas circulares de formas replicativas específicas del virión o del ADN en replicación y las formas dimericas encontradas en las construcciones moleculares denominadas en tándem.

La descripción se refiere además a la utilización de una secuencia nucleotídica según la descripción, como cebador o sonda, para la detección y/o la amplificación de secuencias de ácido nucleico.

- 40 Las secuencias nucleotídicas según la descripción se pueden utilizar así para amplificar secuencias nucleotídicas, en particular mediante la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Erich, 1989; Innis *et al.*, 1990; Rolfs *et al.*, 1991; et White *et al.*, 1997)

Estos cebadores oligodesoxirribonucleicos u oligorribonucleicos tienen ventajosamente una longitud de por lo menos 8 nucleótidos, preferentemente de por lo menos 12 nucleótidos, y también más preferentemente por lo menos 20 nucleótidos.

Se pueden emplear ventajosamente otras técnicas de amplificación del ácido nucleico como alternativas a la PCR.

- 45 Las secuencias nucleotídicas de la descripción, en particular los cebadores según la descripción, se pueden utilizar en otros procedimientos de amplificación de un ácido nucleico diana, tales como:

- la técnica TAS (Transcription-based Amplification System), descrita por Kwok *et al.* en 1989;
- la técnica 3SR (Self-Sustained Sequence Replication), descrita por Guatelli *et al.* en 1990;
- la técnica NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), descrita por Kievis *et al.* en 1991;
- 50 - la técnica SDA (Strand Displacement Amplification) o técnica de amplificación con desplazamiento de hebra (Walker *et al.*, 1992);
- la técnica TMA (Transcription Mediated Amplification).

Los polinucleótidos de la descripción se pueden utilizar también en técnicas de amplificación o de modificación del ácido nucleico que sirve de sonda, tales como

- la técnica LCR (Ligase Chain Reaction), descrita por Landegren *et al.* en 1988 y perfeccionada por Barany *et al.* en 1991, que emplea una ligasa termoestable;
- 5 - la técnica de RCR (Repair Chain Reaction), descrita por Segev en 1992;
- la técnica CPR (Cycling Probe Reaction), descrita por Duck *et al.* en 1990;
- la técnica de amplificación con Q-beta-replicas, descrita por Miele *et al.* en 1983 y perfeccionada en particular por Chu *et al.* en 1986, Lizardi *et al.* en 1988, y después por Burg *et al.*, así como por Stone *et al.* en 1996.

10 En el caso en que el polinucleótido diana a detectar es un ARN, por ejemplo un ARNm, se podrá utilizar, previamente a la realización de una reacción de amplificación con ayuda de por lo menos un cebador según la descripción o a la realización de un procedimiento de detección con ayuda de por lo menos una sonda de la descripción, una enzima de tipo transcriptasa inversa con el fin de obtener un ADNc a partir del ARN contenido en la muestra biológica. El ADNc obtenido servirá entonces de diana para el o los cebadores o la o las sondas utilizadas en el procedimiento de amplificación o de detección según la descripción.

15 La sonda de detección se elegirá de tal manera que se hibride con la secuencia diana o el amplicón generado a partir de la secuencia diana. Una sonda de detección de este tipo tendrá ventajosamente por secuencia una secuencia de por lo menos 12 nucleótidos, en particular de por lo menos 20 nucleótidos, y preferentemente de por lo menos 100 nucleótidos.

20 La descripción comprende también las secuencias nucleotídicas que se pueden utilizar como sonda o cebador según la descripción, caracterizadas porque están marcadas por un compuesto radioactivo o por un compuesto no radioactivo.

25 Se pueden utilizar las secuencias nucleotídicas no marcadas como sondas o cebadores, sin embargo las secuencias están marcadas generalmente por un elemento radioactivo (^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I) o por una molécula no radioactiva (biotina, acetilaminofluoreno, digoxigenina, 5-bromo-desoxiuridina, fluoresceína) para obtener unas sondas que se pueden utilizar para numerosas aplicaciones.

Unos ejemplos de marcado no radioactivos de secuencias nucleotídicas están descritos, por ejemplo, en la patente francesa nº 78.10975 o por Urdea *et al.* o por Sanchez-Pescador *et al.* en 1988.

En este último caso, se podrá utilizar también uno de los métodos de marcado descritos en las patentes FR 2 422 956 y FR-2 518 755.

30 La técnica de hibridación se puede realizar de varias maneras (Matthews *et al.* 1988). El método más general consiste en inmovilizar el ácido nucleico extraído de las células sobre un soporte (tal como nitrocelulosa, nailon, poliestireno) y en incubar, en condiciones bien definidas, el ácido nucleico diana inmovilizado con la sonda. Después de la hibridación, se retira el exceso de sonda y las moléculas híbridas formadas se detectan mediante el método apropiado (medición de la radioactividad, de la fluorescencia o de la actividad enzimática relacionada con la sonda).

35 La descripción comprende asimismo las secuencias nucleotídicas según la descripción, caracterizadas porque están inmovilizadas sobre un soporte, de manera covalente o no covalente.

40 Según otra realización ventajosa de las secuencias nucleotídicas según la descripción, estas últimas se pueden utilizar inmovilizadas sobre un soporte y servir así para capturar la hibridación específica del ácido nucleico diana obtenido a partir de la muestra biológica a ensayar. Si es necesario, el soporte sólido se separa de la muestra y el complejo de hibridación formado entre la sonda denominada de captura y el ácido nucleico diana se detecta a continuación gracias a una segunda sonda, denominada sonda de detección, marcada por un elemento fácilmente detectable.

Otro objeto de la presente descripción es un vector para la clonación y/o la expresión de una secuencia, caracterizado porque contiene una secuencia nucleotídica según la descripción.

45 Los vectores según la descripción, caracterizados porque comprenden los elementos que permiten la expresión y/o la secreción de dichas secuencias nucleotídicas en una célula hospedadora forman parte asimismo de la descripción.

50 El vector debe entonces comprender un promotor, unas señales de iniciación y de terminación de la traducción, así como unas regiones apropiadas de regulación de la transcripción. Debe poder ser mantenido de manera estable en la célula hospedadora y puede eventualmente poseer unas señales particulares que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diferentes elementos se eligen en función del hospedadora celular usado. Con este fin, las secuencias nucleotídicas según la descripción se pueden insertar en unos vectores de replicación autónoma en el seno del hospedador elegido, o en unos vectores integradores del hospedador elegido.

Dichos vectores se prepararán según los métodos usados habitualmente por el experto en la materia, y los clones resultantes se podrán introducir en un hospedador apropiado mediante unos métodos estándares, tales como, por ejemplo, la lipofección, la electroporación, el choque térmico.

Los vectores según la descripción son, por ejemplo, unos vectores de origen plasmídico o vírico.

- 5 Un vector preferido para la expresión de los polipéptidos de la descripción es el baculovirus.

Se prefiere asimismo el vector pBS KS en el que se inserta la secuencia de ADN en tándem del circovirus MAP de tipo A (o DFP), tal como el depositado en la CNCM el 3 de julio de 1997, con el número I-1891.

Estos vectores son útiles para transformar unas células hospedadoras con el fin de clonar o expresar las secuencias nucleotídicas de la descripción.

- 10 La descripción comprende asimismo las células hospedadoras transformadas por un vector según la descripción.

Estas células se pueden obtener mediante la introducción en unas células hospedadoras de una secuencia nucleotídica insertada en un vector tal como se ha definido anteriormente, y después el cultivo de dichas células en unas condiciones que permiten la replicación y/o la expresión de la secuencia nucleotídica transfectada.

- 15 El hospedadora celular se puede seleccionar de entre unos sistemas procariotas o eucariotas, tal como, por ejemplo, las células bacterianas (Olins y Lee, 1993), pero también las células de levadura (Buckholz, 1993), al igual que las células animales, en particular los cultivos de células de mamíferos (Edwards y Aruffo, 1993), y en particular las células de ovario de hámster chino (CHO), pero también las células de insectos en las que se pueden usar unos procedimientos que usan unos baculovirus por ejemplo (Luckow, 1993).

- 20 Una célula hospedadora preferida para la expresión de las proteínas de la descripción está constituida por las células de insectos sf9.

Una célula hospedadora preferida también según la descripción es *E. coli*, tal como está depositada en la CNCM el 3 de julio de 1997, con el número I-1891.

La descripción se refiere asimismo a los animales que comprenden una de dichas células transformadas según la descripción.

- 25 La obtención de animales transgénicos según la descripción que sobreexpresan uno o varios genes de circovirus MAP o parte de genes se realizará de manera preferida sobre unas ratas, unos ratones o unos conejos según unos métodos bien conocidos por el experto en la materia, tales como mediante transfecciones, víricas o no víricas. Los animales transgénicos que sobreexpresan uno o varios de dichos genes se podrán obtener mediante la transfección de copias múltiples de dichos genes bajo el control de un potente promotor de naturaleza ubicua, o selectivo de un tipo de tejido. Los animales transgénicos se podrán obtener asimismo mediante recombinación homóloga sobre células cepas embrionarias, transferencia de estas células cepas a unos embriones, selección de las quimeras afectadas a nivel de las líneas reproductoras, y crecimiento de dichas quimeras.
- 30

Las células transformadas así como los animales transgénicos según la descripción se pueden utilizar en unos procedimientos de preparación de polipéptido recombinante.

- 35 En la actualidad es posible producir unos polipéptidos recombinantes en cantidad relativamente importante mediante ingeniería genética usando las células transformadas por unos vectores de expresión o usando unos animales transgénicos según la descripción.

Los procedimientos de preparación de un polipéptido de la descripción en forma recombinante, caracterizados porque usan un vector y/o una célula transformada por un vector y/o un animal transgénico que comprende una de dichas células transformadas según la descripción, están comprendidos a su vez en la presente descripción.

- 40 Entre dichos procedimientos de preparación de un polipéptido de la descripción en forma recombinante, se prefieren los procedimientos de preparación que usan un vector y/o una célula transformada por dicho vector y/o un animal transgénico que comprende una de dichas células transformadas, que contiene una secuencia nucleotídica según la descripción que codifica para un polipéptido de circovirus MAP.

- 45 Los polipéptidos recombinantes obtenidos como se ha indicado anteriormente, se pueden presentar tanto en forma glucosilada como no glucosilada, y pueden presentar o no la estructura terciaria natural.

Una variante preferida consiste en producir un polipéptido recombinante fusionado con una proteína "portadora" (proteína quimera). La ventaja de este sistema es que permite una estabilización y una disminución de la proteólisis del producto recombinante, un aumento de la solubilidad durante la renaturalización *in vitro* y/o una simplificación de la purificación cuando la pareja de fusión posee una afinidad para un ligando específico.

- 50

Más particularmente, la descripción se refiere a un procedimiento de preparación de un polipéptido de la descripción que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar las células transformadas en unas condiciones que permiten la expresión de un polipéptido recombinante de secuencia nucleotídica según la descripción;
- 5 b) llegado el caso, recuperar dicho polipéptido recombinante.

Cuando el procedimiento de preparación de un polipéptido de la descripción usa un animal transgénico según la descripción, el polipéptido recombinante se extrae a continuación de dicho animal.

La descripción tiene asimismo por objeto un polipéptido susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento de la descripción tal como el descrito anteriormente.

- 10 La descripción comprende asimismo un procedimiento de preparación de un polipéptido sintético, caracterizado porque utiliza una secuencia de aminoácidos de polipéptidos según la descripción.

La descripción se refiere asimismo a un polipéptido sintético obtenido mediante un procedimiento según la descripción.

- 15 Los polipéptidos según la descripción se pueden preparar asimismo mediante las técnicas clásicas, en el campo de la síntesis de los péptidos. Esta síntesis se puede realizar en solución homogénea o en fase sólida.

Por ejemplo, se recurrirá a la técnica de síntesis en disolución homogénea descrita por Houbenweyl en 1974.

- 20 Este método de síntesis consiste en condensar sucesivamente de dos en dos los aminoácidos sucesivos en el orden requerido, o en condensar unos aminoácidos y unos fragmentos previamente formados y que contienen ya varios aminoácidos en el orden apropiado, o también varios fragmentos previamente preparados así, entendiéndose que se habrá tenido el cuidado de proteger previamente todas las funciones reactivas contenidas por estos aminoácidos o fragmentos, con la excepción de las funciones aminas de uno y carboxilos del otro o viceversa, que deben intervenir normalmente en la formación de las uniones peptídicas, en particular después de la activación de la función carboxilo, según los métodos bien conocidos en la síntesis de los péptidos.

Según otra técnica preferida de la descripción, se recurre a la descrita por Merrifield.

- 25 Para fabricar una cadena peptídica según el procedimiento de Merrifield, se recurre a una resina polímera muy porosa, sobre la cual se fija el primer aminoácido C-terminal de la cadena. Este aminoácido se fija sobre una resina por medio de su grupo carboxílico y se protege su función amina. Así se fijan, unos detrás de otros, los aminoácidos que constituirán la cadena peptídica sobre el grupo amina cada vez desprotegido previamente de la porción de la cadena peptídica ya formada, y que está ligada a la resina. Cuando la totalidad de la cadena peptídica deseada está
- 30 formada, se eliminan los grupos protectores de los diferentes aminoácidos que constituyen la cadena peptídica y se suelta el péptido de la resina con la ayuda de un ácido.

La descripción se refiere además a polipéptidos híbridos que presentan por lo menos un polipéptido según la descripción, y una secuencia de un polipéptido susceptible de inducir una respuesta inmunitaria en el ser humano o el animal.

- 35 Ventajosamente, el determinante antigénico es tal que es susceptible de inducir una respuesta humoral y/o celular.

Dicho determinante podrá comprender un polipéptido según la invención en forma glucosilada utilizado con vistas a obtener unas composiciones inmunógenas susceptibles de inducir la síntesis de anticuerpos dirigidos contra unos epítomos múltiples. Dichos polipéptidos o sus fragmentos glucosilados forman parte asimismo de la invención.

- 40 Estas moléculas híbridas pueden estar constituidas en parte por una molécula portadora de polipéptidos o de sus fragmentos según la descripción, asociada a una parte eventualmente inmunógena, en particular un epítomo de la toxina diftérica, la toxina tetánica, un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (patente FR 79 21811), el antígeno VP1 del virus de la poliomielitis o cualquier otra toxina o antígeno vírico o bacteriano.

- 45 Los procedimientos de síntesis de las moléculas híbridas engloban los métodos utilizados en ingeniería genética para construir unas secuencias nucleotídicas híbridas que codifican para las secuencias polipeptídicas buscadas. Se podrá hacer referencia, por ejemplo, ventajosamente a la técnica de obtención de genes que codifican para unas proteínas de fusión descrita por Minton en 1984.

Dichas secuencias nucleotídicas híbridas que codifican para un polipéptido híbrido así como los polipéptidos híbridos según la descripción caracterizados porque se trata de polipéptidos recombinantes obtenidos por la expresión de dichas secuencias nucleotídicas híbridas, forman parte asimismo de la descripción.

- 50 La descripción comprende asimismo los vectores caracterizados porque contienen una de dichas secuencias nucleotídicas híbridas. Las células hospedadoras transformadas por dichos vectores, los animales transgénicos que comprenden una de dichas células transformadas así como los procedimientos de preparación de polipéptidos

recombinantes que utilizan dichos vectores, dichas células transformadas y/o dichos animales transgénicos evidentemente forman parte asimismo de la descripción.

Los polipéptidos según la invención, los anticuerpos según la descripción descritos a continuación y las secuencias nucleotídicas según la descripción se pueden utilizar ventajosamente en unos procedimientos para la detección y/o la identificación de circovirus MAP, o de circovirus porcinos diferentes de un circovirus MAP, en una muestra biológica (tejido o fluido biológico) susceptible de contenerlos. Estos procedimientos, según la especificidad de los polipéptido, de los anticuerpos y de las secuencias nucleotídicas según la descripción que se utilizarán, podrán detectar y/o identificar en particular un circovirus MAP o un circovirus porcino diferente de un circovirus MAP o diferente del circovirus MAP de tipo B.

Los polipéptidos según la invención se pueden utilizar ventajosamente en un procedimiento para la detección y/o la identificación de circovirus MAP de tipo A, de tipo B, de tipo A o B, de circovirus porcino diferente del circovirus MAP de tipo B, o de circovirus porcino diferente del circovirus MAP de tipo A o B, en una muestra biológica (tejido o fluido biológico) susceptible de contenerlos, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- a) puesta en contacto de esta muestra biológica con un polipéptido o uno de sus fragmentos según la descripción (en unas condiciones que permiten una reacción inmunológica entre dicho polipéptido y los anticuerpos eventualmente presentes en la muestra biológica);
- b) puesta en evidencia de los complejos antígeno-anticuerpo eventualmente formados.

En la presente descripción, por circovirus MAP se designará, salvo que se indique lo contrario, un circovirus MAP de tipo A o de tipo B, y por circovirus porcino diferente de MAP, salvo que se indique lo contrario, un circovirus porcino diferente de un circovirus MAP de tipo A y B.

Preferentemente, la muestra biológica está constituida por un fluido, por ejemplo un suero de cerdo, sangre completa o biopsias.

Se puede utilizar cualquier procedimiento habitual para realizar dicha detección de los complejos antígeno-anticuerpo eventualmente formados.

A título de ejemplo, un método preferido emplea unos procesos inmunoenzimáticos según la técnica ELISA, por inmunofluorescencia, o radio-inmunológicos (RIA) o equivalente.

De esta manera, la descripción se refiere asimismo a los polipéptido según la descripción, marcados con la ayuda de un marcador adecuado tal como del tipo enzimático, fluorescente, radioactivo.

Dichos métodos comprenden por ejemplo las etapas siguientes:

- depositar cantidades determinadas de una composición polipeptídica según la descripción en los pocillos de una placa de microtitulación,
- introducir en dichos pocillos disoluciones crecientes de suero, o de muestra biológica diferente tal como se ha definido anteriormente, que se debe analizar,
- incubar la microplaca,
- introducir en los pocillos de la placa de microtitulación anticuerpos marcados dirigidos contra unas inmunoglobinas de cerdo, habiendo sido realizado el marcado con la ayuda de una enzima seleccionada de entre las capaces de hidrolizar un sustrato modificando la absorción de las radiaciones de este último, por lo menos a una longitud de onda determinada, por ejemplo a 550 nm,
- detectar, en comparación con un testigo de control, la cantidad de sustrato hidrolizado.

La invención se refiere asimismo a un kit o estuche para la detección y/o la identificación de circovirus MAP, de circovirus de porcino diferente de un circovirus MAP o de circovirus porcino diferente del circovirus MAP de tipo B, caracterizado porque comprende los elementos siguientes:

- un polipéptido según la descripción,
- llegado el caso, los reactivos para la constitución del medio propicio a la reacción inmunológica o específica,
- llegado el caso, los reactivos que permiten la detección de los complejos antígeno-anticuerpo producidos por la reacción inmunológica entre el o los polipéptidos de la descripción y los anticuerpos eventualmente presentes en la muestra biológica, pudiendo estos reactivos llevar asimismo un marcador, o ser susceptibles de ser reconocidos a su vez por un reactivo marcado, más particularmente en el caso en que el polipéptido según la descripción no está marcado,
- llegado el caso, una muestra biológica de referencia (testigo negativo) desprovisto de anticuerpos reconocidos por un polipéptido según la descripción,
- llegado el caso, una muestra biológica de referencia (testigo positivo) que contiene una cantidad predeterminada de anticuerpos reconocidos por un polipéptido según la descripción.

Los polipéptidos según la descripción permiten preparar unos anticuerpos monoclonales o policlonales caracterizados porque reconocen específicamente los polipéptidos según la invención. Los anticuerpos monoclonales se podrán preparar ventajosamente a partir de hibridomas según la técnica descrita por Kohler y Milstein en 1975. Los anticuerpos policlonales se podrán preparar, por ejemplo, por inmunización de un animal, en particular un ratón, con un polipéptido según la invención o un ADN según la descripción, asociado a un adyuvante de la respuesta inmunitaria, y después purificación de los anticuerpos específicos contenidos en el suero de los animales inmunizados sobre una columna de afinidad sobre la que se ha fijado previamente el polipéptido que ha servido de antígeno. Los anticuerpos policlonales según la descripción también se pueden preparar por purificación, sobre una columna de afinidad, sobre la que se ha inmovilizado previamente un polipéptido según la descripción, de los anticuerpos contenidos en el suero de cerdos infectados por un circovirus MAP.

La descripción tiene asimismo por objeto anticuerpos mono o policlonales o sus fragmentos, o anticuerpos quiméricos, que pueden reconocer específicamente un polipéptido aislado que tiene una secuencia seleccionada entre las secuencias SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19 y SEC ID nº 20.

La descripción tiene asimismo por objeto anticuerpos monoclonales o sus fragmentos, o anticuerpos quiméricos, que pueden reconocer específicamente un polipéptido aislado que tiene una secuencia seleccionada entre las secuencias SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19 y SEC ID nº 20.

Los anticuerpos de la descripción podrán ser marcados asimismo de la misma manera que se ha descrito anteriormente para las sondas nucleicas de la descripción tales como un marcado de tipo enzimático, fluorescente o radioactivo.

La descripción prevé además un procedimiento para la detección y/o la identificación de circovirus MAP, de circovirus porcino diferente de un circovirus MAP, o diferente del circovirus MAP de tipo B, en una muestra biológica, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- a) poner en contacto la muestra biológica (tejido o fluido biológico) con un anticuerpo mono o policlonal según la descripción (en unas condiciones que permiten una reacción inmunológica entre dichos anticuerpos y los polipéptidos de circovirus MAP, de circovirus porcino diferente de un circovirus MAP, de circovirus porcino diferente del circovirus MAP de tipo B, eventualmente presentes en la muestra biológica);
- b) poner en evidencia el complejo antígeno-anticuerpo eventualmente formado.

Entra asimismo en el marco de la descripción, un kit o estuche para la detección y/o la identificación de circovirus MAP, de circovirus porcino diferente de un circovirus MAP o de circovirus porcino diferente del circovirus MAP de tipo B, caracterizado porque comprende los elementos siguientes:

- un anticuerpo policlonal o monoclonal según la descripción, llegado el caso marcado;
- llegado el caso, un reactivo para la constitución del medio propicio para realizar la reacción inmunológica;
- llegado el caso, un reactivo que permite la detección de los complejos antígeno-anticuerpo producidos por la reacción inmunológica, pudiendo también este reactivo llevar un marcador, o ser susceptible de ser reconocido a su vez por un reactivo marcado, más particularmente en el caso en que dicho anticuerpo monoclonal o policlonal no está marcado;
- llegado el caso, unos reactivos para realizar la lisis de las células de la muestra ensayada.

La presente descripción tiene asimismo por objeto un procedimiento para la detección y/o la identificación de MAP, de circovirus porcino diferente de un circovirus MAP o de circovirus porcino diferente del circovirus MAP de tipo B, en una muestra biológica, caracterizado porque utiliza una secuencia nucleotídica según la descripción.

Más particularmente, la descripción se refiere a un procedimiento para la detección y/o la identificación de circovirus MAP, de circovirus porcino diferente de un circovirus MAP o de circovirus porcino diferente del circovirus MAP de tipo B, en una muestra biológica, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- a) llegado el caso, aislar el ADN a partir de la muestra biológica a analizar;
- b) amplificación específica del ADN de la muestra con la ayuda de por lo menos un cebador, o un par de cebadores, según la descripción;
- c) puesta en evidencia de los productos de amplificación.

Éstos pueden ser detectados por ejemplo mediante la técnica de hibridación molecular utilizando una sonda nucleica según la descripción. Esta sonda estará ventajosamente marcada por un elemento no radioactivo (sonda fría) o radioactivo.

En el sentido de la presente descripción, se entenderá por "ADN de la muestra biológica" o "ADN contenido en la muestra biológica", o bien el ADN presente en la muestra biológica considerada, o bien eventualmente el ADNc obtenido tras la acción de una enzima de tipo transcriptasa inversa sobre el ARN presente en dicha muestra biológica.

Otro objeto de la presente descripción consiste en un procedimiento según la descripción, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- 5 a) puesta en contacto de una sonda nucleotídica según la descripción con una muestra biológica, habiendo sido el ADN contenido en la muestra biológica, llegado el caso, previamente hecho accesible para la hibridación, en unas condiciones que permiten la hibridación de la sonda al ADN de la muestra;
- b) puesta en evidencia del híbrido formado entre la sonda nucleotídica y el ADN de la muestra biológica.

La presente descripción se refiere también a un procedimiento según la descripción, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- 10 a) puesta en contacto de una sonda nucleotídica inmovilizada sobre un soporte según la descripción con una muestra biológica, habiendo sido el ADN contenido en la muestra biológica, llegado el caso, previamente hecho accesible para la hibridación, en unas condiciones que permiten la hibridación de la sonda al ADN de la muestra;
- b) puesta en contacto del híbrido formado entre la sonda nucleotídica inmovilizada sobre un soporte y el ADN contenido en la muestra biológica, llegado el caso tras la eliminación del ADN de la muestra biológica que no se ha hibridado con la sonda, con una sonda nucleotídica marcada según la descripción;
- 15 c) puesta en evidencia del nuevo híbrido formado en la etapa b).

Según un modo de realización ventajoso del procedimiento para la detección y/o la identificación definido anteriormente, éste está caracterizado porque, previamente a la etapa a), el ADN de la muestra biológica está previamente amplificado con la ayuda de por lo menos un cebador según la descripción.

- 20 La descripción prevé además un kit o estuche para la detección y/o la identificación de circovirus MAP, de circovirus porcino diferente del circovirus MAP o de circovirus porcino diferente del circovirus MAP de tipo B, caracterizado porque comprende los elementos siguientes:

- a) una sonda nucleotídica según la descripción;
- b) llegado el caso, los reactivos necesarios para la realización de una reacción de hibridación;
- 25 c) llegado el caso, por lo menos un cebador según la descripción así como los reactivos necesarios para una reacción de amplificación del ADN.

La descripción se refiere asimismo a un kit o estuche para la detección y/o la identificación de circovirus MAP, de circovirus porcino diferente de un circovirus MAP o de circovirus porcino diferente del circovirus MAP de tipo B, caracterizado porque los elementos siguientes:

- 30 a) una sonda nucleotídica, denominada sonda de captura, según la descripción;
- b) una sonda oligonucleotídica, denominada sonda de revelación, según la descripción;
- c) llegado el caso, por lo menos un cebador según la descripción así como los reactivos necesarios para una reacción de amplificación del ADN.

- 35 La descripción se refiere también a un kit o estuche necesario para la detección y/o la identificación de circovirus MAP, de circovirus porcino diferente de un circovirus MAP o de circovirus porcino diferente del circovirus MAP de tipo B, caracterizado porque comprende los elementos siguientes:

- a) por lo menos un cebador según la descripción;
- b) llegado el caso, los reactivos necesarios para efectuar una reacción de amplificación de ADN;
- c) llegado el caso, un componente que permite verificar la secuencia del fragmento amplificado, más particularmente una sonda oligonucleotídica según la descripción.

- 40 Se puede utilizar un anticuerpo según la descripción para seleccionar el compuesto orgánico o inorgánico capaz de modular, inducir o inhibir la expresión de los genes, y/o de modificar la replicación celular del circovirus MAP o capaz de inducir o de inhibir las patologías vinculadas a una infección por un circovirus MAP.

- 45 La descripción comprende asimismo un método de selección de compuestos capaces de unirse a un polipéptido o a uno de sus fragmentos según la descripción, capaces de unirse a una secuencia nucleotídica según la descripción, o capaces de reconocer un anticuerpo según la descripción, y/o capaces de modular, de inducir o de inhibir la expresión de genes, y/o de modificar la replicación celular de circovirus MAP o capaces de inducir o de inhibir las patologías relacionadas con una infección por un circovirus MAP, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- 50 a) puesta en contacto de dicho compuesto con dicho polipéptido, dicha secuencia nucleotídica, con una célula transformada según la descripción y/o administración de dicho compuesto a un animal transformado según la descripción;
- b) determinación de la capacidad de dicho compuesto para unirse con dicho polipéptido o dicha secuencia nucleotídica, o modular, inducir o inhibir la expresión de genes, o modular el crecimiento o la replicación de circovirus MAP, o inducir o inhibir en dicho animal transformado las patologías relacionadas con una infección por circovirus MAP (denominada actividad de dicho compuesto)
- 55

Los compuestos susceptibles de ser seleccionados pueden ser unos compuestos orgánicos tales como unos polipéptidos o hidratos de carbono o cualquier otro compuesto orgánico o inorgánico ya conocidos, o unos compuestos orgánicos nuevos elaborados a partir de técnicas de modelización molecular y obtenidos por síntesis química, siendo estas técnicas conocidas por el experto en la materia.

- 5 Dichos compuestos seleccionados se podrán utilizar para modular la replicación celular de circovirus MAP y para contrarlar así la infección por este virus. Los métodos que permiten determinar dichas modulaciones son muy conocidos por el experto en la materia.

- 10 Esta modulación se puede realizar por ejemplo por un agente capaz de unirse a una proteína e inhibir o potenciar así su actividad biológica, o capaz de unirse a una proteína de cubierta de la superficie externa de dicho virus y bloquear la penetración de dicho virus en la célula hospedadora o favorecer la acción del sistema inmunitario del organismo infectado dirigido contra dicho virus. Esta modulación se puede realizar asimismo mediante un agente capaz de unirse a una secuencia nucleotídica de un ADN de dicho virus y bloquear por ejemplo la expresión de un polipéptido cuya actividad biológica o estructural es necesaria para la replicación o para la proliferación de dicho virus células hospedadoras a células hospedadoras en el animal hospedadora.

- 15 La descripción se refiere a los compuestos susceptibles de ser seleccionados por un método de selección según la descripción.

La descripción se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado de entre los compuestos siguientes:

- 20 a) una secuencia nucleotídica según la descripción;
b) un polipéptido según la descripción;
c) un vector, una partícula vírica o una célula transformada según la descripción;
d) un anticuerpo según la descripción;
e) un compuesto susceptible de ser seleccionado mediante un método de selección según la descripción;

- 25 eventualmente en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, llegado el caso, con uno o varios adyuvantes de la inmunidad apropiados.

La descripción se refiere asimismo a una composición inmunógena o vacunal caracterizada comprende un compuesto seleccionado de entre los compuestos siguientes:

- 30 a) una secuencia nucleotídica según la descripción;
b) un polipéptido según la descripción;
c) un vector o una partícula vírica según la descripción; y
d) una célula según la descripción;

La descripción se refiere además a una composición vacunal según la invención, caracterizada porque comprende una mezcla de los dos compuestos a) y b) anteriores, y porque uno de dichos dos compuestos se refiere al circovirus MAP de tipo A y el otro se refiere al circovirus MAP de tipo B.

- 35 Por compuesto relativo al circovirus MAP de tipo A o de tipo B, se entiende designar en este caso respectivamente un compuesto obtenido a partir de la secuencia genómica del circovirus MAP de tipo A o de tipo B.

La descripción prevé una composición inmunógena y/o vacunal, caracterizada porque comprende por lo menos uno de los siguientes compuestos:

- 40 - una secuencia nucleotídica SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, o uno de sus fragmentos;
- un polipéptido de secuencia SEC ID nº 14, uno de sus fragmentos, o un fragmento del polipéptido de secuencia SEC ID nº 15,
- un vector o una partícula vírica que comprende una secuencia nucleotídica SEC ID nº 11, uno de sus fragmentos o un fragmento de la secuencia SEC ID nº 12, o
45 - una célula transformada capaz de expresar un polipéptido de secuencias SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, o uno de sus fragmentos; o
- una mezcla de por lo menos dos de dichos compuestos.

- 50 La descripción comprende asimismo una composición inmunógena y/o vacunal según la invención, caracterizada porque comprende dicha mezcla de por lo menos dos de dichos compuestos como producto de combinación para un uso simultáneo, separado o espaciado en el tiempo para la prevención o el tratamiento de infecciones por un circovirus MAP, en particular de tipo B.

En una realización preferida, la composición vacunal según la invención comprende la mezcla de los siguientes compuestos:

- un plásmido pcDNA3 que contiene un ácido nucleico de secuencia SEC ID nº 11;
- un plásmido pcDNA3 que contiene un ácido nucleico de secuencia SEC ID nº 12;

- un plásmido pcDNA3 que contiene un ácido nucleico que codifica para la proteína GM-CSF;
- un baculovirus recombinante que contiene un ácido nucleico de secuencia SEC ID nº 11;
- un baculovirus recombinante que contiene un ácido nucleico de secuencia SEC ID nº 12; y
- llegado el caso, un adyuvante de la inmunidad apropiado, en particular el adyuvante AIFTM

5 La descripción prevé asimismo una composición farmacéutica según la descripción, para la prevención o el tratamiento de una infección por un circovirus MAP.

La descripción prevé también una composición farmacéutica según la descripción, para la prevención o el tratamiento de una infección por un circovirus MAP de tipo B.

10 La descripción se refiere asimismo al uso de una composición según la descripción para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de una infección por un circovirus MAP, preferentemente por el circovirus MAP de tipo B.

Según otro aspecto, la descripción tiene por objeto un vector, una partícula vírica o una célula según la descripción, para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad por terapia génica.

15 Por último, la descripción comprende la utilización de un vector, de una partícula vírica o de una célula según la descripción, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o la prevención de una enfermedad por terapia génica.

20 Los polipéptidos de la descripción que entran en las composiciones inmunógenas o vacunales según la invención se pueden seleccionar mediante unas técnicas conocidas por el experto en la materia como por ejemplo sobre la capacidad de dichos polipéptidos para estimular las células T, que se traduce por ejemplo por su proliferación o la secreción de interleucinas, y que desemboca en la producción de anticuerpos dirigidos contra dichos polipéptidos.

En el cerdo, tal como en el ratón, en los que se administra una dosis ponderal de la composición vacunal comparable con la dosis usada en el ser humano, la reacción de anticuerpos se ensaya mediante la extracción del suero seguido por un estudio de la formación de un complejo entre los anticuerpos presentes en el suero y el antígeno de la composición vacunal, según las técnicas habituales.

25 Las composiciones farmacéuticas según la descripción contendrán una cantidad eficaz de los compuestos de la descripción, es decir, en cantidad suficiente de dicho o de dichos compuestos que permite obtener el efecto deseado, tal como por ejemplo la modulación de la replicación celular de circovirus MAP. El experto en la materia sabrá determinar esta cantidad, en función por ejemplo de la edad y del peso del individuo a tratar, del estado de desarrollo de la patología, de los efectos secundarios eventuales y por medio de un ensayo de evaluación de los efectos obtenidos sobre una muestra de población, siendo estos ensayos conocidos en estos campos de aplicaciones.

Según la descripción, dichas composiciones vacunales estarán preferentemente en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, llegado el caso, con uno o varios adyuvantes de la inmunidad apropiados.

35 En la actualidad, diversos tipos de vacunas están disponibles para proteger el animal o el ser humano contra unas enfermedades infecciosas: microorganismos vivos atenuados (*M. bovis* - BSG para la tuberculosis), microorganismos desactivados (virus de la gripe), unos extractos acelulares (*Bordetella pertussis* para la tos ferina), proteínas recombinadas (antígeno de superficie del virus de la hepatitis B), unos poliósidos (neumococos). Unas vacunas preparadas a partir de péptidos de síntesis o de microorganismos genéticamente modificados que expresan unos antígenos heterólogos están en curso de experimentación. Más recientemente todavía, se han propuesto unos

40 ADN plasmídicos recombinados que comprenden unos genes que codifican para unos antígenos protectores como estrategia vacunal alternativa. Este tipo de vacunación se realiza con un plásmido particular que se deriva de un plásmido de *E. coli* que no se replica *in vivo* y que codifica únicamente para la proteína vírica. Se han inmunizado unos animales inyectando simplemente el ADN plasmídico desnudo en el músculo. Esta técnica conduce a la expresión de la proteína vírica *in situ* y a una respuesta inmunitaria de tipo celular (CTL) y de tipo humoral

45 (anticuerpo). Esta doble inducción de la respuesta inmunitaria es una de las principales ventajas de la técnica de vacunación con ADN desnudo.

Las composiciones vacunales que comprenden secuencias nucleotídicas o vectores en los que se insertan dichas secuencias, se describen en particular en la solicitud internacional WO 90/11092 y asimismo en la solicitud internacional WO 95/11307.

50 La secuencia nucleotídica constitutiva de la composición vacunal según la descripción se puede inyectar al hospedador después de haber sido acoplada a unos compuestos que favorecen la penetración de este polinucleótido en el interior de la célula o su transporte hasta el núcleo celular. Los conjugados resultantes se pueden encapsular en unas micropartículas polímeras, tal como se describe en la solicitud internacional WO 94/27238 (Medisorb Technologies International).

55

Según otra realización de la composición vacunal según la invención, la secuencia nucleotídica, preferentemente un ADN, se compleja con un DEAE-dextrano (Pagano *et al.*, 1967) o con unas proteínas nucleares (Kaneda *et al.*, 1989), con unos lípidos (Felgner *et al.*, 1987) o se encapsula en unos liposomas (Fraley *et al.*, 1980) o también se introduce en forma de un gel que facilita su transfección en las células (Midoux *et al.*, 1993, Pastore *et al.*, 1994). El polinucleótido o el vector según la invención pueden estar asimismo en suspensión en una disolución tampón o estar asociado con unos liposomas.

Ventajosamente, dicha vacuna se preparará según la técnica descrita por Tacson *et al.* O Huygen *et al.* en 1996 o también según la técnica descrita por Davis *et al.* en la solicitud internacional WO 95/11307.

Dicha vacuna se puede preparar asimismo en forma de una composición que contiene un vector, dispuesta bajo el control de elementos de regulación que permiten su expresión en el ser humano o en el animal. Se podrá usar, por ejemplo, como vector de expresión *in vivo* del antígeno polipeptídico de interés, el plásmido pcDNA3 o el plásmido pcDNA1/neo, ambos comercializados por Invitrogen (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). También se puede usar el plásmido VIJns.tPA, descrito por Shiver *et al.* en 1995. Dicha vacuna comprenderá ventajosamente, además del vector recombinante, una disolución salina, por ejemplo una disolución de cloruro de sodio.

Mediante la expresión vehículo farmacéuticamente aceptable, se entiende designar un compuesto o una combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica o vacunal que no provoca reacciones secundarias y que permite, por ejemplo, facilitar la administración del compuesto activo, el aumento de su duración de vida y/o de su eficacia en el organismo, el aumento de su solubilidad en disolución o también la mejora de su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y serán adaptados por el experto en la materia en función de la naturaleza y del modo de administración del compuesto activo elegido.

En lo que se refiere a las formulaciones vacunales, éstas pueden comprender unos adyuvantes de la inmunidad apropiados que son conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo el hidróxido de aluminio, un representante de la familia de los péptidos muramilo como de los derivados peptídicos del N-acetil-muramilo, un lisado bacteriano, o también el adyuvante incompleto de Freund.

Estos compuestos se pueden administrar por vía sistémica, en particular por vía intravenosa, por vía intramuscular, intradérmica o sub-cutánea, o por vía oral. De manera más preferida, la composición vacunal que comprende unos polipéptidos según la invención, se administrará por vía intramuscular, a través de la alimentación o mediante vaporización en varias veces, de manera espaciada en el tiempo.

Sus modos de administración, posologías y formas galénicas óptimas se pueden determinar según los criterios tenidos en cuenta generalmente en el establecimiento de un tratamiento adaptado a un animal como, por ejemplo, la edad o el peso, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios constatados.

La presente descripción tiene asimismo por objeto la utilización de las secuencias nucleotídicas de circovirus MAP según la descripción, para la construcción de vectores retrovíricos autorreplicativos y las aplicaciones terapéuticas de éstas, en particular en el campo de la terapia génica humana *in vivo*.

Ya no hace falta demostrar la factibilidad de la terapia génica aplicada al ser humano y esto se refiere a numerosas aplicaciones terapéuticas como las enfermedades genéticas, las enfermedades infecciosas y los cánceres. Numerosos documentos de la técnica anterior describen los medios para realizar una terapia génica, en particular por medio de vectores víricos. De una manera general, los vectores se obtienen por delección de por lo menos una parte de los genes víricos que son sustituidos por los genes de interés terapéutico. Dichos vectores se pueden propagar en una línea de complementación que proporciona en trans las funciones víricas delecionadas para generar una partícula de vector vírico defectivo para la replicación pero capaz de infectar una célula hospedadora. En la actualidad, los vectores víricos se encuentran entre los más utilizados y sus modos de infección están descritos ampliamente en la bibliografía accesible para el experto en la materia.

El principio de la terapia génica es suministrar un gen funcional, denominado gen de interés, cuyo ARN o proteína correspondiente producirá el efecto bioquímico deseado en las células o tejidos diana. Por una parte, la inserción de genes permite la expresión prolongada de moléculas complejas e inestables como unos ARN o unas proteínas que pueden ser extremadamente difíciles, incluso imposible, de obtener o de administrar directamente. Por otra parte, la inserción controlada del gen deseado en el interior de células específicas localizadas permite regular el producto de expresión en tejidos definidos. Para ello, es necesario poder insertar el gen terapéutico deseado en el interior de células seleccionadas y por lo tanto disponer de un método de inserción capaz de apuntar específicamente las células o los tejidos seleccionados.

De entre los métodos de inserción de genes, como por ejemplo la micro-inyección, en particular la inyección de ADN plasmídico desnudo (Derse, D. *et al.*, 1995, et Zhao, T.M. *et al.*, 1996), la electroporación, la recombinación homóloga, la utilización de partículas víricas, como los retrovirus, está ampliamente extendida. Sin embargo, aplicados *in vivo*, los sistemas de transferencia de gen de tipo retrovírico recombinante presentan al mismo tiempo un bajo poder infeccioso (concentración insuficiente de partículas víricas) y una falta de especificidad con respecto a las células diana seleccionadas.

La realización de vectores víricos células específicas, que presentan un tropismo tejido-específico, y cuya transducción del gen de interés se puede efectuar de manera adecuada mediante las células diana, se puede realizar por ejemplo fusionando un ligando específico de las células hospedadoras diana en la parte N-terminal de una proteína de superficie de la cubierta de circovirus MAP. Se puede citar por ejemplo la construcción de partículas retrovíricas que presentan la molécula CD4 en la superficie de la cubierta de manera que se apunte a las células humanas infectadas por el virus VIH (YOUNG, J.A.T. *et al.*, Sciences 1990, 250, 1421-1423), de partículas víricas que presentan una hormona peptídica fusionada con una proteína de cubierta para infectar específicamente las células que expresan el receptor correspondiente (KASAHARA, N. *et al.*, Sciences 1994, 266, 1373-1376) o también de partículas víricas que presentan un polipéptido fusionado capaz de fijarse sobre el receptor del factor de crecimiento de la epidermis (EGF) (COSSET, F.L. *et al.*, J. of Virology 1995, 69, 10, 6314-6322). En otro enfoque, unos fragmentos monocatenarios de anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie de las células diana, se insertan por fusión en la parte N-terminal de la proteína de cubierta (VALSESIA-WITTMAN, S. *et al.*, J. of Virology 1996, 70, 3, 2059-2064; TEARINA CHU, T. H. *et al.*, J. of Virology 1997, 71, 1, 720-725).

En el sentido de la presente descripción, un gen de interés de uso en la descripción se puede obtener de un organismo eucariota, procariota o de un virus mediante cualquier técnica convencional. Preferentemente, es capaz de producir un producto de expresión que tiene un efecto terapéutico y puede tratarse de un producto homólogo a la célula hospedadora o, de manera alternativa, heterólogo. En el marco de la presente descripción, un gen de interés puede codificar para un producto (i) intracelular (ii) membranario presente en la superficie de la célula hospedadora o (iii) segregado fuera de la célula hospedadora. Puede comprender por lo tanto unos elementos adicionales apropiados como, por ejemplo, una secuencia que codifica para una señal de secreción. Estas señales son conocidas por el experto en la materia.

De acuerdo con los objetivos pretendidos por la presente invención, un gen de interés puede codificar para una proteína aislada que corresponde a la totalidad o a parte de una proteína natural tal como se encuentra en la naturaleza. Puede tratarse asimismo de una proteína quimérica, por ejemplo procedente de la fusión de polipéptidos de orígenes diversos o de un mutante que presenta unas propiedades biológicas mejoradas y/o modificadas. Un mutante de este tipo se puede obtener mediante unas técnicas de biología habituales por sustitución, delección y/o adición de uno o varios residuos aminoácidos.

Se previere muy particularmente utilizar un gen de interés terapéutico que codifica para un producto de expresión capaz de inhibir o retrasar el establecimiento y/o el desarrollo de una enfermedad genética o adquirida. Un vector según la descripción está destinado particularmente a la prevención o al tratamiento de la mucoviscidosis, de la hemofilia A o B, de la miopatía de Duchenne o de Becker, del cáncer, del SIDA y de otras bacterias o enfermedades infecciosas debidas a un organismo patógeno: virus, bacteria, parásito o prión. Los genes de interés que se pueden utilizar en la presente descripción, son los que codifican por ejemplo para las proteínas siguientes:

- una citocina y en particular una interleucina, un interferón, un factor de necrosis tisular y un factor de crecimiento y en particular hematopoyética (G-CSF, GM-CSF),
- un factor o un cofactor implicado en la coagulación y en particular el factor VIII, el factor von Willebrand, la antitrombina III, la proteína C, la trombina y la hirudina,
- una enzima o un inhibidor de enzima tal como los inhibidores de proteasas víricas,
- un producto de expresión de un gen suicida como la timidina quinasa del virus HSV (virus del herpes) de tipo 1,
- un activador o un inhibidor de canales iónicos,
- una proteína de la cual la ausencia, la modificación o la desregulación de la expresión es responsable de una enfermedad genética, tal como la proteína CFTR, la distrofina o minidistrofina, la insulina, la ADA (adenosina diaminosa), la glucocerebrosidasa y la fenilhidroxilasa,
- una proteína capaz de inhibir la iniciación o la progresión de cánceres, tal como los productos de expresión de los genes supresores de tumores, por ejemplo los genes P53 y Rb,
- una proteína capaz de estimular una respuesta inmunitaria o un anticuerpo, y
- una proteína capaz de inhibir una infección vírica o su desarrollo, por ejemplo los epítopos antigénicos del virus en cuestión o unas variantes alteradas de proteínas víricas susceptibles de entrar en competición con las proteínas víricas naturales.

La descripción se refiere así a los vectores caracterizados porque comprenden una secuencia nucleotídica de circovirus MPA según la descripción, y porque comprenden además un gen de interés.

La presente descripción se refiere asimismo a unas partículas víricas generadas a partir de dicho vector según la descripción. Se refiere además a unos métodos para la preparación de partículas víricas según la descripción, caracterizadas porque utilizan un vector según la descripción, incluyendo las pseudopartículas víricas (VLP, Virus-Like Particles).

La descripción tiene asimismo por objeto células animales transfectadas por un vector según la descripción.

Están comprendidas asimismo en la descripción las células animales, en particular de mamíferos, infectadas por una partícula vírica según la descripción.

La presente descripción se refiere asimismo a un vector, a una partícula vírica o a una célula según la descripción, para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad genética o de una enfermedad adquirida como el cáncer o una enfermedad infecciosa. La descripción se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende a título de agente terapéutico o profiláctico un vector o una célula según la descripción, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otras características y ventajas de la invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de los ejemplos y de las figuras siguientes:

Leyendas de las figuras

Figura 1: Esquema experimental que ha permitido llegar al aislamiento y a la identificación del circovirus asociado con el MAP de tipo A o B.

Ensayo 1: reproducción experimental del MAP mediante inoculación de triturados de órganos de cerdos de ganaderías que padecen MAP.

Ensayo 2: reproducción experimental del MAP.

Ensayo 3: reproducción experimental del MAP.

Ensayo 4: ninguna reproducción experimental del MAP.

Figura 2: Organización del genoma de circovirus asociado con el MAP de tipo A (PCVA)

- Hebra de polaridad (+) (SEC ID nº 1);
- Hebra de polaridad (-) (SEC ID nº 2, representada según la orientación 3' → 5');;
- secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por las dos hebras de ADN en los tres marcos de lectura posibles.

Figura 3: Alineación de la secuencia nucleotídica SEC ID nº 1 del circovirus MAP de tipo A (PCVA) y de los circovirus cepa MEEHAN y cepa MANKERTZ de las líneas celulares porcinas.

Figura 4: Alineación de la secuencia de aminoácidos SEC ID Nº 6 de polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 3 (ORF1) del circovirus MAP de tipo A (PCVA) y de las secuencias nucleotídicas correspondientes de los circovirus cepa MEEHAN y cepa MANKERTZ de las líneas celulares porcinas.

Figura 5: Alineación de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7 de polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 4 (ORF2) del circovirus MAP de tipo A (PCVA) y de las secuencias nucleotídicas correspondientes de los circovirus cepa MEEHAN y cepa MANKERTZ de las líneas celulares porcinas.

Figura 6: Alineación de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8 de polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 5 (ORF3) del circovirus MAP de tipo A (PCVA) y de las secuencias nucleotídicas correspondientes de los circovirus cepa MEEHAN y cepa MANKERTZ de las líneas celulares porcinas.

Figura 7: Análisis mediante transferencia Western de las proteínas recombinantes del circovirus MAP de tipo A (PCVA). Los análisis se han realizado sobre unos extractos celulares de células Sf9 obtenidos después de la infección por el baculovirus recombinante PCV ORF1.

Figura 8: Organización del genoma del circovirus asociado a MAP de tipo B (PCVB)

- Hebra de polaridad (+) (SEC ID nº 9);
- Hebra de polaridad (-) (SEC ID nº 10, representada según la orientación 3' → 5');;
- secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por las dos hebras de ADN en los tres marcos de lectura posibles.

Figura 9: Evolución de la ganancia media diaria (GMQ) de cerdos de ganaderías que padecen la enfermedad de adelgazamiento del lechón (MAP o DFP), puestos en las condiciones experimentales.

Figura 10: GMQ comparada para los 3 lotes de cerdos (F1, F3 y F4) calculada sobre un periodo de 28 días después del ensayo de vacunación.

Figura 11: Hipertermia superior a 41°C, expresada en porcentaje comparado para los 3 lotes de cerdos (F1, F3 y F4) calculada sobre un periodo de 28 días después del ensayo de vacunación.

Figura 12: Membranas de los puntos peptídicos que corresponden a los ORF2 reveladas con la ayuda de un suero de cerdo infectado, procedente de una ganadería convencional.

Los números de péptidos específicos del circovirus de tipo B así como sus homólogos no reactivos (tipo A) se indican en negrita.

Los péptidos inmunógenos no específicos se indican en cursiva.

Figura 13: Alineación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por el ORF2 del circovirus MAP de tipo A y por el ORF'2 del circovirus MAP de tipo B. La posición de 4 péptidos que corresponden a unos epítomos específicos del circovirus MAP de tipo B se indica sobre la secuencia correspondiente en trazo en negrita, su homólogo sobre la secuencia del circovirus MAP de tipo A se indica asimismo mediante un trazo simple.

Ejemplos (los ejemplos 1 a 5 son ilustrativos)

Ejemplo 1: Clonación, secuenciación y caracterización del circovirus MAP de tipo A (PCVA)

1 - Procedimientos experimentales

Reproducción experimental de la infección y de su síndrome (véase la figura 1). Se ha efectuado un primer ensayo con unos cerdos procedentes de una ganadería muy bien atendida, pero afectada por la enfermedad del adelgazamiento del lechón (MAP) o denominada asimismo DFP (Decaimiento fatal del lechón). Unas pruebas de contacto con unos cerdos EOPS (exento de organismos patógenos específicos) han mostrado una transferencia de contaminante(s) que se traduce por una patología compleja que asocia la hipertermia, la disminución del crecimiento, diarrea y conjuntivitis. El virus SDRP (síndrome disgenésico y respiratorio porcino, enfermedad infecciosa debida a un arterivirus) se ha aislado rápidamente a partir de los cerdos de ganadería y de los cerdos de contacto. El conjunto de las señales clínicas podría haber sido atribuido a la presencia del virus SDRP. Sin embargo, dos cerdos de ganadería han presentado unas señales de DFP sin que el virus SDRP haya sido aislado. Los análisis histológicos y las fórmulas sanguíneas han mostrado, sin embargo, que estos cerdos padecían un proceso infeccioso de origen vírico.

En un segundo ensayo, se han inoculado unos cerdos EOPS de 8 semanas por vía intra-traqueal con los triturados de órganos procedentes de dos cerdos de ganaderías que padecen DFP. Los cerdos inoculados han presentado hipertermia 8 a 9 días post-infección, y después su crecimiento se ha ralentizado. Otros cerdos EOPS, puestos en contacto, han presentado unas señales similares, atenuadas, 30 días después de la prueba inicial. No se ha observado ninguna seroconversión frente a una cepa europea o canadiense de virus SDRP en estos animales.

Un tercer ensayo ha permitido reproducir el síndrome a partir de extracciones efectuadas sobre los cerdos del segundo ensayo.

Conclusión

El síndrome se reproduce en las condiciones experimentales. Se determina mediante por lo menos un agente infeccioso, transmisible por contacto directo. Las constantes clínicas son una hipertermia a veces elevada (superior o igual a 41,5°C) que se desarrolla 8 a 10 días después de la infección. Se puede observar una disminución del crecimiento. Las demás manifestaciones son una inversión de la fórmula sanguínea (inversión de la relación linfocito/polinuclear de 70/30 a 30/70) y unas lesiones frecuentes sobre los ganglios, en particular los que drenan el aparato respiratorio (hipertrofia ganglionar, pérdida de estructura con necrosis e infiltración por unas células mononucleadas o polinucleadas gigantes).

2 - Estudios en laboratorio

Se han usado diversos soportes celulares que incluyen unas células de riñón de cerdo primarias o en línea, unas células de testículo de cerdo, unas células de riñón de monos, unos linfocitos de cerdo, unos macrófagos alveolares de cerdos, unos monocitos de la sangre circulante, para demostrar la presencia eventual de un virus. No se ha demostrado ningún efecto citopático sobre estas células. En cambio, el uso de un suero de cerdo enfermo después de la infección experimental ha permitido revelar un antígeno intracelular en los monocitos, los macrófagos y aproximadamente 10% de las células de riñón de cerdo (RP) infectadas con los triturados de órgano. Esta revelación indirecta ha sido realizada en cinética en diferentes momentos de cultivo. De ello se desprende que el antígeno aparece inicialmente en el núcleo de las células infectadas antes de expandirse en el citoplasma. Los pasos sucesivos en cultivo celular no han permitido amplificar la señal.

En microscopia electrónica sobre unos triturados de órganos, se han visualizado unas partículas esféricas marcadas específicamente por el suero de cerdos enfermos, infectados en las condiciones experimentales. El tamaño de estas partículas se estima en 20 nm.

Después de dos pasos de estos triturados de órganos sobre unos linfocitos de cerdo y después de tres pasos sobre células de riñón o de testículo de cerdo, se ha desarrollado y amplificado un efecto citopático. En el microscopio electrónico se ha visualizado un adenovirus que, en las condiciones experimentales, no ha reproducido el DFP (se observa sólo un pico de hipertermia 24 a 48 horas después de la infección, y después nada más).

Se han podido demostrar unas bandas de ADN en ciertas extracciones de cerdos infectados en las condiciones experimentales y que han presentado unas señales de la enfermedad (resultados no representados). Existe una cierta correspondencia entre las extracciones que dan un resultado positivo en cultivo celular y los que presentan una banda de ADN.

Conclusión

Por lo menos dos tipos de virus se han demostrado en los triturados de órganos procedentes de cerdos enfermos de DFP. Uno es un adenovirus, pero no reproduce por sí mismo la enfermedad. El otro tipo de virus es un circovirus y está asociado al DFP. Este circovirus, del cual se han aislado y secuenciado dos tipos, denominados a continuación

circovirus MAP de tipo A (o PCVA) y circovirus MAP de tipo B (o PCVB) presentan unas mutaciones con relación a las secuencias conocidas de circovirus no patógenas para el cerdo.

3 - Clonación y secuenciación del ADN de circovirus MAP de tipo A

5 Extracción del ADN forma replicativa (RF), escisión por la enzima Kpn I y amplificación mediante un par de cebadores que flanquean el sitio de restricción Kpn I. Secuenciación de las dos hebras por lo menos dos veces mediante el método de Sanger.

10 La secuencia nucleica de la Hebra de polaridad (+) del genoma de circovirus MAP de tipo A (o PCVA), cepa DFP, está representada por la secuencia SEC ID nº 1 en el listado de las secuencias, estando la secuencia nucleica de la Hebra de polaridad (-) del genoma del circovirus MAP de tipo A (o PCVA) representada por la secuencia nucleica 3' → 5' de la figura 3 o por la secuencia SEC ID nº 2 (representada según la orientación 5' → 3') en el listado de secuencias.

15 Las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 6, SEC ID nº 7 y SEC ID nº 8 del listado de secuencias representan respectivamente las secuencias de las proteínas codificadas por las secuencias nucleicas de los 3 marcos abiertos de lectura SEC ID nº 3 (ORF1), que corresponde a la proteína REP, SEC ID nº 4 (ORF2) y SEC ID nº 5 (ORF3), determinadas a partir de la secuencia SEC ID nº 1 de la Hebra de polaridad (+) o de la secuencia nucleica SEC ID nº 2 de la Hebra de polaridad (-) del genoma del circovirus MAP de tipo A.

4 - Comparación de las secuencias nucleotídicas y de los aminoácidos del circovirus MAP de tipo A (o asociado a MAP) obtenidas con las secuencias correspondientes de circovirus MEEHAN y MANKERTZ de líneas celulares porcinas

20 Uso del programa de análisis de secuencia de ADN, DNASIS.

Secuencia de los oligonucleótidos usados como cebadores o sondas en los procedimientos de detección y/o de identificación

1. detección específica del circovirus MAP de tipo A:

25 cebador PCV5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';
cebador PCV10: 5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3';

2. detección específica del circovirus de las líneas celulares:

cebador PCV5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';
cebador MEE1: 5' TGG AAT GTT AAC TAC CTC AA 3';

3. detección diferencial:

30 los pares de cebadores usados son los descritos por ejemplo en los párrafos 1 y 2 anteriores;

4. detección de las formas replicativas RF (replicative forms) circulares monoméricas:

cebador PCV5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';
cebador PCV6: 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3';

5. detección de los vectores que comprenden los dímeros en tándem:

35 dímero Nar:

cebador KS 620: 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3';
cebador PCV5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3'; dímero Kpn:
cebador KS 620: 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3';
cebador PCV 6: 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3';

40 6. detección diferencial:

los pares de cebadores usados son los descritos, por ejemplo, en los párrafos 4 y 5 anteriores.

45 Los procedimientos que usan los pares de cebadores descritos en los párrafos 4 y 5 son particularmente interesantes para detectar de manera diferencial las formas monoméricas circulares de formas replicativas específicas del virión o del ADN en replicación y las formas diméricas encontradas en las construcciones moleculares denominadas en tándem.

Las construcciones en tándem del genoma vírico (dímeros) tales como las construcciones usadas para la preparación del vector pBS KS+ Tándem PCV Kpn 1, depositado en la CNCM con el número I-1891, el 3 de julio de 1997 (*E. coli* transformado por dicho vector) son muy interesantes para su uso en unos métodos de producción en

- 5 cantidad suficiente de un inóculo constituido por ADN, destinado a la producción de virus, y esto en ausencia de protocolo satisfactorio de producción de virus en sistema celular. Dichos métodos de producción que usan estas construcciones en tándem del genoma vírico permitirán estudiar mediante mutación los factores de virulencia y por consiguiente, se podrán usar para la fabricación de una colección de virus que comprenden las mutaciones indicadas en la construcción de los vectores que presentarán el tropismo y la virulencia apropiados. Estos vectores con estructura autorreplicativa presentan unas propiedades buscadas en transferencia de genes, en particular para sus aplicaciones en terapia génica, y en vacunología.

Análisis mediante transferencia Western de las proteínas recombinantes del circovirus MAP de tipo A

- 10 Los resultados han sido obtenidos usando un antisuero específico del circovirus MAP producido durante el ensayo 1 (véase la figura 1).

Tipo de productos analizados

Se han realizado los análisis sobre unos extractos celulares de células Sf9 obtenidos después de la infección por el baculovirus recombinante PCV ORF 1.

- 15 El cultivo de las células Sf9 se ha realizado en caja de Petri de 25 cm² según los métodos de cultivo estándares para estas células. Después de la centrifugación, los residuos celulares se recogen mediante 300 µl de tampón PBS (tampón fosfato salino).

Electroforesis (PAGE-SDS)

La electroforesis se realiza sobre los extractos celulares Sf9 obtenidos anteriormente sobre 5 muestras (véase la tabla 1 a continuación) en las siguientes condiciones:

- 20 % de gel de poliacrilamida: 8%; Condiciones: desnaturalizantes;
Voltaje: 80V; duración: 135 min.

Tabla 1: Naturaleza de las muestras sometidas a la electroforesis

Nº de pocillo	1	2	3	4	5
Depósitos	PM Rainbow	Raoul 24h	Raoul 48h	Raoul 72h	Raoul 96 h
µl muestra	10	15	15	15	15
µl Laemli 4X	0	5	5	5	5
Leyendas de la tabla 1: Laemli 4X: tampón de carga PM Rainbow: marcadores de peso molecular (35, 52, 77, 107, 160 y 250 kD) Raoul 24h, 48h, 72h y 96h: productos de expresión del ORF1 del circovirus MAP de tipo A					

Transferencia western

- 25 Después de la electroforesis, se transfieren las bandas obtenidas en los diferentes pocillos sobre una membrana de nitrocelulosa durante 1h a 100v en un tampón TGM (Tris-glicina-metanol).

La transferencia western se realiza en las siguientes condiciones:

- 30 1) Saturación mediante una disolución que contiene 5% de leche desnatada; 0,05% de Tween 20 en un tampón TBS 1X (Tris buffer saline) durante 30 min.
2) 1^{er} anticuerpo:

se añaden 10 ml de anticuerpo anticircovirus MAP de tipo A diluidos a 1/100, y el medio de reacción se incubaba a continuación una noche a 4°C. Se efectúan tres lavados de 10 min. en TBS 1X.

3) 2º anticuerpo:

- 35 se añaden 10 ml de anticuerpo P164 de conejo anti-inmunoglobulinas de cerdo, acoplados con la peroxidasa (Dakopath) diluidos a 1/100, y se incubaba a continuación el medio de reacción durante 3 horas a 37°C. Se efectúan tres lavados de 10 min. en TBS 1X.

4) Revelado

Se usa el sustrato 4-cloro-1-naftol, en presencia de agua oxigenada para el revelado.

Resultados

Los resultados se representan en la figura 7.

Cinética de aparición de los anticuerpos específicos de la proteína recombinante REP del circovirus MAP de tipo A expresado en baculovirus después de la infección de los cerdos por el circovirus MAP de tipo A (ensayo 4, véase la figura 1)

Después de la infección de los cerdos, se extrae una muestra de suero de cada uno de los cerdos infectados en diferentes periodos en la tabla por fecha de extracción (efectuado en este caso el mismo año) y después se analiza mediante transferencia western.

El revelado de los anticuerpos específicos se realiza de la manera descrita anteriormente.

Los resultados obtenidos se representan en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2: Cinética de aparición de los anticuerpos específicos

Muestra	Cerdos	10/06	16/06	23/06	01/07	08/07	15/07	21/07
A3	1							
Testigo	2							
B2	1	Neg	Neg	Neg	+	+	++	+++
infec	2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
RP+	3	Neg	Neg	Neg	Neg	+	+	+
	4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	+

Leyendas de la tabla 2:
A3 Control: animales de control no infectados;
B2 Infec. RP+: animales infectados con unas células de riñón de cerdos (RP) que contienen el circovirus; Neg.: negativo;
+, ++, +++: escala de intensidad de la reacción positiva;
10/06, 16/06, 23/06, 01/07, 08/07, 15/07, 21/07: fecha expresadas en día/mes en las que se han efectuado las diferentes extracciones de suero.

Ejemplo 2: Clonación, secuenciación y caracterización del circovirus MAP de tipo B (PCVB)

Las técnicas usadas para la clonación, la secuenciación y la caracterización del circovirus MAP de tipo B (PCVB) son las usadas en el ejemplo 1 anterior para el circovirus MAP de tipo A (PCVA).

La secuencia nucleica de la Hebra de polaridad (+) del genoma del circovirus MAP de tipo B (o PCVB) está representada por la secuencia SEC ID nº 9 en el listado de secuencias, estando la secuencia nucleica de la Hebra de polaridad (-) del genoma del circovirus MAP de tipo B (o PCVB) representada por la secuencia nucleica 3' → 5' de la figura 8 o por la secuencia SEC ID nº 10 (representada según la orientación 5' → 3') en el listado de secuencias.

Las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 14, SEC ID nº 15 y SEC ID nº 16 del listado de secuencias representan respectivamente las secuencias de las proteínas codificadas por las secuencias nucleicas de los 3 marcos abiertos de lectura SEC ID nº 11 (ORF1), que corresponden a la proteína REP, SEC ID nº 12 (ORF2) y SEC ID nº 13 (ORF3), determinadas a partir de la secuencia SEC ID nº 9 de la Hebra de polaridad (+) o de la secuencia nucleica SEC ID nº 10 de la Hebra de polaridad (-) del genoma del circovirus MAP de tipo B.

Ejemplo 3: Análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas (ORF1, ORF2 y genómica) y de las secuencias de aminoácidos codificados por ORF1 y ORF2 de los circovirus MAP de tipo A (PCVA) o de tipo B (PCVB).

Los resultados expresados en % de homología se representan en las tablas 3 y 4 siguientes.

Tabla 3: Análisis comparado de las secuencias de aminoácidos

% de homología	ORF1	ORF2
PCVA/PCVB	80,4	56,2

Tabla 4: Análisis comparado de las secuencias nucleotídicas

% de homología	Genómica	ORF1	ORF2	Resto
PCVA/PCVB	70,4	80,4	60,1	66,1

Ejemplo 4: Observación de la enfermedad y reproducción de la enfermedad en las condiciones experimentales

5 a) Ensayo nº 1: Observación de la enfermedad

El objetivo es seleccionar unos animales de ganaderías al principio de la enfermedad y disponerlos en las condiciones experimentales para seguir la evolución de la patología y describir todas las manifestaciones clínicas. Este primer ensayo se ha efectuado sobre 3 cerdos de ganadería de 10 semanas de edad de los cuales 2 ya estaban enfermos (afectados de decaimiento), y sobre 3 otros cerdos de 13 semanas de edad, que no presentaban ninguna señal de enfermedad. La observación clínica se ha desplegado sobre un periodo de 37 días. Dos cerdos de 10 semanas han decaído rápidamente (cerdo 1 y 2, figura 9) y fueron eutanasiados 5 y 6 días después de su llegada. Uno solo ha presentado hipertermia en 5 días y diarrea. Otros dos cerdos han presentado disnea y tos, de los cuales uno ha tenido además hipertermia, superior a 41°C, los dos primeros días de su estancia. Otro cerdo ha tenido un crecimiento ralentizado en la segunda semana (cerdo 6, figura 9), sin que haya revelado ninguna otra señal clínica. En el plano lesional, 5 cerdos de 6 han presentado unas lesiones macroscópicas de neumonía gris, y el sexto presentaba unas lesiones cicatriciales sobre el pulmón.

b) Ensayo nº 2: Reproducción de la enfermedad a partir de inóculos preparados sobre cerdos de ganadería.

Los dos cerdos enfermos del ensayo 1 han servido para preparar unos inóculos que se ha ensayado en el ensayo 2 sobre unos cerdos exentos de organismos patógenos específicos (EOPS, SPF en versión anglo-sajona). Los cerdos EOPS tenían 9 semanas de edad en el momento de la inoculación. Los resultados clínicos y lesionales se representan en la tabla 5.

Tabla 5: recapitativo de las medidas efectuadas durante unas reproducciones experimentales de la MAP (entre paréntesis se indican los valores de los animales de control, los valores subrayados indican una diferencia entre animales infectados y animales de control)

Ensayo	Medida	2	3	4	5	6	7
Situación de los cerdos	EOPS CNEVA	EOPS terreno	EOPS CNEVA	EOPS CNEVA	EOPS CNEVA	Convencionales	Convencionales
Edad	9 semanas	6 semanas	5 semanas	5 semanas	5 semanas	5 semanas	6-7 semanas
Número	4	6	12	8	8	8	8
Vía de inoculación	Vía intratraqueal	Vía intratraqueal	Vía intratraqueal + intramuscular	Vía intratraqueal + intramuscular	Vía intratraqueal + intramuscular	Vía intratraqueal + intramuscular	Vía intratraqueal + intramuscular
Título inoculo por cerdo	ND*	ND*	10 ^{4,53} TCID ₅₀ por ml: 1 ml IM + 5 ml IT	10 ^{4,53} TCID ₅₀ por ml: 1 ml IM + 5 ml IT	10 ^{4,53} TCID ₅₀ por ml: 1 ml IM + 5 ml IT	10 ^{4,53} TCID ₅₀ por ml: 1 ml IM + 5 ml IT	10 ^{4,53} TCID ₅₀ por ml: 1 ml IM + 5 ml IT
Principio de las hipotermias	10 días post-infección	9-13 días post-infección	12-13 días post-infección	9-14 días post-infección	8-12 días post-infección	12 días post-infección	12 días post-infección
% de cerdos en hipotermia**	100%	83%	92%	100%	75%	88%	88%
N° de días de hipotermia por cerdo**	7	4,5	3,3	5,8	7,5	11,6	11,6
Temperaturas máximas***	40,4 a 41,7°C	40,6 a 42,3°C	40,2 a 41,6°C	40,3 a 40,8°C	40,6 a 42°C	40,2 a 41,9°C	40,2 a 41,9°C
Hipotermia**** % por semana							
S1	3,5 (3,5)	17 (36)	7 (5)	37 (7)	16 (17)	20 (28)	20 (28)
S2	42 (3,5)	7 (13)	13 (1)	21 (3)	52 (10)	37 (28)	37 (28)
S3	35 (3,5)	33 (10)	28 (7)	62 (2)	34 (12)	79 (17)	79 (17)
S4	21 (3,5)	28 (7)	5 (0)	6 (3)	25 (22)	55 (3)	55 (3)
GMQ:							
S1	928(1053)	417 (357)	564 (620)	650 (589)	401 (407)	509 (512)	509 (512)
S2	678 (1028)	428 (617)	503 (718)	612 (584)	294 (514)	410 (310)	410 (310)
S3	661 (1000)	771 (642)	381 (657)	520 (851)	375 (586)	435 (440)	435 (440)
S4	786 (1100)	550 (657)	764 (778)	641 (696)	473 (610)	451 (681)	451 (681)
Transmisión cerdos por contactos	Si al 100%	Si al 75%	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
% de lesiones pulmonares	25	75	0	25	25	12	12
% de lesiones ganglionares	17	33	67	25	50	12	12

* ND: no determinado,

** hipotermia cuando la temperatura es superior a 40°C,

*** intervalo de las temperaturas máximas registradas a nivel individual,

**** el porcentaje corresponde al número de registros de temperatura superior a 40°C dividido por el número total de registros de temperaturas en la semana sobre el conjunto de los cerdos.

* ND: no determinado,

** hipotermia cuando la temperatura es superior a 40°C,

*** intervalo de las temperaturas máximas registradas a nivel individual,

**** el porcentaje corresponde al número de registros de temperatura superior a 40°C dividido por el número total de registros de temperaturas en la semana sobre el conjunto de los cerdos.

En este ensayo, no ha habido ningún decaimiento, como mucho una ralentización del crecimiento en la segunda, tercera o cuarta semana después de la infección. Estos datos ilustran que ciertas condiciones de ganadería favorecen probablemente la expresión de la enfermedad.

c) Ensayos nº 3 a nº 7: Reproducción de los ensayos experimentales

- 5 La multiplicación de los ensayos experimentales sobre cerdos ha tenido como objetivo dominar y caracterizar mejor el modelo experimental. El conjunto de los resultados se presenta en la tabla 5.

En las condiciones experimentales, el MAP se caracteriza así por una larga incubación, de 8 a 14 días, unas verdaderas hipertermias de 2 a 8 días, una disminución del consumo alimenticio y una ralentización del crecimiento ponderal en la segunda, tercera o cuarta semana post-infección. La tabla lesional asociada a esta expresión clínica
10 comprende esencialmente unas hipertrofias ganglionarias y unas lesiones de neumonía.

Conclusión

La realización de este modelo experimental permite demostrar de manera indiscutible el papel etiológico directo del circovirus MAP en la enfermedad. Además, este modelo es la herramienta indispensable para la comprensión de los mecanismos patogénicos y el estudio de futuros candidatos a vacunas.

- 15 **Ejemplo 5: Demostración de la eficacia protectora de una composición vacunal según la invención realizada a partir de fragmentos nucleicos de secuencia de circovirus**

MAP

1) Animales usados para el estudio

- 20 Se han usado unos lechones que presentan la enfermedad MAP, reproducida en las condiciones experimentales descritas en el párrafo c) del Ejemplo 4, en un protocolo de evaluación de la eficacia de la composición vacunal que comprende unos fragmentos nucleicos de secuencia de circovirus MAP.

2) Composición vacunal ensayada y protocolo de vacunación a) Componentes usados para el estudio

Se han obtenido los plásmidos a partir del plásmido pcDNA3 de INVITROGENE

- Plásmidos pcDNA3 ORF-

- 25 Estos plásmidos son unos plásmidos que no comprenden ninguna inserción de ácido nucleico de circovirus MAP y se usan a título de plásmido de control negativo.

- Plásmido pcDNA3ORF1+ y plásmido pcDNA3ORF2+

- 30 Los plásmidos pcDNA3ORF1+ y pcDNA3ORF2+ son unos plásmidos que comprenden una inserción de ácido nucleico de la secuencia del circovirus MAP de tipo B, respectivamente un inserción que comprende el fragmento de ácido nucleico SEC ID nº 11 (ORF'1) que codifica para la proteína Rep de secuencia SEC ID nº 14 y una inserción que comprende el fragmento de ácido nucleico SEC ID nº 12 (ORF'2) que codifica para la proteína de secuencia SEC ID nº 15, que corresponde probablemente a la proteína de cápside, comprendiendo estas construcciones nucleicas el codón ATG de iniciación de la secuencia que codifica la proteína correspondiente.

- Plásmido GMCSF+

- 35 El GM-CSF (Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor) es una citocina que interviene en el desarrollo, la maduración y la activación de los macrófagos, de los granulocitos y de las células dendríticas presentadoras de antígeno. Se estima que la aportación beneficiosa del GM-CSF en la vacunación es una activación celular en particular con el reclutamiento y la diferenciación de células presentadoras de antígeno.

- 40 Este plásmido pcDNA3-GMCSF+ comprende una inserción de ácido nucleico que codifica para el factor de estimulación de colonias granulocitos/macrófago, la proteína GM-CSF.

El gen que codifica para esta proteína GM-CSF ha sido clonado y secuenciado por Inumaru *et al.* (Immunol. Cell. Biol., 1995, 73(5), 474-476). El plásmido pcDNA3-GMCSF ha sido obtenido del Dr. B. Charley del INRA de Jouy-en-Josas (78, Francia).

- Baculovirus recombinantes

- 45 Los baculovirus denominados ORF- son unos virus que no presenta ninguna inserción que comprende un fragmento de ácido nucleico capaz de expresar una proteína de circovirus MAP.

Los baculovirus denominados ORF1+ (BAC ORF1+) u ORF2+(BAC ORF2+) son unos baculovirus recombinantes que presentan respectivamente una inserción que comprende un fragmento de ácido nucleico SEC ID nº 11 (ORF'1)

y una inserción que comprende el fragmento de ácido nucleico SEC ID nº 12 (ORF'2).

- Adyuvante

El adyuvante suministrado por la Compañía Seppic filial de AIR LIQUIDE es el adyuvante que corresponde a la referencia AIF SEPPIC.

5 b) Protocolo de vacunación

Se reparten unos lechones destetados de 3 semanas de edad en cuatro lotes A, B, C y D comprendiendo cada uno 8 lechones.

Los lotes A, B y C, de 3 semanas de edad, reciben cada uno una primera inyección (inyección M1) de 1 ml que contiene 200 microgramos de plásmidos (ADN desnudo) en PSB, pH: 7,2, por vía intramuscular para cada uno de los plásmidos mencionados a continuación para cada lote, y después, a las 5 semanas de edad una segunda inyección (inyección M2) que comprende estos mismos plásmidos. Se practica una tercera inyección simultáneamente por el otro lado del cuello. Esta tercera inyección comprende 1 ml de una suspensión que contiene $5 \cdot 10^6$ células infectadas por baculovirus recombinantes y 1 ml de adyuvante AIF SEPPIC.

Lote A (F1) (lote de control):

15 - primera inyección

Plásmido pcDNA3ORF1-, plásmido pcDNA3ORF2- y plásmido GMCSF+,

- segunda y tercera inyección (simultáneas)

Plásmido pcDNA3ORF1-, plásmido pcDNA3ORF2- y plásmido GMCSF+; Células transformadas por baculovirus que no contiene ninguna inserción de ácido nucleico que codifica para una proteína de circovirus MAP; Adyuvante AIF SEPPIC.

Lote B (F2) (Lote de control):

- primera inyección

Plásmido pcDNA3ORF1-, plásmido pcDNA3ORF2- y plásmido GMCSF+;

- segunda y tercera inyección (simultáneas)

25 Plásmido pcDNA3ORF1-, plásmido pcDNA3ORF2- y plásmido GMCSF+; Células transformadas por baculovirus que no contiene ninguna inserción de ácido nucleico que codifica para una proteína de circovirus MAP; Adyuvante AIF SEPPIC.

Lote C (F3):

- primera inyección

30 Plásmido pcDNA3ORF1-, plásmido pcDNA3ORF2+ y plásmido GMCSF+;

- segunda y tercera inyección (simultáneas)

Plásmido pcDNA3ORF1+, plásmido pcDNA3ORF2+ y plásmido GMCSF+;

35 Células transformadas por unos baculovirus recombinantes BAC ORF1+ y BAC ORF2+ capaces de expresar respectivamente la proteína Rep de secuencia SEC ID nº 14 y la proteína de secuencia SEC ID nº 15 del circovirus MAP de tipo B.

Lote D (F4) (lote de control): ninguna inyección

Los lotes de lechones B, C y D se inyectan (puesta a prueba) a las 6 semanas de edad mientras que el lote A no está sometido a la prueba.

3) Seguimiento de los lotes

40 - recuento tos-estornudos: 15 minutos/lote/día;
- consistencia de las materias fecales: todos los días;
- registros habituales: Toma de sangre semanal, pesaje;
- pesajes de los rechazos alimenticios: 3 veces por semana;
- cálculo de la ganancia diaria en peso (gmq);

45

Las ganancias medias diarias se han calculado para cada uno de los lotes en un periodo de 28 días tras la puesta a prueba (véase la figura 10), y se ha efectuado asimismo un cálculo intermedio de la gmq para cada uno de los lotes en el primer y el segundo periodo de 14 días. Los resultados obtenidos se indican a continuación en la tabla 6.

Tabla 6: Ganancias medias diarias

	F1	F2	F3	F4
d1-d14	411 g	450 g	511 g	461 g
d14-d28	623 g	362 g	601 g	443 g
d0-d28	554 g	406 g	556 g	452 g

5

- Medición de la hipertermia

La medición de la hipertermia, superior a 41°C (véase la figura 11) y superior a 40,2°C, se ha efectuado para cada uno de los lotes en un periodo total de 28 días tras la puesta a prueba. Los resultados obtenidos, que corresponden a la relación expresada en porcentaje entre el número de registros térmicos superiores a 41°C (o superiores a 40,2°C) y entre el número total de registros térmicos efectuados sobre el conjunto de los cerdos por periodos de una semana, se indican a continuación en las tablas 7 y 8, respectivamente para las mediciones de hipertermia superior a 41°C y superior a 40,2°C.

10

Tabla 7: Hipertermias > 41°C

	F1	F2	F3	F4
S1	4,1	0,	0,	0,
S2	10,7	16,	0,	8,9
S2	4,7	27,	0,	45,
S4	0,	0,	0,	7,5

15

Tabla 8: Hipertermias > 40,2°C

	F1	F2	F3	F4
S1	29,1	10,41	29,1	20,8
S2	28,5	39,2	10,7	37,5
S2	14,3	68,7	25,0	81,2
S4	3,3	17,5	20,0	55

4) Conclusión

Los registros efectuados muestran claramente que los animales que han recibido las tres inyecciones de una composición vacunal que comprende unos fragmentos de ácido nucleico de circovirus MAP según la invención y/o capaces de expresar unas proteínas recombinantes de circovirus MAP, en particular de tipo B, no han presentado ninguna hipertermia (véase la figura 10). Estos animales no han conocido además ninguna disminución de su crecimiento, siendo las gmq comparables a las de los animales de control no infectados (véase la figura 9). No han presentado ninguna señal clínica particular.

20

Estos resultados demuestran la protección eficaz de los lechones contra la infección por un circovirus MAP de la invención, agente primario responsable de la MAP o DFP, aportada por una composición vacunal preparada a partir de un fragmento de ácido nucleico de la secuencia nucleica de circovirus MAP según la invención, en particular de tipo B, y/o a partir de proteínas recombinantes codificadas por estos fragmentos de ácidos nucleicos.

25

Estos resultados muestran en particular que las proteínas aisladas codificadas por ORF1 y ORF2 de circovirus MAP según la descripción son unas proteínas inmunógenas que inducen una respuesta protectora eficaz para la prevención de la infección por un circovirus MAP en una composición vacunal según la invención.

30

Ejemplo 6: Diagnóstico serológico de circovirus MAP mediante inmunodosificación usando unas proteínas recombinantes o unos péptidos de síntesis de circovirus MAP

A - Diagnóstico serológico mediante proteínas recombinantes

5 La identificación y la secuenciación de circovirus porcino MAP permiten producir mediante las técnicas de recombinación genética bien conocidas por el experto en la materia unas proteínas recombinantes de circovirus MAP.

Mediante estas técnicas, se han expresado unas proteínas recombinantes codificadas en particular por el ORF'2 del circovirus MAP, de tipo B, mediante unas células de insecto Sf9 transformadas y después aisladas.

10 Se extraen estas proteínas recombinantes codificadas por el ORF'2, después del cultivo de las células Sf9 transformadas, mediante lisis celular térmica gracias a 3 ciclos de congelación/descongelación -70°C/+37°C. Se lisan asimismo unas células Sf9 sanas o Sf9 de control no transformadas.

15 Estas dos fracciones antigénicas procedentes de células Sf9 de control no transformadas y de células Sf9 que expresan el ORF'2 se precipitan a 4°C mediante una disolución al 60% más o menos 5% de sulfato de amonio saturado. Se realiza una dosificación de proteínas totales con la ayuda del kit Biorad. Se adsorben 500 ng de proteínas Sf9 de control y de proteínas Sf9 que expresan el ORF'2 semipurificadas, en disolución en tampón bicarbonato 0,05 M pH 9,6, de forma pasiva en el fondo de 3 cúpulas diferentes de una microplaca Nunc Maxisorp mediante incubación durante una noche a +4°C.

La reactividad de los sueros de cerdos frente a cada una de estas fracciones antigénicas se evalúa mediante una reacción ELISA indirecta cuyo protocolo experimental se detalla a continuación:

- 20 - Etapa de saturación: 200 µl/cúpula de PBS1X/leche semidesnatada 3%, incubación durante 1h30 a 37°C.
 - Lavado: 200 µl/cúpula de PBS1X/Tween 20: 0,05%, 3 lavados rápidos.
 - Etapa de incubación de los sueros: 100 µl/cúpula de suero diluido al 1/100 en PBS1X/leche semidesnatada, 1%/Tween 20: 0,05%, incubación durante 1 h a 37°C.
 - Lavado: 200 µl/cúpula de PBS1X/Tween 20: 0,05%, 2 lavados rápidos seguidos de 2 lavados de 5 min.
 25 - Etapa de incubación del conjugado: 50 µl/cúpula de conjugado de conejo anti-cerdo diluido al 1/1000 en PBS1X/leche semidesnatada, 1%/Tween 20: 0,05%, incubación durante 1h a 37°C.
 - Lavado: 200 µl/cúpula de PBS1X/Tween 20: 0,05%, 2 lavados rápidos seguidos de 2 lavados de 5 min.
 - Etapa de revelado: 100 µl/cúpula de sustrato OPD/Tampón de citrato/H₂O₂, incubación durante 15 min. a 37°C.
 - Detención de la reacción: 50 µl/cúpula H₂SO₄1N.
 30 - Lectura con el espectrofotómetro a 490 nm.

Resultados

Los resultados obtenidos se presentan a continuación en la tabla 9.

Tabla 9

Antígenos	Reactividad del suero de cerdo no inoculado por el circovirus	Reactividad del suero de cerdo inoculado por el circovirus
Sf9 de control purificado	0,076	0,088
Sf9 que expresa ORF'2 purificado	0,071	1,035

35 Los resultados se expresan en densidad óptica medida con el espectrofotómetro a 490 nm durante el análisis mediante ELISA de la reactividad de sueros de cerdo inoculado o no por el circovirus MAP de tipo B según el protocolo indicado anteriormente.

B - Diagnóstico serológico mediante péptido de síntesis

40 La cartografía epitópica de las proteínas codificadas, por ejemplo, por las secuencias nucleicas ORF1 y ORF2 de los dos tipos de circovirus MAP (tipos A y B) ha permitido entre otros identificar unos epítopos circovíricos inmunógenos sobre las proteínas codificadas por las secuencias nucleicas ORF'1 y ORF'2 así como los epítopos específicos de la proteína codificada por la secuencia nucleica ORF'2 del circovirus MAP de tipo B. Se han sintetizado en forma de péptido cuatro epítopos específicos del circovirus MAP de tipo B y un epítipo común a los dos tipos de circovirus MAP situados sobre la proteína codificada por la secuencia nucleica ORF'2. Se han sintetizado asimismo los péptidos equivalentes en el circovirus de tipo A. Todos estos péptidos han sido evaluados como antígenos de
 45 diagnóstico en el ámbito de la realización de un ensayo serológico.

Resultados

Los resultados obtenidos se representan en la tabla 10 a continuación.

Tabla 10: Resultados de la evaluación como antígeno de diagnóstico de péptidos sintéticos codificados por las secuencias nucleicas ORF2 y ORF'2 de circovirus MAP de tipo A y B.

Reactividad del suero de cerdo infectados por circovirus B							
Péptido	Tipo de circovirus MAP	Posición	Secuencia AA	EOPS D0/D54	Convencional 1 D0/D42	Convencional 2 D0/D42	Especificidad epitópica
121 177	B A	71-85 84	VDMRMFNINDFLPPG NVNELRFNIGQFLPP	+/-, +++ +/- +, +	++ +/-, +/-	- +/-, -	Circovirus B
132 188 133 189	B A B	115-129 114-127 119-134 118-132	QGDRGVGSSAVILDD TSNQRGVGSTVIL GVGSSAVILDDNWFVK RGVGVSTVILDANFV	+/-, +/- +/- -, ++ +/-, -	++ -, +/- ++ -, +/-	+ +/-, +/- ++ +/-, +/-	Circovirus B
146 202	B A	171-185 170-184	FTIDYFQPNKRNQL DQTDWTFQPNKRNQ	-, +/- +++ +++	- ++ +/-, ++	- +, ++	Circovirus A y B
152 208	B A	195-209 194-208	VDHVGLGTAFENSIY NVEHTGLGYALQNAT	-, ++ -, -	+++ -, -	+/-, + -, -	Circovirus B

Ejemplo 7: Caracterización de los epítomos específicos del circovirus MAP de tipo B

Se han elegido para este estudio las proteínas codificadas por el ORF2 de los circovirus porcinos de tipo A y B. Para cada una de las ORF2 (tipos A y B), se han sintetizado 56 péptidos de 15 aminoácidos que se solapan cada 4 aminoácidos, recubriendo así la totalidad de la proteína (véase la tabla 11 a continuación).

- 5 Tabla 11: Secuencia de aminoácidos de los 56 péptidos de 15 aminoácidos sintetizados a partir de la secuencia nucleica ORF'2 (tipo B) y ORF2 (tipo A) de circovirus MAP con su número de spot correspondiente (véase la figura 12)

ORF'2 tipo B		ORF2 tipo A	
Spot nº	Secuencia	Spot nº	Secuencia
104	MTYPRRRYRRRRHRP	160	MTWPRRRYRRRRTRP
105	RRRYRRRRHRPRSHL	161	RRRYRRRRTRPRSHL
106	RRRRHRPRSHLGQIL	162	RRRRTRPRSHLGNIL
107	HRPRSHLGQILRRRP	163	TRPRSHLGNILRRRP
108	SHLGQILRRRPWL VH	164	SHLGNILRRRPYL VH
109	QILRRRPWL VHP RHR	165	NILRRRPYL VHP AFR
110	RRPWL VHP RHR YRWR	166	RRPYL VHP AFR NRYR
111	LVHP RHR YRWR RKNG	167	LVHP AFR NRYR WRRK
112	RHR YRWR RKNG IFNT	168	AFR NRYR WRRK TGIF
113	RWRRKNG IFNTRL SR	169	RYR WRRK TGIF NSRL
114	KNG IFNTRL SRTFGY	170	RRKTGIF NSRL SREF
115	FNTRL SRTFGY TVKR	171	GIF NSRL SREF VLT I
116	LSRTFGY TVKR TTVR	172	SRL SREF VLT IRGGH
117	FGY TVKR TTVR TPSW	173	REF VLT IRGGH SQPS
118	VKR TTVR TPSW AVDM	174	LTIRGGH SQPS WNVN
119	TVR TPSW AVDM MRFN	175	GGH SQPS WNVN ELRF
120	PSW AVDM MRFN INDF	176	QPS WNVN ELRF NIGQ
121	VDM MRFN INDF LPPG	177	NVN ELRF NIGQ FLPP
122	RFN INDF LPPG GGSN	178	LRFNIGQ FLPP SGGT
123	NDF LPPG GGSN PRSV	179	IGQ FLPP SGGT NPLP
124	PPGGGSN PRSV PF EY	180	LPPSGGT NPLP L PFQ
125	GSN PRSV PF EY YRIR	181	GGTNPLP L PFQ YYRI
126	RSVPF EY YRIR KV KV	182	PLPLP FQ YYRI R KAK
127	FEYYRIR KV KVEFWP	183	PFQ YYRI R KAK YEFY
128	RIR KV KVEFWP CSPI	184	YRIR KAK YEFY PRDP
129	VKVEFWP CSPI TQGD	185	KAK YEFY PRDP ITSN
130	FWP CSPI TQGD RGVG	186	EYPRDP ITSN QRGV
131	SPITQGD RGVG S SAV	187	RDP ITSN QRGV GSTV
132	QGDRGVG S SAV ILDD	188	TSN QRGV GSTV VILD

(continuación)

ORF2 tipo B		ORF2 tipo A	
Spot nº	Secuencia	Spot nº	Secuencia
133	GVGSSAVILDDNFVT	189	RGVGSTVVILDANFV
134	SAVILDDNFVTKATA	190	STVVILDANFVTPST
135	LDDNFVTKATALTYD	191	ILDANFVTPSTNLAY
136	FVTKATALTYDPYVN	192	NFVTPSTNLAYDPYI
137	ATALTYDPYVNYSSR	193	PSTNLAYDPYINYSS
138	TYDPYVNYSSRHTIT	194	LAYDPYINYSSRHTI
139	YVNYSSRHTITQPFS	195	PYINYSSRHTIRQPF
140	SSRHTITQPFSYHSR	196	YSSRHTIRQPFTYHS
141	TITQPFSYHSRYFTP	197	HTIRQPFTYHSRYFT
142	PFSYHSRYFTP KPVL	198	QPFTYHSRYFTP KPE
143	HSRYFTP KPVL DFTI	199	YHSRYFTP KPELDQT
144	FTP KPVL DFTIDYFQ	200	YFTP KPELDQTIDWF
145	PVL DFTIDYFQ PNNK	201	KPELDQTIDWFQ PNN
146	FTIDYFQ PNNKRNQL	202	DQTIDWFQ PNNKRNQ
147	YFQ PNNKRNQLWLRL	203	DWFQ PNNKRNQLWLH
148	NNKRNQLWLRLQTAG	204	PNNKRNQLWLHLNTH
149	NQLWLRLQTAGNVDH	205	RNQLWLHLNTHTNVE
150	LRLQTAGNVDHVGLG	206	WLHLNTHTNVEHTGL
151	TAGNVDHVGLGTAFE	207	NHTNVEHTGLGYAL
152	VDHVGLGTAFENSIY	208	NVEHTGLGYALQNAT
153	GLGTAFENSIYDQEY	209	TGLGYALQNATTAQN
154	AFENSIYDQEYNIRV	210	YALQNATTAQNYVVR
155	SIYDQEYNIRVTMYV	211	NATTAQNYVVRITIY
156	QEYNIRVTMYVQFRE	212	AQNYVVRITIYVQFR
157	IRVTMYVQFREFNFK	213	VVRITIYVQFREFIL
158	MYVQFREFNFKDPPL	214	TIYVQFREFILKDPL
159	VQFREFNFKDPPLNP	215	YVQFREFILKDPLNE

- 5 Estos péptidos han sido sintetizados según el método "spot" que consiste en una síntesis simultánea de un gran número de péptidos sobre un soporte sólido de celulosa, constituyendo a cada lugar de síntesis de un péptido un spot (Synt:em, NIMES). Este método implica una orientación de los péptidos sobre la placa, estando éstos fijados de manera covalente por el extremo carboxi. Un spot representa aproximadamente 50 nmoles de péptido.

La referencia de los spot y de las secuencias peptídicas correspondientes se proporciona en la tabla 11.

Estas membranas han sido usadas para unos ensayos de inmunorreactividad frente a sueros de cerdos EOPS infectados o no experimentalmente por la cepa circovírica MAP de tipo B así como frente a sueros de cerdos infectados, procedentes de ganaderías convencionales (ganaderías convencionales 1 o 2). Este estudio ha permitido demostrar unos péptidos inmunorreactivos específicos del circovirus de tipo B que corresponde a los spot nº 121, nº 132, nº 133 y nº 152 (respectivamente de secuencias de aminoácidos SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19 y SEC ID nº 20). Se presenta una ilustración en la figura 12 en la que las membranas se revelan con un suero de cerdo infectado, procedente de una ganadería convencional. Se han demostrado asimismo unos péptidos inmunorreactivos no específicos de tipo, entre los cuales se considerará el péptido nº 146 que es altamente inmunógeno.

- 10 Una comparación entre las secuencias peptídicas de los circovirus de tipo A y B (figura 13) indica una divergencia comprendida entre 20 y 60% para los péptidos inmunorreactivos específicos de tipo B, y una divergencia más baja (13%) entre los péptidos no específicos.

Referencias bibliográficas

- 15 Allan, G. M. *et al.*, 1995, Vet. Microbiol., 44: 49-64.
Barany, F., 1911, PNAS. USA, 88: 189-193.
Boulton, L.H. *et al.*, 1997, J. Gen. Virol., 78 (Pt 6), 1265-1270.
Buckholz, R.G., 1993, Yeast systems for the expression of heterologous gene products. Curr. Op. Biotechnology 4: 538-542.
20 Burg, J.L. *et al.*, 1996, Mol. and Cell. Probes, 10: 257-271.
Chu, B.C.F. *et al.*, 1986, NAR, 14: 5591-5603.
Chu, P.W.G. *et al.*, 1993, Virus Research, 27: 161-171.
Clark, E.G., 1997, American Association of Swine Practitioners, 499-501.
Daft, B. *et al.*, 1996, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 32.
Derse, D. *et al.*, 1995, J. Virol., 69(3): 1907-1912.
25 Duck, P. *et al.*, 1990, Biotechniques, 9: 142-147.
Dulac, G.C. *et al.*, 1989, Can. J. Vet. Res., 53: 431-433.
Edwards, C.P., and Aruffo, A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4: 558-563.
Edwards, S. *et al.*, 1994, Vet. Rec., 134: 680-681.
30 Erlich, H.A., 1989, In PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. New York: Stockton Press.
Felgner, *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., 84: 7413.
Fontes, E.P.B. *et al.*, 1994, J. Biol. Chem., Vol. 269, N° 11: 8459-8465.
Fraley *et al.*, 1980, J. Biol. Chem., 255: 10431.
35 Guateli, J.C. *et al.*, 1990, PNAS. USA, 87: 1874-1878.
Hackland, A.F. *et al.*, 1994, Arch. Virol., 139: 1-22.
Hanson, S.F. *et al.*, 1995, Virology, 211: 1-9.
Harding, J.C., 1997, American Association of Swine Practitioners, 503.
Harding, R.M. *et al.*, 1993, Journal of General Virology, 74: 323-328.
40 Harding, J.C. et Clark, E.G., 1997, Swine Health and Production, Vol. 5, N° 5: 201-203.
Heyraud-Nitschke, F. *et al.*, 1995, Nucleic Acids Research, Vol. 23, N° 6.
Horner, G.W., 1991, Surveillance 18(5): 23.
Houbenweyl, 1974, en Meuthode der Organischen Chemie, E. Wunsch Ed., Volumen 15-I y 15-II, Thieme, Stuttgart.
45 Huygen, K. *et al.*, 1996, Nature Medicine, 2(8): 893-898.
Innis, M.A. *et al.*, 1990, en PCR Protocols. A guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press.
Kaneda, *et al.*, 1989, Science, 243: 375.
Kievitis, T. *et al.*, 1991, J. Virol. Methods, 35: 273-286.
Kohler, G. *et al.*, 1975, Nature, 256(5517): 495-497.
50 Kwoh, D.Y. *et al.*, 1989, PNAS. USA, 86: 1173-1177.
Ladany, S. *et al.*, 1989, J. Clin. Microbiol. 27: 2778-2783.
Lazarowitz, S. G. *et al.*, 1989, The EMBO Journal, Vol. 8 N° 4: 1023-1032.
Luckow, V.A., 1993, Baculovirus systems for the expression of human gene products. Curr. Op. Biotechnology 4: 564-572.
55 Mankertz, A. *et al.*, 1997, J. Virol., 71: 2562-2566.
Matthews, J.A. *et al.*, 1988, Anal. Biochem., 169: 1-25.
McNeilly, F. *et al.*, 1996, Vet. Immunol. Immunopathol., 49: 295-306.
Meehan, B.M. *et al.*, 1997, J. Gen. Virol., 78: 221-227.
Meehan, B.M. *et al.*, 1998, J. Gen. Virol., 79: 2171-2179.
60 Merrifield, R.D., 1966, J. Am. Chem. Soc., 88(21): 5051-5052.
Midoux, 1993, Nucleic Acids Research, 21: 871-878.
Miele, E.A. *et al.*, 1983, J. Mol. Biol., 171: 281-295.
Murphy, F.A. *et al.*, 1995, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag

Wien New York.

Nayar, G.P. *et al.*, 1997, Can. Vet. J. 38(6): 385-386.

Olins, P.O., y Lee, S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in E. coli. Curr. Op. Biotechnology 4: 520-525.

5 Pagano *et al.*, 1967, J. Virol., 1: 891.

Rolfs, A. *et al.*, 1991, In PCR Topics. Usage of Polymerase Chain reaction in Genetic and Infectious Disease. Berlin: Springer-Verlag.

Sambrook, J. *et al.*, 1989, en Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

10 Sanchez-Pescador, R., 1988, J. Clin. Microbiol., 26(10): 1934-1938.

Segev D., 1992, en «Non-radioactive Labeling and Detection of Biomolecules». Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York: 197-205.

Shiver, J.W., 1995, en Vaccines 1995, eds Chanock, R.M. Brown, F. Ginsberg, H.S. & Norrby, E., pp.95-98, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

15 Tascon, R.E *et al.*, 1996, Nature Medicine, 2(8): 888-892.

Tischer, I. *et al.*, 1982, Nature, 295: 64-66.

Tischer, I. *et al.*, 1986, Arch. Virol., 91: 271-276.

Tischer, I. *et al.*, 1988, Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A] 270: 280-287. Tischer, I. *et al.*, 1995, Arch. Virol., 140: 737-743.

20 Urdea, M.S., 1988, Nucleic Acids Research, 11: 4937-4957.

Walker, G.T. *et al.*, 1992, NAR 20: 1691-1696.

Walker, G.T. *et al.*, 1992, PNAS. USA, 89: 392-396.

White, B.A. *et al.*, 1997, Methods in Molecular Biology, 67, Humana Press, Towota. Zhao, T.M. *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93(13): 6653-6658.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> WYETH LLC

<120> SECUENCIAS DE CIRCOVIRUS ASOCIADO A LA ENFERMEDAD DEL ADELGAZAMIENTO DEL LECHÓN (MAP)

<130> D17221

30 <140> EP 08154913.1

<141> 1998-12-04

<150> FR 97 15396

<151> 05-12-1997

<150> PCT/FR98/02634

35 <151> 04-12-1998

<150> EP 98958957.7

<151> 04-12-1998

<160> 20

<170> PatentIn Vers. 2.0

40 <210> 1

<211> 1759

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo A

<220>

45 <223> Hebra de polaridad + (5'-3')

<400> 1

ES 2 548 146 T3

```

accagcgcac  ttccggcagcg  gcagcacctc  ggcagcggtca  gtgaaaatgc  caagcaagaa  60
aagcgggcccg  caaccccata  agagggtgggt  gttcacccctt  aataatcctt  ccgaggagga  120
gaaaaacaaa  atacgggagc  ttccaatctc  cctttttgat  tattttgttt  gtggcgagga  180
aggttttgaa  gagggtagaa  ctctcacct  ccagggggtt  gcgaattttg  ctaagaagca  240
gacttttaac  aagggtgaagt  ggtatttttg  tgcccgctgc  cacatcgaga  aagcgaaagg  300
aaccgaccag  cagaataaag  aatactgcag  taaagaaggc  cacatactta  tcgagtgtgg  360
agctccgcgg  aaccagggga  agcgagcgca  cctgtctact  gctgtgagta  cccttttgga  420
gacggggtct  ttggtgactg  tagccgagca  gtttcctgta  acgtatgtga  gaaatttccg  480
cgggctggct  gaacttttga  aagtgcgagc  gaagatgcag  aagcgtgatt  ggaagacagc  540
tgtacacgtc  atagtgggcc  cgcccggttg  tgggaagagc  cagtgggccc  gtaattttgc  600
tgagcctagg  gacacctact  ggaagcctag  tagaaataag  tgggtgggatg  gatatcatgg  660
agaagaagtt  gttgttttgg  atgattttta  tggctgggta  ccttgggatg  atctactgag  720
actgtgtgac  cggatatccat  tgactgtaga  gactaaaggg  ggtactgttc  cttttttggc  780
ccgcagtatt  ttgattacca  gcaatcaggc  ccccaggaa  tgggtactcct  caactgctgt  840
cccagctgta  gaagctctct  atcggaggat  tactactttg  caattttgga  agactgctgg  900
agaacaatcc  acggaggtag  ccgaaggcgg  atttgaagca  gtggaccac  cctgtgccct  960
tttcccatat  aaaataaatt  actgagtctt  ttttgttatc  acatcgtaat  ggtttttatt  1020
tttattcatt  tagagggtct  ttcaggataa  attctctgaa  ttgtacataa  atagtcaacc  1080
ttaccacata  attttgggct  gtggttgcat  tttggagcgc  atagcccagg  cctgtgtgct  1140
cgacattggg  gtgggtattt  aaatggagcc  acagctgggt  tcttttatta  tttggctgga  1200
accaatcaat  tgtttggtct  agctctgggt  tgggggtgaa  gtacctggag  tggtaggtaa  1260
agggctgcct  tatggtgtgg  cgggaggagt  agttaatata  ggggtcatag  gccagttgg  1320
tgaggggggg  tacaaagttg  gcatccaaga  taacaacagt  ggacccaaca  cctctttgat  1380
tagagggtgat  ggggtctctg  gggtaaaatt  catatttagc  ctttctaata  cggtagtatt  1440
ggaaaggtag  gggtaggggg  ttggtgcgc  ctgagggggg  gaggaactgg  ccgatgttga  1500
atctcagctc  gttaacattc  caagatggct  gcgagtgtcc  tcctcttatg  gtgagtacaa  1560

attctctaga  aaggcgggaa  ttgaagatac  ccgtctttcg  gcgccatctg  taacgggtttc  1620
tgaaggcggg  gtgtaccaa  tatggtcttc  tccggaggat  gtttccaaga  tggctgcggg  1680
ggcgggtccg  tcttctgcgg  taacgcctcc  ttggccacgt  catcctataa  aagtgaagaa  1740
agtgcgctgc  tgtagtatt  1759

```

<210> 2

<211> 1759

5

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo A

<220>

<223> Hebra de polaridad - (5'-3')

<400> 2


```

aatactacag cagcgcaactt ctttcacttt tataggatga cgtggccaag gaggcgttac 60
cgcagaagac ggacccgccc ccgcagccat cttggaaacg tcctccggag aagaccatat 120
ttggtacacc ccgccttcag aaaccgttac agatggcgcc gaaagacggg tatcttcaat 180
tcccgccttt ctagagaatt tgtactcacc ataagaggag gacactcgca gccatcttgg 240
aatgttaacg agctgagatt caacatcggc cagttcctcc cccctcagg cggcaccaac 300
cccctacccc tacctttcca atactaccgt attagaaagg ctaaataatga attttacc 360
agagacccca tcacctctaa tcaaagaggt gttgggtcca ctgttggtat cttggatgcc 420
aactttgtaa cccctccac caacttggcc tatgaccctt atattaacta ctctcccg 480
cacaccataa ggcagccctt tacctaccac tccaggtact tcaccccaa accagagcta 540
gaccaaaciaa ttgattgggt ccagccaaat aataaaagaa accagctgtg gctccattta 600
aataccacca ccaatgtcga gcacacaggg ctgggctatg cgctccaaa tgcaaccaca 660
gcccaciaatt atgtggtaag gttgactatt tatgtacaat tcagagaatt tctctgaaa 720
gacctctaa atgaataaaa ataaaaacca ttacgatgtg ataacaaaa agactcagta 780
atttatttta tatgggaaaa gggcacaggg tgggtccact gcttcaaata ggcttcggg 840
tacctccgtg gattgttctc cagcagtctt ccaaaattgc aaagtagtaa tcctccgata 900
gagagcttct acagctggga cagcagttga ggagtacat tcctgggggg cctgattgct 960
ggtaatacaa atactgcggg ccaaaaaagg aacagtaccc ctttagtct ctacagtcaa 1020
tggataccgg tcacacagtc tcagtagatc atcccaagg aaccagcat aaaaatcatc 1080
caaaacaaca acttcttctc catgatatac atcccaccac ttatttctac taggcttcca 1140
gtagggtgct ctaggtcag caaaattacg ggcccactgg ctcttccac aaccggcg 1200
gcccactatg acgtgtacag ctgtcttcca atcacgctg tgcatcttcc cgctcacttt 1260
caaaagtcca gccagccgc ggaaatttct cacatacgtt acaggaaact gctcggctac 1320
agtcacaaa gacccgtct ccaaaagggt actcacagca gtagacaggt cgctgcgtt 1380
cccctgggtc cgcgagctc cacactcgat aagtatgtgg cttctttac tgcagtattc 1440
tttattctgc tggctcgttc ctttcgttt ctcatgtgg cagcgggcac caaaatacca 1500
cttcaccttg ttaaaagtct gcttcttagc aaaattcgca aaccctgga ggtgaggagt 1560
tctaccctct tccaaacctt cctcgccaca aacaaaataa tcaaaaagg agattggaag 1620
ctcccgattt ttgtttttct cctcctcgga aggattatta aggtgaaca cccacctctt 1680
atgggggtgc gggcgcttt tcttgcttgg cattttcact gacgctgcc aggtgctgcc 1740
gctgccgaag tgcgtggt 1759

```

<210> 3

<211> 939

<212> ADN

5 <213> Circovirus MAP tipo A

<220>

<223> ORF1

<400> 3

```

atgccaaagca agaaaagcgg cccgcaaccc cataagaggt ggggtgttcac ccttaataat 60
ccttccgagg aggagaaaaa caaaatacgg gagcttccaa tctccctttt tgattatttt 120
gtttgtggcg aggaaggttt ggaagagggt agaactcctc acctccagg gtttgcaaat 180
tttgctaaga agcagacttt taacaagggt aagtgggtatt ttggtgccc ctgccacatc 240
gagaaaagcga aaggaaccga ccagcagaat aaagaatact gcagtaaaga aggccacata 300
cttatcgagt gtggagctcc gcggaaccag ggggaagcga gcgacctgtc tactgctgtg 360
agtacccttt tggagacggg gtctttgtg actgtagccg agcagtttcc tgtaacgtat 420

gtgagaaatt tccgcgggct ggctgaactt ttgaaagtga gcgggaagat gcagcagcgt 480
gattggaaga cagctgtaca cgtcatagt ggcccgccc gttgtgggaa gagccagtgg 540
gcccgttaatt ttgctgagcc tagggacacc tactggaagc ctagtagaaa taagtgggtg 600
gatggatatac atggagaaga agttgttgtt ttggatgatt tttatggctg gttaccttgg 660
gatgatctac tgagactgtg tgaccggtat ccattgactg tagagactaa aggggggtact 720
gttccctttt tggcccgag tattttgatt accagcaatc agggcccca ggaatggtac 780
tctcaactg ctgtcccagc tgtagaagct ctctatcgga ggattactac tttgcaattt 840
tggaagactg ctggagaaca atccacggag gtacccgaag gccgatttga agcagtggac 900
ccaccctgtg cccttttccc atataaaata aattactga 939

```

10

<210> 4

<211> 702

<212> ADN

ES 2 548 146 T3

<213> Circovirus MAP tipo A

<220>

<223> ORF2

<400> 4

```

5   atgacgtggc caaggaggcg ttaccgcaga agacggaccc gccccgcag ccatcttgga 60
    aacatcctcc ggagaagacc atatcttgga cccccgcct tcagaaaccg ttacagatgg 120
    cgccgaaaga cgggtatctt caattcccgc ctttctagag aatttgtact caccataaga 180
    ggaggacact cgcagccatc ttggaatgtt aacgagctga gattcaacat cggccagttc 240
    ctccccccct caggcggcac caacccccct cccctacctt tccaatacta ccgtattaga 300
    aaggctaaat atgaatttta ccccagagac cccatcacct ctaatcaaag aggtgttggg 360
    tccactgttg ttatcttgga tgccaacttt gtaacccct ccaccaactt ggctatgac 420
    ccctatatta actactcctc ccgccacacc ataaggcagc cctttaccta ccaactccagg 480
    tacttcaccc ccaaaccaga gctagaccaa acaattgatt ggttccagcc aaataataaa 540
    agaaaccagc tgtggctcca tttaaatacc cacaccaatg tcgagcacac aggcctgggc 600
    tatgcgtcc aaaatgcaac cacagcccaa aattatgtgg taaggttgac tatttatgta 660
5   caattcagag aatttatcct gaaagaccct ctaaatgaat aa 702

```

<210> 5

<211> 621

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo A

10 <220>

<223> ORF3

<400> 5

```

    atgatatcca tcccaccact tatttctact aggcttccag taggtgtccc taggctcagc 60
    aaaattacgg gccactggc tcttcccaca accgggcggg cccactatga cgtgtacagc 120
    tgtcttccaa tcacgtgtgt gcatcttccc gctcactttc aaaagtccag ccagcccgcg 180
    gaaatttctc acatacgtta caggaaaactg ctgcgctaca gtcaccaaag acccgtctc 240
    caaaagggtg ctacagcag tagacaggtc gctgcgttc cctgggttc gcggagctcc 300
    aactcgata agtatgtggc cttctttact gcagtattct ttattctgct ggtcgggttc 360
    tttcgctttc tcgatgtggc agcgggcacc aaaataccac ttcacctgt taaaagtctg 420
    cttcttagca aaattcgcaa acccctggag gtgaggagtt ctacctctt ccaaaccttc 480
    ctgccacaa aaaaaataat caaaaaggga gattggaagc tcccgtaatt tgtttttctc 540
    ctctcgga ggattattaa ggggtgaacac ccaccttta tgggggttgcg ggccgctttt 600
    cttgcttggc attttcactg a 621

```

<210> 6

15 <211> 312

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo A

<400> 6

```

    Met Pro Ser Lys Lys Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe
      1             5             10             15

```

ES 2 548 146 T3

```

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

```

<210> 7

<211> 233

<212> PRT

5 <213> Circovirus MAP tipo A

<400> 7

ES 2 548 146 T3

```

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

Gln Pro Ser Trp Asn Val Asn Glu Leu Arg 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 Gln
          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 Thr 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 Glu
 225              230

```

<210> 8

<211> 206

<212> PRT

5 <213> Circovirus MAP tipo A

<400> 8

```

Met Ile Ser Ile Pro Pro Leu Ile Ser Thr Arg Leu Pro Val Gly Val
 1              5              10              15

Pro Arg Leu Ser Lys Ile Thr Gly Pro Leu Ala Leu Pro Thr Thr Gly
          20              25              30

```

ES 2 548 146 T3

Arg Ala His Tyr Asp Val Tyr Ser Cys Leu Pro Ile Thr Leu Leu His
35 40 45

Leu Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser His
50 55 60

Ile Arg Tyr Arg Lys Leu Leu Gly Tyr Ser His Gln Arg Pro Arg Leu
65 70 75 80

Gln Lys Gly Thr His Ser Ser Arg Gln Val Ala Ala Leu Pro Leu Val
85 90 95

Pro Arg Ser Ser Thr Leu Asp Lys Tyr Val Ala Phe Phe Thr Ala Val
100 105 110

Phe Phe Ile Leu Leu Val Gly Ser Phe Arg Phe Leu Asp Val Ala Ala
115 120 125

Gly Thr Lys Ile Pro Leu His Leu Val Lys Ser Leu Leu Leu Ser Lys
130 135 140

Ile Arg Lys Pro Leu Glu Val Arg Ser Ser Thr Leu Phe Gln Thr Phe
145 150 155 160

Leu Ala Thr Asn Lys Ile Ile Lys Lys Gly Asp Trp Lys Leu Pro Tyr
165 170 175

Phe Val Phe Leu Leu Leu Gly Arg Ile Ile Lys Gly Glu His Pro Pro
180 185 190

Leu Met Gly Leu Arg Ala Ala Phe Leu Ala Trp His Phe His
195 200 205

<210> 9

<211> 1767

<212> ADN

5 <213> Circovirus MAP tipo B

<220>

<223> Hebra de polaridad + (5'-3')

<400> 9

accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgccagca 60
agaagaatgg aagaagcgga ccccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatctt gattatctta 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtggtatctt ggggtgcccgc tgccacatcg 300
agaaagcgaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggcaacttac 360
tgatggagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtaccttggt ggagagcggg agtctgggtga ccgttgacaga gcagcaccct gtaacgtttg 480
tcagaaatct ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagttag cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgttg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcagaccgg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtgg 660
atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtta ttgatgactt ttatggctgg ctgcccctgg 720
atgatctact ggactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggccgcagat attctgatta ccagcaatca gaccccggtt gaatgggtact 840
cctcaactgc tgtccagct gtagaagctc tttatcgagg gattacttcc ttgggtatctt 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtctt ttttatcact tcgtaatggt 1020

ES 2 548 146 T3

ttttattatt	cattaagggt	taagtggggg	gtcttttaaaa	ttaaattctc	tgaattgtac	1080
atacatgggt	acacggatat	tgtattcctg	gtcgtatata	ctgttttcga	acgcagtgcc	1140
gaggcctacg	tggctctacat	ttccagcagt	ttgtagtctc	agccacagct	ggtttctttt	1200
ggtgttttgg	tggaagtaat	caatagttaa	atctaggaca	ggtttggggg	taaagtaccg	1260
ggagtggtag	gagaagggct	gggttatggg	atggcgggag	gagtagttta	cataggggtc	1320
ataggtgagg	gctgtggcct	ttgttacaaa	gttatcatct	aaaataacag	caactggagcc	1380
cactcccctg	tcaccctggg	tgatcgggga	gcagggccag	aattcaacct	taacctttct	1440
tattctgtag	tattcaaagg	gcacagagcg	ggggtttgac	ccccctcctg	ggggaagaaa	1500
gtcattaata	ttgaatctca	tcatgtccac	cgcccaggag	ggcgttctga	ctgtggttcg	1560
cttgacagta	tatccgaagg	tgccgggagag	gcgggtgttg	aagatgccat	ttttccttct	1620
ccagcggtaa	cggtggcggg	ggtggacgag	ccagggggcg	cgccggaggga	tctggccaag	1680
atggctgcgg	gggcggtgtc	ttcttcttcg	gtaacgcctc	cttgataacg	tcatactcta	1740
aaacgaaaga	agtgcgctgt	aagtatt				1767

<210> 10

<211> 1767

<212> ADN

5 <213> Circovirus MAP tipo B

<220>

<223> Hebra de polaridad - (5'-3')

<400> 10

aatacttaca	gcgcacttct	ttcgttttca	gatatgacgt	atccaaggag	gcgttaccca	60
agaagaagac	accgcccccg	cagccatctt	ggccagatcc	tccgcgcgcg	cccctggctc	120
gtccaccccc	gccaccgtta	ccgctggaga	aggaaaaatg	gcatcttcaa	caccgcctc	180
tccgcacact	tcgatatac	tgtcaagcga	accacagtca	gaacgcctc	ctgggcggtg	240
gacatgatga	gattcaatat	taatgacttt	cttccccag	gaggggggtc	aaacccccgc	300
tctgtgccct	ttgaatacta	cagaataaga	aagggttaagg	ttgaattctg	gccctgctcc	360
ccgatcacc	aggttgacag	gggagtgggc	tccagtgtctg	ttattttaga	tgataacttt	420
gtaacaaagg	ccacagccct	cacctatgac	ccctatgtaa	actactcctc	ccgccatacc	480
ataacccagc	ccttctccta	ccactcccgg	tactttaccc	ccaaacctgt	cctagatttc	540
actattgatt	acttccaacc	aaacaacaaa	agaaaccagc	tgtggctgag	actacaaact	600
gctggaaatg	tagaccacgt	aggcctcggc	actgcgttcg	aaaacagtat	atacgaccag	660
gaatacaata	tccgtgtaac	catgtatgta	caattcagag	aatttaattt	taaagacccc	720
ccacttaacc	cttaatgaat	aataaaaacc	attacgaagt	gataaaaaag	actcagtaat	780
ttatttccata	tggaaattca	gggcatgggg	gggaaagggt	gacgaactgg	cccccttcct	840
ccgtggattg	ttctgtagca	ttcttccaaa	ataccaagga	agtaatcctc	cgataaagag	900
cttctacagc	tgggacagca	gttgaggagt	accattccaa	cggggtctga	ttgctggtta	960
tcagaatact	gcgggccaaa	aaaggtagag	ttccaccttt	agtctctaca	gtcaatggat	1020
atcgatcaca	cagtctcagt	agatcatccc	agggcagcca	gccataaaag	tcatacaata	1080
caaccacttc	ttcaccatgg	taaccatccc	accacttggt	tctaggtggt	ttccagtatg	1140
tggtttcccg	gtctgcaaaa	ttagcagccc	atttgctttt	accacaccca	ggtggcccca	1200
caatgacgtg	tacattagtc	ttccaatcac	gcttctgcat	tttcccgtc	actttcaaaa	1260
gttcagccag	cccgcggaaa	tttctgacaa	acgttacagg	gtgctgctct	gcaacgggtca	1320
ccagactccc	gctctccaac	aaggtagtca	cagcagtaga	caggtcactc	cgttgctcct	1380
gagatctagg	agctccacac	tccatcagta	agttgccttc	tttactgcag	tattctttat	1440
tctgctgac	tggtcctttc	gctttctcga	tgtggcagcg	ggcaccacaa	taccacttca	1500
ctttattaaa	agtctgcttc	ttcacaaaat	tagcgaaccc	ctggagggtga	ggtgttcgtc	1560
cttctctatt	accctcctcg	ccaacaataa	aataatcaaa	tagggatatt	ggaagatccc	1620
gtattttctt	gcgctcgtct	tcggaaggat	tattcagagt	gaacacccac	cttttatggg	1680
gttgggggtc	gcttcttcca	ttcttcttgc	tgggcagtgt	gctgctgagg	tgctgccgag	1740
gtgctgccgc	tgccgaagtg	cgctggt				1767

10 <210> 11

<211> 945

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo B

<220>

15 <223> ORF1

<400> 11

ES 2 548 146 T3

```

atgcccagca agaagaatgg aagaagcgga ccccaacccc ataaaagggtg ggtgttctact 60
ctgaataatc cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctatct 120
gattatctta ttgttgcgga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg 180
ttcgctaatt ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtgggtatct gggtgcccgc 240
tgccacatcg agaaagcgaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa 300
ggcaacttac tgatggagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct 360
actgctgtga gtacctgtt ggagagcggg agtctgttga ccgttgcaga gcagaccct 420
gtaacgtttg tcagaaatct ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagtga cgggaaaatg 480
cagaagcggtg attggaagac taatgtacac gtcattgttg ggccacctgg gtgtggtaaa 540
agcaaatggg ctgctaattt tgcagaccgg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac 600
aagtgggtgg atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtt ttgatgactt ttatggctgg 660
ctgccctggg atgatctact gagactgtgt gatcgatct cattgactgt agagactaaa 720
gggtggaactg tacctttttt ggcccgagct attctgatta ccagcaatca gaccccgctg 780
gaatggtact cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc 840
ttggtatctt ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc 900
ctttccccc catgccctga atttccatat gaaataaatt actga 945

```

<210> 12

<211> 702

<212> ADN

5 <213> Circovirus MAP tipo B

<220>

<223> ORF2

<400> 12

```

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgaaga agaagacacc gcccccgag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caagcgaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat tcaatattaa tgactttctt 240
ccccaggag ggggggtcaaa cccccgctct gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctccccg atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
agtgtgttta ttttagatga taactttgta acaaaggcca cagccctcac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata accagccct tctcctacca ctcccgttac 480
tttaccacca aacctgtcct agatttctact attgattact tccaaccaaa caacaaaaga 540
aaccagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaattttta agacccccca cttaccctt aa 702

```

10 <210> 13

<211> 315

<212> ADN

<213> Circovirus MAP tipo B

<220>

15 <223> ORF3

<400> 13

```

atggtaacca tcccaccact tgtttctagtg tggtttccag tatgtggttt ccgggtctgc 60
aaaattagca gcccatcttc ttttaccaca ccaggtggc cccacaatga cgtgtacatt 120
agtcttccaa tcacgcttct gcattttccc gctcactttc aaaagttcag ccagcccgcg 180
gaaatttctg acaaacgtta cagggtgctg ctctgcaacg gtcaccagac tcccgtctct 240
caacaaggta ctcacagcag tagacaggtc actccgttgt ccctgagatc taggagctcc 300
acactccatc agtaa 315

```

<210> 14

<211> 314

20 <212> PRT

<213> Circovirus MAP tipo B

<400> 14

ES 2 548 146 T3

```

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 Asp 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

Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr
          85          90          95

Cys Ser Lys Glu Gly Asn Leu Leu Met 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

Ser Gly Ser Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val
          130          135          140

Arg 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 Val Ile Val Gly Pro Pro
          165          170          175

Gly Cys Gly Lys Ser Lys Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asp Pro Glu Thr
          180          185          190

Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly
          195          200          205

Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp
          210          215          220

Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys
          225          230          235          240

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

Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr
          275          280          285

Glu Gln Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro
          290          295          300

Cys Pro Glu Phe Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr
          305          310

```

<210> 15

<211> 233

<212> PRT

5 <213> Circovirus MAP tipo B

ES 2 548 146 T3

<400> 15

```

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 Arg Thr
 50           55           60

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

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val 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 Ser 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 Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
          145          150          155          160

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

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

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

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

Asn Phe Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro
          225          230

```

5 <210> 16
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Circovirus MAP tipo B
 <400> 16

10

ES 2 548 146 T3

Met Val Thr Ile Pro Pro Leu Val Ser 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
Trp Pro His Asn Asp Val Tyr Ile Ser Leu Pro Ile Thr Leu Leu His
35 40 45
Phe Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser Asp
50 55 60
Lys Arg Tyr Arg Val Leu Leu Cys Asn Gly His Gln Thr Pro Ala Leu
65 70 75 80
Gln Gln Gly Thr His Ser Ser Arg Gln Val Thr Pro Leu Ser Leu Arg
85 90 95
Ser Arg Ser Ser Thr Leu His Gln
100

5 <210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Circovirus MAP tipo B
<400> 17

Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu Pro Pro Gly
1 5 10 15

10 <210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Circovirus MAP tipo B
<400> 18

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp
15 1 5 10 15

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Circovirus MAP tipo B
20 <400> 19

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

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
25 <213> Circovirus MAP tipo B
<400> 20

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección y/o identificación en una muestra biológica de un circovirus MAP de tipo B, **caracterizado porque** comprende:
 - 5 a) poner en contacto dicha muestra biológica con un polipéptido aislado codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos una identidad del 90% con la secuencia SEC ID N° 12 y que se corresponde con el ORF2 de un circovirus de tipo B, comprendiendo dicho polipéptido un epítipo específico del circovirus MAP de tipo B presentado mediante al menos un polipéptido seleccionado entre la SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19 y SEC ID N° 20, y
 - b) detectar los complejos antígeno-anticuerpo formados eventualmente.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido aislado comprende al menos una secuencia seleccionada entre: SEC ID N° 17, SEC ID N° 18, SEC ID N° 19 y SEC ID N° 20.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos una identidad del 95% con la secuencia SEC ID N° 12
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia SEC ID N° 12.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polipéptido tiene una secuencia que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia SEC ID N° 15.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho polipéptido tiene una secuencia idéntica a la secuencia SEC ID N° 15.
- 20 7. Kit o estuche para la detección y/o identificación en una muestra biológica de un circovirus MAP de tipo B, que comprende:
 - a) un polipéptido aislado definido según una de las reivindicaciones 1 a 6, y
 - b) un reactivo para la creación de un medio adecuado para la realización de una reacción antigénica.

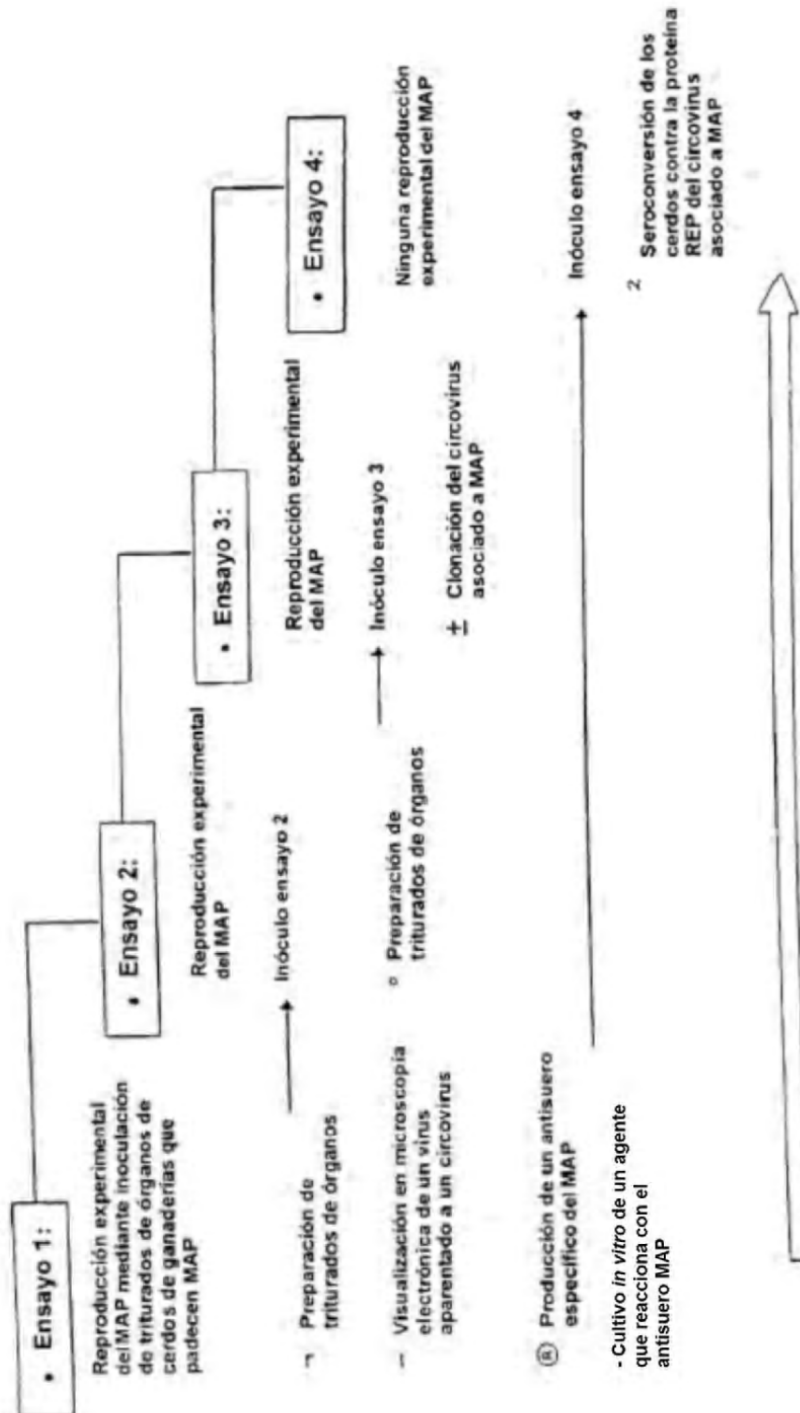


FIGURA 1

Leu Ala Ser Arg Cys Arg Cys Cys Arg Pro Leu Thr Leu Ser Phe Ala Leu Cys
 Trp Arg Val Glu Ala Ala Ala Ala Gly Arg Cys Arg *** His Phe His Trp Ala
 Gly Ala Cys Lys Pro Leu Pro Leu Val Glu Ala Ala Asp Thr Phe Ile Gly Leu

 3' TGG TCG CGT GAA GCC GTC GCC GTC GTG GAG CCG TCG CAG TCA CTT TTA CGG TTC
 9 18 27 36 45 54
 5' ACC AGC GCA CTT CGG CAG CGG CAG CAC CTC GGC AGC GTC AGT GAA AAT GCC AAG

 Thr Ser Ala Leu Arg Gln Arg Gln His Leu Gly Ser Val Ser Glu Asn Ala Lys
 Pro Ala His Phe Gly Ser Gly Ser Thr Ser Ala Ala Ser Val Lys Met Pro Ser
 Gln Arg Thr Ser Ala Ala Ala Ala Pro Arg Gln Arg Gln *** Lys Cys Gln Ala

 Ser Phe Arg Gly Ala Val Gly Tyr Ser Thr Pro Thr *** Gly *** Tyr Asp Lys
 Leu Phe Ala Ala Arg Leu Gly Met Leu Pro Pro His Glu Gly Lys Ile Ile Arg
 Leu Phe Leu Pro Gly Cys Gly Trp Leu Leu His Thr Asn Val Arg Leu Leu Gly

 GTT CTT TTC GCC GGG CGT TGG GGT ATT CTC CAC CCA CAA GTG GGA ATT ATT AGG
 63 72 81 90 99 108
 CAA GAA AAG CGG CCC GCA ACC CCA TAA GAG GTG GGT GTT CAC CCT TAA TAA TCC

 Gln Glu Lys Arg Pro Ala Thr Pro *** Glu Val Gly Val His Pro *** Ser
 Lys Lys Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro
 Arg Lys Ala Ala Arg Asn Pro Ile Arg Gly Gly Cys Ser Pro Leu Ile Ile Leu

 Arg Pro Pro Ser Phe Cys Phe Val Pro Ala Glu Leu Arg Gly Lys Gln Asn Asn
 Gly Leu Leu Leu Phe Val Phe Tyr Pro Leu Lys Trp Asp Gly Lys Lys Ile Ile
 Glu Ser Ser Ser Phe Phe Leu Ile Arg Ser Ser Gly Ile Glu Arg Lys Ser ***

 AAG GCT CCT CCT CTT TTT GTT TTA TGC CCT CGA AGG TTA GAG GGA AAA ACT AAT
 117 126 135 144 153 162
 TTC CGA GGA GGA GAA AAA CAA AAT ACG GGA GCT TCC AAT CTC CCT TTT TGA TTA

 Phe Arg Gly Gly Glu Lys Gln Asn Thr Gly Ala Ser Asn Leu Pro Phe *** Leu
 Ser Glu Glu Glu Lys Asn Lys Ile Arg Glu Leu Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr
 Pro Arg Arg Arg Lys Thr Lys Tyr Gly Ser Phe Gln Ser Pro Phe Leu Ile Ile

 Gln Lys His Arg Pro Leu Asn Pro Leu Pro Tyr Phe Glu Glu Gly Gly Pro Thr
 Lys Asn Thr Ala Leu Phe Thr Gln Phe Leu Thr Ser Ser Arg Val Glu Leu Pro
 Lys Thr Gln Pro Ser Ser Pro Lys Ser Ser Pro Leu Val Gly *** Arg Trp Pro

 AAA ACA AAC ACC GCT CCT TCC AAA CCT TCT CCC ATC TTG AGG AGT GGA GGT CCC
 171 180 189 198 207 216
 TTT TGT TTG TGG CGA GGA AGG TTT GGA AGA GGG TAG AAC TCC TCA CCT CCA GGG

 Phe Cys Leu Trp Arg Gly Arg Phe Gly Arg Gly *** Asn Ser Ser Pro Pro Gly
 Phe Val Cys Gly Glu Glu Gly Leu Glu Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly
 Leu Phe Val Ala Arg Lys Val Trp Lys Arg Val Glu Leu Leu Thr Ser Arg Gly

 Gln Ser Asn Gln *** Ser Ala Ser Lys *** Cys Pro Ser Thr Thr Asn Gln His
 Lys Arg Ile Lys Ser Leu Leu Leu Ser Lys Val Leu His Leu Pro Ile Lys Thr
 Asn Ala Phe Lys Ala Leu Phe Cys Val Lys Leu Leu Thr Phe His Tyr Lys Pro

 CAA ACG CTT AAA ACG ATT CTT CGT CTG AAA ATT GTT CCA CTT CAC CAT AAA ACC
 225 234 243 252 261 270
 GTT TGC GAA TTT TGC TAA GAA GCA GAC TTT TAA CAA GGT GAA GTG GTA TTT TGG

 Val Cys Glu Phe Cys *** Glu Ala Asp Phe *** Gln Gly Glu Val Val Phe Trp
 Phe Ala Asn Phe Ala Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly
 Leu Arg Ile Leu Leu Arg Ser Arg Leu Leu Thr Arg *** Ser Gly Ile Leu Val

FIGURA 2

Gly Ser Gly Cys Arg Ser Leu Ser Leu Phe Arg Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Ser
 Gly Ala Ala Val Asp Leu Phe Arg Phe Ser Gly Val Leu Leu Ile Phe Phe Val
 Ala Arg Gln Trp Met Ser Phe Ala Phe Pro Val Ser Trp Cys Phe Leu Ser Tyr

 ACG GGC GAC GGT GTA GCT CTT TCG CTT TCC TTG GCT GGT CGT CTT ATT TCT TAT
 279 288 297 306 315 324
 TGC CCG CTG CCA CAT CGA GAA AGC GAA AGG AAC CGA CCA GCA GAA TAA AGA ATA

 Cys Pro Leu Pro His Arg Glu Ser Glu Arg Asn Arg Pro Ala Glu *** Arg Ile
 Ala Arg Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr
 Pro Ala Ala Thr Ser Arg Lys Arg Lys Glu Pro Thr Ser Arg Ile Lys Asn Thr

 Cys Tyr Leu Leu Gly Cys Val *** Arg Thr His Leu Glu Ala Ser Gly Pro Ser
 Ala Thr Phe Phe Ala Val Tyr Lys Asp Leu Thr Ser Ser Arg Pro Val Leu Pro
 Gln Leu Leu Ser Pro Trp Met Ser Ile Ser His Pro Ala Gly Arg Phe Trp Pro

 GAC GTC ATT TCT TCC GGT GTA TGA ATA GCT CAC ACC TCG AGG CGC CTT GGT CCC
 333 342 351 360 369 378
 CTG CAG TAA AGA AGG CCA CAT ACT TAT CGA GTG TGG AGC TCC GCG GAA CCA GGG

 Leu Gln *** Arg Arg Pro His Thr Tyr Arg Val Trp Ser Ser Ala Glu Pro Gly
 Cys Ser Lys Glu Gly His Ile Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Asn Gln Gly
 Ala Val Lys Lys Ala Thr Tyr Leu Ser Ser Val Glu Leu Arg Gly Thr Arg Gly

 Ala Cys Arg Gly Thr *** Gln Gln Ser Tyr Gly Lys Pro Ser Pro Thr Lys Pro
 Leu Ala Ala Val Gln Arg Ser Ser His Thr Gly Lys Gln Leu Arg Pro Arg Gln
 Phe Arg Leu Ser Arg Asp Val Ala Thr Leu Val Arg Lys Ser Val Pro Asp Lys

 CTT CGC GTC GCT GGA CAG ATG ACG ACA CTC ATG GGA AAA CCT CTG CCC CAG AAA
 387 396 405 414 423 432
 GAA GCG CAG CGA CCT GTC TAC TGC TGT GAG TAC CCT TTT GGA GAC GGG GTC TTT

 Glu Ala Gln Arg Pro Val Tyr Cys Cys Glu Tyr Pro Phe Gly Asp Gly Val Phe
 Lys Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu Thr Gly Ser Leu
 Ser Ala Ala Thr Cys Leu Leu Leu *** Val Pro Phe Trp Arg Arg Gly Leu Trp

 Ser Gln Leu Arg Ala Thr Glu Gln Leu Thr His Ser Phe Asn Gly Arg Ala Pro
 His Ser Tyr Gly Leu Leu Lys Arg Tyr Arg Ile His Ser Ile Glu Ala Pro Gln
 Thr Val Thr Ala Ser Cys Asn Gly Thr Val Tyr Thr Leu Phe Lys Arg Pro Ser

 CCA CTG ACA TCG GCT CGT CAA AGG ACA TTG CAT ACA CTC TTT AAA GGC GCC CGA
 441 450 459 468 477 486
 GGT GAC TGT AGC CGA GCA GTT TCC TGT AAC GTA TGT GAG AAA TTT CCG CGG GCT

 Gly Asp Cys Ser Arg Ala Val Ser Cys Asn Val Cys Glu Lys Phe Pro Arg Ala
 Val Thr Val Ala Glu Gln Phe Pro Val Thr Tyr Val Arg Asn Phe Arg Gly Leu
 *** Leu *** Pro Ser Ser Phe Leu *** Arg Met *** Glu Ile Ser Ala Gly Trp

 Gln Val Lys Ser Leu Ser Arg Ser Ser Ala Ala Ala His Asn Ser Ser Leu Gln
 Ser Phe Lys Gln Phe His Ala Pro Leu His Leu Leu Thr Ile Pro Leu Cys Ser
 Ala Ser Ser Lys Phe Thr Leu Pro Phe Ile Cys Cys Arg Ser Gln Phe Val Ala

 CCG ACT TGA AAA CTT TCA CTC GCC CTT CTA CGT CGT CGC ACT AAC CTT CTG TCG
 495 504 513 522 531 540
 GGC TGA ACT TTT GAA AGT GAG CCG GAA GAT GCA GCA GCG TGA TTG GAA GAC AGC

 Gly *** Thr Phe Glu Ser Glu Arg Glu Asp Ala Ala Ala *** Leu Glu Asp Ser
 Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Gln Arg Asp Trp Lys Thr Ala
 Leu Asn Phe *** Lys *** Ala Gly Arg Cys Ser Ser Val Ile Gly Arg Gln Leu

FIGURA 2 (continuación 1)

Val Arg *** Leu Pro Gly Ala Arg Asn His Ser Ser Gly Thr Pro Gly Tyr Asn
 Tyr Val Asp Tyr His Ala Arg Gly Thr Thr Pro Leu Ala Leu Pro Gly Thr Ile
 Thr Cys Thr Met Thr Pro Gly Gly Pro Gln Pro Phe Leu Trp His Ala Arg Leu

 ACA TGT GCA GTA TCA CCC GGG CGG GCC AAC ACC CTT CTC GGT CAC CCG GGC ATT
 549 558 567 576 585 594
 TGT ACA CGT CAT AGT GGG CCC GCC CGG TTG TGG GAA GAG CCA GTG GGC CCG TAA

 Cys Thr Arg His Ser Gly Pro Ala Arg Leu Trp Glu Glu Pro Val Gly Pro ***
 Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly Lys Ser Gln Trp Ala Arg Asn
 Tyr Thr Ser *** Trp Ala Arg Pro Val Val Gly Arg Ala Ser Gly Pro Val Ile

Gln Gln Ala *** Pro Cys Arg Ser Ser Ala *** Tyr Phe Tyr Thr Thr Pro His
 Lys Ser Leu Arg Pro Val Gly Val Pro Leu Arg Thr Ser Ile Leu Pro Pro Ile
 Lys Ala Ser Gly Leu Ser Val *** Gln Phe Gly Leu Leu Phe Leu His His Ser

 AAA ACG ACT CGG ATC CCT GTG GAT GAC CTT CGG ATC ATC TTT ATT CAC CAC CCT
 603 612 621 630 639 648
 TTT TGC TGA GCC TAG GGA CAC CTA CTG GAA GCC TAG TAG AAA TAA GTG GTG GGA

 Phe Cys *** Ala *** Gly His Leu Leu Glu Ala *** *** Lys *** Val Val Gly
 Phe Ala Glu Pro Arg Asp Thr Tyr Trp Lys Pro Ser Arg Asn Lys Trp Trp Asp
 Leu Leu Ser Leu Gly Thr Pro Thr Gly Ser Leu Val Glu Ile Ser Gly Gly Met

Ile Asp His Leu Leu Leu Gln Gln Lys Pro His Asn Lys His Ser Thr Val Lys
 Ser Ile Met Ser Phe Phe Asn Asn Asn Gln Ile Ile Lys Ile Ala Pro *** Arg
 Pro Tyr *** Pro Ser Ser Thr Thr Thr Lys Ser Ser Lys *** Pro Gln Asn Gly

 ACC TAT AGT ACC TCT TCT TCA ACA ACA AAA CCT ACT AAA AAT ACC GAC CAA TGG
 657 666 675 684 693 702
 TGG ATA TCA TGG AGA AGA AGT TGT TGT TTT GCA TGA TTT TTA TGG CTG GTT ACC

 Trp Ile Ser Trp Arg Arg Ser Cys Cys Phe Gly *** Phe Leu Trp Leu Val Thr
 Gly Tyr His Gly Glu Glu Val Val Val Leu Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro
 Asp Ile Met Glu Lys Lys Leu Leu Phe Trp Met Ile Phe Met Ala Gly Tyr Leu

Pro His Asp Val Ser Val Thr His Gly Thr Asp Met Ser Gln Leu Ser *** Leu
 Pro Ile Ile *** Gln Ser Gln Thr Val Pro Ile Trp Gln Ser Tyr Leu Ser Phe
 Gln Ser Ser Arg Ser Leu Ser His Ser Arg Tyr Gly Asn Val Thr Ser Val Leu

 AAC CCT ACT AGA TGA CTC TGA CAC ACT GGC CAT AGG TAA CTG ACA TCT CTG ATT
 711 720 729 738 747 756
 TTG GGA TGA TCT ACT GAG ACT GTG TGA CCG GTA TCC ATT GAC TGT AGA GAC TAA

 Leu Gly *** Ser Thr Glu Thr Val *** Pro Val Ser Ile Asp Cys Arg Asp ***
 Trp Asp Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys
 Gly Met Ile Tyr *** Asp Cys Val Thr Gly Ile His *** Leu *** Arg Leu Lys

Pro Tyr Gln Glu Lys Lys Pro Gly Cys Tyr Lys Ser *** Trp Cys Asp Pro Gly
 Pro Thr Ser Asn Arg Lys Gln Gly Ala Thr Asn Gln Asn Gly Ala Ile Leu Gly
 Pro Pro Val Thr Gly Lys Lys Ala Arg Leu Ile Lys Ile Val Leu Leu *** Ala

 TCC CCC ATG ACA AGG AAA AAA CCG GGC GTC ATA AAA CTA ATG GTC GTT AGT CCG
 765 774 783 792 801 810
 AGG GGG TAC TGT TCC TTT TTT GGC CCG CAG TAT TTT GAT TAC CAG CAA TCA GGC

 Arg Gly Tyr Cys Ser Phe Phe Gly Pro Gln Tyr Phe Asp Tyr Gln Gln Ser Gly
 Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn Gln Ala
 Gly Val Leu Phe Leu Phe Trp Pro Ala Val Phe *** Leu Pro Ala Ile Arg Pro

FIGURA 2 (continuación 2)

Gly Pro Ile Thr Ser Arg Leu Gln Gln Gly Leu Gln Leu Leu Glu Arg Asp Ser
 Gly Leu Phe Pro Val Gly *** Ser Ser Asp Trp Ser Tyr Phe Ser Glu Ile Pro
 Gly Trp Ser His Tyr Glu Glu Val Ala Thr Gly Ala Thr Ser Ala Arg *** Arg

 GGG GGT CCT TAC CAT GAG GAG TTG ACG ACA GGG TCG ACA TCT TCG AGA GAT AGC
 819 828 837 846 855 864
 CCC CCA GGA ATG GTA CTC CTC AAC TGC TGT CCC AGC TGT AGA AGC TCT CTA TCG

 Pro Pro Gly Met Val Leu Leu Asn Cys Cys Pro Ser Cys Arg Ser Ser Leu Ser
 Pro Gln Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu Ala Leu Tyr Arg
 Pro Arg Asn Gly Thr Pro Gln Leu Leu Ser Gln Leu *** Lys Leu Ser Ile Gly

Ser *** *** Lys Ala Ile Lys Ser Ser Gln Gln Leu Val Ile Trp Pro Pro Val
 Pro Asn Ser Ser Gln Leu Lys Pro Leu Ser Ser Ser Phe Leu Gly Arg Leu Tyr
 Leu Ile Val Val Lys Cys Asn Gln Phe Val Ala Pro Ser Cys Asp Val Ser Thr

 CTC CTA ATG ATG AAA CGT TAA AAC CTT CTG ACG ACC TCT TGT TAG GTG CCT CCA
 873 882 891 900 909 918
 GAG GAT TAC TAC TTT GCA ATT TTG GAA GAC TGC TGG AGA ACA ATC CAC GGA GGT

 Glu Asp Tyr Tyr Phe Ala Ile Leu Glu Asp Cys Trp Arg Thr Ile His Gly Gly
 Arg Ile Thr Thr Thr Leu Gln Phe Thr Lys Thr Ala Gly Glu Gln Ser Thr Glu Val
 Gly Leu Leu Leu Cys Asn Phe Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asn Pro Arg Arg Tyr

Arg Leu Gly Ile Gln Leu Leu Pro Gly Val Arg His Gly Lys Gly Met Tyr Phe
 Gly Phe Ala Ser Lys Phe Cys His Val Trp Gly Thr Gly Lys Glu Trp Ile Phe
 Gly Ser Pro Arg Asn Ser Ala Thr Ser Gly Gly Gln Ala Arg Lys Gly Tyr Leu

 TGG GCT TCC GGC TAA ACT TCG TCA CCT GGG TGG GAC ACG GGA AAA GGG TAT ATT
 927 936 945 954 963 972
 ACC CGA AGG CCG ATT TGA AGC AGT GGA CCC ACC CTG TGC CCT TTT CCC ATA TAA

 Thr Arg Arg Pro Ile *** Ser Ser Gly Pro Thr Leu Cys Pro Phe Pro Ile ***
 Pro Glu Gly Arg Phe Glu Ala Val Asp Pro Pro Cys Ala Leu Phe Pro Tyr Lys
 Pro Lys Ala Asp Leu Lys Gln Trp Thr His Pro Val Pro Phe Ser His Ile Lys

Leu Asn Ser Leu Arg Lys Gln *** *** Met Thr Ile Thr Lys Ile Lys Ile ***
 Tyr Ile Val Ser Asp Lys Lys Asn Asp Cys Arg Leu Pro Lys *** Lys *** Glu
 Ile Phe *** Gln Thr Lys Lys Thr Ile Val Asp Tyr His Asn Lys Asn Lys Asn

 TTA TTT AAT GAC TCA GAA AAA ACA ATA GTG TAG CAT TAC CAA AAA TAA AAA TAA
 981 990 999 1008 1017 1026
 AAT AAA TTA CTG AGT CTT TTT TGT TAT CAC ATC GTA ATG GTT TTT ATT TTT ATT

 Asn Lys Leu Leu Ser Leu Phe Cys Tyr His Ile Val Met Val Phe Ile Phe Ile
 Ile Asn Tyr *** Val Phe Phe Val Ile Thr Ser *** Trp Phe Leu Phe Leu Phe
 *** Ile Thr Glu Ser Phe Leu Leu Ser His Arg Asn Gly Phe Tyr Phe Tyr Ser

Lys Ser Pro Arg Glu Pro Tyr Ile Arg Gln Ile Thr Cys Leu Tyr Asp Val Lys
 Asn Leu Pro Asp Lys Leu Ile Phe Glu Arg Phe Gln Val Tyr Ile Thr Leu Arg
 Met *** Leu Thr Lys *** Ser Leu Asn Glu Ser Asn Tyr Met Phe Leu *** Gly

 GTA AAT CTC CCA GAA AGT CCT ATT TAA GAG ACT TAA CAT GTA TTT ATC AGT TGG
 1035 1044 1053 1062 1071 1080
 CAT TTA GAG GGT CTT TCA GGA TAA ATT CTC TGA ATT GTA CAT AAA TAG TCA ACC

 His Leu Glu Gly Leu Ser Gly *** Ile Leu *** Ile Val His Lys *** Ser Thr
 Ile *** Arg Val Phe Gln Asp Lys Phe Ser Glu Leu Tyr Ile Asn Ser Gln Pro
 Phe Arg Gly Ser Phe Arg Ile Asn Ser Leu Asn Cys Thr *** Ile Val Asn Leu

FIGURA 2 (continuación 3)

Gly Cys Leu Lys Pro Ser His Asn Cys Lys Pro Ala Cys Leu Gly Pro Arg His
 Val Val Tyr Asn Gln Ala Thr Thr Ala Asn Gln Leu Ala Tyr Gly Leu Gly Thr
 *** Trp Met Ile Lys Pro Gln Pro Gln Met Lys Ser Arg Met Ala Trp Ala Gln

 AAT GGT GTA TTA AAA CCC GAC ACC AAC GTA AAA CCT CGC GTA TCG GGT CCG GAC
 1089 1098 1107 1116 1125 1134
 TTA CCA CAT AAT TTT GGG CTG TGG TTG CAT TTT GGA GCG CAT AGC CCA GGC CTG

 Leu Pro His Asn Phe Gly Leu Trp Leu His Phe Gly Ala His Ser Pro Gly Leu
 Tyr His Ile Ile Leu Gly Cys Gly Cys Ile Leu Glu Arg Ile Ala Gln Ala Cys
 Thr Thr *** Phe Trp Ala Val Val Ala Phe Trp Ser Ala *** Pro Arg Pro Val

Ala Arg Cys Gln His Pro Tyr Lys Phe Pro Ala Val Ala Pro Lys Lys *** ***
 His Glu Val Asn Thr His Thr Asn Leu His Leu Trp Leu Gln Asn Arg Lys Asn
 Thr Ser Ser Met Pro Thr Pro Ile *** Ile Ser Gly Cys Ser Thr Glu Lys Ile

 ACA CGA GCT GTA ACC ACA CCC ATA AAT TTA CCT CGG TGT CGA CCA AAG AAA ATA
 1143 1152 1161 1170 1179 1188
 TGT GCT CGA CAT TGG TGT GGG TAT TTA AAT GGA GCC ACA GCT GGT TTC TTT TAT

 Cys Ala Arg His Trp Cys Gly Tyr Leu Asn Gly Ala Thr Ala Gly Phe Phe Tyr
 Val Leu Asp Ile Gly Val Gly Ile *** Met Glu Pro Gln Leu Val Ser Phe Ile
 Cys Ser Thr Leu Val Trp Val Phe Lys Trp Ser His Ser Trp Phe Leu Leu Leu

Lys Ala Pro Val Leu *** Asn Asn Pro Arg Ala Arg Thr Gln Pro His Leu Val
 Asn Pro Gln Phe Trp Asp Ile Thr Gln Asp Leu Glu Pro Lys Pro Thr Phe Tyr
 Ile Gln Ser Ser Gly Ile Leu Gln Lys Thr *** Ser Gln Asn Pro Pro Ser Thr

 ATA AAC CGA CCT TGG TTA GTT AAC AAA CCA GAT CGA GAC CAA ACC CCC ACT TCA
 1197 1206 1215 1224 1233 1242
 TAT TTG GCT GGA ACC AAT CAA TTG TTT GGT CTA GCT CTG GTT TGG GGG TGA AGT

 Tyr Leu Ala Gly Thr Asn Gln Leu Phe Gly Leu Ala Leu Val Trp Gly *** Ser
 Ile Trp Leu Glu Pro Ile Asn Cys Leu Val *** Leu Trp Phe Gly Gly Glu Val
 Phe Gly Trp Asn Gln Ser Ile Val Trp Ser Ser Ser Gly Leu Gly Val Lys Tyr

Gln Leu Pro Leu Tyr Leu Ala Ala Lys His His Pro Pro Leu Leu Leu *** Tyr
 Arg Ser His Tyr Thr Phe Pro Gln Arg Ile Thr His Arg Ser Ser Tyr Asn Ile
 Gly Pro Thr Thr Pro Leu Pro Ser Gly *** Pro Thr Ala Pro Pro Thr Thr Leu

 TGG ACC TCA CCA TCC ATT TCC CGA CGG AAT ACC ACA CCG CCC TCC TCA TCA ATT
 1251 1260 1269 1278 1287 1296
 ACC TGG AGT GGT AGG TAA AGG GCT GCC TTA TGG TGT GGC GGG AGG AGT AGT TAA

 Thr Trp Ser Gly Arg *** Arg Ala Ala Leu Trp Cys Gly Gly Arg Ser Ser ***
 Pro Gly Val Val Gly Lys Gly Leu Pro Tyr Gly Val Ala Gly Gly Val Val Asn
 Leu Glu Trp *** Val Lys Gly Cys Leu Met Val Trp Arg Glu Glu *** Leu Ile

Leu Pro *** Leu Gly Leu Gln His Leu Pro Asn Cys Leu Gln Cys Gly Leu Tyr
 Tyr Pro Asp Tyr Ala Leu Asn Thr Ser Pro Thr Val Phe Asn Ala Asp Leu Ile
 Ile Pro Thr Met Pro Trp Thr Pro Pro Pro Pro *** Leu Thr Pro Met Trp Ser

 ATA TCC CCA GTA TCC GGT TCA ACC ACC TCC CCC AAT GTT TCA ACC GTA GGT TCT
 1305 1314 1323 1332 1341 1350
 TAT AGG GGT CAT AGG CCA AGT TGG TGG AGG GGG TTA CAA AGT TGG CAT CCA AGA

 Tyr Arg Gly His Arg Pro Ser Trp Trp Arg Gly Leu Gln Ser Trp His Pro Arg
 Ile Gly Val Ile Gly Gln Val Gly Gly Gly Gly Tyr Lys Val Gly Ile Gln Asp
 *** Gly Ser *** Ala Lys Leu Val Glu Gly Val Thr Lys Leu Ala Ser Lys Ile

FIGURA 2 (continuación 4)

Cys Cys His Val Trp Cys Arg Lys Ser *** Leu His His Pro Arg Gln Pro Leu
 Val Val Thr Ser Gly Val Gly Arg Gln Asn Ser Thr Ile Pro Asp Arg Pro Tyr
 Leu Leu Leu Pro Gly Leu Val Glu Lys Ile Leu Pro Ser Pro Thr Glu Pro Thr

 ATT GTT GTC ACC TGG GTT GTG GAG AAA CTA ATC TCC ACT ACC CCA GAG ACC CCA
 1359 1368 1377 1386 1395 1404
 TAA CAA CAG TGG ACC CAA CAC CTC TTT GAT TAG AGG TGA TGG GGT CTC TGG GGT

 *** Gln Gln Trp Thr Gln His Leu Phe Asp *** Arg *** Trp Gly Leu Trp Gly
 Asn Asn Ser Gly Pro Asn Thr Ser Leu Ile Arg Gly Asp Gly Val Ser Gly Val
 Thr Thr Val Asp Pro Thr Pro Leu *** Leu Glu Val Met Gly Ser Leu Gly ***

Ile *** Ile *** Gly Lys *** Tyr Pro Leu Ile Pro Phe Thr Pro Thr Pro Pro
 Phe Glu Tyr Lys Ala Lys Arg Ile Arg Tyr Tyr Gln Phe Arg Leu Pro Leu Pro
 Phe Asn Met Asn Leu Arg Glu Leu Val Thr Thr Asn Ser Leu Tyr Pro Tyr Pro

 TTT TAA GTA TAA ATC GGA AAG ATT ATG CCA TCA TAA CCT TTC CAT CCC CAT CCC
 1413 1422 1431 1440 1449 1458
 AAA ATT CAT ATT TAG CCT TTC TAA TAC GGT AGT ATT GGA AAG GTA GGG GTA GGG

 Lys Ile His Ile *** Pro Phe *** Tyr Gly Ser Ile Gly Lys Val Gly Val Gly
 Lys Phe Ile Phe Ser Leu Ser Asn Thr Val Val Leu Glu Arg *** Gly *** Gly
 Asn Ser Tyr Leu Ala Phe Leu Ile Arg *** Tyr Trp Lys Gly Arg Gly Arg Gly

Gln His Arg Arg Leu Pro Pro Pro Val Pro Arg His Gln Ile Glu Ala Arg ***
 Asn Thr Gly Gly Ser Pro Pro Leu Phe Gln Gly Ile Asn Phe Arg Leu Glu Asn
 Thr Pro Ala Ala Gln Pro Pro Ser Ser Ser Ala Ser Thr Ser Asp *** Ser Thr

 CCA ACC ACG GCG GAC TCC CCC CCT CCT TGA CCG GCT ACA ACT TAG AGT CGA GCA
 1467 1476 1485 1494 1503 1512
 GGT TGG TGC CGC CTG AGG GGG GGA GGA ACT GGC CGA TGT TGA ATC TCA GCT CGT

 Gly Trp Cys Arg Leu Arg Gly Gly Gly Thr Gly Arg Cys *** Ile Ser Ala Arg
 Val Gly Ala Ala *** Gly Gly Glu Glu Leu Ala Asp Val Glu Ser Gln Leu Val
 Leu Val Pro Pro Glu Gly Gly Arg Asn Trp Pro Met Leu Asn Leu Ser Ser Leu

Cys Glu Leu Ile Ala Ala Leu Thr Arg Arg Lys His His Thr Cys Ile Arg ***
 Val Asn Trp Ser Pro Gln Ser His Gly Gly Arg Ile Thr Leu Val Phe Glu Arg
 Leu Met Gly Leu His Ser Arg Thr Asp Glu Glu *** Pro Ser Tyr Leu Asn Glu

 ATT GTA AGG TTC TAC CGA CGC TCA CAG GAG GAG AAT ACC ACT CAT GTT TAA GAG
 1521 1530 1539 1548 1557 1566
 TAA CAT TCC AAG ATG GCT GCG AGT GTC CTC CTC TTA TGG TGA GTA CAA ATT CTC

 *** His Ser Lys Met Ala Ala Ser Val Leu Leu Leu Trp *** Val Gln Ile Leu
 Asn Ile Pro Arg Trp Leu Arg Val Ser Ser Ser Tyr Gly Glu Tyr Lys Phe Ser
 Thr Phe Gln Asp Gly Cys Glu Cys Pro Pro Leu Met Val Ser Thr Asn Ser Leu

Phe Pro Pro Phe Gln Leu Tyr Gly Asp Lys Pro Ala Met Gln Leu Pro Lys Gln
 Ser Leu Arg Ser Asn Phe Ile Gly Thr Lys Arg Arg Trp Arg Tyr Arg Asn Arg
 Leu Phe Ala Pro Ile Ser Ser Val Arg Arg Glu Ala Gly Asp Thr Val Thr Glu

 ATC TTT CCG CCC TTA ACT TCT ATG GGC AGA AAG CCG CGG TAG ACA TTG CCA AAG
 1575 1584 1593 1602 1611 1620
 TAG AAA GGC GGG AAT TGA AGA TAC CCG TCT TTC GGC GCC ATC TGT AAC GGT TTC

 *** Lys Gly Gly Asn *** Arg Tyr Pro Ser Phe Gly Ala Ile Cys Asn Gly Phe
 Arg Lys Ala Gly Ile Glu Asp Thr Arg Leu Ser Ala Pro Ser Val Thr Val Ser
 Glu Arg Arg Glu Leu Lys Ile Pro Val Phe Arg Arg His Leu *** Arg Phe Leu

FIGURA 2 (continuación 5)

Leu Arg Pro Thr Gly Phe Ile Thr Lys Glu Pro Pro His Lys Trp Ser Pro Gln
 Phe Ala Pro His Val Leu Tyr Pro Arg Arg Arg Leu Ile Asn Gly Leu His Ser
 Ser Pro Pro Thr Tyr Trp Ile His Asp Glu Gly Ser Ser Thr Glu Leu Ile Ala

 ACT TCC GCC CCA CAT GGT TTA TAC CAG AAG AGG CCT CCT ACA AAG GTT CTA CCG
 1629 1638 1647 1656 1665 1674
 TGA AGG CGG GGT GTA CCA AAT ATG GTC TTC TCC GGA GGA TGT TTC CAA GAT GGC

 *** Arg Arg Gly Val Pro Asn Met Val Phe Ser Gly Gly Cys Phe Gln Asp Gly
 Glu Gly Gly Val Tyr Gln Ile Trp Ser Ser Pro Glu Asp Val Ser Lys Met Ala
 Lys Ala Gly Cys Thr Lys Tyr Gly Leu Leu Arg Arg Met Phe Pro Arg Trp Leu

 Pro Pro Pro Asp Thr Lys Gln Pro Leu Ala Glu Lys Ala Val Asp Asp *** Leu
 Arg Pro Arg Thr Arg Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Pro Trp Thr Met Arg Tyr
 Ala Pro Ala Pro Gly Asp Glu Ala Thr Val Gly Gly Gln Gly Arg *** Gly Ile

 ACG CCC CCG CCC AGG CAG AAG ACG CCA TTG CCG AGG AAC CCG TGC AGT AGG ATA
 1683 1692 1701 1710 1719 1728
 TGC GGG GGC GGG TCC GTC TTC TCC GGT AAC GCC TCC TTG GCC ACG TCA TCC TAT

 Cys Gly Gly Gly Ser Val Phe Cys Gly Asn Ala Ser Leu Ala Thr Ser Ser Tyr
 Ala Gly Ala Gly Pro Ser Ser Ala Val Thr Pro Pro Trp Pro Arg His Pro Ile
 Arg Gly Arg Val Arg Leu Leu Arg *** Arg Leu Leu Gly His Val Ile Leu ***

 Leu Ser Leu Leu Ala Ser Ser Tyr Tyr
 Phe His Phe Phe His Ala Ala Thr Thr Asn
 Phe Thr Phe Ser Thr Arg Gln Gln Leu Ile

 TTT TCA CTT TCT TCA CGC GAC GAC ATC ATA A 5'
 1737 1746 1755
 AAA AGT GAA AGA AGT GCG CTG CTG TAG TAT T 3'

 Lys Ser Glu Arg Ser Ala Leu Leu *** Tyr
 Lys Val Lys Glu Val Arg Cys Cys Ser Ile
 Lys *** Lys Lys Cys Ala Ala Val Val

FIGURA 2 (continuación 6)

circopormank	1	10	20	30	40	50	50
circopormeeh	1	ACCAGCGCAC	TTCCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCGTCA	GTGAAAATGC	50
circopordfp	1	ACCAGCGCAC	TTCCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCGTCA	GTGAAAATGC	50
circopormank	51	60	70	80	90	100	100
circopormeeh	51	CAAGCAAGAA	AAGCGGCCCG	CAACCCCAT	AGAGGTGGGT	TTTCAACCTT	100
circopordfp	51	CAAGCAAGAA	AAGCGGCCCG	CAACCCCAT	AGAGGTGGGT	TTTCAACCTT	100
circopormank	101	110	120	130	140	150	150
circopormeeh	101	AATAATCCTT	CCGAGGAGGA	GAAAAACAAA	ATACGGGAGC	TCCAATCTC	150
circopordfp	101	AATAATCCTT	CCGAGGAGGA	GAAAAACAAA	ATACGGGAGC	TCCAATCTC	150
circopormank	151	160	170	180	190	200	200
circopormeeh	151	CCTTTTGTAT	FATTTTGT	SCGGAGAGGA	AGGTTTGGAA	SAGGGTAGAA	200
circopordfp	151	CCTTTTGTAT	FATTTTGT	SCGGAGAGGA	AGGTTTGGAA	SAGGGTAGAA	200
circopormank	201	210	220	230	240	250	250
circopormeeh	201	CTGCTCACCT	CCAGGGGTTT	SCGAATTTTG	CTAAGAAGCA	SACTTTTAAAC	250
circopordfp	201	CTGCTCACCT	CCAGGGGTTT	SCGAATTTTG	CTAAGAAGCA	SACTTTTAAAC	250
circopormank	251	260	270	280	290	300	300
circopormeeh	251	AAGGTGAAGT	GGTATTTTGG	FGCCCGCTGC	CACATCGAGA	SAGCGAAAGG	300
circopordfp	251	AAGGTGAAGT	GGTATTTTGG	FGCCCGCTGC	CACATCGAGA	SAGCGAAAGG	300
circopormank	301	310	320	330	340	350	350
circopormeeh	301	SACCGACCAG	CAGAATAAAG	SATACTGCAG	FAAAGAAAGGC	CACATACTTA	350
circopordfp	301	SACCGACCAG	CAGAATAAAG	SATACTGCAG	FAAAGAAAGGC	CACATACTTA	350
circopormank	351	360	370	380	390	400	400
circopormeeh	351	TCGAGTGTGG	AGCTCCGCGG	SACCGAGGGA	SGCGCAGCGA	CCTGTCTACT	400
circopordfp	351	TCGAGTGTGG	AGCTCCGCGG	SACCGAGGGA	SGCGCAGCGA	CCTGTCTACT	400
circopormank	401	410	420	430	440	450	450
circopormeeh	401	GCTGTGAGTA	CCCTTTTGG	SACGGGGTCT	TTGGTGACTG	TAGCCGAGCA	450
circopordfp	401	GCTGTGAGTA	CCCTTTTGG	SACGGGGTCT	TTGGTGACTG	TAGCCGAGCA	450
circopormank	451	460	470	480	490	500	500
circopormeeh	451	GTTCCTGT	ACGTATGTGA	GAAATTTCCG	CGGGCTGGCT	GAACCTTTGA	500
circopordfp	451	GTTCCTGT	ACGTATGTGA	GAAATTTCCG	CGGGCTGGCT	GAACCTTTGA	500
circopormank	501	510	520	530	540	550	550
circopormeeh	501	SAGTGAGCGG	GAAGATGCAG	CAGCGTGATT	SGAAGACAGC	TGTACACGTC	550
circopordfp	501	SAGTGAGCGG	GAAGATGCAG	CAGCGTGATT	SGAAGACAGC	TGTACACGTC	550
circopormank	551	560	570	580	590	600	600
circopormeeh	551	ATAGTGGGCC	CGCCCGGTTG	TGGGAAGAGC	CAGTGGGCCC	GTAAATTTTGC	600
circopordfp	551	ATAGTGGGCC	CGCCCGGTTG	TGGGAAGAGC	CAGTGGGCCC	GTAAATTTTGC	600

FIGURA 3

		610	620	630	640	650	
circopormank	601	FGAGCCTAGC	GACACCTACT	GGAAGCCTAG	FAGAAATAAG	FGGTGGGATG	650
circopormeeh	601	FGAGCCTAGG	GACACCTACT	GGAAGCCTAG	FAGAAATAAG	FGGTGGGATG	650
circopordfp	601	FGAGCCTAGG	GACACCTACT	GGAAGCCTAG	FAGAAATAAG	FGGTGGGATG	650
		660	670	680	690	700	
circopormank	651	GATATCATGG	AGAAGAAGTT	STTGTTTTGG	ATGATTTTAA	FGGCTGGTTA	700
circopormeeh	651	GATATCATGG	AGAAGAAGTT	STTGTTTTGG	ATGATTTTAA	FGGCTGGTTA	700
circopordfp	651	GATATCATGG	AGAAGAAGTT	STTGTTTTGG	ATGATTTTAA	FGGCTGGTTA	700
		710	720	730	740	750	
circopormank	701	CCTTGGGATG	ATCTACTGAG	ACTGTGTGAC	CGGTATCCAT	FGACTGTAGA	750
circopormeeh	701	CCTTGGGATG	ATCTACTGAG	ACTGTGTGAC	CGGTATCCAT	FGACTGTAGA	750
circopordfp	701	CCTTGGGATG	ATCTACTGAG	ACTGTGTGAC	CGGTATCCAT	FGACTGTAGA	750
		760	770	780	790	800	
circopormank	751	GACTAAAGGG	GGTACTGTTG	TTTTTTTGGC	TGGCAGTATT	FTGATTACCA	800
circopormeeh	751	GACTAAAGGG	GGTACTGTTG	TTTTTTTGGC	TGGCAGTATT	FTGATTACCA	800
circopordfp	751	GACTAAAGGG	GGTACTGTTG	TTTTTTTGGC	TGGCAGTATT	FTGATTACCA	800
		810	820	830	840	850	
circopormank	801	GCAATCAGGC	CCCCCAGGAA	FGGTACTCCT	CAACTGCTGT	CCAGCTGTA	850
circopormeeh	801	GCAATCAGGC	CCCCCAGGAA	FGGTACTCCT	CAACTGCTGT	CCAGCTGTA	850
circopordfp	801	GCAATCAGGC	CCCCCAGGAA	FGGTACTCCT	CAACTGCTGT	CCAGCTGTA	850
		860	870	880	890	900	
circopormank	851	GAAAGCTCTCT	ATCGGAGGAT	FACTACTTTG	CAATTTTGGG	AGACTGCTGG	900
circopormeeh	851	GAAAGCTCTCT	ATCGGAGGAT	FACTACTTTG	CAATTTTGGG	AGACTGCTGG	900
circopordfp	851	GAAAGCTCTCT	ATCGGAGGAT	FACTACTTTG	CAATTTTGGG	AGACTGCTGG	900
		910	920	930	940	950	
circopormank	901	AGAACAATCC	ACGGAGGTAC	CCGAAGGCCG	TTTTGAAGCA	GTGGACCCAC	950
circopormeeh	901	AGAACAATCC	ACGGAGGTAC	CCGAAGGCCG	TTTTGAAGCA	GTGGACCCAC	950
circopordfp	901	AGAACAATCC	ACGGAGGTAC	CCGAAGGCCG	TTTTGAAGCA	GTGGACCCAC	950
		960	970	980	990	1000	
circopormank	951	CCTGTGCCCT	TTTCCCATAT	AAAAATAATT	ACTGAGTCTT	TTTTGTTATC	1000
circopormeeh	951	CCTGTGCCCT	TTTCCCATAT	AAAAATAATT	ACTGAGTCTT	TTTTGTTATC	1000
circopordfp	951	CCTGTGCCCT	TTTCCCATAT	AAAAATAATT	ACTGAGTCTT	TTTTGTTATC	1000
		1010	1020	1030	1040	1050	
circopormank	1001	ACATCGTAAT	GGTTTTTATT	TTTATTTATT	TAGAGGGTCT	TTTAGGATAA	1050
circopormeeh	1001	ACATCGTAAT	GGTTTTTATT	TTTATTTATT	TAGAGGGTCT	TTTAGGATAA	1050
circopordfp	1001	ACATCGTAAT	GGTTTTTATT	TTTATTTATT	TAGAGGGTCT	TTTAGGATAA	1050
		1060	1070	1080	1090	1100	
circopormank	1051	ATTCTCTGAA	TTGTACATAA	ATAGTCAGCC	TTACCACATA	ATTTTGGGCT	1100
circopormeeh	1051	ATTCTCTGAA	TTGTACATAA	ATAGTCAGCC	TTACCACATA	ATTTTGGGCT	1100
circopordfp	1051	ATTCTCTGAA	TTGTACATAA	ATAGTCAGCC	TTACCACATA	ATTTTGGGCT	1100
		1110	1120	1130	1140	1150	
circopormank	1101	GTGGCTGCAT	TTTGGAGCGC	ATAGCCGAGG	CCTGTGTGCT	CGACATTGGT	1150
circopormeeh	1101	GTGGCTGCAT	TTTGGAGCGC	ATAGCCGAGG	CCTGTGTGCT	CGACATTGGT	1150
circopordfp	1101	GTGGCTGCAT	TTTGGAGCGC	ATAGCCGAGG	CCTGTGTGCT	CGACATTGGT	1150
		1160	1170	1180	1190	1200	
circopormank	1151	GTGGGTATTT	AAATGGAGCC	ACAGCTGGTT	TCTTTTATTA	TTTGGGTGGA	1200
circopormeeh	1151	GTGGGTATTT	AAATGGAGCC	ACAGCTGGTT	TCTTTTATTA	TTTGGGTGGA	1200
circopordfp	1151	GTGGGTATTT	AAATGGAGCC	ACAGCTGGTT	TCTTTTATTA	TTTGGGTGGA	1200

FIGURA 3 (continuación 1)

		1210	1220	1230	1240	1250	
circopormank	1201	ACCAATCAAT	TGTTTGGTCC	AGCTCAGGTT	TGGGGGTGAA	GTACCTGGAG	1250
circopormeeh	1201	ACCAATCAAT	TGTTTGGTCC	AGCTCAGGTT	TGGGGGTGAA	GTACCTGGAG	1250
circopordfp	1201	ACCAATCAAT	TGTTTGGTCT	AGCTCTGGTT	TGGGGGTGAA	GTACCTGGAG	1250
		1260	1270	1280	1290	1300	
circopormank	1251	TGGTAGGTAA	AGGGCTGCCT	FATGGTGTGG	CGGGAGGAGT	AGTTAATATA	1300
circopormeeh	1251	TGGTAGGTAA	AGGGCTGCCT	FATGGTGTGG	CGGGAGGAGT	AGTTAATATA	1300
circopordfp	1251	TGGTAGGTAA	AGGGCTGCCT	FATGGTGTGG	CGGGAGGAGT	AGTTAATATA	1300
		1310	1320	1330	1340	1350	
circopormank	1301	GGGGTCATAG	GCCAAGTTGG	TGGAGGGGGT	TACAAAGTTG	GCATCCAAGA	1350
circopormeeh	1301	GGGGTCATAG	GCCAAGTTGG	TGGAGGGGGT	TACAAAGTTG	GCATCCAAGA	1350
circopordfp	1301	GGGGTCATAG	GCCAAGTTGG	TGGAGGGGGT	TACAAAGTTG	GCATCCAAGA	1350
		1360	1370	1380	1390	1400	
circopormank	1351	TAAACAACAGT	GGACCCAACA	CCTCTTTCT	TAGAGGTGAT	GGGGTCTCTG	1400
circopormeeh	1351	TAAACAACAGT	GGACCCAACA	CCTCTTTGAT	TAGAGGTGAT	GGGGTCTCTG	1400
circopordfp	1351	TAAACAACAGT	GGACCCAACA	CCTCTTTGAT	TAGAGGTGAT	GGGGTCTCTG	1400
		1410	1420	1430	1440	1450	
circopormank	1401	GGGTAAAATT	CATATTTAGC	CTTTCTAATA	CGGTAGTATT	GGAAAGGTAG	1450
circopormeeh	1401	GGGTAAAATT	CATATTTAGC	CTTTCTAATA	CGGTAGTATT	GGAAAGGTAG	1450
circopordfp	1401	GGGTAAAATT	CATATTTAGC	CTTTCTAATA	CGGTAGTATT	GGAAAGGTAG	1450
		1460	1470	1480	1490	1500	
circopormank	1451	GGGTAGGGGG	TTGGTGCCGC	CTGAGGGGGG	GAGGAACTGG	CCGATGTTGA	1500
circopormeeh	1451	GGGTAGGGGG	TTGGTGCCGC	CTGAGGGGGG	GAGGAACTGG	CCGATGTTGA	1500
circopordfp	1451	GGGTAGGGGG	TTGGTGCCGC	CTGAGGGGGG	GAGGAACTGG	CCGATGTTGA	1500
		1510	1520	1530	1540	1550	
circopormank	1501	ATCTGAGGTC	GTTAACATTC	CAAGATGGCT	GCGAGTATCC	TCCTTTTATG	1550
circopormeeh	1501	ATCTGAGGTC	GTTAACATTC	CAAGATGGCT	GCGAGTATCC	TCCTTTTATG	1550
circopordfp	1501	ATCTGAGGTC	GTTAACATTC	CAAGATGGCT	GCGAGTATCC	TCCTTTTATG	1550
		1560	1570	1580	1590	1600	
circopormank	1551	GTGATACAA	ATTCTGTAGA	AGGCGGGAA	TTGAAGATAC	CCGTCTTTCG	1600
circopormeeh	1551	GTGATACAA	ATTCTGTAGA	AGGCGGGAA	TTGAAGATAC	CCGTCTTTCG	1600
circopordfp	1551	GTGATACAA	ATTCTGTAGA	AGGCGGGAA	TTGAAGATAC	CCGTCTTTCG	1600
		1610	1620	1630	1640	1650	
circopormank	1601	CGCCCATCTG	TAACGGTTTC	TGAAGGCGGG	GTGTGCCAAA	TATGGTCTTC	1650
circopormeeh	1601	CGCCCATCTG	TAACGGTTTC	TGAAGGCGGG	GTGTGCCAAA	TATGGTCTTC	1650
circopordfp	1601	CGCCCATCTG	TAACGGTTTC	TGAAGGCGGG	GTGTGCCAAA	TATGGTCTTC	1650
		1660	1670	1680	1690	1700	
circopormank	1651	TCCGGAGGAT	GTTTCCAAGA	TGGCTGCGGG	GGCGGGTCCT	TCTTCTGCGG	1700
circopormeeh	1651	TCCGGAGGAT	GTTTCCAAGA	TGGCTGCGGG	GGCGGGTCCT	TCTTCTGCGG	1700
circopordfp	1651	TCCGGAGGAT	GTTTCCAAGA	TGGCTGCGGG	GGCGGGTCCT	TCTTCTGCGG	1700
		1710	1720	1730	1740	1750	
circopormank	1701	TAACGCCTCC	TGGCCACGT	CATCCTATAA	AGTGAAAGA	AGTGGCTGC	1750
circopormeeh	1701	TAACGCCTCC	TGGCCACGT	CATCCTATAA	AGTGAAAGA	AGTGGCTGC	1750
circopordfp	1701	TAACGCCTCC	TGGCCACGT	CATCCTATAA	AGTGAAAGA	AGTGGCTGC	1750
		1760	1770	1780	1790	1800	
circopormank	1751	TGTAGTATT					1800
circopormeeh	1751	TGTAGTATT					1800
circopordfp	1751	TGTAGTATT					1800

FIGURA 3 (continuación 2)

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	MPSKKSGPQP	HKRWVFTLNN	PSEEEKNKIR	ELPISLFDYF	VCGEEGLEEG	50
circopormeeh	1	MPSKKSGPQP	HKRWVFTLNN	PSEEEKNKIR	ELPISLFDYF	VCGEEGLEEG	50
circopordfp[	1	MPSKKSGPQP	HKRWVFTLNN	PSEEEKNKIR	ELPISLFDYF	VCGEEGLEEG	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	RTAHLQGFAN	FAKKQTFNKV	KWYFGARCHI	EKAKGTOQQN	KEYCSKEGHI	100
circopormeeh	51	RTPHLQGFAN	FAKKQTFNKV	KWYFGARCHI	EKAKGTDQQN	KEYCSKEGHI	100
circopordfp[	51	RTPHLQGFAN	FAKKQTFNKV	KWYFGARCHI	EKAKGTOQQN	KEYCSKEGHI	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	IECGAPRNO	GKRSOLSTAV	STLLETGSLV	TVAEQFPVTY	VRNFRGLAEL	150
circopormeeh	101	IECGAPRNO	GKRSOLSTAV	STLLETGSLV	TVAEQFPVTY	VRNFRGLAEL	150
circopordfp[	101	IECGAPRNO	GKRSOLSTAV	STLLETGSLV	TVAEQFPVTY	VRNFRGLAEL	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	KVSGKMQR	QWKTAVHVIV	GPPGCGKSQW	ARNFAEPDT	YWKPSRNKWW	200
circopormeeh	151	KVSGKMQR	QWKTAVHVIV	GPPGCGKSQW	ARNFAEPRDT	YWKPSRNKWW	200
circopordfp[	151	KVSGKMQR	QWKTAVHVIV	GPPGCGKSQW	ARNFAEPRDT	YWKPSRNKWW	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	DGYHGEEVVV	LDDFYGWLPI	DDLRLCDRY	PLTVETKGGT	VPFLARSILI	250
circopormeeh	201	DGYHGEEVVV	LDDFYGWLPI	DDLRLCDRY	PLTVETKGGT	VPFLARSILI	250
circopordfp[	201	DGYHGEEVVV	LDDFYGWLPI	DDLRLCDRY	PLTVETKGGT	VPFLARSILI	250
		260	270	280	290	300	
circopormank	251	TSNQAPQEWY	SSTAVPAVEA	LYRRITTLQF	WKTAGEQSTE	VPEGRFEAVD	300
circopormeeh	251	TSNQAPQEWY	SSTAVPAVEA	LYRRITTLQF	WKTAGEQSTE	VPEGRFEAVD	300
circopordfp[	251	TSNQAPQEWY	SSTAVPAVEA	LYRRITTLQF	WKTAGEQSTE	VPEGRFEAVD	300
		310	320	330	340	350	
circopormank	301	PPCALFPYKI	NY				350
circopormeeh	301	PPCALFPYKI	NY				350
circopordfp[	301	PPCALFPYKI	NY				350

FIGURA 4

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	MTWPRRRYRR	RRTPRSHLG	ILRRRPYLA	HPAFNRNRYRW	RRKTGIFNCR	50
circopormeeh	1	MTWPRRRYRR	RRTPRSHLG	ILRRRPYLA	HPAFNRNRYRW	RRKTGIFNSR	50
circopordfp[	1	MTWPRRRYRR	RRTPRSHLG	ILRRRPYL	HPAFNRNRYRW	RRKTGIFNSR	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	LSKEFVLTIK	GGYSQPSWIV	ILRFNIGQF	PPSGGTNPL	PLPFQYYRIR	100
circopormeeh	51	LSKEFVLTIK	GGYSQPSWNV	ILRFNIGQF	PPSGGTNPL	PLPFQYYRIR	100
circopordfp[	51	LSKEFVLTIK	GGYSQPSWNV	ILRFNIGQF	PPSGGTNPL	PLPFQYYRIR	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	KAKYEFYPRD	PITSNORGVG	STVVILDANF	VTPSTNLAYD	PYINYSRHT	150
circopormeeh	101	KAKYEFYPRD	PITSNORGVG	STVVILDANF	VTPSTNLAYD	PYINYSRHT	150
circopordfp[	101	KAKYEFYPRD	PITSNORGVG	STVVILDANF	VTPSTNLAYD	PYINYSRHT	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	IRQPFTYHSR	YFTPKELDQ	IEWFHPNNK	RNQLWLHLNT	HTNVENTGLG	200
circopormeeh	151	IRQPFTYHSR	YFTPKELDQ	IDWFHPNNK	RNQLWLHLNT	HTNVENTGLG	200
circopordfp[	151	IRQPFTYHSR	YFTPKELDQ	IDWFHPNNK	RNQLWLHLNT	HTNVENTGLG	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	YALQNAATAQ	HYVVRLLIYV	QREFILKOP	LNK		250
circopormeeh	201	YALQNAATAQ	HYVVRLLIYV	QREFILKOP	LNK		250
circopordfp[	201	YALQNAATAQ	HYVVRLLIYV	QREFILKOP	LNK		250

FIGURA 5

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	MISIPPLIST	RLPVGVARLS	KITGPLALPT	TGRAHYOVYS	CLPITLLHLP	50
circopormeeh	1	MISIPPLIST	RLPVGVPRLS	KITGPLALPT	TGRAHYOVYS	CLPITLLHLP	50
circopordfp[	1	MISIPPLIST	RLPVGVPRLS	KITGPLALPT	TGRAHYOVYS	CLPITLLHLP	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	AMFQKFSQPA	EISHIRYREL	LGYSHQRPRL	QKGTMSRQV	AALPLVPRSS	100
circopormeeh	51	AMFQKFSQPA	EISHIRYREL	LGYSHQRPRL	QKGTMSRQV	AALPLVPRSS	100
circopordfp[	51	AMFQKFSQPA	EISHIRYR	LGYSHQRPRL	QKGTMSRQV	AALPLVPRSS	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	TLDKYVAFFT	AVFFILLVGS	FRFLDVAAGT	XIPLHLVKSL	LSKIRKPLE	150
circopormeeh	101	TLDKYVAFFT	AVFFILLVGS	FRFLDVAAGT	XIPLHLVKSL	LSKIRKPLE	150
circopordfp[	101	TLDKYVAFFT	AVFFILLVGS	FRFLDVAAGT	XIPLHLVKSL	LSKIRKPLE	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	VSSTLFQTF	SANKIIKKG	DWKLPYFVFL	LLGRIIKGEH	PPLMGLRAAF	200
circopormeeh	151	VSSTLFQTF	SANKIIKKG	DWKLPYFVFL	LLGRIIKGEH	PPLMGLRAAF	200
circopordfp[	151	VSSTLFQTF	ATIKIIKKG	DWKLPYFVFL	LLGRIIKGEH	PPLMGLRAAF	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	LAWHFH					250
circopormeeh	201	LAWHFH					250
circopordfp[	201	LAWHFH					250

FIGURA 6

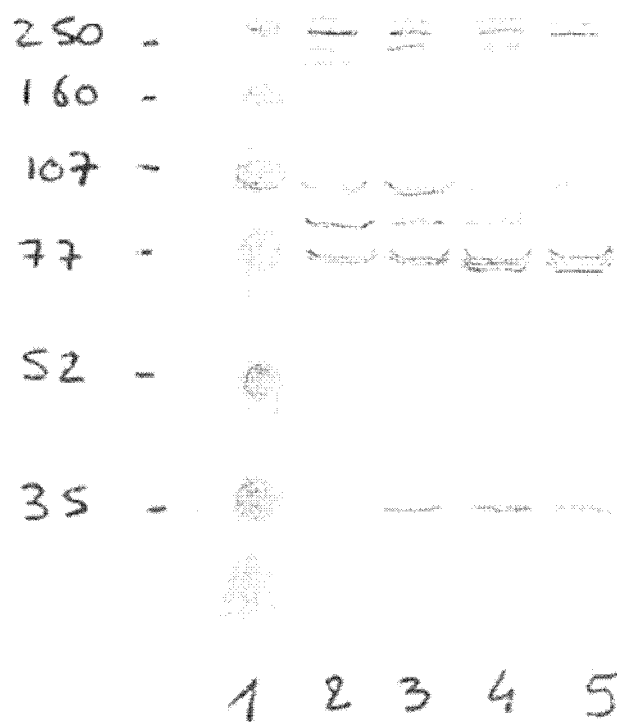


FIGURA 7

Leu Ala Ser Arg Cys Arg Cys Cys Arg Pro Leu Val Glu Ala Ala Val His Gly
 Trp Arg Val Glu Ala Ala Ala Gly Arg Cys Cys Arg Leu Leu Met Gly
 Gly Ala Cys Lys Pro Leu Pro Leu Val Glu Ala Ala Gly *** Cys Cys Cys Ala

 3' TCG TCG CGT GAA GCC GTC GCC GTC GTG CAG CCG TCG TCG AGT CGT CGT TGT ACG
 9 18 27 36 45 54
 5' ACC AGC GCA CTT CCG CAG CCG CAG CAC CTC GCG AGC ACC TCA GCA GCA ACA TCG

 Thr Ser Ala Leu Arg Gln Arg Gln His Leu Gly Ser Thr Ser Ala Ala Thr Cys
 Pro Ala His Phe Gly Ser Gly Ser Thr Ser Ala Ala Pro Gln Gln Gln His Ala
 Gln Arg Thr Ser Ala Ala Ala Ala Pro Arg Gln His Leu Ser Ser Asn Met Pro

 Ala Leu Leu Ile Ser Ser Ala Ser Gly Leu Gly Met Phe Pro Pro His Glu Ser
 Leu Leu Phe Phe Pro Leu Leu Pro Gly Trp Gly Trp Leu Leu His Thr Asn Val
 Trp Cys Ser Ser His Phe Phe Arg Val Gly Val Gly Tyr Phe Thr Pro Thr ***

 GGT CGT TCT TCT TAC CTT CTT CCG CTG GCG TTG GCG TAT TTT CCA CCC ACA AGT
 63 72 81 90 99 108
 CCA GCA AGA AGA ATG GAA GAA CCG GAC CCC AAC CCC ATA AAA GGT GCG TGT TCA

 Pro Ala Arg Arg Met Glu Glu Ala Asp Pro Asn Pro Ile Lys Gly Gly Cys Ser
 Gln Gln Glu Glu Trp Lys Lys Arg Thr Pro Thr Pro *** Lys Val Gly Val His
 Ser Lys Lys Asn Gly Arg Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe Thr

 Gln Ile Ile Arg Gly Phe Val Leu Ala Leu Phe Tyr Pro Ile Lys Trp Tyr Gly
 Arg Phe Leu Gly Glu Ser Ser Ser Arg Leu Phe Ile Arg Ser Arg Gly Ile Asp
 Glu Ser Tyr Asp Lys Arg Leu Arg Ala Cys Ser Phe Val Pro Asp Glu Leu Ile

 GAG ACT TAT TAG GAA GGC TTC TGC TCG CGT TCT TTT ATG CCC TAG AAG GTT ATA
 117 126 135 144 153 162
 CTC TGA ATA ATC CTT CCG AAG ACG AGC GCA AGA AAA TAC GGG ATC TTC CAA TAT

 Leu *** Ile Ile Leu Pro Lys Thr Ser Ala Arg Lys Tyr Gly Ile Phe Gln Tyr
 Ser Glu *** Ser Phe Arg Arg Arg Ala Gln Glu Asn Thr Gly Ser Ser Asn Ile
 Leu Asn Asn Pro Ser Glu Asp Glu Arg Lys Lys Ile Arg Asp Leu Pro Ile Ser

 *** Lys Ile Ile Lys Asn Asn Ala Leu Leu Thr Ile Leu Phe Ser Ser Cys Arg
 Arg Asn Ser *** Lys Ile Thr Pro Ser Ser Pro Leu Ser Ser Pro Arg Val Gly
 Gly Ile Gln Asn Asn *** Gln Gln Arg Pro Pro Tyr His Pro Leu Val Phe Val

 GGG ATA AAC TAA TAA AAT AAC AAC CCG TCC TCC CAT TAC TCC TTC CTG CTT GTG
 171 180 189 198 207 216
 CCC TAT TTG ATT ATT TTA TTG TTG CCG AGG AGG GTA ATG AGG AAG GAC GAA CAC

 Pro Tyr Leu Ile Ile Leu Leu Leu Ala Arg Arg Val Met Arg Lys Asp Glu His
 Pro Ile *** Leu Phe Tyr Cys Trp Arg Gly Gly *** *** Gly Arg Thr Asn Thr
 Leu Phe Asp Tyr Phe Ile Val Gly Glu Glu Gly Asn Glu Glu Gly Arg Thr Pro

 Val Glu Leu Pro Glu Ser Ile Lys His Leu Leu Leu Ser Lys Ile Phe His Leu
 *** Arg Trp Pro Asn Ala Leu Lys Thr Phe Phe Cys Val Lys Leu Leu Thr Phe
 Glu Gly Gly Pro Thr Arg *** Asn Gln Ser Ser Ala Ser Lys *** Tyr Leu Ser

 GAG TCG AGC TCC CCA AGC GAT TAA AAC ACT TCT TCG TCT GAA AAT TAT TTC ACT
 225 234 243 252 261 270
 CTC ACC TCC AGG GGT TCG CTA ATT TTG TGA AGA AGC AGA CTT TTA ATA AAG TGA

 Leu Thr Ser Arg Gly Ser Leu Ile Leu *** Arg Ser Arg Leu Leu Ile Lys ***
 Ser Pro Pro Gly Val Arg *** Phe Cys Glu Glu Ala Asp Phe *** *** Ser Glu
 His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe Val Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys

FIGURA 8

Pro Ile Gln Thr Gly Ala Ala Val Asp Leu Phe Arg Phe Ser Cys Ile Leu Leu
 His Tyr Lys Pro Ala Arg Gln Trp Met Ser Phe Ala Phe Pro Val Ser *** Cys
 Thr Thr Asn Pro His Gly Ser Gly Cys Arg Ser Leu Ser Leu Phe Leu Asp Ala
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 TCA CCA TAA ACC CAC GCG CGA CCG TGT AGC TCT TTC OCT TTC CTT GTC TAG TCG
 279 288 297 306 315 324
 AGT GGT ATT TGG GTG CCC GCT GCC ACA TCG AGA AAG CGA AAG GAA CAG ATC AGC
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Ser Gly Ile Trp Val Pro Ala Ala Thr Ser Arg Lys Arg Lys Glu Gln Ile Ser
 Val Val Phe Gly Cys Pro Leu Pro His Arg Glu Ser Glu Arg Asn Arg Ser Ala
 Trp Tyr Leu Gly Ala Arg Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln

Ile Phe Phe Val Ala Thr Phe Phe Ala Val *** Gln His Leu Thr Ser Ser Arg
 Phe Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Ser Pro Leu Lys Ser Ile Ser His Pro Ala Gly
 Ser Tyr Leu Ile Ser Cys Tyr Leu Leu Cys Ser Val Ser Pro Thr His Leu Glu
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 TCT TAT TTC TTA TGA CCG CAT TTC TTC CCG TGA ATG ACT ACC TCA CAC CTC GAG
 333 342 351 360 369 378
 AGA ATA AAG AAT ACT GCA GTA AAG AAG CCA ACT TAC TGA TGG AGT GTG CAG CTC
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Arg Ile Lys Asn Thr Ala Val Lys Lys Ala Thr Tyr *** Trp Ser Val Glu Leu
 Glu *** Arg Ile Leu Gln *** Arg Arg Gln Leu Thr Asp Gly Val Trp Ser Ser
 Asn Lys Glu Tyr Cys Ser Lys Glu Gly Asn Leu Leu Met Glu Cys Gly Ala Pro

Ser Arg Leu Ser Leu Pro Thr Val Gln Arg Ser Ser His Thr Gly Gln Gln Leu
 Leu Asp *** Pro Cys Arg Leu Ser Arg Asp Val Ala Thr Leu Val Lys Asn Ser
 *** Ile Glu Pro Val Val Ser His Gly Thr *** Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 GAT CTA GAG TCC CTG TTG CCG CAC TCG ACA GAT GAC GAC ACT CAT GGA ACA ACC
 387 396 405 414 423 432
 CTA GAT CTC AGG GAC AAC GGA GTG ACC TGT CTA CTG CTG TGA GTA CCG TGT TCG
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Leu Asp Leu Arg Asp Asn Gly Val Thr Cys Leu Leu Leu *** Val Pro Cys Trp
 *** Ile Ser Gly Thr Thr Glu *** Pro Val Tyr Cys Cys Glu Tyr Leu Val Gly
 Arg Ser Gln Gly Gln Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu

Ala Pro Thr Gln His Gly Asn Cys Leu Leu Val Arg Tyr Arg Lys Asp Ser Ile
 Leu Pro Leu Arg Thr Val Thr Ala Ser Cys Cys Gly Thr Val Asn Thr Leu Phe
 Ser Arg Ser Asp Pro Ser Arg Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Thr Gln *** Phe
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 TCT CCG CCT CAG ACC ACT GCG AAC GTC TCG TCG TCG GAC ATT GCA AAC AGT CTT
 441 450 459 468 477 486
 AGA GCG GGA GTC TCG TGA CCG TTG CAG AGC AGC ACC CTG TAA CCG TTG TCA GAA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Arg Ala Gly Val Trp *** Pro Leu Gln Ser Ser Thr Leu *** Arg Leu Ser Glu
 Glu Arg Glu Ser Gly Asp Arg Cys Arg Ala Ala Pro Cys Asn Val Cys Gln Lys
 Ser Gly Ser Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val Arg Asn

Glu Ala Pro Gln Ser Phe Lys Gln Phe His Ala Pro Phe His Leu Leu Thr Ile
 Lys Arg Pro Ser Ala Ser Ser Lys Phe Thr Leu Pro Phe Ile Cys Phe Arg Ser
 Asn Gly Arg Ala Pro Gln Val Lys Ser Leu Ser Arg Ser Phe Ala Ser Ala His
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 TAA AGG CCG CCG ACC GAC TTG AAA ACT TTC ACT CCG CCG TTT ACG TCT TCG CAC
 495 504 513 522 531 540
 ATT TCC CCG GCG TCG CTG AAC TTT TGA AAG TGA GCG GGA AAA TCG AGA AGC GTG
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Ile Ser Ala Gly Trp Leu Asn Phe *** Lys *** Ala Gly Lys Cys Arg Ser Val
 Phe Pro Arg Ala Gly *** Thr Phe Glu Ser Glu Arg Glu Asn Ala Glu Ala ***
 Phe Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Lys Arg Asp

FIGURA 8 (continuación 1)

Pro Leu Ser Ile Tyr Val Asp Asn His Pro Trp Arg Pro Thr Thr Phe Ala Phe
 Gln Phe Val Leu Thr Cys Thr Met Thr Pro Gly Gly Pro His Pro Leu Leu Leu
 Asn Ser Ser *** His Val Arg *** Gln Pro Ala Val Gln Thr His Tyr Phe Cys

 TAA CCT TCT GAT TAC ATG TGC AGT AAC ACC CCG GTG GAC CCA CAC CAT TTT CGT
 549 558 567 576 585 594
 ATT GGA AGA CTA ATG TAC ACG TCA TTG TGG GGC CAC CTG GGT GTG GTA AAA CCA

 Ile Gly Arg Leu Met Tyr Thr Ser Leu Trp Gly His Leu Gly Val Val Lys Ala
 Leu Glu Asp *** Cys Thr Arg His Cys Gly Ala Thr Trp Val Trp *** Lys Gln
 Trp Lys Thr Asn Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly Lys Ser Lys

Pro Ser Ser Ile Lys Cys Val Arg Phe Gly Cys Val Pro Phe Trp Arg Ser Val
 His Ala Ala Leu Lys Ala Ser Gly Ser Val Val Tyr Gln Phe Gly Gly Leu Phe
 Ile Pro Gln *** Asn Gln Leu Gly Pro Phe Trp Met Ser Ser Val Val *** Phe

 TTA CCC GAC GAT TAA AAC GTC TGG GCC TTT GGT GTA TGA CCT TTG GTG GAT CTT
 603 612 621 630 639 648
 AAT GGG CTG CTA ATT TTG CAG ACC CCG AAA CCA CAT ACT GGA AAC CAC CTA GAA

 Asn Gly Leu Leu Ile Leu Gln Thr Arg Lys Pro His Thr Gly Asn His Leu Glu
 Met Gly Cys *** Phe Cys Arg Pro Gly Asn His Ile Leu Glu Thr Thr *** Lys
 Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asp Pro Glu Thr Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn

Leu Pro Pro Ile Thr Val Met Thr Phe Phe His Asn Asn Asn Ile Val Lys Ile
 Leu His His Ser Pro *** Trp Pro Ser Ser Thr Thr Thr Ile Ser Ser Lys ***
 Cys Thr Thr Pro His Asn Gly His His Leu Leu Pro Gln *** Gln His Ser Lys

 TGT TCA CCA CCC TAC CAA TGG TAC CAC TTC TTC ACC AAC AAT AAC TAC TGA AAA
 657 666 675 684 693 702
 ACA AGT GGT GGG ATG GTT ACC ATG GTG AAG AAG TGG TTG TTA TTG ATG ACT TTT

 Thr Ser Gly Gly Met Val Thr Met Val Lys Lys Trp Leu Leu Leu Met Thr Phe
 Gln Val Val Gly Trp Leu Pro Trp *** Arg Ser Gly Cys Tyr *** *** Leu Leu
 Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr

Ala Pro Gln Gly Pro Ile Ile *** Gln Ser Gln Thr Ile Ser Ile Trp Gln Ser
 Pro Gln Ser Gly Gln Ser Ser Arg Ser Leu Ser His Ser Arg Tyr Gly Asn Val
 His Ser Ala Ala Arg Pro His Asp Val Ser Val Thr His Asp Ile Asp Met Ser

 TAC CGA CCG ACG GGA CCC TAC TAG ATG ACT CTG ACA CAC TAG CTA TAG GTA ACT
 711 720 729 738 747 756
 ATG GCT GGC TGC CCT GGG ATG ATC TAC TGA GAC TGT GTG ATC GAT ATC CAT TGA

 Met Ala Gly Cys Pro Gly Met Ile Tyr *** Asp Cys Val Ile Asp Ile His ***
 Trp Leu Ala Ala Leu Gly *** Ser Thr Glu Thr Val *** Ser Ile Ser Ile Asp
 Gly Trp Leu Pro Trp Asp Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr

Tyr Leu Ser Phe Thr Ser Ser Tyr Arg Lys Gln Gly Ala Thr Asn Gln Asn Gly
 Thr Ser Val Leu Pro Pro Val Thr Gly Lys Lys Ala Arg Leu Ile Arg Ile Val
 Gln Leu Ser *** Leu His Phe Gln Val Lys Lys Pro Gly Cys Tyr Glu Ser ***

 GAC ATC TCT GAT TTC CAC CTT GAC ATG GAA AAA ACC GGG CGT CAT AAG ACT AAT
 765 774 783 792 801 810
 CTG TAG AGA CTA AAG GTG GAA CTG TAC CTT TTT TGG CCC GCA GTA TTC TGA TTA

 Leu *** Arg Leu Lys Val Glu Leu Tyr Leu Phe Trp Pro Ala Val Phe *** Leu
 Cys Arg Asp *** Arg Trp Asn Cys Thr Phe Phe Gly Pro Gln Tyr Ser Asp Tyr
 Val Glu Thr Lys Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr

FIGURA 8 (continuación 2)

Ala Ile Leu Gly Arg Gln Phe Pro Val Gly *** Ser Ser Asp Trp Ser Tyr Phe
 Leu Leu *** Val Gly Asn Ser His Tyr Glu Glu Val Ala Thr Gly Ala Thr Ser
 Trp Cys Asp Ser Gly Thr Pro Ile Thr Ser Arg Leu Gln Gln Gly Leu Gln Leu
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 GGT CGT TAG TCT GCG GCA ACC TTA CCA TGA GGA GTT GAC GAC ACG GTC GAC ATC
 819 828 837 846 855 864
 CCA CCA ATC ACA CCC CGT TCG AAT GGT ACT CCT CAA CTG CTG TCC CAG CTG TAG
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Pro Ala Ile Arg Pro Arg Trp Asn Gly Thr Pro Gln Leu Leu Ser Gln Leu ***
 Gln Gln Ser Asp Pro Val Gly Met Val Leu Leu Asn Cys Cys Pro Ser Cys Arg
 Ser Asn Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Ser Lys Ile Pro Pro Asn Ser Gly Gln Tyr Lys Pro Leu Ile Ser Cys Phe Leu
 Ala Arg *** Arg Leu Ile Val Glu Lys Thr Asn Gln Phe Phe Ala Val Ser Cys
 Leu Glu Lys Asp Ser Ser *** Lys Arg Pro Ile Lys Ser Ser His *** Leu Val
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 TTC GAG AAA TAG CCT CCT AAT GAA GGA ACC ATA AAA CCT TCT TAC GAT GTC TTG
 873 882 891 900 909 918
 AAG CTC TTT ATC GGA GGA TTA CTT CCT TCG TAT TTT GGA AGA ATG CTA CAG AAC
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Lys Leu Phe Ile Gly Gly Leu Leu Pro Trp Tyr Phe Gly Arg Met Leu Gln Asn
 Ser Ser Leu Ser Glu Asp Tyr Phe Leu Gly Ile Leu Glu Glu Cys Tyr Arg Thr
 Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr Glu Gln
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Gly Arg Leu Phe Pro Ala Leu Glu Asp Gly Lys Gly Gly Trp Ala Arg Phe Lys
 Asp Val Ser Ser Pro Pro Trp Asn Thr Val Arg Glu Gly Gly His Gly Ser Asn
 Ile Trp Pro Pro Leu Pro Gly Thr Arg *** Gly Lys Gly Gly Met Gly Gln Ile
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 TTA GGT GCC TCC TTC CCC CGG TCA ACC AGT CCG AAA CCG CCG GTA CCG GAC TTA
 927 936 945 954 963 972
 AAT CCA CCG AGG AAG GCG GCC AGT TCG TCA CCC TTT CCC CCC CAT CCC CTG AAT
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Asn Pro Arg Arg Lys Gly Ala Ser Ser Ser Pro Phe Pro Pro His Ala Leu Asn
 Ile His Gly Gly Arg Gly Pro Val Arg His Pro Phe Pro Pro Met Pro *** Ile
 Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro Cys Pro Glu Phe
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Trp Ile Phe Tyr Ile Val Ser Asp Lys Lys Asp Ser Arg Leu Pro Lys *** ***
 Gly Tyr Ser Ile Phe *** Gln Thr Lys Lys Ile Val Glu Tyr His Asn Lys Asn
 Glu Met His Phe Leu Asn Ser Leu Arg Lys *** *** Lys Thr Ile Thr Lys Ile
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 AAG GTA TAC TTT ATT TAA TGA CTC AGA AAA AAT AGT GAA GCA TTA CCA AAA ATA
 981 990 999 1008 1017 1026
 TTC CAT ATG AAA TAA ATT ACT GAG TCT TTT TTA TCA CTT CGT AAT GGT TTT TAT
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Phe His Met Lys *** Ile Thr Glu Ser Phe Leu Ser Leu Arg Asn Gly Phe Tyr
 Ser Ile *** Asn Lys Leu Leu Ser Leu Phe Tyr His Phe Val Met Val Phe Ile
 Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr *** Val Phe Phe Ile Thr Ser *** Trp Phe Leu Leu
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Glu Asn Leu Thr Leu His Pro Thr Lys Leu Ile Leu Asn Glu Ser Asn Tyr Met
 Asn Met Leu Pro *** Thr Pro Pro Arg *** Phe *** Ile Arg Gln Ile Thr Cys
 Ile *** *** Pro Asn Leu Pro Pro Asp Lys Phe Asn Phe Glu Arg Phe Gln Val
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 ATA AGT AAT TCC CAA TTC ACC CCC CAG AAA TTT TAA TTT AAG AGA CTT AAC ATG
 1035 1044 1053 1062 1071 1080
 TAT TCA TTA AGG GTT AAG TCG GCG GTC TTT AAA ATT AAA TTC TCT GAA TTG TAC
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Tyr Ser Leu Arg Val Lys Trp Gly Val Phe Lys Ile Lys Phe Ser Glu Leu Tyr
 Ile His *** Gly Leu Ser Gly Gly Ser Leu Lys Leu Asn Ser Leu Asn Cys Thr
 Phe Ile Lys Gly *** Val Gly Gly Leu *** Asn *** Ile Leu *** Ile Val His
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

FIGURA 8 (continuación 3)

Cys Pro *** Val Ser Ile Thr Asn Arg Thr Thr Tyr Val Thr Lys Ser Arg Leu
Val His Asn Cys Pro Tyr Gln Ile Gly Pro Arg Ile Tyr Gln Lys Arg Val Cys
Tyr Met Thr Val Arg Ile Asn Tyr Glu Gln Asp Tyr Ile Ser Asn Glu Phe Ala

TAT GTA CCA ATG TGC CTA TAA CAT AAG GAC CAG CAT ATA TGA CAA AAG CTT GCG
1089 1098 1107 1116 1125 1134
ATA CAT GGT TAC ACG GAT ATT GTA TTC CTG GTC GTA TAT ACT GTT TTC GAA CCG

Ile His Gly Tyr Thr Asp Ile Val Phe Leu Val Val Tyr Thr Val Phe Glu Arg
Tyr Met Val Thr Arg Ile Leu Tyr Ser Trp Ser Tyr Ile Leu Phe Ser Asn Ala
Thr Trp Leu His Gly Tyr Cys Ile Pro Gly Arg Ile Tyr Cys Phe Arg Thr Gln

Ala Ser Ala *** Thr Thr *** Met Glu Leu Leu Lys Tyr Asp *** Gly Cys Ser
His Arg Pro Arg Arg Pro Arg Cys Lys Trp Cys Asn Thr Thr Glu Ala Val Ala
Thr Gly Leu Gly Val His Asp Val Asn Gly Ala Thr Gln Leu Arg Leu Trp Leu

TCA CGG CTC CGG ATG CAC CAG ATG TAA ACG TCG TCA AAC ATC AGA GTC GGT GTC
1143 1152 1161 1170 1179 1188
AGT CCC GAG GCC TAC GTG GTC TAC ATT TCC AGC AGT TTG TAG TCT CAG CCA CAG

Ser Ala Glu Ala Tyr Val Val Tyr Ile Ser Ser Ser Leu *** Ser Gln Pro Gln
Val Pro Arg Pro Thr Trp Ser Thr Phe Pro Ala Val Cys Ser Leu Ser His Ser
Cys Arg Gly Leu Arg Gly Leu His Phe Gln Gln Phe Val Val Ser Ala Thr Ala

Thr Glu Lys Thr Thr Gln Asn Ser Thr Ile Leu Leu Ser Ile *** Ser Leu Asn
Pro Lys Lys Gln Gln Lys Thr Pro Leu Leu *** Tyr His Phe Arg Pro Cys Thr
Gln Asn Arg Lys Asn Asn Pro Gln Phe Tyr Asp Ile Thr Phe Asp Leu Val Pro

GAC CAA AGA AAA CAA CAA ACC AAC CTT CAT TAG TTA TCA CTT TAG ATC CTG TCC
1197 1206 1215 1224 1233 1242
CTG GTT TCT TTT GTT GTT TGG TTG GAA GTA ATC AAT AGT GAA ATC TAG GAC ACG

Leu Val Ser Phe Val Val Trp Leu Glu Val Ile Asn Ser Glu Ile *** Asp Arg
Trp Phe Leu Leu Leu Phe Gly Trp Lys *** Ser Ile Val Lys Ser Arg Thr Gly
Gly Phe Phe Cys Cys Leu Val Gly Ser Asn Gln *** *** Asn Leu Gly Gln Val

Pro Pro Leu Thr Gly Pro Thr Thr Pro Ser Pro Ser Pro *** Pro Ile Ala Pro
Gln Pro Tyr Leu Val Pro Leu Pro Leu Leu Leu Ala Pro Asn His Tyr Pro Pro
Lys Pro Thr Phe Tyr Arg Ser His Tyr Ser Phe Pro Gln Thr Ile Thr His Arg

AAA CCC CCA TTT CAT GGC CCT CAC CAT CCT CTT CCC GAC CCA ATA CCA TAC CCG
1251 1260 1269 1278 1287 1296
TTT GGG GGT AAA GTA CCG GGA GTG GTA GGA GAA GGG CTG GGT TAT GGT ATG CCG

Phe Gly Gly Lys Val Pro Gly Val Val Gly Glu Gly Leu Gly Tyr Gly Met Ala
Leu Gly Val Lys Tyr Arg Glu Trp *** Glu Lys Gly Trp Val Met Val Trp Arg
Trp Gly *** Ser Thr Gly Ser Gly Arg Arg Arg Ala Gly Leu Trp Tyr Gly Gly

Pro Thr Thr *** Met Pro Thr Met Pro Ser Pro Gln Pro Arg Gln *** Leu Thr
Leu Leu Leu Lys Cys Leu Pro *** Leu His Pro Ser His Gly Lys Asn Cys Leu
Ser Ser Tyr Asn Val Tyr Pro Asp Tyr Thr Leu Ala Thr Ala Lys Thr Val Phe

CCT CCT CAT CAA ATG TAT CCC CAG TAT CCA CTC CCG ACA CCG GAA ACA ATG TTT
1305 1314 1323 1332 1341 1350
GGA GGA GTA GTT TAC ATA GGG GTC ATA GGT GAG GGC TGT GGC CTT TGT TAC AAA

Gly Gly Val Val Tyr Ile Gly Val Ile Gly Glu Gly Cys Gly Leu Cys Tyr Lys
Glu Glu *** Phe Thr *** Gly Ser *** Val Arg Ala Val Ala Phe Val Thr Lys
Arg Ser Ser Leu His Arg Gly His Arg *** Gly Leu Trp Pro Leu Leu Gln Ser

FIGURA 8 (continuación 4)

```

Ile Met *** Phe Leu Leu Val Pro Ala Trp Glu Gly Thr Val Arg Pro Ser Arg
*** *** Arg Phe Tyr Cys Cys Gln Leu Gly Ser Gly Gln *** Gly Pro His Asp
Asn Asp Asp Leu Ile Val Ala Ser Ser Gly Val Gly Arg Asp Gly Gln Thr Ile
---
CAA TAG TAG ATT TTA TTG TCG TGA CCT CGG GTG AGG GGA CAG TCG GAC CCA CTA
1359      1368      1377      1386      1395      1404
GTT ATC ATC TAA AAT AAC AGC ACT GGA GCC CAC TCC CCT GTC ACC CTG GGT GAT
---
Val Ile Ile *** Asn Asn Ser Thr Gly Ala His Ser Pro Val Thr Leu Gly Asp
Leu Ser Ser Lys Ile Thr Ala Leu Glu Pro Thr Pro Leu Ser Pro Trp Val Ile
Tyr His Leu Lys *** Gln His Trp Ser Pro Leu Pro Cys His Pro Gly *** Ser

Pro Ala Pro Gly Ser Asn Leu Arg Leu Arg Glu *** Glu Thr Thr Asn Leu Pro
Pro Leu Leu Ala Leu Ile *** Gly *** Gly Lys Lys Asn Gln Leu Ile *** Leu
Pro Ser Cys Pro Trp Phe Glu Val Lys Val Lys Arg Ile Arg Tyr Tyr Glu Phe
---
GCC CCT CGT CCC GGT CTT AAG TTG GAA TTG GAA AGA ATA AGA CAT CAT AAG TTT
1413      1422      1431      1440      1449      1458
CGG GGA GCA GGG CCA GAA TTC AAC CTT AAC CTT TCT TAT TCT GTA GTA TTC AAA
---
Arg Gly Ala Gly Pro Glu Phe Asn Leu Asn Leu Ser Tyr Ser Val Val Phe Lys
Gly Glu Gln Gly Gln Asn Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Leu *** Tyr Ser Lys
Gly Ser Arg Ala Arg Ile Gln Pro *** Pro Phe Leu Phe Cys Ser Ile Gln Arg

Cys Leu Ala Pro Thr Gln Gly Gly Glu Gln Pro Phe Phe Thr Met Leu Ile Ser
Ala Cys Leu Pro Pro Lys Val Gly Arg Arg Pro Ser Ser Leu *** *** Tyr Gln
Pro Val Ser Arg Pro Asn Ser Gly Gly Gly Pro Pro Leu Phe Asp Asn Ile Asn
---
CCC GTG TCT CGC CCC CAA ACT GGG GGG AGG ACC CCC TTC TTT CAG TAA TTA TAA
1467      1476      1485      1494      1503      1512
GGG CAC AGA GCG GCG GTT TGA CCC CCC TCC TCG GGG AAG AAA GTC ATT AAT ATT
---
Gly His Arg Ala Gly Val *** Pro Pro Ser Trp Gly Lys Lys Val Ile Asn Ile
Gly Thr Glu Arg Gly Phe Asp Pro Pro Pro Gly Gly Arg Lys Ser Leu Ile Leu
Ala Gln Ser Gly Gly Leu Thr Pro Leu Leu Gly Glu Glu Ser His *** Tyr ***

Asp *** *** Thr Trp Arg Gly Pro Pro Arg Glu Ser Gln Pro Glu Ser Ser Leu
Ile Glu Asp His Gly Gly Gly Leu Leu Ala Asn Gln Ser His Asn Ala Gln Cys
Phe Arg Met Met Asp Val Ala Trp Ser Pro Thr Arg Val Thr Thr Arg Lys Val
---
CTT AGA GTA GTA CAG GTG GCG GGT CCT CCC GCA AGA CTG ACA CCA AGC GAA CTG
1521      1530      1539      1548      1557      1566
GAA TCT CAT CAT GTC CAC CGC CCA GGA GGG CGT TCT GAC TGT GGT TCG CTT GAC
---
Glu Ser His His Val His Arg Pro Gly Gly Arg Ser Asp Cys Gly Ser Leu Asp
Asn Leu Ile Met Ser Thr Ala Gln Glu Gly Val Leu Thr Val Val Arg Leu Thr
Ile Ser Ser Cys Pro Pro Pro Arg Arg Ala Phe *** Leu Trp Phe Ala *** Gln

Ile Asp Ser Pro Ala Pro Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ala Met Lys Gly Glu Gly
Tyr Ile Arg Leu His Pro Leu Pro Pro His Gln Leu His Trp Lys Glu Lys Glu
Thr Tyr Gly Phe Thr Arg Ser Leu Arg Thr Asn Phe Ile Gly Asn Lys Arg Arg
---
TCA TAT AGG CTT CCA CGC CCT CTC CGC CCA CAA CTT CTA CCG TAA AAA GGA AGA
1575      1584      1593      1602      1611      1620
AGT ATA TCC GAA GGT GCG GGA GAG GCG GGT GTT GAA GAT GCC ATT TTT CCT TCT
---
Ser Ile Ser Glu Gly Ala Gly Glu Ala Gly Val Glu Asp Ala Ile Phe Pro Ser
Val Tyr Pro Lys Val Arg Glu Arg Arg Val Leu Lys Met Pro Phe Phe Leu Leu
Tyr Ile Arg Arg Cys Gly Arg Gly Gly Cys *** Arg Cys His Phe Ser Phe Ser

```

FIGURA 8 (continuación 5)

Ala Thr Val Thr Ala Pro Thr Ser Ser Gly Pro Ala Ala Ala Ser Ser Arg Ala
 Leu Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ala Leu Pro Pro Pro Pro Asp Pro
 Trp Arg Tyr Arg His Arg Pro His Val Leu Trp Pro Arg Arg Arg Leu Ile Gln

 GGT CGC CAT TGC CAC CGC CCC CAC CTG CTC GGT CCC CGC CGC CTC CTA GAC
 1629 1638 1647 1656 1665 1674
 CCA GCG GTA ACG GTG GCG GGG GTG GAC GAG CCA GCG GCG GCG GAG GAT CTG

 Pro Ala Val Thr Val Ala Gly Val Asp Glu Pro Gly Ala Ala Ala Glu Asp Leu
 Gln Arg *** Arg Trp Arg Gly Trp Thr Ser Gln Gly Arg Arg Arg Arg Ile Trp
 Ser Gly Asn Gly Gly Gly Gly Gly Arg Ala Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly

 Leu Ile Ala Ala Pro Ala Thr Asp Glu Glu Glu Thr Val Gly Gly Gln Ile Arg
 Trp Ser Pro Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys Pro Leu Ala Glu Lys Ser Val
 Gly Leu His Ser Arg Pro Arg His Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Pro Tyr

 CGG TTC TAC CGA CGC CCC CGC CAC AGA AGA AGA ACC CAT TGC CGA GGA ACC TAT
 1683 1692 1701 1710 1719 1728
 GCC AAG ATG GCT GCG GCG GCG GTG TCT TCT TCT TCG GTA ACG CCT CCT TCG ATA

 Ala Lys Met Ala Ala Gly Ala Val Ser Ser Ser Ser Val Thr Pro Pro Trp Ile
 Pro Arg Trp Leu Arg Gly Arg Cys Leu Leu Leu Arg *** Arg Leu Leu Gly Tyr
 Gln Asp Gly Cys Gly Gly Gly Val Phe Phe Phe Gly Asn Ala Ser Leu Asp Thr

 *** Ile Gln Phe Arg Phe Phe His Ala Thr Leu Ile
 Asp Tyr Arg Phe Val Phe Ser Thr Arg Gln Leu Tyr
 Thr Met Asp Ser Phe Ser Leu Leu Ala Ser Tyr Thr Asn

 GCA GTA TAG ACT TTT GCT TTC TTC ACG CGA CAT TCA TAA 5'
 1737 1746 1755 1764
 CGT CAT ATC TGA AAA CGA AAG AAG TGC GCT GTA AGT ATT 3'

 Arg His Ile *** Lys Arg Lys Lys Cys Ala Val Ser Ile
 Val Ile Ser Glu Asn Glu Arg Ser Ala Leu *** Val
 Ser Tyr Leu Lys Thr Lys Glu Val Arg Cys Lys Tyr

FIGURA 8 (continuación 6)

GMQ en gramos

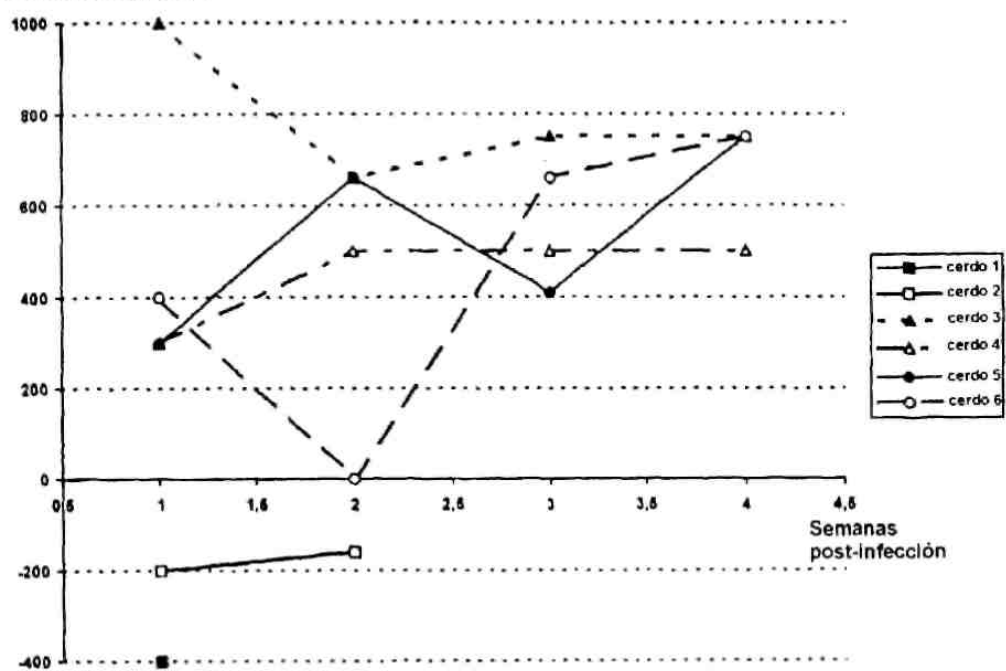


FIGURA 9

gmq : j0 - j28

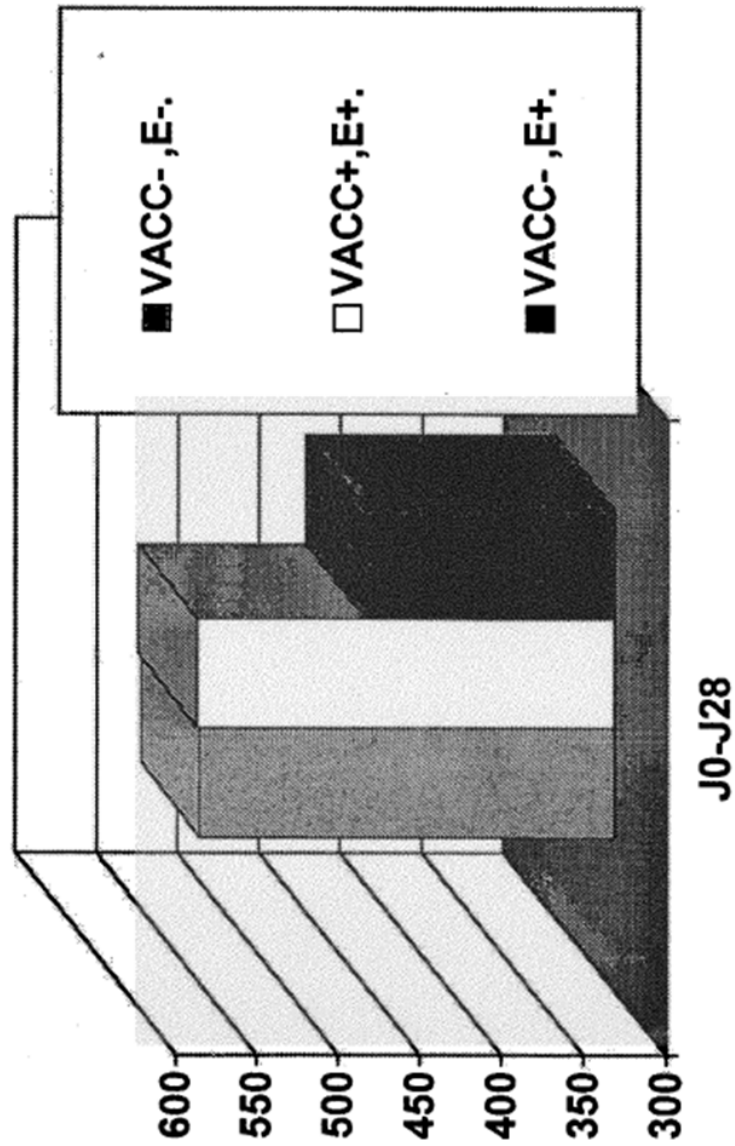


FIGURA 10

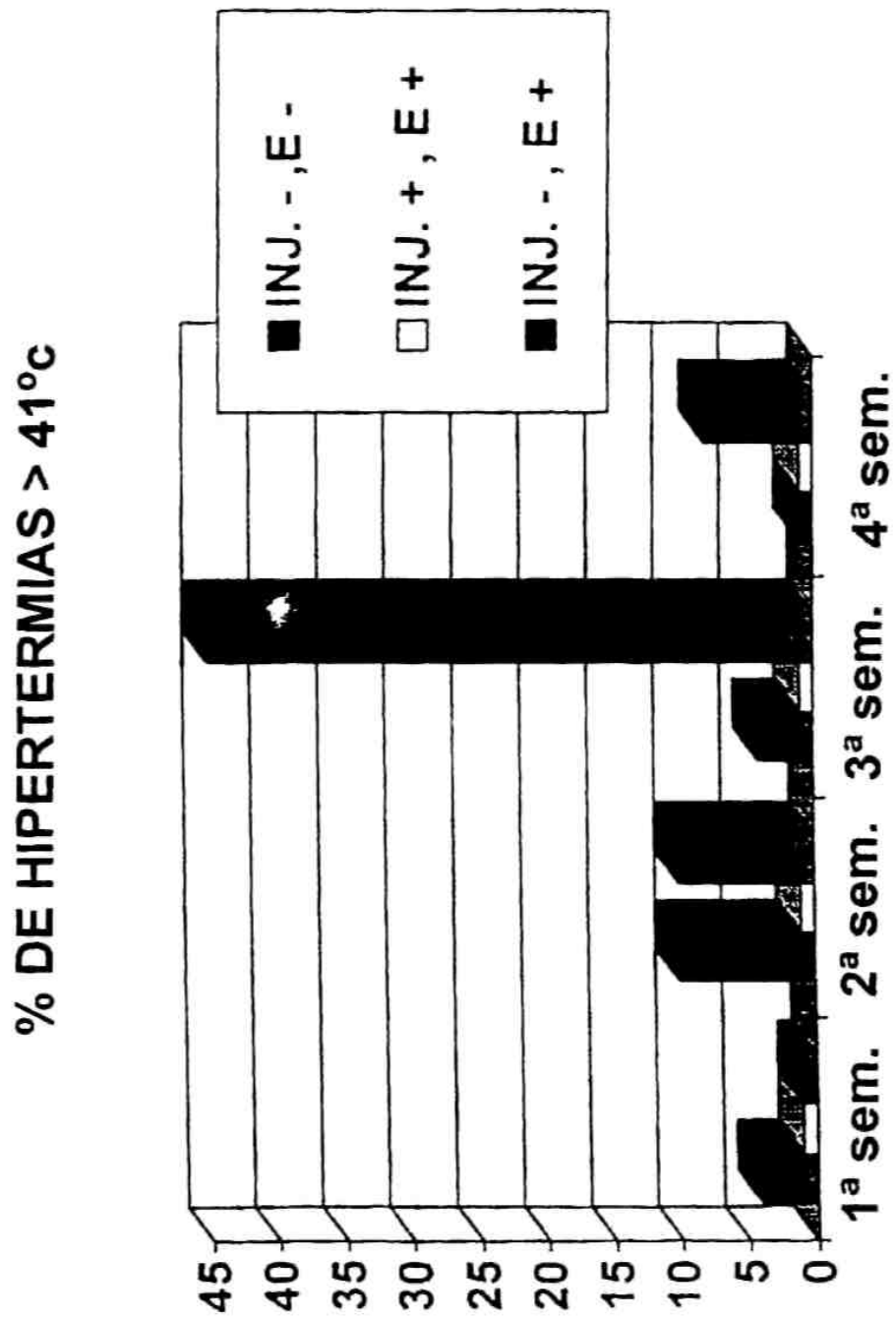
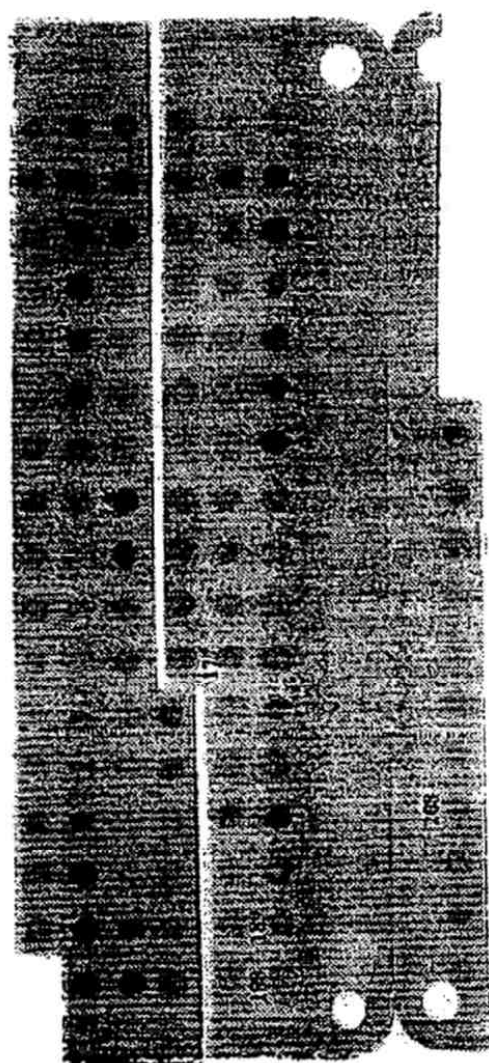


FIGURA 11



Tipo B
spol n° 104 a 159

Tipo A
spol n° 160 a 215

FIGURA 12

		50	51
1			
pcvA	MTWERRRRYRR RRTRRSHLG NILRRRPYL VHPAFRRNRYRW RRKTGIENSR LSREFVLT I. RGGHSQPSWN		
pcvB	MTYPRRRYRR RRRPRSHLG QILRRRPWL VHP..RHRYRW RRKNGIENTR LSRTFGYTVK RTTVRTPSWA		
	<u>péptido 177</u>	100	101
			<u>péptidos 188 a 189</u>
pcvA	VNELRFENIGQ FLPPSGGTNP LPLPFQYYRI RKAKYEFYPR DPITSNQRGV GSTVVILDAN FVTPSTNLAY		
pcvB	VDMRFENIND FLPPGGGSP RSVPFYYRI RKVKVEFWPC SPITQGDGRV GSSAVILDDN FVTKATALTY		<u>péptidos 132 a 133</u>
	<u>péptido 121</u>		
	150	151	péptido 208
pcvA	DPYINYSSRH TIRQPFYHS RYFTPKPELD QTICWFQPNN KRNQLWLHLN THTNVEHTGL GYALQNATTA		
pcvB	DPYVNYSSRH TITQPFYHS RYFTPKPVLD FTICYFQPNN KRNQLWLRLQ TAGNVVDHVGL GTAFENSIYD		<u>péptido 152</u>
		235	
pcvA	QNYVVRLTIY VQREFILKD P.LNE		
pcvB	QEYNIRVTMY VQREFNEKD PPLNP		

FIGURA 13