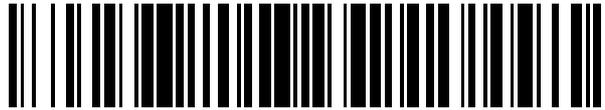


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 513**

51 Int. Cl.:

C12N 15/34 (2006.01)

C07K 14/01 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/863 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2000 E 08005549 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 1975235**

54 Título: **Vacuna de poxvirus recombinante contra el circovirus porcino**

30 Prioridad:

10.06.1999 US 138478 P

01.06.2000 US 583545

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

19.02.2016

73 Titular/es:

**MERIAL (100.0%)
29, AVENUE TONY GARNIER
69007 LYON, FR**

72 Inventor/es:

**BUBLLOT, MICHEL;
PEREZ, JENNIFER M. y
CHARREYRE, CATHERINE E.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 560 513 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

Vacuna de poxvirus recombinante contra el circovirus porcino

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a composiciones que son inmunológicas, inmunogénicas o composiciones de vacunas y/o confieren inmunidad protectora contra la infección por PCV2. La presente invención se refiere además a las utilidades de dichas composiciones.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El síndrome del desmedro multisistémico post-destete (PMWS) es una enfermedad recientemente reconocida de los cerdos jóvenes. El PMWS se caracteriza clínicamente por una pérdida progresiva de peso y otros síntomas, tales como taquipnea, siplea e ictericia. Patológicamente, se han observado infiltrados linfocíticos y granulomatosos, linfadenopatía y, más raramente, hepatitis y nefritis linfocíticas y granulomatosas (Clark, 1997; Harding, 1997).

15

[0003] Esta enfermedad se ha descrito en diferentes países europeos, así como en Norteamérica. El tratamiento y la prevención de esta enfermedad no están actualmente disponibles.

20

[0004] Varias líneas de evidencia apuntan hacia el circovirus porcino como el agente etiológico de PMWS (Ellis et al., 1998). Se han recuperado circovirus de cerdos con PMWS, y se han mostrado anticuerpos para circovirus porcino en cerdos con la enfermedad.

25

[0005] Los circovirus son virus de ADN circular monocatenario que se encuentran en una gama de especies de animales y plantas. El circovirus porcino se aisló originalmente como un contaminante de una línea continua de riñón de cerdo. El aislado del cultivo celular se ha designado como PK-15 (Meehan et al., 1997). Más recientemente, el circovirus porcino obtenido de cerdos con PMWS se ha comparado con PK-15. Dichos virus difieren sustancialmente de PK-15 a nivel de secuencia de nucleótidos y proteínas y se han designado como PCV2 (Meehan et al., 1998; Hamel et al., 1998).

30

[0006] Se han identificado hasta trece marcos de lectura abiertos (ORF) en el genoma de PCV2 (COL1 a COL13 en la solicitud de patente francesa 98 03707). Cuatro de estos ORF comparten una homología sustancial con los ORF análogos en el genoma de PK-15. ORF1 (Meehan et al., 1998; correspondiente a COL4 en la solicitud de patente francesa 98 03707), que comprende los nucleótidos 398-1342 (GenBank número de acceso AF055392), tiene el potencial de codificar una proteína con un peso molecular previsto de 37,7 kD. ORF2 (Meehan et al., 1998; correspondiente a COL13 en la solicitud de patente francesa 98 03707) que comprende los nucleótidos 1381-1768 unidos a 1-314 (GenBank número de acceso AF055392), puede codificar una proteína con un peso molecular previsto de 27,8 kD. ORF3 (Meehan et al., 1998; correspondiente a COL7 en la solicitud de patente francesa 98 03707), que comprende los nucleótidos 1018-704 (GenBank número de acceso AF055392), puede codificar una proteína con un peso molecular previsto de 11,9 kD. ORF4 (Meehan et al., 1998; correspondiente a COL10 en la solicitud de patente francesa 98 03707), que comprende los nucleótidos 912-733 (GenBank número de acceso AF055392), puede codificar una proteína con un peso molecular previsto de 6,5 kD.

40

45

[0007] ORF1 de PCV2 es altamente homólogo (identidad del 86%) con el ORF1 del aislado de PK-15 (Meehan et al., 1998). La proteína ORF1 de PK-15 se ha caracterizado parcialmente (Meehan et al., 1997; Mankertz et al., 1998a). Se sabe que es esencial para la replicación de virus y está probablemente implicado en la replicación del ADN viral.

50

[0008] La identidad en la secuencia de proteínas entre los ORF2 respectivos fue inferior (identidad del 66%) que la de los ORF1, pero cada uno de los ORF2 compartía una región N-terminal básica altamente conservada, similar a la observada en la región N-terminal de la proteína estructural principal del virus de la anemia de pollito (CAV) del circovirus aviar (Meehan et al., 1998). Recientemente, Mankertz et al. (1998b) ha sugerido que el ORF2 del aislado de PK-15 (designado ORF1 en Mankertz et al., 1998b) codifica una proteína de la cápside.

55

[0009] Se observaron mayores diferencias entre los respectivos ORF3 y ORF4 del aislado de PK-15 y PCV2- En cada caso, hubo una delección de la región C-terminal de ORF4 y ORF3 de PCV2 en comparación con el correspondiente ORF presente en el genoma del aislado de PK-15. La mayor homología en la secuencia de proteínas se observó en las regiones N-terminales de tanto ORF3 como ORF4 (Meehan et al., 1998).

60

[0010] El análisis de la transcripción del genoma de PCV2 no se ha publicado aún. Los datos recientes obtenidos con el aislado de PK-15 indicaron que el transcrito de ORF2 se corta y empalma (Mankertz et al., 1998b).

65 [0011] Se han utilizado satisfactoriamente virus vaccinia para inmunizar contra la viruela, culminando en la erradicación mundial de la viruela en 1980. Con la erradicación de la viruela, el nuevo papel de los poxvirus se ha

vuelto importante, el de vector diseñado genéticamente para la expresión de genes exógenos (Panicali y Paoletti, 1982; Paoletti et al., 1984). Los genes que codifican antígenos heterólogos se han expresado en vaccinia, dando lugar a menudo en inmunidad protectora contra la estimulación por el correspondiente patógeno (revisado en Tartaglia et al., 1990). También se ha utilizado una cepa altamente atenuada de vacunas, designada MVA, como vector para vacunas basadas en poxvirus. La utilización de MVA se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.185.146.

[0012] Dos sistemas de vectores de vacuna adicionales implican la utilización de poxvirus limitados a huéspedes naturales, poxvirus aviares (avipox). Tanto el virus de la viruela aviar (FPV; Taylor et al. 1988a, b) como el poxvirus de canario (CPV; Taylor et al., 1991 & 1992) se han diseñado para expresar de productos génicos exógenos. El virus de la viruela aviar (FPV) es el virus prototipo del género Avipox de la familia de los poxvirus. El virus causa una enfermedad de las aves de corral económicamente importante que ha estado bien controlada desde los años 20 mediante la utilización de vacunas atenuadas vivas. La replicación de los virus avipox está limitada a especies aviares (Matthews, 1982) y no existen informes en la literatura de virus avipox que causen una infección productiva en alguna especie no aviar, incluyendo el hombre. Esta limitación del huésped proporciona una barrera de seguridad inherente para la transmisión de los virus a otra especie y hace de la utilización de vectores de vacunas basadas en virus avipox en aplicaciones veterinaria y humana una proposición atractiva.

[0013] Se ha utilizado FPV de manera ventajosa como vector que expresan antígenos de patógenos de aves de corral. La proteína hemaglutinina de un virus de la gripe aviar virulenta se expresó en un FPV recombinante (Taylor et al., 1988c). Después de la inoculación del recombinante en pollitos y pavos, se indujo una respuesta inmune que era protectora contra la estimulación con virus de la gripe homólogo o heterólogo (Taylor et al., 1988c). También se han desarrollado recombinantes de FPV que expresan las glicoproteínas de superficie del Virus de la Enfermedad de Newcastle (Taylor et al., 1990 ; Edbauer et al., 1990).

[0014] Se han preparado otros poxvirus atenuados mediante modificaciones genéticas de cepas de tipo salvaje del virus. El vector NYVAC, derivado por delección de genes de virulencia específica y de diversos huéspedes de la cepa Copenhagen de vaccinia (Tartaglia et al., 1992), ha demostrado ser útil como vector recombinante en la obtención de una respuesta inmune protectora contra un antígeno exógeno expresado.

[0015] Otro vector de poxvirus diseñado en ALVAC, derivado del poxvirus de canario. ALVAC no se replica de manera productiva en huéspedes no aviares, una característica que se cree que mejora el perfil de seguridad (Taylor et al., 1991 & 1992). Tanto ALVAC como NYVAC son vectores BSL-1.

[0016] Una estrategia para el desarrollo de una vacuna de subunidad PCV2 es la utilización de vectores virales vivos para expresar ORF de PCV2 relevantes. Los poxvirus recombinantes se pueden construir en dos etapas conocidas en la técnica y análogas a los métodos para crear recombinantes sintéticos de poxvirus, tales como el virus vaccinia y virus avipox descritos en la Patente de Estados Unidos Nos. 4,769,330; 4,722,848; 4,603,112; 5,110,587; 5,174,993; 5,494,807; y 5,505,941, cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia. Debe entenderse por tanto que la disposición de un poxvirus recombinante de PCV2, y de composiciones y productos de los mismos, particularmente recombinantes de PCV2 de base ALVAC y composiciones y productos de los mismos, especialmente los recombinantes que contienen ORF 1 y/o 2 de PCV2 y composiciones y productos de los mismos, serían un avance altamente deseable sobre el estado de la tecnología actual.

45 OBJETIVOS Y DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0017] Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones y métodos para el tratamiento y profilaxis de la infección con PCV2. También es un objetivo proporcionar un medio para tratar o prevenir PMWS.

[0018] Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición inmunogénica que comprende (i) un poxvirus recombinante que comprende una molécula de ADN aislada que consiste en ORF1 y ORF2 como los ORF del circovirus porcino tipo 2 (PCV2), en la que el poxvirus es: ALVAC, o

un poxvirus de canario atenuado, en el que dicho poxvirus de canario se atenúa a través de más de 200 pases en serie sobre fibroblastos de embriones de pollitos, del que una semilla viral original se sometió a cuatro purificaciones sucesivas en placa bajo agar, de donde se amplificó un clon de placa a través de cinco pases adicionales, y (ii) un portador.

[0019] Según otro un aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de un poxvirus recombinante que comprende una molécula de ADN aislada que consiste en ORF1 y ORF2 como los ORF del circovirus porcino tipo 2 (PCV2), en la que el poxvirus es:

ALVAC, o un poxvirus de canario atenuado, en el que dicho poxvirus de canario se atenúa a través de más de 200 pases en serie sobre fibroblastos de embriones de pollito, del que una semilla viral original se sometió a cuatro purificaciones sucesivas en placa bajo agar, de donde se amplificó un clon de placa a través de cinco pases adicionales, para la preparación de una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmune contra PCV2 en un cerdo adulto,

un cerdo joven o una cerda gestante.

[0020] Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una vacuna comprende (i) un poxvirus recombinante que comprende una molécula de ADN aislada que consiste en ORF1 y ORF2 como los ORF del circovirus porcino tipo 2 (PCV2), en la que el poxvirus es:

ALVAC, o

un poxvirus de canario atenuado, en el que dicho poxvirus de canario se atenúa a través de más de 200 pases en serie sobre fibroblastos de embriones de pollito, del que una semilla viral original se sometió a cuatro purificaciones sucesivas en placa bajo agar, de donde se amplificó un clon de placa a través de cinco pases adicionales; y (ii) un portador.

[0021] Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona la composición inmunogénica de la presente invención para utilizar en el tratamiento o la prevención de PMWS o el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 en cerdo adulto, un cerdo joven o una cerda gestante.

[0022] De este modo, la presente invención se refiere a una composición antigénica, inmunológica, inmunogénica o de vacuna o una composición terapéutica para inducir una respuesta antigénica, inmunogénica o inmunológica en un animal huésped inoculado con la composición.

[0023] El poxvirus recombinante contiene y expresa una molécula de ácido nucleico exógena que codifica un ORF, antígeno, inmunógeno o epítipo de interés de PCV2, o una proteína que produce una respuesta inmunológica contra PCV2 o afecciones provocadas por PCV2, tal como PMWS. Por ejemplo, el poxvirus recombinante puede ser un poxvirus recombinante modificado; por ejemplo, tal como un poxvirus que ha inactivado en el mismo funciones genéticas codificadas por el virus, por ejemplo, funciones genéticas codificadas por el virus no esenciales, de manera que el virus recombinante tiene una virulencia atenuada y una seguridad aumentada. La descripción también proporciona los virus utilizados en la composición, así como métodos para la fabricación y usos de la composición y virus.

[0024] El virus recombinante modificado puede incluir, por ejemplo, en una región no esencial del genoma del virus, una secuencia de ADN heterólogo que codifica una proteína antigénica derivada de ORF de PCV2, es decir, ORF 1 y 2 de PCV2.

[0025] En una realización, la composición inmunogénica que contiene un poxvirus recombinante modificado que tiene funciones genéticas codificadas por el virus no esenciales inactivadas, de manera que el poxvirus recombinante tiene una virulencia atenuada y una seguridad aumentada. El virus recombinante modificado incluye, por ejemplo, en una región no esencial del genoma del virus, una secuencia de ADN heterólogo que codifica una proteína antigénica (es decir, derivada de ORFs de PCV2, ORF 1 y 2), donde la composición, cuando se administra a un huésped, es capaz de inducir una respuesta inmunológica específica para el antígeno.

[0026] En una realización adicional, el virus recombinante modificado tiene funciones genéticas codificadas por el virus no esenciales inactivadas en el mismo, de manera que el virus tiene una virulencia atenuada, y donde el virus recombinante modificado contiene además ADN de un origen heterólogo, por ejemplo, en una región no esencial del genoma del virus. El ADN codifica genes de PCV2, ORF1 y ORF2, y opcionalmente cualquiera o todos de ORF3, o ORF4 (Meehan et al., 1998), o epítipo o epítopos de interés a partir de los mismos. Las funciones genéticas se pueden inactivar mediante la delección de un marco de lectura abierto que codifica un factor de virulencia o mediante la utilización de virus limitados a huéspedes naturales.

[0027] De manera ventajosa, el marco de lectura abierto que se elimina del genoma del poxvirus o el virus se selecciona del grupo que consiste en J2R, B 13R + B14R, A26L, A56R, C7L - K1L, e I4L (según al terminología indicadas en Goebel et al., 1990); y la combinación de los mismos. En este aspecto, el marco de lectura abierto comprende un gen de timidina quinasa, una región hemorrágica, una región del cuerpo de inclusión de tipo A, un gen de hemaglutinina, una región del gen de variedad de huéspedes o una subunidad grande, ribonucleótido reductasa; o, la combinación de los mismos.

[0028] Preferiblemente, el vector del poxvirus es un ALVAC o un poxvirus de canario que se atenuó, por ejemplo, a través de mas de 200 pases en serie sobre fibroblastos de embriones de pollitos (cepa de vacuna Rentschler), del que una semilla viral original se sometió a cuatro purificaciones sucesivas en placa bajo agar, de donde se amplificó un clon de placa a través de cinco pases adicionales. (Véase también la Patente de Estados Unidos Nos. 5,756,103 y 5,766,599 con respecto a AT VAC y TROVAC (un virus de viruela aviar atenuado útil en la práctica de esta descripción); y las Patentes de Estados Unidos Nos. 6,004,777, 5,990,091, 5,770,212, 6,033,904, 5,869,312, 5,382,425, y WO 95/30018, con respecto a vectores que también se pueden utilizar en la práctica de esta descripción, tales como vectores que tienen una mayor expresión, vectores que tienen funciones eliminadas de los mismos y vectores útiles con respecto a huéspedes porcinos (por ejemplo, vectores útiles con huéspedes porcinos pueden incluir, un poxvirus, incluyendo un virus vaccinia, un virus avipox, un poxvirus de canario y un poxvirus de cerdo), así como con respecto a los términos utilizados y enseñanzas de la presente invención, tales como "composición inmunogénica", "composición inmunológica", "vacuna", y "epítipo de interés", y dosis, rutas de

administración, formulaciones, adyuvantes y suso para virus recombinantes y productos de expresión de los mismos).

5 [0029] La presente invención en un aspecto adicional se refiere al producto de expresión del poxvirus recombinante de la invención y los usos para el mismo, tales como para formar composiciones antigénicas, inmunológicas o de vacuna para el tratamiento, prevención, diagnóstico o análisis; y se describe el ADN del poxvirus recombinante que es útil en la construcción de sondas de ADN y cebadores de PCR.

10 [0030] Estas y otras realizaciones se describen o son obvios a partir de la siguiente descripción detallada y están comprendidas por la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 [0031] Se conseguirá un mejor entendimiento de la descripción haciendo referencia a los dibujos acompañantes, incorporados en la presente invención por referencia, en los que:

- La figura 1 (SEC ID NO:1) muestra la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 3,7 pares de kilobases de ADN de ALVAC que contiene el marco de lectura abierto C6.
- La figura 2 muestra el mapa del plásmido dador pJP102.
- La figura 3 (SEC ID NO:8) muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento de 2,5 pares de kilobases del plásmido dador pJP102 desde los sitios de restricción KpnI (posición 653) hasta SacI (posición 3166).
- La figura 4 muestra el mapa del plásmido dador pJP105.
- La figura 5 muestra el mapa del plásmido dador pJP107.
- La figura 6 (SEC ID NO:11) muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento de 3,6 pares de kilobases del plásmido dador pJP107 desde los sitios de restricción KpnI (posición 653) hasta SacI (posición 4255).

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 [0032] En un aspecto, la presente invención utiliza un poxvirus recombinante, que contiene en el mismo una secuencia de ADN de PCV2, por ejemplo, en una región no esencial del genoma del poxvirus. El poxvirus es de manera ventajosa un poxvirus de canario atenuado, tal como ALVAC.

35 [0033] Según la presente invención, el poxvirus recombinante expresa productos génicos del gen de PCV2 exógeno. Se insertan ORF específicos de PCV2 en el vector del poxvirus y el poxvirus recombinante resultante se utiliza para infectar un animal. La expresión en el animal de productos génicos de PCV2 da lugar a una respuesta inmune en el animal a PCV2. De este modo, el poxvirus recombinante de la presente invención se puede utilizar en una composición inmunológica o vacuna para proporcionar un medio para inducir una respuesta inmune que puede ser, aunque no necesariamente, protectora.

40 [0034] El procedimiento de administración para el poxvirus PCV2 recombinante o el producto de expresión del mismo, composiciones de la descripción, tales como composiciones inmunológicas, antigénicas o de vacuna o composiciones terapéuticas, pueden ser a través de una ruta parenteral (intradérmica, intramuscular o subcutánea). Dicha administración permite una respuesta inmune sistémica o respuestas humorales o mediadas por células.

45 [0035] Más generalmente, los poxvirus PCV2 recombinantes de la presente invención, las composiciones de poxvirus PCV2 antigénicas, inmunológicas o de vacuna o composiciones terapéuticas se pueden preparar según técnicas estándar conocidas por los expertos en el campo farmacéutico o veterinario. Dichas composiciones se pueden administrar en dosis y mediante técnicas conocidas para expertos en el campo farmacéutico o veterinario teniendo en consideración factores tales como la edad, sexo, peso, especie y condición del paciente particular y la ruta de administración. Las composiciones se pueden administrar solas o se pueden coadministrar o administrar 50 secuencialmente con composiciones, por ejemplo, con "otras" composiciones inmunológicas, antigénicas o de vacuna o terapéuticas, proporcionando así composiciones multivalentes o "cóctel" o de combinación de la presente invención y métodos que las utilizan. De nuevo, los ingredientes y forma de administración (secuencial o coadministración), así como dosis las dosificaciones, se pueden determinar teniendo en consideración factores, tales como la edad, sexo, peso, especie y condición del paciente particular y, la ruta de administración. En este aspecto, 55 se hace referencia a la Patente de Estados Unidos No. 5,843,456, dirigida a composiciones contra la rabia y composiciones de combinación y usos de las mismas.

60 [0036] Entre los ejemplos de composiciones de la presente invención se incluyen preparaciones líquidas para orificio, por ejemplo, administración oral, nasal, anal, vaginal, peroral, intragástrica, etc., tales como suspensiones, jarabes o elixires; y preparaciones para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable), tales como suspensiones estériles o emulsiones. En dichas composiciones, el poxvirus recombinante se utiliza en una mezcla íntima con un portador adecuado, y se puede utilizar con un diluyente o excipiente adecuado, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similar. Las composiciones también se pueden liofilizar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares, tales 65 como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, adyuvantes, aditivos gelificantes o aumentadores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes, y similares, dependiendo de la

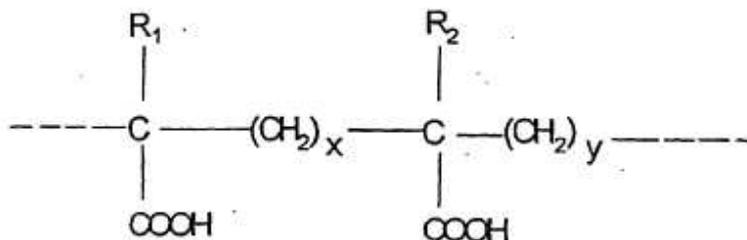
ruta de administración y la preparación deseada. Se pueden consultar textos estándar, tales como "REMINGTONS PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17a edición, 1985, para preparar preparaciones adecuadas, sin mucha experimentación. Las dosis adecuadas también se pueden basar en los siguientes Ejemplos.

5 **[0037]** Las composiciones pueden contener por lo menos un compuesto adyuvante elegido entre los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivados de alqueno.

[0038] Los compuestos adyuvantes preferidos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con éteres de polialqueno de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos por el término carbómero (Pharmeuropa Vol. 8, No. 2, Junio 1996). Los expertos en la materia pueden también referirse a la Patente de Estados Unidos No. 2,909,462 que describe dichos polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene por lo menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, estando los átomos de hidrógeno de por lo menos tres hidroxilos sustituidos por radicales alifáticos insaturados que tienen por lo menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son aquellos que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener en sí otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos comercializados bajo el nombre Carbopol® (BF Goodrich, Ohio, USA) son particularmente apropiados. Están reticulados con alil sacarosa o con alil pentaeritritol. Entre ellos, se pueden mencionar Carbopol® 974P, 934P y 971P.

20 **[0039]** Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno, se prefieren los copolímeros EMA® (Monsanto) que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno, lineales o reticulados, por ejemplo, reticulados con divinil éter. Se hace referencia a J. Fields et al., Nature, 186 : 778-780, 4 Junio 1960.

25 **[0040]** Desde el punto de vista de su estructura, los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros EMA® se forman preferiblemente de unidades básicas de la siguientes fórmula:



en la que:

- R1 y R2, que son idénticos o diferentes, representan H o CH₃

- x = 0 ó 1, preferiblemente x = 1

40 - y = 1 ó 2, con x + y = 2

[0041] Para los copolímeros EMA®, x = 0 e y = 2. Para los carbómeros, x = y = 1.

45 **[0042]** La disolución de estos polímeros en agua conduce a una solución ácida que se neutralizará, preferiblemente hasta pH fisiológico, con el fin de proporcionar la solución adyuvante en la que se incorporará la propia vacuna. Los grupos carboxilo del polímero están entonces parcialmente en forma de COO⁻.

[0043] Preferiblemente, se prepara una solución de adyuvante según la presente invención, especialmente de carbómero, en agua destilada, preferiblemente en presencia de cloruro de sodio, estando la solución obtenida a pH ácido. Esta solución madre se diluye mediante su adición a la cantidad deseada (para obtener la concentración final deseada) o una parte sustancial de la misma, de agua cargada con NaCl, preferiblemente, solución salina fisiológica (NaCl 9 g/l), rápidamente en varias partes con una neutralización concomitante o posterior (pH 7,3 a 7,4), preferiblemente con NaOH. Esta solución a pH fisiológico se utilizará tal cual para mezclarse con la vacuna, la cual se puede almacenar especialmente en forma liofilizada, líquida o congelada.

55 **[0044]** La concentración del polímero en la composición de vacuna final será de 0,01 a 2% p/v, más particularmente de 0,06 a 1% p/v, preferiblemente de 0,1 a 0,6% p/v. Las composiciones inmunológicas según la presente invención se pueden asociar a por lo menos una vacuna atenuada viva, inactivada, de subunidades o vacuna recombinante (por ejemplo, poxvirus como vector o ADN plasmídico) que expresan por lo menos un inmunógeno de otro patógeno de cerdo.

60 **[0045]** La presente invención utiliza vectores que codifican y que expresan secuencias de nucleótidos equivalentes, es decir, secuencias que no cambian ni la funcionalidad ni la especificidad de cepa (cepa de tipo 1 y cepa de tipo 2) del gen considerado o aquellas de polipéptidos codificados por este gen. Naturalmente, se incluyen las secuencias que difieren por la degeneración del código.

- [0046]** Las secuencias de PCV-2 utilizadas en los ejemplos se derivan de Meehan et al. (Cepa Imp.1010 nucleótidos de ORF1 398-1342; nucleótidos de ORF2 1381-314; y corresponden respectivamente a ORF4 y ORF13 en la solicitud de Estados Unidos de No. de Serie 09/161,092 de 25 Septiembre 1998 y a COL4 y COL13 en WO-A-9918214). Se han publicado otras cepas de PCV-2 y sus secuencias en WO-A-9918214 y se denominan Imp1008, 5 Imp999, Imp1011-48285 y Imp1011-48121, así como en A.L. Hamel et al. J. Virol. June 1998, vol 72, 6: 5262-5267 (GenBank AF027217) y en I. Morozov et al. J. Clinical Microb. Sept. 1998 vol. 36, 9: 2535-2541, así como GenBank AF086834, AF086835 y AF086836, y dan acceso a secuencias de ORF equivalentes. Estas secuencias, o ORF de las mismas, o regiones de las mismas que codifican un antígeno o epítipo de interés también se pueden utilizar en la práctica de esta invención.
- 10 **[0047]** La presente invención también comprende las secuencias equivalentes a las utilizadas en la presente invención en los documentos citados aquí; por ejemplo, las secuencias que son capaces de hibridarse a la secuencia de nucleótidos bajo condiciones de astringencia elevada (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989). Entre las secuencias equivalentes, se pueden mencionar los fragmentos génicos que conservan la inmunogenicidad 15 de la secuencia completa, por ejemplo, un epítipo de interés.
- [0048]** La homología de todo el genoma entre los tipos 1 y 2 de PCV es de aproximadamente el 75%. Para ORF1, es de aproximadamente el 86%, y para ORF2, aproximadamente el 66%. Por el contrario, las homologías ente 20 genomas y entre ORF en el tipo 2 están generalmente por encima del 95%.
- [0049]** Además, las secuencias equivalentes útiles en la práctica de la presente invención, para ORF1, son aquellas secuencias que tienen una homología igual o superior al 88%, de manera ventajosa del 90%, o superior, preferiblemente del 925 ó 95% o superior con el ORF1 de la cepa Imp1010, y para ORF2, son aquellas secuencias que tiene una homología igual o superior al 80%, de manera ventajosa del 85% o superior, preferiblemente del 90% 25 ó 95% o superior con ORF2 de la cepa Imp1010.
- [0050]** ORF1 y ORF2 según Meehan 1998 tiene el potencial de codificar proteínas con pesos moleculares previstos de 37,7 kD y 27,8 kD respectivamente. ORF3 y ORF4 (según Meehan et al. 1998, corresponden a ORF7 y ORF 10 30 respectivamente en WO-A-9918214) tienen el potencial de codificar proteínas con pesos moleculares previstos de 11,9 y 6,5 kD, respectivamente. Las secuencias de estos ORF también está disponible en Genbank AF 055392. También se pueden incorporar en plásmidos y se pueden utilizar según la descripción sola o en combinación, por ejemplo, con ORF1 y/o ORF2.
- [0051]** Los otros ORF 1-3 y 5, 6, 8-9, 11-12 descritos en la solicitud U.S. de No. de Serie 09/161,092 de 25 35 Septiembre 1998 (COLs 1-3 y 5, 6, 8-9, 11-12 en WO-A-9918214), o la región o regiones de los mismos que codifican un antígeno o epítipo de interés, se pueden utilizar en la práctica de la presente invención, por ejemplo, solos o en combinación o, en cualquier caso, entre sí o con ORFs 1 y 2 o la región o regiones de los mismos que codifican el antígeno o antígenos o epítipo o epítopos.
- 40 **[0052]** La presente invención también comprende el uso de secuencias equivalentes; por ejemplo, de ORFs de varias cepas de PCV-2 citadas aquí. Para la homología, se puede determinar que existen secuencias equivalentes que provienen de una cepa de PCV que tiene un ORF2 y/o un ORF1 que tienen una homología tal como se ha definido anteriormente con el correspondiente ORF de la cepa 1010.
- 45 **[0053]** Para ORF3 según Meehan, una secuencia equivalente tiene una homología con la misma que es de manera ventajosa, por ejemplo, igual o superior al 80%, por ejemplo 85% o superior, preferiblemente 90% o 95% o superior con ORF3 de la cepa Imp1010. Para ORF4 según Meehan 1998, de manera ventajosa una secuencia equivalente tiene una homología que es igual o superior a un 86%, de manera ventajosa al 90% o superior, preferiblemente a un 50 95% o superior con ORF4 de la cepa Imp 1010.
- [0054]** A partir de la secuencia de nucleótidos genómica, por ejemplo, las descritas en WO-A-99 18214, es rutinario determinar los ORF utilizando software estándar, tal como MacVector®. Además, la alineación de genomas con los de la cepa 1010 y la comparación con los ORF de la cepa 1010 permite a un experto en la materia determinar fácilmente los ORF del genoma de otra cepa (por ejemplo, otras cepas descritas en WO-A-99 18214 o en otros 55 documentos citados aquí).
- [0055]** La utilización de software o la alineación de secuencias no conllevan una gran experimentación y proporciona un acceso directo a ORF o moléculas de ácido nucleico equivalentes.
- 60 **[0056]** La homología en la secuencia de nucleótidos se puede determinar utilizando el programa "Align" de Myers y Miller, ("Optimal Alignments in Linear Space", CABIOS 4, 11-17, 1988, incorporado en la presente por referencia) y disponible en NCBI. Alternativa o adicionalmente, el término "homología" o "identidad", por ejemplo, con respecto a una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, puede indicar una medida cuantitativa de homología entre dos secuencias. El porcentaje en la homología de secuencia se puede calcular como $(N_{ref}-N_{dif}) * 100 / N_{ref}$, donde N_{dif} es el 65 número total de residuos no idénticos en las dos secuencias cuando se alinean y donde N_{ref} es el número de residuos en una de las secuencias. Por tanto, la secuencia de ADN AGTCAGTC tendrá una similitud de secuencia

del 75% con la secuencia AATCAATC ($N_{ref} = 8$; $N_{dif}=2$).

[0057] Alternativa o adicionalmente, "homología" o "identidad" con respecto a las secuencias puede referirse al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las dos secuencias, donde la alineación de las dos secuencias se puede determinar según el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur and Lipman, 1983 PNAS USA 80:726, incorporado en la presente por referencia), por ejemplo, utilizando una tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, una penalización por espacio de 4, y se pueden realizar de manera conveniente un análisis asistido por ordenador e interpretación de la secuencia que incluyen la alineación utilizando programas disponibles comercialmente (por ejemplo, Intelligenetics TMSuite, Intelligenetics Inc. CA). Cuando se dice que las secuencias de ARN son similares, o tienen un grado de identidad u homología de la secuencia con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN.

[0058] Las secuencias de ARN en el alcance de la presente invención se pueden derivar de secuencias de ADN, considerando la timidina (T) en la secuencia de ADN igual a uracilo (U) en las secuencias de ARN.

[0059] Adicional o alternativamente, la similitud o identidad u homología de la secuencia de aminoácidos se puede determinar utilizando el programa BlastP (Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402, incorporado en la presente invención) y disponible en NCBI. Las siguientes referencias (incorporadas en la presente por referencia) proporcionan algoritmos para comparar la identidad u homología relativa de residuos de aminoácidos de dos proteínas y adicionalmente o alternativamente, con respecto a lo anterior, las enseñanzas en estas referencias se pueden utilizar para determinar el porcentaje de homología o identidad: Needleman SB y Wunsch CD, "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins," J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970); Smith TF y Waterman MS, "Comparison of Bio-sequences " Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981); Smith TF, Waterman MS y Sadler JR, "Statistical characterization of nucleic acid sequence functional domains," Nucleic Acids Res, 11:2205-2220 (1983); Feng DF y Dolittle RF, "Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees," J. of Molec. Evol., 25: 351-360, (1987); Higgins DG y Sharp PM, "Fast and sensitive multiple sequence alignment on a microcomputer," CABIOS 5: 151-153 (1989); Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ, "ClusterW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acid Res., 22:4673-480 (1994); y, Devereux J, Haeblerle P and Smithies O, "A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX," Nucl. Acids Res., 12: 387-395 (1984).

[0060] La presente invención no sólo permite la administración en cerdos adultos, sino también en los jóvenes y en hembras gestantes; en el último caso, esto hace posible, en particular, conferir inmunidad pasiva a los recién nacidos (anticuerpos maternos). Preferiblemente, las cerdas se inoculan antes de la reproducción; y/o antes de aparearse y/o durante la gestación. De manera ventajosa, se realiza por lo menos una inoculación antes de aparearse y preferiblemente va seguido de una inoculación a realizar durante la gestación, por ejemplo, aproximadamente a la mitad de la gestación (aproximadamente 6-8 semanas de gestación) y/o al final de la gestación (aproximadamente 11-13 semanas de gestación). De este modo, una pauta ventajosa es una inoculación antes de engendrar y/o aparearse y una inoculación de refuerzo durante la gestación. A continuación, puede haber una reinoculación antes de cada apareamiento y/o durante la gestación en aproximadamente la mitad de la gestación y/o al final de la gestación. Preferiblemente, las reinoculaciones son durante la gestación. Los cerdos también se pueden inocular, por ejemplo, antes del apareamiento.

[0061] Los lechones, tales como lechones de hembras vacunadas (por ejemplo, inoculadas tal como se describe aquí), se inoculan en las primeras semanas de vida, por ejemplo, inoculación en la semana uno y/o dos y/o tres y/o cuatro y/o cinco de vida. Preferiblemente, los lechones se inoculan en primer lugar en la primera semana de vida o en la tercera semana de vida (por ejemplo, en el momento del destete). De manera ventajosa, dichos lechones se refuerzan a continuación de dos a cuatro semanas después.

[0062] La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos ilustrativos no limitantes.

EJEMPLOS

[0063] La presente invención en una realización preferida se refiere a poxvirus recombinantes que contienen en el mismo una secuencia de ADN de PCV2 en una región no esencial del genoma de poxvirus. Los productos génicos que expresan los poxvirus recombinantes del gen PCV2 exógeno. En particular, se aislaron los genes de ORF2 y ORF1 que codifican las proteínas de PCV2, se caracterizaron y se insertaron en recombinantes de ALVAC (vector de poxvirus de canario). Las técnicas de biología molecular utilizadas son las descritas por Sambrook et al. (1989).

[0064] Líneas celulares y cepas de virus. La cepa de PCV2 designada como Imp:1010-Stoon se ha descrito previamente (Meehan et al., 1998). Se aisló a partir de tejidos de nódulos linfáticos mesentéricos de un cerdo enfermo originario de Canadá. La clonación del genoma de PCV2 se describió por Meehan et al. (1998). El plásmido pGem7ZImp1010-Stoon-EcoRI No. 14 contiene el genoma de PCV2 como un fragmento EcoRI insertado en el sitio EcoRI del plásmido pGem-7Z (Promega, Madison, WI). La secuencia de nucleótidos completa de la cepa de PCV-2

Imp.1010-Stoon PCV2 fue determinada por Meehan et al. (1998) y es capaz bajo el número de acceso de GenBank AF055392.

5 **[0065]** El poxvirus de canario parental (cepa Rentschler) es una cepa de vacuna para canarios. La cepa de vacuna se obtuvo de un aislado de tipo salvaje y se atenuó a través de más de 200 pases en serie sobre fibroblastos de embriones de pollitos. Se sometió una la semilla viral original a cuatro purificaciones sucesivas en placa bajo agar y se amplificó un clon de placa a través de cinco pases adicionales, después de lo cual se utilizó el virus original como virus parental en las pruebas de recombinación in vitro. El aislado de poxvirus de canario purificado en placa se designó como ALVAC. ALVAC se depositó el 14 de noviembre de 1996 bajo los términos del Tratado de Budapest
10 en la American Type Culture Collection, ATCC número de acceso VR-2547.

[0066] La generación de recombinantes del poxvirus implica diferentes etapas: (a) construcción de un plásmido de inserción que contiene secuencias ("brazos") que flanquean el locus de inserción en el genoma del poxvirus, y un sitio de clonación múltiple (MCS) localizado ente los dos brazos flanqueantes (por ejemplo, véase el Ejemplo 1); (2)
15 construcción de plásmidos dadores que consisten en un plásmido de inserción en el MCS en el que se ha insertado un cassette de expresión de genes exógenos (por ejemplo, véase los ejemplos 2 a 5); (3) recombinación in vitro en cultivo celular entre los brazos del plásmido dador y el genoma del poxvirus parental que permite la inserción del cassette de expresión de genes exógenos en el locus apropiado del genoma del poxvirus, y la purificación en placa del virus recombinante (por ejemplo, véase el ejemplo 6).
20

[0067] Los inmunógenos recombinantes de PCV2 se pueden utilizar asociados con inmunógenos de PCV1 para la inmunización de animales contra PMWS. En una estrategia menos preferida, se pueden utilizar inmunógenos de PCV1 sin inmunógenos de PCV2.

25 **Ejemplo 1 – CONSTRUCCIÓN DE POXVIRUS DE CANARIO**

INSERCIÓN DE PLÁSMIDO EN EL LOCUS C6

[0068] La figura 1 (SEC Id No. 1) es la secuencia de un segmento de 3,7 kb del ADN de poxvirus de canario. El análisis de la secuencia reveló un ORF designado como C6L que se inicia en la posición 377 y termina en la posición 2254. A continuación, se describe un plásmido de inserción de C6 construido mediante la eliminación del ORF de C6 y su sustitución por un sitio de clonación múltiple (MCS) flanqueado por señales de terminación transcripción y traduccional. Se amplificó un fragmento por PCR de 380 pb a partir de ADN genómico de poxvirus de canario utilizando los cebadores de oligonucleótidos C6A1 (SEC ID NO:2) y C6B1 (SEQ ID NO:3). Se amplificó un
35 fragmento por PCR de 1155 pb a partir de ADN genómico de poxvirus de canario utilizando los cebadores de oligonucleótidos C6C1 (SEC ID NO:4) y C6D1 (SEC ID NO: 5). Los fragmentos de 380 pb y 1155 pb se fusionaron mediante su adición como plantilla y amplificación de un fragmento por PCR de 1613 pb utilizando los cebadores de oligonucleótidos C6A1 (SEC ID NO:2) y C6D1 (SEQ ID NO:5). Este fragmento se digirió con *SacI* y *KpnI*, y se unión en pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) digerido con *SacI/KpnI*. El plásmido resultante, pC6L se confirmó mediante análisis de la secuencia de ADN. Consiste en 370 pb de ADN de poxvirus de canario en dirección 5' de C6 ("brazo izquierdo de C6"), la señal de terminación temprana de vaccinia, los codones de parada de la traducción en seis marcos de lectura, un MCS que contiene los sitios *SmaI*, *PstI*, *XhoI* y *EcoRI*, señal de terminación temprana de vaccinia, codones de parada de la traducción en seis marcos de lectura y la secuencia de 1156 pb en dirección 3' del poxvirus de canario ("brazo derecho de C6").
40
45

[0069] Se derivó el plásmido pJP099 de pC6L mediante la unión de un cassette que contenía el promotor de vaccinia H6 (descrito en Taylor et al. (1988c), Guo et al. (1989), y Perkus et al. (1989)) acoplado a un gen exógeno en los sitios *SmaI/EcoRI* de pC6L. Este plásmido pJP099 contiene un sitio *EcoRV* único y un sitio *NruI* único localizados en el extremo 3' del promotor H6 y un sitio *SaII* único localizado entre el codón de PARADA del gen exógeno y el brazo izquierdo de C6. El fragmento *EcoRV/SaII* o *NruI/SaII* de ~4,5 kb de pJP099 contiene por tanto la secuencia del plásmido (pBluescript SK+ ; Stratagene, La Jolla, CA, USA), los dos brazos de C6 y el extreme 5' del promotor H6 hasta el sitio *EcoRV* o *NruI*.
50

Secuencias de los cebadores:

55 **[0070]** Cebador C6A1 (SEC ID NO:2)
ATCATCGAGCTCGCGGCCCGCCTATCA.AAAGTCTTAATGAGTT

60 **[0071]** Cebador C6B1 (SEC ID NO:3)

GAATTCCTCGAGCTGCAGCCCCGGGTTTTTATAGCTAATTAGTCAATTTTTTC
GTAAGTAAGTATTTTTATTTAA

65

[0072] Cebador C6C1 (SEC ID NO:4)

CCC GGGCTGCAGCTCGAGGAATTCTTTTATTGATTAAGTCAAATGAG
TATATATAATTGAAAAAGTAA

5

[0073] Cebador C6D1 (SEC ID NO:5)

GATGATGGTACCTTCATAAATACAAGTTTGATTAAGTTAAGTTG

Ejemplo 2 - CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDO DADOR DE ALVAC PARA ORF2 DE PCV2

10

[0074] Se digirió con EcoRI el plásmido pGem7Z-Imp1010-Stoon-EcoRF No. 14, que contenía el genoma de PCV2 como un fragmento de EcoRI en el plásmido pGem-7Z, y se aisló y unió un fragmento de 1768 pb.

[0075] Con el fin de insertar el ORF2 de PCV2 en un vector de inserción de ALVAC apropiado; Se utilizaron los cebadores JP760 (SEC ID NO:6) y JP773 (SEC ID NO:7) para amplificar el ORF2 de PCV2 a partir del fragmento de EcoRI unido de 1768 pb (ver anteriormente) que da lugar a J1304 de PCR. El cebador JP760 (SEC ID NO:6) contiene el extremo 3' del promotor H6 de *EcoRV* y el extremo 5' de ORF2 de PCV2. El cebador JP773 (SEC ID NO:7) contiene el extremo 3' del ORF2 de PCV2 seguido del sitio *SalI*. El producto de la PCR J1304 se digirió a continuación con *EcoRV/SalI* y se clonó como un fragmento de ~750 pb en un fragmento de ~4,5 kb *EcoRV/SalI* de pJP099 (véase anteriormente en el ejemplo 1). El plásmido resultante se confirmó mediante el análisis de secuencia y se designó como pJP102 (véase el mapa de pJP102 en la Figura 2 y la secuencia (SEC ID NO:8) en la Figura 3). La secuencia de ORF2 coincide con la secuencia disponible en GenBank, Número de acceso AF055392. El plásmido dador pJP102 (linealizado con *NotI*) se utiliza en una prueba de recombinación in vitro (IVR) para generar el recombinante de ALVAC vCP1614 (véase el ejemplo 6).

25

Secuencia de los cebadores:

[0076] JP760 (SEC ID NO:6)

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

30

[0077] JP773 (SEC ID NO:7)

TAC-TAC-TAC-GTC-GAC-TTA-GGG-TTT-AAG-TGG-GGG-GTC

35

Ejemplo 3 – CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO DADOR DE ALVAC PARA ORF1 Y ORF2 DE PCV2

[0078] Se amplificó el ORF1 de PCV2 mediante PCR utilizando los cebadores JP774 (SEC ID NO:9) y JP775 (SEC ID NO:10) en el plásmido pGem7Z-Imp1010-Stoon-EcoRI No. 14 que da lugar a J1311 de PCR. El cebador JP774 (SEC ID NO:9) contiene el extremo 3' del promotor H6 de *Nrul* y el extremo 5' de ORF1 de PCV2. El cebador JP775 (SEC ID NO:10) contiene el extremo 3' del ORF1 de PCV2 seguido de un sitio *SalI*. El producto de PCR J1311 (~1Kb) se clonó en pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El plásmido resultante se confirmó mediante análisis de secuencia y se designó como pJP104. La secuencia de ORF1 coincide con la secuencia disponible en el GenBank, Número de Acceso AF055392. Se aisló un fragmento de ~970 pb de *Nrul/SalI* de pJP 104 y se clonó en un fragmento de ~4,5 kb de *Nrul/SalI* de pJP099 (véase el Ejemplo 1), que da lugar a un plásmido que se confirmó mediante análisis por restricción y se designó como pJP105 (véase la figura 4). El plásmido dador pJP105 se pudo utilizar en una prueba de recombinación in vitro (descrita en el ejemplo 6) para generar recombinante de ALVAC que expresa el ORF1 de PCV2.

[0079] Se crearon extremos romos de un fragmento BamHI/SalI de pJP102 (ver el Ejemplo 2) utilizando el fragmento Klenow de ADN polimerasa, y se clonó en el sitio EcoRI con extremos romos creados por Klenow de pJP105. Se comprobó la orientación de inserción de los clones mediante el análisis de restricción y se eligió la orientación de cabeza a cabeza. Este plásmido se confirmó mediante el análisis de secuencia y se designó como pJP107 (véase el mapa de pJP107 en la Figura 5 y la secuencia (SEC ID NO:11) en la Figura 6). El plásmido dador pJP107 (linealizado con *NotI*) no se utilizó en una prueba de recombinación in vitro (IVR) para generar el recombinante de ALVAC vCP1615 (véase el Ejemplo 6).

Secuencia de los cebadores:

60 [0080] JP774 (SEQ ID NO:9)

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

65

[0081] JP775 (SEQ ID NO:10)

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

Ejemplo 4 - CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDO DADOR DE ALVAC PARA ORF2 DE PCV1

5 **[0082]** Se utilizó el plásmido pPCV1 (B. Meehan et al. J. Gen. Virol. 1997. 78. 221-227), que contenía el genoma de PCV1 como fragmento PstI en el plásmido pGem-7Z, como plantilla para amplificar el ORF2 de PCV1.

[0083] Con el fin de insertar el ORF2 de PCV2 en un vector de inserción de ALVAC apropiado: Se utilizaron los cebadores JP787 (SEC ID NO:12) y JP788 (SEC ID NO:13) para amplificar el ORF2 de PCV1 del plásmido pPCV1
 10 (ver anteriormente) que da lugar a J1315 de PCR. El cebador JP787 (SEC ID NO:12) contiene el extremo 3' del promotor H6 de *EcoRV* y ORF 2 seguido del sitio *SaI*. El producto de PCR J1315 se digirió a continuación con *EcoRV/SaI* y se clonó como un fragmento de ~750 pb en un fragmento de ~4,5 kb de *EcoRV/SaI* de pJP099 (véase anteriormente en el Ejemplo 1). El plásmido resultante se confirmó mediante análisis de secuencia y se designó como pJP113. La secuencia de ORF2 coincide con la secuencia disponible en GenBank, Número de
 15 Acceso U49186. El plásmido dador pJP113 (linealizado con *NotI*) se utilizó en una prueba de recombinación in vitro (IVR) para generar el recombinante de ALVAC vCP1621 (véase el Ejemplo 7).

Secuencia de los cebadores:

20 **[0084]** JP787 (SEC ID NO:12)

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

25 **[0085]** JP788 (SEC ID NO:13)

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

Ejemplo 5 - CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO PARA ORF2 Y ORF1 DE PCV1

30 **[0086]** Se digirió con *PstI* el plásmido pPCV1 (véase el Ejemplo 4 anterior), que contenía el genoma de PCV1 como un fragmento *PstI* en el plásmido pGem-7Z, y se aisló y ligó un fragmento de 1759 pb.

[0087] Los cebadores JP789 (SEC ID NO:1) y JP790 (SEC ID NO:15) se utilizaron para amplificar el ORF1 de PCV1 del fragmento *PstI* unido de 1759 pb (ver anteriormente), que da lugar a J1316 de PCR. El cebador JP789 (SEC ID
 35 NO:14) contiene el extremo 3' del promotor H6 de *NruI* y el extremo 5' de ORF1 de PCV1. El cebador JP790 (SEC ID NO:15) contiene el extremo 3' de ORF1 de PCV1 seguido de un sitio *SaI*. El producto de PCR J1316 (~1 Kb) se clonó en pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El plásmido resultante se confirmó mediante análisis de secuencia y se designó como pJP114. La secuencia de ORF1 coincide con la secuencia disponible en GenBank, Número de Acceso U49186. Se aisló un fragmento *NruI/SaI* de ~970 pb de pJP114 y se clonó en un fragmento *NruI/SaI* de
 40 ~4,5 kb de pJP099 (véase el Ejemplo 1), que da lugar a un plásmido que se confirmó mediante análisis de restricción y se designó como pJP115. El plásmido dador pJP115 se podría utilizar en una prueba de recombinación in vitro (descrito en el ejemplo 7) para generar un recombinante de ALVAC que expresa el ORF1 de PCV1.

[0088] Se crearon extremos romos de un fragmento *BamHI/SaI* de ~838 pb de pJP113 (ver el Ejemplo 4) utilizando
 45 el fragmento Klenow de ADN polimerasa, y se clonó en el sitio *EcoRI* con extremos romos creados por Klenow de pJP115. Se comprobó la orientación de inserción de los clones mediante el análisis de restricción y se eligió la orientación de cabeza a cabeza. Este plásmido se confirmó mediante el análisis de secuencia y se designó como pJP117. El plásmido dador pJP117 (linealizado con *NotI*) no se utilizó en una prueba de recombinación in vitro (IVR) para generar el recombinante de ALVAC vCP1622 (véase el Ejemplo 7).

50

Secuencia de los cebadores:

[0089] JP789 (SEC ID NO:14)

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

[0090] JP790 (SEC ID NO:15)

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

Ejemplo 6 – GENERACIÓN DE RECOMBINANTES DE ALVAC-PCV2

[0091] Se linealizaron los plásmidos pJP102 (véase el Ejemplo 2 y la figura 2) y pJP107 (véase el Ejemplo 3 y la figura 5) con *NotI* y se transfectaron en células CEF primarias infectadas con ALVAC utilizando el método de precipitación fosfato de calcio descrito anteriormente (Panicali y Paoletti, 1982; Piccini et al., 1987). Se seleccionaron
 65 las placas positivas en base a la hibridación a sondas radiomarcadas de PCV2 específicas y se sometieron a cuatro rondas secuenciales de purificación en placa hasta conseguir una población pura. A continuación, se amplificó una

placa representativa de cada IVR y los recombinantes de ALVAC resultantes se designaron como vCP1614 y vCP1615. El virus vCP1614 es el resultado de los casos de recombinación entre ALVAC y el plásmido dador pJP102 y contiene el ORF2 de PCV2 insertado en el locus C6 de ALVAC. El virus vCP1615 es el resultado de los casos de recombinación entre ALVAC y el plásmido dador pJP107, y contiene el ORF2 y ORF1 de PCV2 insertados en el locus C6 de ALVAC en la orientación de cabeza a cabeza.

[0092] De una forma similar, un ALVAC recombinante que expresa sólo el ORF1 de PCV2 se puede generar utilizando el plásmido dador pJP105 descrito en el ejemplo 3.

10 [0093] Inmunofluorescencia. Con el fin de determinar si las proteínas de PCV2 se expresaban en las células Vero infectadas con el recombinante de ALVAC, se realizó un análisis de la inmunofluorescencia (IF). Las células Vero infectadas se lavaron con PBS 24 horas después de la infección (m.o.i. de aproximadamente 10) y se fijaron con acetona fría al 95% durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se utilizaron cinco preparaciones de anticuerpo monoclonales (MAb) (sobrenadante de hibridoma) específicas para ORF1 de PCV2 (PCV2 199 1D3GA & PCV2 210 7G5GD) o ORF2 de PCV2 (PCV2 190 4C7CF, PCV2 190 2B1BC & PCV2 190 3A8BC) como primer anticuerpo. Estos anticuerpos monoclonales se obtuvieron de Merial-Lyon. Los anticuerpos monoclonales también se pueden obtener siguiendo las enseñanzas de los documentos citados en la presente invención, por ejemplo WO-A-99 18214, 1998, las solicitudes francesas Nos. 97/12382, 98/00873, 98/03707, solicitadas el 3 de octubre de 1997, 22 de enero de 1998, y 20 de marzo de 1998, y WO99/29717.

20 [0094] La reacción IF se realizó tal como se describe por Taylor et al. (1990).

[0095] La inmunofluorescencia específica de PCV2 con los tres anticuerpos específicos de ORF2 se podía detectar en células infectadas con vCP1614 y las células infectadas con vCP1615. La inmunofluorescencia específica de PCV2 con los dos anticuerpos específicos de ORF1 se podía detectar en células infectadas sólo con vCP1615. Estos resultados indicaban que, tal como se esperaba, el vCP1614 expresa sólo ORF2, mientras que vCP1615 expresa tanto ORF1 como ORF2. No se detectó fluorescencia en células Vero infectadas con ALVAC, ni en células Vero no infectadas.

30 Ejemplo 7 – GENERACIÓN DE RECOMBINANTES ALVAC-PCV1

[0096] Se linealizaron los plásmidos pJP113 (véase el Ejemplo 4) y pJP117 (véase el Ejemplo 5) con *NotI* y se transfectaron en células CEF primarias infectadas con ALVAC utilizando el método de precipitación de fosfato de calcio descrito previamente (Panicali y Paoletti, 1982; Piccini et al., 1987). Se seleccionaron las placas positivas en base a la hibridación a sondas radiomarcadas de PCV1 específicas y se sometieron a cuatro rondas secuenciales de purificación en placa hasta conseguir una población pura. A continuación, se amplificó una placa representativa de cada IVR y los recombinantes de ALVAC resultantes se designaron como vCP1621 y vCP1622. El virus vCP1621 es el resultado de los casos de recombinación entre ALVAC y el plásmido dador pJP113 y contiene el ORF2 de PCV1 insertado en el locus C6 de ALVAC. EL virus vCP1622 es el resultado de los casos de recombinación entre ALVAC y el plásmido dador pJP117, y contiene el ORF2 y ORF1 de PCV1 insertados en el locus C6 de ALVAC en la orientación de cabeza a cabeza.

[0097] De una forma similar, un ALVAC recombinante que expresa sólo el ORF1 de PCV1 se puede generar utilizando el plásmido dador pJP115 descrito en el ejemplo 5.

45 [0098] Inmunofluorescencia. Con el fin de determinar si las proteínas de PCV1 se expresaban en las células Vero infectadas con el recombinante de ALVAC, se realizó un análisis de la inmunofluorescencia (IF). Las células Vero infectadas se lavaron con PBS 24 horas después de la infección (m.o.i. de aproximadamente 10) y se fijaron con acetona fría al 95% durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un suero policlonal de cerdo anti-PCV1 específico (Allan G. et al. Microbiol. 1999, 66: 115-123) como primer anticuerpo. La reacción IF se realizó tal como se describe por Taylor et al. (1990).

[0099] La inmunofluorescencia específica de PCV1 se podía detectar en células infectadas con vCP1621 y células infectadas con vCP1622. Estos resultados indicaban que, tal como se esperaba, el vCP1621 y vCP1622 expresan productos específicos de PCV1. No se detectó fluorescencia con suero policlonal de cerdo específico de PCV2 en células infectadas con vCP1621 y en células infectadas con vCP1622. No se detectó fluorescencia en células Vero infectadas con ALVAC parental, ni en células Vero no infectadas.

60 Ejemplo 8 – FORMULACIÓN DE POXVIRUS DE CANARIO RECOMBINANTES CON CARBOPOL™ 974P

[0100] Para la preparación de vacunas, se pueden mezclar poxvirus de canario recombinantes vCP1614 y vCP1615 (Ejemplo 6) con soluciones de carbómero. De la misma manera, los poxvirus de canario recombinantes vCP1621 y vCP1622 (Ejemplo 7) se pueden mezclar con soluciones de carbómero. El componente carbómero utilizado para la vacunación de cerdos según la presente invención es el Carbopol™ 974P fabricado por la compañía BF Goodrich (peso molecular de # 3,000,000). Se prepara en primer lugar una solución madre de Carbopol™ 974P al 1,5% en agua destilada que contenía 1 g/l de cloruro sódico. Esta solución madre se utiliza a continuación para fabricar una

solución de Carbopol™ 974P de 4 mg/ml en agua fisiológica. La solución madre se mezcla con el volumen requerido de agua fisiológica, ya sea en una etapa o en varias etapas sucesivas, ajustando el valor de pH en cada etapa con una solución de hidróxido de sodio 1 N (o más concentrado) para obtener un pH final de 7,3-7,4. Esta solución de Carbopol™ 974P final es una solución lista para su uso para reconstituir un virus recombinante liofilizado o para diluir una solución madre de virus recombinante concentrado. Por ejemplo, para obtener una suspensión viral final que contenía 10^8 pfu por dosis de 2 ml, se pueden diluir 0,1 ml de una solución madre de 10^9 pfu/ml en 1,9 ml de la solución lista para su uso anterior de Carbopol™ 974P 4 mg/ml. De la misma manera, también se pueden preparar soluciones listas para su uso Carbopol™ 974P 2 mg/ml.

10 **Ejemplo 9 – INMUNIZACIÓN DE CERDOS Y POSTERIOR ESTIMULACIÓN**

9.1. **INMUNIZACIÓN DE LECHONES DE 1 DÍA DE VIDA**

[0101] Se colocaron en aisladores grupos de lechones, expulsados por cesárea en el día 0. Los lechones se vacunan mediante ruta intramuscular en el día 2 con varias soluciones de vacunas. Las suspensiones virales de vacunas se preparan mediante dilución de soluciones madre de virus recombinantes en agua fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Los intervalos adecuados para suspensiones virales se pueden determinar empíricamente, pero variarán en general desde 10^6 a 10^{10} , y preferiblemente aproximadamente 10^{10} , pfu/dosis. Las soluciones de vacunas también se pueden preparar mezclando la suspensión de virus recombinante con una solución de Carbopol™ 974P, tal como se describe en el Ejemplo 8. Los lechones se vacunan con:

- Virus recombinante vCP1614 (Ejemplo 2);
- Virus recombinante vCP1615 (Ejemplo 3);
- Virus recombinante vCP1614 mezclado con Carbopol (solución de 4 mg/ml); o
- Virus recombinante vCP1615 mezclado con Carbopol (solución de 4 mg/ml).

[0102] Las suspensiones virales contienen 10^8 unidades formadoras de placas (pfu) por dosis. Cada suspensión viral se inyecta mediante vía intramuscular bajo un volumen de 1 ml. La inyección intramuscular se administra en los músculos del cuello.

[0103] Se administran dos inyecciones de suspensiones virales en el Día 2 y el Día 14 del experimento. Se realiza una estimulación en el Día 21 mediante la administración oronasal de una suspensión viral preparada a partir de un cultivo de una cepa virulenta de PCV-2. Después de la estimulación, se monitorizan los lechones durante 3 semanas por los signos clínicos específicos del síndrome del desmedro multisistémico post-destete. Se valoran los siguientes signos: Temperatura rectal: monitorización diaria durante 2 semanas después de la estimulación, a continuación 2 mediciones de la temperatura rectal durante la tercera semana.

[0104] Peso: los lechones se pesan justo antes de la estimulación y a continuación semanalmente durante las primeras 3 semanas después de la estimulación.

[0105] Se toman muestras en el Día 2, Día 14, Día 21, Día 28, Día 35, y Día 42 del experimento con el fin de monitorizar los niveles de viremia y títulos de anticuerpo específico anti-PCV2. Necropsias: en el Día 42, todos los lechones supervivientes se someten a eutanasia de manera humana y se les practica la necropsia para buscar lesiones macroscópicas específicas de PMWS. Las muestras de tejido se preparan a partir de hígado, nódulos linfáticos, bazo, riñones y timo con el fin de buscar lesiones histológicas específicas.

9.2. **INMUNIZACIÓN DE LECHONES DE 5-7 SEMANAS DE VIDA**

[0106] Se vacunan lechones de 5-7 semanas de vida, libres de anticuerpos maternos específicos anti-PCV2, mediante vía intramuscular con varias soluciones de vacunas. Se preparan suspensiones virales de vacunas mediante la dilución de soluciones madre de virus recombinantes en agua fisiológica estéril (NaCl al 0,9%). Las soluciones de vacunas también se pueden preparar mezclando la suspensión de virus recombinantes con una solución de Carbopol™ 974P, tal como se describe en el Ejemplo 8.

Los lechones se vacunan con:

- Virus recombinante vCP1614 (Ejemplo 2);
- Virus recombinante vCP1615 (Ejemplo 3);
- Virus recombinante vCP1614 mezclado con Carbopol (solución de 4 mg/ml); o
- virus recombinante vCP1615 mezclado con Carbopol (solución de 4 mg/ml).

[0107] Las suspensiones virales contienen 10^8 unidades formadoras de placas (pfu) por dosis. Cada suspensión viral se inyecta mediante vía intramuscular bajo un volumen de 2 ml. La inyección intramuscular se administra en los músculos del cuello. Se administran dos inyecciones de suspensiones virales en el Día 0 y el Día 21 del experimento. Se realiza una estimulación en el Día 35 mediante la administración oronasal de una suspensión viral preparada a partir de un cultivo de una cepa virulenta de PCV-2. Después de la estimulación, se monitorizan los lechones durante 8 semanas por los signos clínicos específicos del síndrome del desmedro multisistémico post-destete. La monitorización clínica es idéntica a la descrita en el Ejemplo 9.1, a excepción de que la duración total de la monitorización es de 8 semanas en lugar de 3 semanas.

[0108] Las necropsias se realizan a través del experimento para lechones que mueren a partir del estímulo y al final del experimento (Día 97) para todos los lechones supervivientes. Las muestras de tejido son las mismas que se han descrito en el Ejemplo 9.1.

5

9.3. INMUNIZACIÓN DE LECHONES RECIÉN NACIDOS

[0109] Se colocan en aisladores grupos de 3 ó 4 lechones expulsados por cesárea en el día 0. En el día 2 se vacunan los lechones con 10^8 pfu de vCP 1614, vCP 1615 o vector de ALVAC parental en 1 ml de PBS mediante vía intramuscular en la parte del cuello. Se administra una segunda inyección de vacuna o placebo en el día 14. La vacunación con recombinante de ALVAC es bien tolerada por lechones y no se observa evidencia de reacción adversa a la vacunación. Los lechones se estimulan en el día 21 mediante administración oronasal de una suspensión viral de PCV-2, 1 ml en cada conducto nasal. Se realizan necropsias en el día 45 y se recogen muestras de tejido para el aislamiento del virus.

15 Resultados de la necropsia:

• El PMWS se caracteriza en general por linfadenopatía y más raramente por hepatitis o nefritis. De este modo, las observaciones generales en nódulos linfáticos se valoran para cada lechón de la siguiente manera: 0 = no se observa aumento visible de los nódulos linfáticos; 1 = aumento ligero de los nódulos linfáticos, limitado a nódulos linfáticos bronquiales; 2 = aumento moderado de los nódulos linfáticos, limitado a nódulos linfáticos bronquiales; 3 = aumento severo de los nódulos linfáticos, extendido a nódulos linfáticos bronquiales, submandibular prescapular e inguinal.

Grupos	Valoración
vCP1614	0,5
	0,0
	0,0
	1,0
promedio	0,38
desviación estándar	0,48
vCP1615	0,0
	0,5
	0,5
	1,0
promedio	0,5
desviación estándar	0,41
Controles	2,0
	2,5
	2,5
	2,5
promedio	2,38
desviación estándar	0,25

La linfadenopatía bronquial para PCV-2 es una observación general prominente. Se observa una reducción significativa de la lesión de nódulos linfáticos en relación con el grupo de control después de la inmunización con vCP 1614 y vCP 1615 ($p \leq 0,05$).

25

REFERENCIAS

[0110]

1. Clark, E.G. Proc. Amer. Assoc. Swine Pract., pp. 499-501 (1997).
2. Edbauer, C., R. Weinberg, J. Taylor, A. Rey-Senelonge, J.F. Bouquet, P. Desmettre y E. Paoletti, Virology 179, 901-904 (1990).
3. Ellis, J., L. Hassard, E. Clark, J. Harding, G. Allan, P. Willson, J. Strakappe, K. Martin, F. McNeilly, B. Meehan, D. Todd, D. Haines, Can. Vet. J. 39, 44-51 (1998).
4. Goebel, S.J., G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.W. Davis, J.P. Winslow, E. Paoletti, Virology 179, 247-266, 517-563 (1990).
5. Guo, P., S. Goebel, S. Davis, M.E. Perkus, B. Languet, P. Desmettre, G. Allen, and E. Paoletti, J. Virol. 63, 4189-4198 (1989).
6. Hamel, A.L., L.L. Lin and G. P.S. Nayar, J. Virol. 72, 5262-5267 (1998).
7. Harding J.C., Proc. Am. Assoc. Swine Pract. 28, 503 (1997).
8. Mankertz, A., J. Mankertz, K. Wolf, H.-J. Buhk, Gen. Virol. 79, 381-384 (1998a).
9. Mankertz, J., H.-J. Buhk, G. Blaess, A. Mankertz, Virus Gene 16, 267-276 (1998b).
10. Matthews, R.E.F., Intervirology 17, 42-44 (1982).
11. Meehan, B.M., J.L. Creelan, M.S. McNulty, D. Todd, J. Gen. Virol. 78, 221-227 (1997).

40

12. Meehan, B.M., F. McNeilly, D. Todd, S. Kennedy, V.A. Jewhurst, J.A. Ellis, L.E. Hassard, E.G. Clark, D.M. Haines, G.M. Allan, J. Gen. Virol. 79,2171-2179 (1998).
13. Nayar, G.P.S., A. Hamel and L. Lin. Can. Vet. J. 38, 385-386 (1997).
14. Panicali, D. and E. Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4927-4931 (1982).
- 5 15. Paoletti, E., B.R. Lipinskaks, C. Samsonoff, S. Mercer, and D. Panicali, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 193-197 (1984).
16. Perkus, M.E., K. Limbach, and E. Paoletti, J. Virol. 63, 3829-3836 (1989).
17. Piccini, A., M.E. Perkus, and E. Paoletti, In Methods in Enzymology, Vol. 153, eds. Wu, R., and Grossman, L., (Academic Press) pp. 545-563 (1987).
- 10 18. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, In Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition, (Cold Spring Harbor Press, NY) (1989).
19. Tartaglia, J., J. Winslow, S. Goebel, G.P. Johnson, J. Taylor, and E. Paoletti, J. Gen. Virol. 71, 1517-1524 (1990).
20. Tartaglia, J., Perkus ME, Taylor J, Norton EK, Audonnet JC, Cox WI, Davis SW, van der Hoeven J, Meignier B, Riviere M, and E. Paoletti, Virology 188, 217-32 (1992).
- 15 21. Taylor, J., R. Weinberg, B. Languet, Ph. Desmettre and E. Paoletti, Vaccine 6, 497-503 (1988a).
22. Taylor, J. and E. Paoletti, Vaccine 6, 466-468 (1988b).
23. Taylor, J., R. Weinberg, Y. Kawaoka, R. Webster and E. Paoletti, Vaccine 6, 504-508 (1988c).
24. Taylor, J., C. Edbauer, A. Rey-Senelonge, J.F. Bouquet, E. Norton, S. Goebel, P. Desmettre and E. Paoletti, J. Virol. 64, 1441-1450 (1990).
- 20 25. Taylor, J., C. Trimarchi, R. Weinberg, B. Languet, F. Guillemin, P. Desmettre and E. Paoletti, Vaccine 9, 190-193 (1991).
26. Taylor J, Weinberg R, Tartaglia J, Richardson C, Alkhatib G, Briedis D, Appel M, Norton E, Paoletti E., Virology187, 321-328 (1992).
27. Todd, D., F.D. Niagro, B.W. Ritchie, W. Curran, G.M. Allan, P.D. Lukert, K.S. Latimer, W.L. Steffens, M.S.
- 25 McNulty, Arch. Virol. 117, 129-135 (1991).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0111]

- 30 (1) INFORMACIÓN GENERAL:
- (i) SOLICITANTE: Bublot, Michel Perez, Jennifer M. Charreyre, Catherine E.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Poxvirus recombinante del Circovirus Porcino 2
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 13
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 35 (A) DESTINATARIO: Frommer Lawrence HaugLLP
- (B) CALLE: 745 Fifth Avenue
- (C) CIUDAD: NY
- (D) ESTADO: NY
- (E) PAÍS: USA
- 40 (F) CP: 10151
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: DISQUETE
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- 45 (D) SOFTWARE: Patent In Release #1.0, Version #1.25
- (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE SOLICITUD:
- (C) CLASIFICACIÓN:
- 50 (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Kowalski, Thomas J.
- (B) NÚMERO DE RESGITRO: 32, 147
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 454313-2511.1
- (ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIONES:
- 55 (A) TELÉFONO: 212-588-0800
- (B) TELEFAX: 212-588-0500
- (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:1:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 60 (A) LONGITUD: 3701 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID NO:1:

65

ES 2 560 513 T3

5 AAGCTTCTAT CAAAAGTCTT AATGAGTTAG GTGTAGATAG TATAGATATT ACTACAAAGG
60

TATTCATATT TCCTATCAAT TCTAAAGTAG ATGATATTAA TAACTCAAAG ATGATGATAG
120

10 TAGATAATAG ATACGCTCAT ATAATGACTG CAAATTTGGA CGGTTACAT TTTAATCATC
180

ACGCGTTCAT AAGTTTCAAC TGCATAGATC AAAATCTCAC TAAAAAGATA GCCGATGTAT
240

15 TTGAGAGAGA TTGACATCT AACTACGCTA AAGAAATTAC AGTTATAAAT AATACATAAT
300

GGATTTTGTT ATCATCAGTT ATATTTAACA TAAGTACAAT AAAAAGTATT AAATAAAAAT
360

20 ACTTACTTAC GAAAAAATGT CATTATTACA AAAACTATAT TTTACAGAAC AATCTATAGT
420

AGAGTCCTTT AAGAGTTATA ATTTAAAAGA TAACCATAAT GTAATATTTA CCACATCAGA
480

25 TGATGATACT GTGTAGTAA TAAATGAAGA TAATGTACTG TTATCTACAA GATTATTATC
540

ATTGATAAAA ATTCTGTTTT TTAACCTCCT TAATAACGGT TTATCAAAT ACGAAACTAT
600

30 TAGTGATACA ATATTAGATA TAGATACTCA TAATTATTAT ATACCTAGTT CTTCTTCTTT
35

40

45

50

55

60

65

ES 2 560 513 T3

660

5 GTTAGATATT CTAAAAAAAA GAGCGTGTGA TTTAGAATTA GAAGATCTAA ATTATGCGTT
720

AATAGGAGAC AATAGTAACT TATATTATAA AGATATGACT TACATGAATA ATTGGTTATT
780

10 TACTAAAGGA TTATTAGATT ACAAGTTTGT ATTATTGCGC GATGTAGATA AATGTTACAA
840

ACAGTATAAT AAAAAGAATA CTATAATAGA TATAATACAT CGCGATAACA GACAGTATAA
900

15 CATATGGGTT AAAAATGTTA TAGAATACTG TTCTCCTGGC TATATATTAT GGTTACATGA
960

TCTAAAAGCC GCTGCTGAAG ATGATTGGTT AAGATACGAT AACCGTATAA ACGAATTATC
1020

20 TGCGGATAAA TTATACACTT TCGAGTTCAT AGTTATATTA GAAAATAATA TAAACATTT
1080

ACGAGTAGGT ACAATAATTG TACATCCAAA CAAGATAATA GCTAATGGTA CATCTAATAA
1140

25 TATACTTACT GATTTTCTAT CTTACGTAGA AGAACTAATA TATCATCATA ATTCATCTAT
1200

AATATTGGCC GGATATTTTT TAGAATTCTT TGAGACCACT ATTTTATCAG AATTTATTTT
1260

30 TTCATCTTCT GAATGGGTAA TGAATAGTAA CTGTTTAGTA CACCTGAAAA CAGGGTATGA
1320

AGCTATAGTC TTTGATGCTA GTTTATTTTT CCAACTCTCT ACTAAAAGCA ATTATGTAAA
1380

35 ATATTGGACA AAGAAAACCT TGCAGTATAA GAACTTTTTT AAAGACGGTA AACAGTTAGC
1440

40 AAAATATATA ATTAAGAAAG ATAGTCAGGT GATAGATAGA GTATGTTATT TACACGCAGC
1500

45

50

55

60

65

ES 2 560 513 T3

TGTATATAAT CACGTAACCT ACTTAATGGA TACGTTTAAA ATTCCTGGTT TTGATTTTAA
1560

5 ATTCTCCGGA ATGATAGATA TACTACTGTT TGGAATATTG CATAAGGATA ATGAGAATAT
1620

ATTATATCCG AAACGTGTTT CTGTAACATA TATAATATCA GAATCTATCT ATGCAGATTT
1680

10 TTACTTTATA TCAGATGTTA ATAAATTCAG TAAAAAGATA GAATATAAAA CTATGTTTCC
1740

TATACTCGCA GAAACTACT ATCCAAAAGG AAGGCCCTAT TTTACACATA CATCTAACGA
1800

15 AGATCTTCTG TCTATCTGTT TATGCGAAGT AACAGTTTGT AAAGATATAA AAAATCCATT
1860

ATTATATTCT AAAAAGGATA TATCAGCAAA ACGATTCATA GGTTTATTTA CATCTGTCTG
1920

20 TATAAATACG GCTGTTGAGT TAAGAGGATA TAAAATAAGA GTAATAGGAT GTTTAGAATG
1980

GCCTGAAAAG ATAAAAATAT TTAATTCTAA TCCTACATAC ATTAGATTAT TACTAACAGA
2040

25 AAGACGTTTA GATATTCTAC ATTCCTATCT GCTTAAATTT AATATAACAG AGGATATAGC
2100

TACCAGAGAT GGAGTCAGAA ATAATTTACC TATAATTCTT TTTATCGTCA GTTATTGTAG
2160

30 ATCGTATACT TATAAATTAC TAAATTGCCA TATGTACAAT TCGTGTAAGA TAACAAAGTG
2220

35 TAAATATAAT CAGGTAATAT ATAATCCTAT ATAGGAGTAT ATATAATTGA AAAAGTAAAA
2280

TATAAATCAT ATAATAATGA AACGAAATAT CAGTAATAGA CAGGAACTGG CAGATTCTTC
2340

40

45

50

55

60

65

ES 2 560 513 T3

TTCTAATGAA GTAAGTACTG CTAATCTCC AAAATTAGAT AAAAAAGATA CAGCAAATAC
 2400
 5 AGCTTCATTC AACGAATTAC CTTTAAATTT TTTCAGACAC ACCTTATTAC AACTAACTA
 2460
 AGTCAGATGA TGAGAAAGTA AATATAAATT TAACTTATGG GTATAATATA ATAAAGATTG
 2520
 10 ATGATATTAA TAATTTACTT AACGATGTTA ATAGACTTAT TCCATCAACC CCTTCAAACC
 2580
 TTCTCGATA TTATAAATA CCAGTAAATG ATATTAAAT AGATTGTTA AGAGATGTAA
 2640
 15 ATAATTATTT GGAGGTAAAG GATATAAAT TAGTCTATCT TTCACATGGA AATGAATTAC
 2700
 CTAATATTAA TAATTATGAT AGGAATTTTT TAGGATTAC AGCTGTTATA TGTATCAACA
 2760
 20 ATACAGGCAG ATCTATGGTT ATGGTAAAAC ACTGTAACGG GAAGCAGCAT TCTATGGTAA
 2820
 CTGGCCTATG TTTAATAGCC AGATCATTTT ACTCTATAAA CATTTTACCA CAAATAATAG
 2880
 25 GATCCTCTAG ATATTTAATA TTATATCTAA CAACAACAAA AAAATTTAAC GATGTATGGC
 2940
 CAGAAGTATT TTCTACTAAT AAAGATAAAG ATAGTCTATC TTATCTACAA GATATGAAAG
 3000
 30 AAGATAATCA TTTAGTAGTA GCTACTAATA TGGAAAGAAA TGTATACAAA AACGTGGAAG
 3060
 CTTTATATT AAATAGCATA TTAGTAGAAG ATTTAAAATC TAGACTTAGT ATAACAAAAC
 3120
 35 AGTTAAATGC CAATATCGAT TCTATATTTT ATCATAACAG TAGTACATTA ATCAGTGATA
 3180
 40 TACTGAAACG ATCTACAGAC TCAACTATGC AAGGAATAAG CAATATGCCA ATTATGTCTA

45

50

55

60

65

3240

ATATTTTAAC TTTAGAACTA AAACGTTCTA CCAATACTAA AAATAGGATA CGTGATAGGC
3300

5

TGTTAAAAGC TGCAATAAAT AGTAAGGATG TAGAAGAAAT ACTTTGTTCT ATACCTTCGG
3360

AGGAAAGAAC TTTAGAACAA CTTAAGTTTA ATCAAACCTG TATTTATGAA CACTATAAAA
3420

10

AAATTATGGA AGATACAAGT AAAAGAATGG ATGTTGAATG TCGTAGTTTA GAACATAACT
3480

ATACGGCTAA CTTATATAAA GTGTACGGAC AAAACGAATA TATGATTACT TATATACTAG
3540

15

CTCTCATAAG TAGGATTAAT AATATTATAG AAACCTTAAA ATATAATCTG GTGGGGCTAG
3600

ACGAATCTAC AATACGTAAT ATAAATTATA TAATTTTACA AAGAACAAA AAAAATCAAG
3660

20

TTTCTAATAC CTTATAGATA AACTATATTT TTTACCACTG A
3701

25

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:2:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 42 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID NO:2:

ATCATCGAGC TCGCGGCCGC CTATCAAAAAG TCTTAATGAG TT
42

40

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 73 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID NO:3:

GAATTCCTCG AGCTGCAGCC CGGGTTTTTA TAGCTAATTA GTCATTTTTT CGTAAGTAAG
60

TATTTTATT TAA
73

55

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 72 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID NO:4:

65

ES 2 560 513 T3

CCCCGGGCTGC AGCTCGAGGA ATTCTTTTTTA TTGATTAAGT AGTCAAATGA GTATATATAA
60

5

TTGAAAAAGT AA
72

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:5:

- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 45 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal
15 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID NO:5:

GATGATGGTA CCTTCATAAA TACAAGTTTG ATTAACTTA AGTTG
45

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:6:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 53 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
25 (C) CADENA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID NO:6:

CATCATCATG ATATCCGTTA AGTTTGTATC GTAATGACGT ATCCAAGGAG GCG
53

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:7:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 36 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
35 (C) CADENA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID NO:7:

TACTACTACG TCGACTTAGG GTTTAAGTGG GGGGTC
36

40

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:8:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 2520 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal
50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID NO: 8:

50

55

60

65

ES 2 560 513 T3

GGTACCTTCA TAAATACAAG TTTGATTAAA CTTAAGTTGT TCTAAAGTTC TTTCTCCGA
60

5 AGGTATAGAA CAAAGTATTT CTTCTACATC CTTACTATTT ATTGCAGCTT TTAACAGCCT
120

ATCACGTATC CTATTTTTAG TATTGGTAGA ACGTTTTAGT TCTAAAGTTA AAATATTAGA
180

10 CATAATTGGC ATATTGCTTA TTCCTTGCAT AGTTGAGTCT GTAGATCGTT TCAGTATATC
240

ACTGATTAAT GTACTACTGT TATGATGAAA TATAGAATCG ATATTGGCAT TTAAGTGT
300

15 TGTTATACTA AGTCTAGATT TTAAATCTTC TAGTAATATG CTATTTAATA TAAAAGCTTC
360

CACGTTTTTG TATACATTC TTTCCATATT AGTAGCTACT ACTAAATGAT TATCTTCTTT
420

20 CATATCTTGT AGATAAGATA GACTATCTTT ATCTTTATTA GTAGAAAATA CTTCTGGCCA
480

TACATCGTTA AATTTTTTTG TTGTTGTTAG ATATAATATT AAATATCTAG AGGATCCTAT
540

25 TATTGTGGT AAAATGTTA TAGAGTAAAA TGATCTGGCT ATTAACATA GGCCAGTTAC
600

CATAGAATGC TGCTTCCCGT TACAGTGTTT TACCATAACC ATAGATCTGC CTGTATTGTT
660

30 GATACATATA ACAGCTGTAA ATCCTAAAAA ATTCCTATCA TAATTATTAA TATTAGGTAA
720

35 TTCATTTCCA TGTGAAAGAT AACTAATTT TATATCCTTT ACCTCCAAAT AATTATTTAC
780

40

45

50

55

60

65

ES 2 560 513 T3

ATCTCTTAAA CAATCTATTT TAATATCAIT AACTGGTATT TTATAATATC CAGAAAGGTT
840

5 TGAAGGGGTT GATGGAATAA GTCTATTAAC ATCGTTAAGT AAATTATTAA TATCATGAAT
900

CTTTATTATA TTATACCCAT AAGTTAAATT TATAITTTACT TTCTCATCAT CTGACTTAGT
960

10 TAGTTTGTA AAGGTGTGT CTGAAAAAT TAAAAGGTAA TTCGTTGAAT GAAGCTGTAT
1020

TTGCTGTATC ATTTTTATCT AATTTGGAG ATTTAGCAGT ACTTACTTCA TTAGAAGAAG
1080

15 AATCTGCCAG TTCCTGTCTA TTACTGATAT TTCGTTTCAT TATTATATGA TTTATATTTT
1140

ACTTTTTCAA TTATATATAC TCATTGACT AGTTAATCAA TAAAAGAAT TCCTGCAGCC
1200

20 CTGCAGCTAA TTAATTAAGC TACAAATAGT TTCGTTTTCA CCTGTCTAA TAACTAATTA
1260

ATTAAGGATC CCCCAGCTTC TTTATTCTAT ACTTAAAAG TGAAAATAAA TACAAAGGTT
1320

25 CTTGAGGGTT GTGTAAATT GAAAGCGAGA AATAATCATA AATTATTTCA TTATCGCGAT
1380

ATCCGTTAAG TTTGTATCGT AATGACGTAT CCAAGGAGGC GTTACCGCAG AAGAAGACAC
1440

30 CGCCCCCGCA GCCATCTTGG CCAGATCCTC CGCCGCCGCC CCTGGCTCGT CCACCCCCGC
1500

35 CACCGCTACC GTTGAGAAG GAAAAATGGC ATCTTCAACA CCCGCCTCTC CCGCACCTTC
1560

GGATATACTG TCAAGCGTAC CACAGTCACA ACGCCCTCCT GGGCGGTGGA CATGATGAGA
1620

40

45

50

55

60

65

ES 2 560 513 T3

TTTAAAATG ACGACTTTGT TCCCCCGGA GGGGGACCA ACAAATCTC TATACCCTT
1680

5 GAATACTACA GAATAAGAAA GGTTAAGGTT GAATTCTGGC CCTGCTCCCC CATCACCCAG
1740

GGTGATAGGG GAGTGGGCTC CACTGCTGTT ATTCTAGATG ATAACCTTGT AACAAAGGCC
1800

10 ACAGCCCTAA CCTATGACCC ATATGTAAAC TACTCCTCCC GCCATACAAT CCCCCAACCC
1860

TTCTCCTACC ACTCCCGTTA CTTACACCCC AAACCTGTTC TTGACTCCAC TATTGATTAC
1920

15 TTCCAACCAA ATAACAAAAG GAATCAGCTT TGGCTGAGAC TACAAACCTC TGGAAATGTG
1980

GACCACGTAG GCCTCGGCGC TGCCTTCGAA AACAGTAAAT ACGACCAGGA CTACAATATC
2040

20 CGTGTAAACCA TGTATGTACA ATTCAGAGAA TTTAATCTTA AAGACCCCCC ACTTAAACCC
2100

TAAGTCGACC CCGGGTTTTT ATAGCTAATT AGTCATTTTT TCGTAAGTAA GTATTTTTAT
2160

25 TTAATACTTT TTATTGTAAT TATGTAAAT ATAACCTGATG ATAACAAAAT CCATTATGTA
2220

TTATTTATAA CTGTAATTTT TTTAGCGTAG TTAGATGTCC AATCTCTCTC AAATACATCG
2280

30 GCTATCTTTT TAGTGAGATT TTGATCTATG CAGTTGAAAC TTATGAACGC GTGATGATTA
2340

AAATGTGAAC CGTCCAAATT TGCAGTCATT ATATGAGCGT ATCTATTATC TACTATCATC
2400

35 ATCTTTGAGT TATTAATATC ATCTACTTTA GAATTGATAG GAAATATGAA TACCTTTGTA
2460

40 GTAATATCTA TACTATCTAC ACCTAATCA TTAAGACTTT TGATAGGCGG CCGCGAGCTC
2520

- 50 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:9:
(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 57 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID NO:9:
CATCATCATT CGCGATATCC GTTAAGTTTG TATCGTAATG CCCAGCAAGA AGAATGG
57

- 60 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:10:
(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 36 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID NO:10:
24

ES 2 560 513 T3

TACTACTACG TCGACTCAGT AATTTATTTT ATATGG
36

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 3609 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID NO:11:

15 GGTACCTTCA TAAATACAAG TTTGATTAAG CTTAAGTTGT TCTAAAGTTC TTTCTCCGA
60

AGGTATAGAA CAAAGTATTT CTTCTACATC CTTACTATTT ATTGCAGCTT TTAACAGCCT
120

20 ATCACGTATC CTATTTTTAG TATTGGTAGA ACGTTTTAGT TCTAAAGTTA AAATATTAGA
180

CATAATTGGC ATATTGCTTA TTCCTTGCAT AGTTGAGTCT GTAGATCGTT TCAGTATATC
240

25 ACTGATTAAT GTRACTACTGT TATGATGAAA TATAGAATCG ATATTGGCAT TTAAGTGT
300

TGTTATACTA AGTCTAGATT TTAATCTTC TAGTAATATG CTATTTAATA TAAAGCTTC
360

30 CACGTTTTTG TATACATTTT TTTCCATATT AGTAGCTACT ACTAAATGAT TATCTTCTTT
420

CATATCTTGT AGATAAGATA GACTATCTTT ATCTTTATTA GTAGAAAATA CTTCTGGCCA
480

35 TACATCGTTA AATTTTTTTG TTGTTGTTAG ATATAATATT AAATATCTAG AGGATCCTAT
540

TATTTGTGGT AAAATGTTTA TAGAGTAAAA TGATCTGGCT ATTAACATA GGCCAGTTAC
600

40 CATAGAATGC TGCTTCCCGT TACAGTGTTC TACCATAACC ATAGATCTGC CTGTATTGTT
660

GATACATATA ACAGCTGTAA ATCCTAAAAA ATTCCTATCA TAATTATIAA TATTAGGTAA
720

45 TTCATTTCCA TGTGAAAGAT AGACTAATTT TATATCCTTT ACCTCCAAAT AATTATTTAC
780

50 ATCTCTTAAA CAATCTATTT TAATATCATT AACTGGTATT TTATAATATC CAGAAAGGTT
840

55

60

65

ES 2 560 513 T3

5 TGAAGGGGTT GATGGAATAA GTCTATTAAC ATCGTTAAGT AAATTATTAA TATCATGAAT
900

10 CTTTATTATA TTATACCCAT AAGTTAAATT TATATTACT TTCTCATCAT CTGACTTAGT
960

15 TAGTTTGTA TAAGGTGTGT CTGAAAAAT TAAAAGGTAA TTCGTTGAAT GAAGCTGTAT
1020

20 TTGCTGTATC ATTTTATCT AATTTGGAG ATTTAGCAGT ACTTACTTCA TTAGAAGAAG
1080

25 AATCTGCCAG TTCCTGTCTA TTAGTGATAT TTCGTTTTCAT TATTATATGA TTTATATTTT
1140

30 ACTTTTTCAA TTATATATAC TCATTTGACT AGTTAATCAA TAAAAGAAT TTCGACTTAG
1200

35 GGTTAAGTG GGGGGTCTTT AAGATTAAAT TCTCTGAATT GTACATACAT GGTTACACGG
1260

40 ATATTGTAGT CCTGGTCGTA TTTACTGTTT TCGAACGCAG CGCCGAGGCC TACGTGGTCC
1320

45 ACATTCCAG AGGTTTGTAG TCTCAGCEAA AGCTGATTCC TTTTGTATT TGGTTGGAAG
1380

50 TAATCAATAG TGGAGTCAAG AACAGGTTTG GGTGTGAAGT AACGGGAGTG GTAGGAGAAG
1440

55 GGTGGGGGA TTGTATGGCG GGAGGAGTAG TTTACATATG GGTCATAGGT TAGGGCTGTG
1500

60 GCCTTTGTTA CAAAGTTATC ATCTAGAATA ACAGCAGTGG AGCCCACTCC CCTATCACCC
1560

65 TGGGTGATGG GGGAGCAGGG CCAGAATTCA ACCTTAACCT TTCTTATTCT GTAGTATTCA
1620

70 AAGGGTATAG AGATTTTGTT GGTCCCCCT CCCGGGGAA CAAAGTCGTC AATTTTAAAT
1680

ES 2 560 513 T3

CTCATCATGT CCACCGCCCA GGAGGGCGTT GTGACTGTGG TACGCTTGAC AGTATATCCG
1740

5 AAGGTGCGGG AGAGGCGGGT GTTGAAGATG CCATTTTTCC TTCTCCAACG GTAGCGGTGG
1800

CGGGGGTGA CGAGCCAGGG GCGGCGGCGG AGGATCTGGC CAAGATGGCT GCGGGGGCGG
1860

10 TGTCTTCTTC TGCGGTAACG CCTCCTTGA TACGTCATTA CGATACAAAC TTAACGGATA
1920

TCGCGATAAT GAAATAATTT ATGATTATTT CTCGCTTTCA ATTAAACACA ACCCTCAAGA
1980

15 ACCTTTGTAT TTATTTTCAC TTTTAAAGTA TAGAATAAAG AAGCTGGGGG ATCAATTCCT
2040

GCAGCCCTGC AGCTAATTAA TTAAGCTACA AATAGTTTCG TTTTCACCTT GTCTAATAAC
2100

20 TAATTAATTA AGGATCCCCC AGCTTCTTTA TTCTATACTT AAAAAGTGAA AATAAATACA
2160

AAGGTCTTGT AGGGTTGTGT TAAATTGAAA GCGAGAAATA ATCATAAATT ATTTTATTAT
2220

25 CGCGATATCC GTTAAGTTTG TATCGTAATG CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC
2280

CAACCACATA AAAGGTGGGT GTTCACGCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA
2340

30 ATACGGGAGC TCCCAATCTC CCTATTTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
2400

GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT GCTAATTTG TGAAGAAGCA AACTTTTAAAT
2460

35 AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA AAGCCAAAGG AACTGATCAG
2520

CAGAATAAAG AATATTGCAG TAAAGAAGGC AACTTACTTA TTGAATGTGG AGCTCCTCGA
40

TGATGATTAA AATGTGAACC GTCCAAATTT GCAGTCATTA TATGAGCGTA TCTATTATCT
3480

45 ACTATCATCA TCTTTGAGTT ATTAATATCA TCTACTTTAG AATTGATAGG AAATATGAAT
3540

ACCTTTGTAG TAATATCTAT ACTATCTACA CCTAACTCAT TAAGACTTTT GATAGGCGGC
3600

50 CGCGAGCTC
3609

55

60

65

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 53 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIONES DE SECUENCIAS SEC ID NO:12:

CATCATCATG ATATCCGTTA AGTTTGTATC GTAATGACGT GGCCAAGGAG GCG
53

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID NO:13:

TACTACTACG TCGACTTATT TATTTAGAGG GTCTTTTAGG
40

REIVINDICACIONES

1. Composición inmunogénica que comprende (i) un poxvirus recombinante que comprende una molécula de ADN aislada que consiste en ORF1 y ORF2 como los ORF del circovirus porcino tipo 2 (PCV2), en la que el poxvirus es:
5 ALVAC, o
un poxvirus de canario atenuado, en el que dicho poxvirus de canario se atenúa a través de más de 200 pases en serie sobre fibroblastos de embriones de pollito, del que una semilla viral original se sometió a cuatro purificaciones sucesivas en placa bajo agar, de donde se amplificó un clon de placa a través de cinco pases adicionales, y (ii) un portador.
- 10 2. Composición inmunogénica, según la reivindicación 1, en la que el poxvirus recombinante es un poxvirus de canario ALVAC recombinante.
- 15 3. Composición inmunogénica, según la reivindicación 2, en la que dicho ALVAC tiene la secuencia mostrada en la SEC ID No. 1 y dicho locus C6 se encuentra en una posición de 377 a 2254 de la SEC ID No 1 y en la que la molécula de ADN aislada se encuentra en el locus C6 del genoma de poxvirus de canario ALVAC.
- 20 4. Composición inmunogénica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que contiene un adyuvante.
5. Composición inmunogénica, según la reivindicación 4, en la que el adyuvante es un carbómero.
6. Utilización de un poxvirus recombinante que comprende una molécula de ADN aislada que consiste en ORF1 y ORF2 como los ORF del circovirus porcino tipo 2 (PCV2), en la que el poxvirus es:
ALVAC, o
- 25 un poxvirus de canario atenuado, en el que dicho poxvirus de canario se atenúa a través de más de 200 pases en serie sobre fibroblastos de embriones de pollito, del que una semilla viral original se sometió a cuatro purificaciones sucesivas en placa bajo agar, de donde se amplificó un clon de placa a través de cinco pases adicionales, para la preparación de una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmune contra PCV2 en un cerdo adulto, un cerdo joven o una cerda gestante.
- 30 7. Utilización, según la reivindicación 6, en la que la composición inmunogénica se formula para la administración a una cerda antes de aparearse y de nuevo durante la gestación.
8. Utilización, según la reivindicación 7, en la que la composición inmunogénica se formula para la administración
35 durante la gestación en aproximadamente las semanas 6-8 de gestación y/o aproximadamente las semanas 11-13 de gestación.
9. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que la composición inmunogénica se formula para la administración a una hembra gestante para conferir inmunidad pasiva a un lechón recién nacido.
- 40 10. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que la composición inmunogénica se formula para la administración a una hembra gestante y a continuación, a su lechón o lechones después del nacimiento.
11. Utilización, según la reivindicación 6 ó 10, en la que la composición inmunogénica se formula para la
45 administración a un lechón entre el nacimiento y el destete.
12. Utilización, según la reivindicación 11, en la que la composición inmunogénica se formula para la administración a un lechón en la primera semana de vida o en la tercera semana de vida, y opcionalmente, se formula para la administración de nuevo de dos a cuatro semanas más tarde.
- 50 13. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en la que la composición inmunogénica contiene un adyuvante.
14. Utilización, según la reivindicación 13, en la que el adyuvante es un carbómero.
- 55 15. Vacuna que comprende (i) un poxvirus recombinante que comprende una molécula de ADN aislada que consiste en ORF 1 y ORF2 como los ORF del circovirus porcino tipo 2 (PCV2), en la que el poxvirus es:
ALVAC, o
un poxvirus de canario atenuado, en el que dicho poxvirus de canario se atenúa a través de más de 200 pases en serie sobre fibroblastos de embriones de pollito, del que una semilla viral original se sometió a cuatro purificaciones
60 en placa sucesivas bajo agar, de donde se amplificó un clon de placa a través de cinco pases adicionales; y (ii) un portador.
16. Vacuna, según la reivindicación 15, en la que el poxvirus recombinante es un poxvirus de canario ALVAC
65 recombinante.

17. Vacuna, según la reivindicación 16, en la que dicho ALVAC tiene la secuencia mostrada en la SEC ID No. 1 y dicho locus C6 se encuentra en la posición 377 a 2254 de SEC ID No 1 y en la que la molécula de ADN aislada se encuentra en el locus C6 del genoma del poxvirus de canario de ALVAC.
- 5 18. Vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en la que la molécula de ADN aislada se encuentra en el locus C6 de genoma del poxvirus de canario de ALVAC.
19. Vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, que contiene un adyuvante.
- 10 20. Vacuna, según la reivindicación 19, en la que el adyuvante es un carbómero.
21. Composición inmunogénica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para utilizar en el tratamiento o la prevención del síndrome del desmedro multisistémico post-destete (PMWS) o el tratamiento o la prevención de una infección por PCV2 en cerdo adulto, un cerdo joven o una cerda gestante.
- 15 22. Composición inmunogénica para utilizar, según la reivindicación 21, en la que la composición inmunogénica se formula para la administración a una cerda antes de aparearse y de nuevo durante la gestación.
23. Composición inmunogénica para utilizar, según la reivindicación 22, en la que la composición inmunogénica se formula para la administración durante la gestación en aproximadamente las semanas 6-8 de gestación y/o aproximadamente las semanas 11-13 de gestación.
- 20 24. Composición inmunogénica para utilizar, según la reivindicación 21 a 23, en la que la composición inmunogénica se formula para la administración a una hembra gestante para conferir inmunidad pasiva a un lechón recién nacido.
- 25 25. Composición inmunogénica para utilizar, según la reivindicación 21 a 23, en la que la composición inmunogénica se formula para la administración a una hembra gestante y a continuación, a su lechón o lechones después del nacimiento.
- 30 26. Composición inmunogénica para utilizar, según la reivindicación 21 ó 25, en la que la composición inmunogénica se formula para la administración a un lechón entre el nacimiento y el destete.
27. Composición inmunogénica para utilizar, según la reivindicación 26, en la que la composición inmunogénica se formula para la administración a un lechón en la primera semana de vida o en la tercera semana de vida, y
- 35 opcionalmente, se formula para la administración de nuevo de dos a cuatro semanas más tarde.

HindIII (1)

1 AAGCTTCTATCAAAGTCTTAATGAGITAGGTGTAGATAGTATAGATATTACTACAAAGGTATTCATATT
71 TCCTATCAATTCTAAAGTAGATGATATTAATAACTCAAAGATGATGATAGTAGATAANTAGATACGCTCAT
142 ATAATGACTGCAAATTTGGACGGTTCACATTTTAATCATCACGCGTTCATAAGTTTCACTGCATAGATC
211 AAAATCTCACTAAAAAGATAGCCGATGTATTTGAGAGAGATTGGACATCTAACTACGCTAAAGAAATTAC
281 AGTTATAAATAATACATAATGGATTTTGTATCATCAGTTATTTTAAACATAAGTACAATAAAAAGTATT
351 AAATAAAAATACTTACTTACGAAAAATGTCATTATTACAAAACTATATTTTACAGAACAATCTATAGT
1 Met Ser LeuLeuGlnLysLeuTyrPheThr GluGlnSer IleVal
421 AGAGTCCTTTAAGAGTTATAATTTAAAAGATAACCATAATGTAATATTTACCACATCAGATGATGATACT
15 Met GluSer PheLysSer TyrAsnLeuLysAspAsnHisAsnVal IlePheThr Thr Ser AspAspAspThr
491 GTTGTAGTAATAAATGAAGATAATGTACTGTATCTACAAGATTATTATCATTTTGATAAAAATTCGTGTTTT
39 Val Val Val IleAsnGluAspAsnVal LeuLeuSer Thr ArgLeuLeuSer PheAspLys IleLeuPheP
561 TTAACTCCTTTAATAACGGTTTATCAAATACGAAACTATTAGTGATACAATATTAGATATAGATACTCA
62 HeAsnSer PheAsnAsnGlyLeuSer LysTyrGluThr IleSer AspThr IleLeuAsp IleAspThr Hi
631 TAATTTATATATACCTAGTTCCTTCTCTTTGTTAGATATTCTAAAAAAGAGCGGTGTGATTTAGAATTA
85 AsnTyrTyrIleProSer Ser Ser LeuLeuAspIleLeuLysLysArgAlaCysAspLeuGluLeu
701 GAAGATCTAAATTTATGCGTTAATAGGAGACAATAGTAACTTATATTATAAAGATATGACTTACATGAATA
109 GluAspLeuAsnTyrAlaLeuIleGlyAspAsnSerAsnLeuTyrTyrLysAspMet Thr TyrMetAsnA
771 ATTGGTTATTTACTAAAGGATTATTAGATTACAAGTTTGTATTATTGCGCGATGTAGATAAATGTTACAA
132 snTrpLeuPheThr LysGlyLeuLeuAspTyrLysPheVal LeuLeuArgAspValAspLysCysTyrLy
NruI (880) NdeI (901)

841 ACAGTATAATAAAAAGAATACTATAATAGATATAATACATCGCGATAACAGACAGTATAACATATGGGTT
155 sGlnTyrAsnLysLysAsnThr IleIleAspIleIleHis ArgAspAsnArgGlnTyrAsnIleTrpVal
911 AAAAATGTTATAGAATACTGTTCCTCGCTATATATTATGGTTACATGATCTAAAAGCCGCTGCTGAAG
179 LysAsnVal IleGluTyrCysSer ProGlyTyrIleLeuTrpLeuHis AspLeuLysAlaAlaAlaGluA
981 ATGATTGGTTAAGATACGATAACCGTATAAACGAATTATCTGCGGATAAATTATACACTTTCGAGTTCAT
202 spAspTrpLeuArgTyrAspAsnArgIleAsnGluLeuSer AlaAspLysLeuTyrThr PheGluPheIle
1051 AGTTATATTAGAAAATAATATAAAACATTTACGAGTAGGTACAATAATTGTACATCCAACAAGATAATA
225 eVal IleLeuGluAsnAsnIleLysHisLeuArgVal GlyThr IleIleValHisProAsnLysIleIle
1121 GCTAATGGTACATCTAATAATATACTTACTGATTTTCTATCTTACGTAGAAGAATAATATATATCATCATA
249 AlaAsnGlyThr Ser AsnAsnIleLeuThr AspPheLeuSer TyrVal GluGluLeuIleTyrHisHisA
EcoRI (1223)

1191 ATTCATCTATAATATTGGCCGATATTTTTTAGAATCTTTGAGACCACTATTTTATCAGAATTTATTTTC
272 snSer SerIleIleLeuAlaGlyTyrPheLeuGluPhePheGluThr Thr IleLeuSer GluPheIleSe
1261 TTCATCTTCTGAATGGGTAATGAATAGTAACTGTTTAGTACACCTGAAAACAGGGTATGAAGCTATACTC
295 r Ser Ser Ser GluTrpValMetAsnSerAsnCysLeuValHisLeuLysThr GlyTyrGluAlaIleLeu
1331 TTTGATGCTAGTTTATTTTCCAACTCTCTACTAAAAGCAATTATGTAAAATATTGGACAAAGAAAACCTT
319 PheAspAlaSer LeuPhePheGlnLeuSer Thr LysSerAsnTyrValLysTyrTrpThr LysLysThrL
1401 TGCAGTATAAGAACTTTTTTAAAGACGGTAAACAGTTAGCAAATATATAATTAAGAAAGATAGTCAGGT
342 euGlnTyrLysAsnPhePheLysAspGlyLysGlnLeuAlaLysTyrIleIleLysLysAspSer GlnVa

1473 GATAGATAGAGTATGTTATTTACACGCAGCTGTATATAATCACGTAACCTTACTTAATGGATACGTTTAAA
 365▶ I l l e A s p A r g V a l C y s T y r L e u H i s A l a A l a V a l T y r A s n H i s V a l T h r T y r L e u M e t A s p T h r P h e L y s

1541 ATTCTGGTTTTGATTTTAAATTTCTCCGGAATGATAGATATACTACTGTTTGGAAATATGCATAAGGATA
 389▶ I l e P r o G l y P h e A s p P h e L y s P h e S e r G l y M e t I l l e A s p I l l e L e u L e u P h e G l y I l l e L e u H i s L y s A s p A

1611 ATGAGAATATATTTTATCCGAAACGTGTTTCTGTAACCTAATATAATATCAGAATCTATCTATGCAGATTT
 412▶ s n G l u A s n I l l e P h e T y r P r o L y s A r g V a l S e r V a l T h r A s n I l l e I l l e S e r G l u S e r I l l e T y r A l a A s p P h

1661 TTACTTTATATCAGATGTTAATAAATTCAGTAAAAAGATAGAATATAAACTATGTTTCTTACTACTCGCA
 435▶ e T y r P h e I l l e S e r A s p V a l A s n L y s P h e S e r L y s L y s I l l e G l u T y r L y s T h r M e t P h e P r o I l l e L e u A l a

1751 GAAACTACTATCCAAAAGGAAGGCCCTATTTTACACATACATCTAACGAAGATCTTCTGTCTATCTGTT
 459▶ G l u A s n T y r T y r P r o L y s G l y A r g P r o T y r P h e T h r H i s T h r S e r A s n G l u A s p L e u L e u S e r I l l e C y s L

1821 TATCGGAAGTAAACAGTTTGTAAAGATATAAAAAATCCATTATTATATTCTAAAAAGGATATATCAGCAAA
 482▶ e u C y s G l u V a l T h r V a l C y s L y s A s p I l l e L y s A s n P r o L e u L e u T y r S e r L y s L y s A s p I l l e S e r A l a L y

1891 ACGATTCATAGGTTTATTTACATCTGTGATATAAATACGGCTGTTGAGTTAAGAGGATATAAATAAGA
 505▶ s A r g P h e I l l e G l y L e u P h e T h r S e r V a l A s p I l l e A s n T h r A l a V a l G l u L e u A r g G l y T y r L y s I l l e A r g

1961 GTAATAGGATGTTTAGAATGGCCTGAAAAGATAAAAATATTTAATTTCTAATCTACATACATTAGATTAT
 529▶ V a l I l l e G l y C y s L e u G l u T r p P r o G l u L y s I l l e L y s I l l e P h e A s n S e r A s n P r o T h r T y r I l l e A r g L e u L

2031 TACTAACGAAAGACGTTTATAGATATTTCTACATTCCTATCTGCTTAAATTTTATATAACAGAGGATATAGC
 552▶ e u L e u T h r G l u A r g A r g L e u A s p I l l e L e u H i s S e r T y r L e u L e u L y s P h e A s n I l l e T h r G l u A s p I l l e A l

2101 TACCAGAGATGGAGTCAGAAATAATTTACCTATAATTTCTTTTATCGTCAGTTATTGTAGATCGTATACT
 575▶ a T h r A r g A s p G l y V a l A r g A s n A s n L e u P r o I l l e I l l e S e r P h e I l l e V a l S e r T y r C y s A r g S e r T y r T h r

NdeI (2189)

2171 TATAAATTAATAAATGCCATATGTACAATTCGTGTAAGATAACAAAGTGAATATAATCAGGTAATAT
 599▶ T y r L y s L e u L e u A s n C y s H i s M e t T y r A s n S e r C y s L y s I l l e T h r L y s C y s L y s T y r A s n G l u V a l I l l e T

2241 ATAATCTATATAGGAGTATATATAATGAAAAGTAAAATATAAATCATATAAATGAAACGAAATAT
 622▶ y r A s n P r o l i e . . .

2311 CAGTAATAGACAGGAACCTGGCAGATTCCTTCTTCTAATGAAGTAAGTACTGCTAAATCTCCAAAATTAGAT

2381 AAAAATGATACAGCAAATACAGCTTCATTCACGAATTTACCTTTTAAATTTTTCAGACACACCTTATTAC

2451 AAATAACTAAGTCAGATGATGAGAAAAGTAAATATAAATTTAACTTATGGGTATAATATAATAAAGATTC

2521 ATGATATTAATAATTTACTTAACGATGTTAATAGACTTATTCCATCAACCCCTTCAAACCTTTCTGGATA

2591 TTATAAATAACCAGTTAATGATATTAATAAGATTGTTAAGAGATGTAATAATATTATTGGAGGTAAG

2661 GATATAAATAAGTCTATCTTTTCACATGGAAATGAATTACCTAATATTAATAATTATGATAGGAATTTT

2731 TAGGATTTACAGCTGTTATATGTATCAACAATACAGGCAGATCTATGGTTATGGTAAAACACTGTAACGG

2801 GAAGCAGCAATCTATGGTAACTGGCCTATGTTTAAATAGCCAGATCATTTTACTCTATAAACATTTTACCA

BamHI (2880)

2871 CAAATAATAGGATCCCTCTAGATATTTAATATTATATCTAACAACAACAAAAAATTTAACGATGTATGGC

2941 CAGAAGTATTTTCTACTAATAAAGATAAAGATAGTCTATCTTATCTACAAGATATGAAAGAAGATAATCA

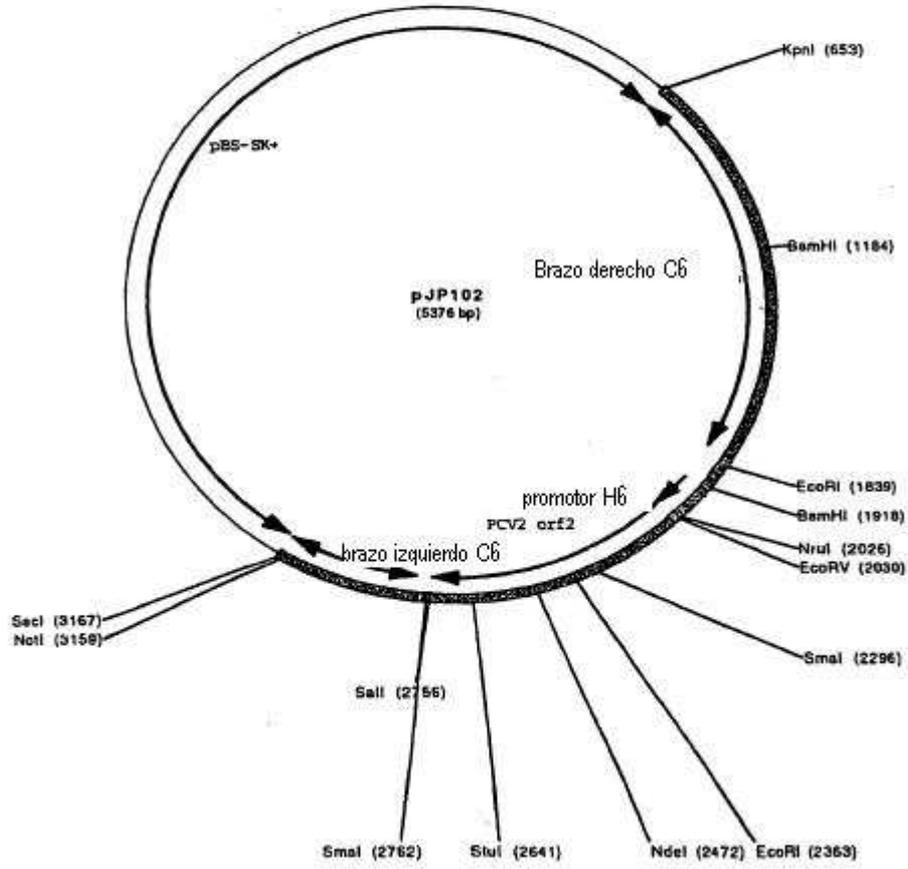
HindIII (3058)

3011 TTTAGTAGTAGCTACTAATATGGAAGAAGTGTATACAAAACGTGGAAGCTTTTATATTAAATAGCATA

3081 TTACTAGAAGATTTAAATCTAGACTTAGTATAACAAAACAGTTAAATGCCAATATCGATTCTATATTT

3151 ATCATAACAGTAGTACATTAATCAGTGATATACTGAAACGATCFACAGACTCAACTATGCAAGGAATAAG
3221 CAATATGCCAATTATGTCTAATATTTAACTTTAGAACTAAAACGTTCTACCAATACTAAAAATAGGATA
3291 CGTGATAGGCTGTTAAAAGCTGCAATAAATAGTAAGGATGTAGAAGAAATACTTTGTTCTATACCTTCGG
3361 AGGAAAGAACTTTAGAACAACTTAAGTTAATCAAACCTTGATTTATGAACACTATAAAAAAATTATGGA
3431 AGATACAAGTAAAAGAATGGATGTTGAATGTCGTAGTTTAGAACATAACTATACGGCTAACTTATATAAA
3501 GTGTACGGACAAAACGAATATATGATTACTTATATACTAGCTCTCATAAGTAGGATTAATAATATTATAG
3571 AAACCTTAAAATATAATCTGGTGGGGCTAGACGAATCTACAATACGTAATATAAATTATATAATTTTACA
3641 AAGAACAAAAAAAATCAAGTTTCTAATACCTTATAGATAAACTATATTTTTTACCCTGA

Fig 2



KpnI (1)

1 GGTACCTTCATAAATACAAGTTTGATTAAACTTAAGTTGTTCTAAAGTTCTTTCTCCGAAGGTATAGAA

71 CAAAGTATTTCTTCTACATCCTTACTATTTATTGACAGCTTTTAACAGCCTATCACGTATCCTATTTTTAG

141 TATTGGTAGAACGTTTTAGTCTAAAGTTAAAATATTAGACATAATTGGCATATTGCTTATTCCTTGCA

211 AGTTGAGTCTGTAGATCGTTTCAGTATATCACTGATTAATGTACTACTGTTATGATGAAATATAGAATCG

281 ATATTGGCATTAACTGTTTTGTATATACTAAGTCTAGATTTTAAATCTTCTAGTAATATGCTATTTAATA

351 TAAAAGCTTCACGTTTTGTATACATTTCTTTCCATATTAGTAGCTACTACTAAATGATTATCTTCTTT

421 CATATCTGTAGATAAGATAGACTATCTTTATCTTTATTAGTAGAAAATACTTCTGGCCATACATCGTTA

BamHI (532)

491 AATTTTTTTGTTGTTGTTAGATATAATATTAATATCTAGAGGATCCTATTATTTGTGGTAAAATGTTTA

561 TAGAGTAAAATGATCTGGCTATTAAACATAGGCCAGTTACCATAGAATGCTGCTTCCCGTTACAGTGT

631 TACCATAACCATAGATCTGCCTGTATTGTTGATACATATAACAGCTGTAATCCTAAAAAATCCTATCA

701 TAATTATTAATATTAGGTAATTCATTTCCATGTGAAGATAGACTAATTTTATATCCTTTACCTCCAAAT

771 AATTATTTACATCTCTTAAACAATCTATTTTAAATATCATTAACTGGTATTTTATAATATCCAGAAAGGTT

841 TGAAGGGGTTGATGGAATAAGTCTATTAACATCGTTAAGTAAATTTAATATATCATGAATCTTTATTATA

911 TTATACCATAAGTTAAATTTATATTTACTTTCTCATCATCTGACTTAGTTAGTTTGTAAATAAGGTGTGT

981 CTGAAAAAATTAAGGTAATTCGTTGAATGAAGCTGTATTTGCTGTATCAITTTTATCTAATTTTGGAG

1051 ATTTAGCAGTACTTACTTTCATTAGAAGAAGAATCTGCCAGTTCCTGTCTATTACTGATATTTCGTTTCAT

EcoRI (1)

1121 TATTATATGATTTATATTTTACTTTTTCAATTATATATACTCATTTGACTAGTTAATCAATAAAAAGAAT

1191 TCCTGCAGCCCTGCAGCTAATTAATTAAGCTACAAATAGTTTCGTTTTACCTTGTCTAATAACTAATTA

BamHI (1266)

1261 ATTAAGGATCCCCAGCTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTT

EcoRV (1378)

NruI (1374)

1331 GTGTTAAATGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTGATCGT

1401 AATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGCAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCCTC
 1▶MetThrTyrProArgArgArgTyrArgArgArgArgHisArgProArgSerHisLeuGlyGlnIleLeu

1471 CGCCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGCTACCGTTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACA
 24▶ArgArgArgProTrpLeuValHisProArgHisArgTyrArgTrpArgArgLysAsnGlyIlePheAsnT

1541 CCCGCCTCTCCCGACCTTCGGATATACTGTCAAGCGTACCACAGTCACAACGCCCTCCTGGGCGGTGGA
 47▶hrArgLeuSerArgThrPheGlyTyrThrValLysArgThrThrValThrThrProSerTrpAlaValAs

SmaI (1644)

1611 CATGATGAGATTTAAAATTGACGACTTTGTTCCCCCGGGAGGGGGACCAACAAAATCTCTATACCCTTT
 70▶pMetMetArgPheLysIleAspAspPheValProProGlyGlyGlyThrAsnLysIleSerIleProPhe

EcoRI (1711)

1681 GAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGGTTGAATTCGGCCCTGCTCCCCCATCACCCAGGGTGATAGGG
 94▶ GluTyrTyrArgIleArgLysValLysValGluPheTrpProCysSerProlIleThrGlnGlyAspArgG

NdeI

1751 GAGTGGGCTCCACTGCTGTTATTCTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCC
 117▶ IyValGlySerThrAlaValIleLeuAspAspAsnPheValThrLysAlaThrAlaLeuThrTyrAspPr

1821 ATATGTAAACTACTCCTCCCGCCATACAATCCCCCAACCCTTCTCCTACCACTCCCGTTACTTCACACCC
 140▶ oTyrValAsnTyrSerSerArgHisThrIleProGlnProPheSerTyrHisSerArgTyrPheThrPro

1891 AAACCTGTTCTTGACTCCACTATTGATTACTTCCAACCAATAACAAAAGGAATCAGCTTTGGCTGAGAC
 164▶ LysProValLeuAspSerThrIleAspTyrPheGlnProAsnAsnLysArgAsnGlnLeuTrpLeuArgL

StuI (1989)

1961 TACAAACCTCTGGAAATGTGGACCACGTAGGCCTCGGCGCTGCGTTGAAAACAGTAAATACGACCAGGA
 187▶ euGlnThrSerGlyAsnValAspHisValGlyLeuGlyAlaAlaPheGluAsnSerLysTyrAspGlnAs

2031 CTACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAATTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCCACTTAAACCC
 210▶ pTyrAsnIleArgValThrMetTyrValGlnPheArgGluPheAsnLeuLysAspProProLeuLysPro

SmaI (2110)

Sall (2104)

2101 TAAGTCGACCCCGGTTTTATAGCTAATFAGTCATTTTTTCGTAAGTAAGTATTTTTATTTAATACTTT
 2171 TTATTGACTTATGTTAAATATAACTGATGATAACAAAATCCATTATGTATTATTTATAACTGTAATTT
 2241 TTTAGCGTAGTTAGATGTCCAATCTCTCAAATACATCGGCTATCTTTTTAGTGAGATTTTGATCTATG
 2311 CAGTTGAAACTTATGAACCGGTGATGATTAATAATGTGAACCGTCCAAATTTGCAGTCATTATATGAGCGT
 2381 ATCTATTATCTACTATCAATCATCTTTGAGTTATTAATATCATCTACTTTAGAAATTGATAGGAAATATGAA

SacI (2515)

NotI (2507)

2451 TACCTTTGTAGTAATATCTATACTATCTACACCTAACTCATTAAAGACTTTTGATAGCGCGCCGCGAGCTC

Fig. 3B

Fig. 4

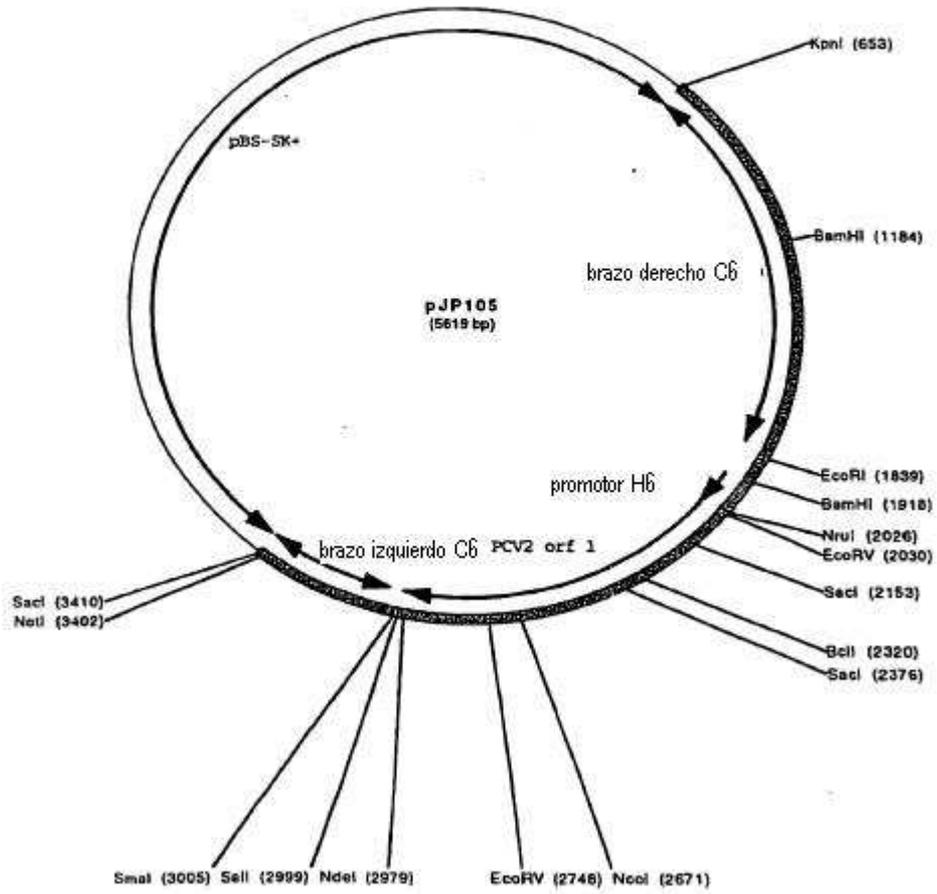
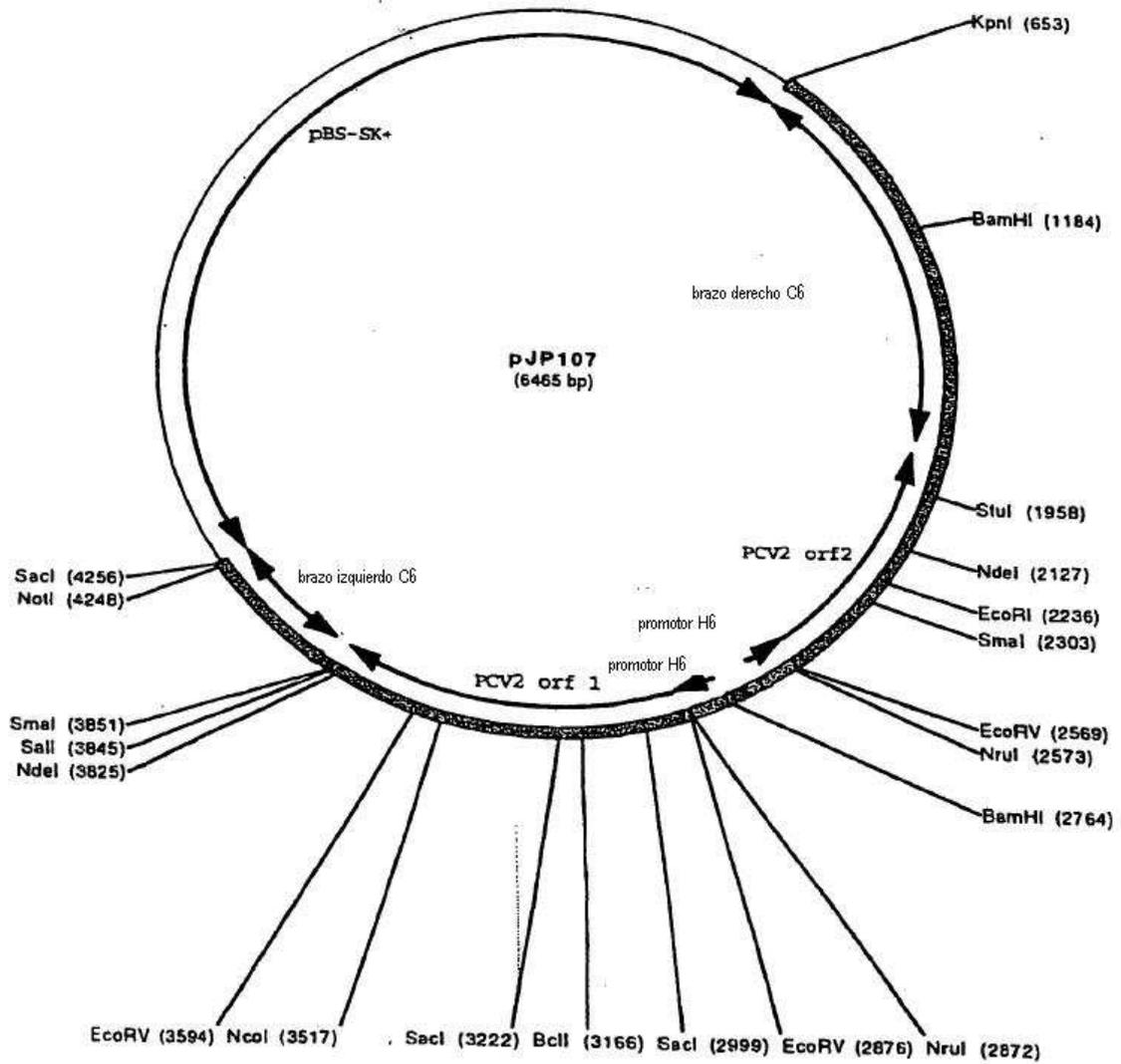


Fig 6A

KpnI (1)
 1 GGTACCTTCATAAATACAAGTTTGATTAACTTAAGTTGTTCTAAAGTTCTTCTCCGAAGGTATAGAA
 71 CAAAGTATTTCTTCTACATCCTTACTATTTATTGCAGCTTTTAAACAGCCTATCACGTATCCTATTTTATG
 141 TATTGGTAGAACGTTTTAGTTCTAAAGTTAAAATATTAGACATAATTGGCATATTGCTTATTCCCTTGCAT
 211 AGTTGAGTCTGTAGATCGTTTCAGTATATCACTGATTAATGTACTACTGTTATGATGAAATATAGAATCG
 281 ATATTGGCATTAACTGTTTTGTTATACTAAGTCTAGATTTTAAATCTTCTAGTAATATGCTATTTAATA
 351 TAAAAGCTTCCACGTTTTTGTATACATTTCTTTCCATATTAGTAGCTACTACTAAATGATATCTTCTTT
 421 CATATCTTGTAGATAAGATAGACTATCTTTATCTTTATTAGTAGAAAATACTTCTGGCCATACATCGTTA
 BamHI (532)
 491 AATTTTTTGTGTTGTTAGATATAATATTAATATCTAGAGGATCCTATTTATTTGTGGTAAAATGTTTA
 561 TAGAGTAAAATGATCTGGCTATTAAACATAGGCCAGTTACCATAGAATGCTGCTTCCCGTTACAGTGT
 631 TACCATAACCATAGATCTGCCCTGTATTGTTGATACATATAACAGCTGTAATCTTAAAAAATTCCTATCA
 701 TAATTAATAATTAGGTAATTCATTTCCATGTGAAAGATAGACTAATTTTATATCTTTCACCTCCAAT
 771 AATTATTACATCTCTTAAACAATCTATTTTAAATATCACTAACTGGTATTTTATAATATCCAGAAAGGTT
 841 TGAAGGGGTTGATGGAATAAGTCTATTAACATCGTTAAGTAAATTATTAATATCATGAATCTTTATATA
 911 TTATACCATAAGTTAAATTTATATTTACTTTCTCATCATCTGACTTAGTTAGTTTGTAAATAAGGTGTGT
 981 CTGAAAAAATTAAGGTAATTCGTTGAATGAAGCTGTATTGCTGTATCATTTTTATCTAATTTTGGAG
 1051 AATTAGCAGTACTTACTTCAATTAGAAGAAGAATCTGCCAGTTCCTGTCTATTACTGATATTTGTTTCAT
 1121 TATTATATGATTTATATTTTACTTTTTCAATTATATATACTCATTGACTAGTTAATCAATAAAAAGAAT
 1191 TTCGACTTAGGGTTAAGTGGGGGTCITTAAGATTAAATTCCTCTGAATGTACATACATGTTACACGG
 233 4 ProLysLeuProProAspLysLeuAsnPheGluArgPheGluValTyrMetThrValArgI
 StuI (1306)
 1261 ATATTGTAGTCTGGTCTGATTTACTGTTTTCGAACGCAGCGCCGAGGCTACGTTGGTCCACATTTCCAG
 212 4 LeAsnTyrAspGlnAspTyrLysSerAsnGluPheAlaAlaGlyLeuGlyValHisAspValAsnGlySe
 1331 AGGTTTGTAGTCTCAGCCAAAGCTGATTCCTTTTTGTTATTTGGTTGGAAGTAATCAATAGTGGAGTCAAG
 189 4 rThrGlnLeuArgLeuTrpLeuGlnAsnArgLysAsnAsnProGlnPheTyrAspIleThrSerAspLeu
 1401 AACAGGTTTGGGTGTGAAGTAACGGGAGTGGTAGGAGAAGGGTTGGGGATTGTATGGCGGGAGGAGTAG
 166 4 ValProLysProThrPheTyrArgSerHisTyrSerPheProGlnProIleThrHisArgSerSerTyrA
 NdeI (1475)
 1471 TTTACATATGGGTATAGGTTAGGGCTGTGGCCTTTGTTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCAGTGG
 142 4 snValTyrProAspTyrThrLeuAlaThrAlaLysThrValPheAsnAspAspLeuIleValAlaThrSe
 EcoRI (1584)
 1541 AGCCCACTCCCTATCACCTGGGTGATGGGGGAGCAGGGCCAGAATTCAACCTTAACTTTCTTATTCT
 119 4 rGlyValGlyArgAspGlyGlnThrIleProSerCysProTrpPheGluValLysValLysArgIleArg
 SmaI (1651)
 1611 GTAGTATTCAAAGGTATAGAGATTTTGTGGTCCCCCTCCCGGGGAACAAAGTCGTCAATTTTAAAT
 96 4 TyrTyrGluPheProIleSerIleLysAsnThrGlyGlyGlyProProValPheAspAspIleLysPheA

Fig 5



168.. CTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTGTGACTGTGGTACGCTTGACAGTATATCCGAAGGTGCGGG
 724 r gMeI MeI AspValAlaIrpSer ProThr Thr Val Thr Thr ArgLysVal Thr TyrGlyPheThr ArgSe

1751 AGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTTCTTCTCCAACGGTAGCGGTGGCGGGGGTGGACGAGCCAGGG
 494 r LeuArgThr AsnPheIleGlyAsnLysArgArgTrpArgTyrArgHisArgProHisValLeuTrpPro

1821 GCGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGGCGGTGTCTTCTCTGCGGTAACGCCTCCTTGGGA
 264 A r g A r g A r g L e u l l e G l n G l y L e u H i s S e r A r g P r o A r g H i s A r g A r g A r g T y r A r g A r g A r g P r o T

NruI (1921)
 EcoRV (1917)

1891 TACGTCAATTACGATACAACTTAACGGATATCGCGATAATGAAATAATTTATGATTATTTCTCGCTTTCA
 24 y r Thr Met

1961 ATTTAACACAACCCCTCAAGAACCTTTGTATTTATTTTTCACTTTTTAAGTATAGAATAAAGAAGCTGGGGG

203.. ATCAATTCCTGCAGCCCTGCAGCTAATTAATTAAGCTACAAATAGTTTCGTTTTACCTTGTCTAATAAC

BamHI (2112)

210.. TAATTAATTAAGGATCCCCAGCTTCTTTATTTCTATACTTAAAAAGTAAAAATAAATACAAAGGTTCTTG

EcoRV (2224)
 NruI (2220)

2171 AGGTTGTGTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTAATTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTG

2241 TATCGTAATGCCAGCAAGAAGATGGAAGAAGCGGACCCCAACCACATAAAGGTGGGTGTTCCAGCTG
 1 P MeI ProSer LysLysAsnGlyArgSer GlyProGlnProHisLysArgTrpValPheThrLeu

SacI (2347)

2311 AATAATCCTTCCGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGCTCCCAATCTCCCTATTTGATTATTTTATTG
 22 P AsnAsnProSer GluAspGluArgLysLysIleArgGluLeuProIleSer LeuPheAspTyrPheIleV

2381 TTGGCGAGGAGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGTTCGCTAATTTTGTGAAGAAGCA
 45 P a l G l y G l u G l u G l y A s n G l u G l u G l y A r g T h r P r o H i s L e u G l n G l y P h e A l a A s n P h e V a l L y s L y s G l

BclI (2514)

2451 AACTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCCGCTGCCACATCGAGAAAGCCAAAGGAAGTATGATCAG
 68 P n Thr PheAsnLysValLysTrpTyrLeuGlyAlaArgCysHisIleGluLysAlaLysGlyThrAspGln

SacI (2570)

2521 CAGAATAAAGAATATTCAGTAAAGAAGGCAACTTACTTATTGAATGTGGAGCTCTCGATCTCAAGGAC
 92 P Gl nAsnLysGluTyrCysSer LysGluGlyAsnLeuLeuIleGluCysGlyAlaProArgSer Gl nGlyG

2591 AACCGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTACCTTGTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCA
 115 P I n A r g S e r A s p L e u S e r T h r A l a V a l S e r T h r L e u L e u G l u S e r G l y S e r L e u V a l T h r V a l A l a G l u G l

2661 GCACCCTGTAAACGTTTGTGTCAGAAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAAGTGAAGCGGGAAAATGCAG
 138 P n H i s P r o V a l T h r P h e V a l A r g A s n P h e A r g G l y L e u A l a G l u L e u L e u L y s V a l S e r G l y L y s M e t G l n

2731 AAGCGTGAATGGAAGACCAATGTACACGTCAATGTGGGGCCACCTGGGTGTGGTAAAGCAATGGGCTG
 162 P L y s A r g A s p T r p L y s T h r A s n V a l H i s V a l l e V a l G l y P r o P r o G l y C y s G l y L y s S e r L y s T r p A l a A

NcoI (2865)

2801 CTAATTTTGCAGACCCGAAACCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATGG
 185 P l a A s n P h e A l a A s p P r o G l u T h r T h r T y r T r p L y s P r o P r o A r g A s n L y s T r p T r p A s p G l y T y r H i s G l

2871 TGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGATCTACTGAGACTGTGTGAT
 208 P y G l u G l u V a l V a l V a l l e A s p A s p P h e T y r G l y T r p L e u P r o T r p A s p A s p L e u L e u A r g L e u C y s A s p

EcoRV (2942)

2941 CGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAAGTGTACCTTTTTTGGCCCGCAGTATTTCTGATTACCA
 232 P A r g T y r P r o L e u T h r V a l G l u T h r L y s G l y G l y T h r V a l P r o P h e L e u A l a A r g S e r l l e L e u l l e T h r S

ES 2 560 513 T3

3011 GCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTCCTCAACTGCTGTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGAT
255 SerAsnGlnThrProLeuGluTrpTyrSerSerThrAlaValProAlaValGluAlaLeuTyrArgArgIle

3081 TACTTCCTTGGTATTTTGGGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGCCAGTTCGTCACCCTT
278 ThrSerLeuValPheTrpLysAsnAlaThrGluGlnSerThrGluGluGlyGlnPheValThrLeu

NdeI (3173) SmaI (3189)
Sall (3193)

3151 TCCCCCCATGCCCTGAATTTCCATATGAAATAAATTACTGAGTCGACCCCGGGTTTTTATAGCTAATTA
302 SerProProCysProGluPheProTyrGluIleAsnTyr

3221 GTCATTTTTTCGTAAGTAAGTATTTTTATTTAATACTTTTTATTGTACTTATGTTAAATATAACTGATGA

3291 TAACAAAATCCATTATGTATTATTATAACTGTAATTTCTTTAGCGTAGTTAGATGTCCAATCTCTCTCA

3361 AATACATCGGCTATCTTTTTAGTGAGATTTTGATCTATGCAGTTGAAACTTATGAACGCGTGATGATTAA

3431 AATGTGAACCGTCCAAATTTGCAGTCATTATATGAGCGTATCTATTATCTACTATCATCATCTTTGAGTT

3502 ATTAATATCATCTACTTTAGAATTGATAGGAAATATGAATACCTTTGTAGTAATATCTATACTATCTACA

SacI (3604)
NotI (3596)

3571 CCTAACTCATTAAGACTTTTGATAGGCGCCGCGAGCTC