

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 013**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**C07K 14/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2012 PCT/EP2012/066934**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13030320**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2012 E 12751536 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2750704**

54 Título: **Proteínas sintéticas de la cápside y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**02.09.2011 EP 11306094**

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

**16.02.2018**

73 Titular/es:

**CEVA SANTE ANIMALE (100.0%)  
10 Avenue de La Ballastière  
33500 Libourne Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**PÉNZES, ZOLTÁN;  
KOLLÁR, ANNA y  
IVOK, MARIANNA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 655 013 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**

Proteínas sintéticas de la cápside y usos de las mismas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a proteínas sintéticas y sus usos. Más concretamente, la invención se refiere a proteínas sintéticas de la cápside de tipo Circovirus con propiedades mejoradas. Estas proteínas, o los ácidos nucleicos codificantes, son útiles, p. ej., para generar anticuerpos, composiciones inmunógenas o vacunas. La invención se refiere además a métodos para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas a CVP2 en mamíferos usando dichas proteínas, ácidos nucleicos o composiciones. La invención también se refiere a composiciones y métodos para detectar CVP2 en una muestra, usando las proteínas, ácidos nucleicos o anticuerpos anteriores.

**10 Antecedentes de la invención**

El circovirus porcino (CVP) se identificó originalmente como un contaminante de cultivos celulares de riñón porcino (PK15 ATCC CCL-33). El virión de CVP se ha caracterizado por ser un virus icosaédrico sin envoltura con un ADN circular monocatenario de aproximadamente 1,76 kb. El CVP se clasificó en el género Circovirus de la familia Circoviridae, que consiste en otros circovirus animales tal como el virus de la enfermedad del pico y las plumas de las psitaciformes, circovirus de la oca, Circovirus del canario y Circovirus de la paloma. Se han reconocido dos genotipos de CVP. El CVP procedente de células PK15 se ha considerado no es patógeno para los cerdos, y se le denomina CVP tipo 1 (CVP1). Por otro lado, CVP tipo 2 (CVP2) ha sido aceptado como el principal agente infeccioso involucrado en varias enfermedades porcinas. Las enfermedades asociadas a CVP2 causan pérdidas económicas significativas a los productores porcinos de todo el mundo. Las enfermedades asociadas a CVP2 se describen en el documento WO2007/076520 e incluyen, por ejemplo, síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS), dermatitis porcina y síndrome de nefropatía (PDNS), complejo de enfermedad respiratoria porcina (PRDC), trastornos reproductivos, enteritis granulomatosa, epidermitis exudativa, linfadenitis necrosante y temblores congénitos. Se han notificado casos de CVP2 subtipo A (CVP2A) y CVP2 subtipo B (CVP2B) especialmente en 2000 en Europa occidental y en Europa central en 2003. Más recientemente, se han notificado cambios similares en 2008 en jabalíes.

Las vacunas contra el CVP2 actualmente desarrolladas, tales como Circovac® (Merial), Ingelvac®, CircoFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica) o Suvaxyn®, son vacunas contra el CVP2 inactivadas o vacunas subunitarias. Con respecto a las vacunas contra el CVP2 inactivadas, las cepas contra el CVP2 actuales subtipo A o B presentan varias debilidades. Especialmente, los virus CVP2 solo pueden producirse a valores bajos, generalmente menos de 10<sup>5</sup> partículas víricas de TCID50 por ml. Además, estos virus no pueden mantenerse en cultivos de tejidos ni en estirpes celulares permanentemente infectadas. Con respecto a las vacunas subunitarias contra CVP2A, normalmente usan una proteína de la cápside de CVP2A recombinada purificada producida por la expresión del gen ORF2 de CVP2A en un sistema de baculovirus. En este sentido, la proteína codificada por ORF2 de cepas Imp1011 de CVP2 se ha descrito en la patente europea EP1741785. Una proteína codificada por ORF2 de la cepa CVP2Rm de CVP2 se ha descrito en el documento WO2010/061000. La proteína codificada por ORF2 de la cepa 412 de CVP2 se ha descrito en la patente europea EP1816200. Otra proteína codificada por un ORF2 de un la cepa de CVP2 adicional se ha descrito en las patentes europeas EP1036180 o EP2225367.

Sin embargo, la eficacia de expresión y la inmunogenia de estas proteínas naturales de la cápside no son óptimas y no siempre proporcionan el nivel requerido de protección inmunitaria en los animales vacunados.

40 Por consiguiente, hay necesidad de composiciones de vacuna alternativas para mejorar la eficacia del tratamiento o la prevención de infecciones por CVP2 en mamíferos, especialmente en cerdos.

**Compendio de la invención**

45 La presente invención describe proteínas sintéticas de la cápside con propiedades mejoradas. Estas proteínas se pueden usar solas o en combinación con otras proteínas de la cápside o inmunógenos, para producir una inmunidad protectora o defensiva mejorada contra la infección por CVP2 en mamíferos.

Un objeto de la invención, por lo tanto, se refiere a proteínas que comprenden una secuencia seleccionada de la SEQ ID n°: 2, 4 o 6, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con una de dichas secuencias y es capaz de provocar o estimular una respuesta inmunitaria contra un virus CVP2.

Otros objetos de la invención son los definidos en las reivindicaciones.

50 La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína como se definió anteriormente. La invención también se refiere a un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico, normalmente bajo el control de un activador.

Otro objeto de la presente invención es una composición que comprende una proteína, ácido nucleico o vector como se definió anteriormente. La composición puede comprender además un excipiente y/o un adyuvante. La composición puede usarse como un inmunógeno para producir anticuerpos específicos. La composición puede ser una vacuna.

A este respecto, un objeto concreto de la invención es una composición de vacuna que comprende una cantidad

inmunológicamente eficaz de una proteína, ácido nucleico o vector como se definió anteriormente y, opcionalmente, un excipiente y/o un adyuvante. La vacuna puede comprender otros principios activos tales como uno o varios antígenos proteicos adicionales.

5 La invención también se refiere a un método para producir dicha vacuna, así como al uso de dicha vacuna para tratar mamíferos.

La invención también describe métodos para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas a CVP2 en un mamífero no humano, y métodos para inmunizar o vacunar un sujeto animal no humano, tales como cerdos, ganado porcino, lechones, contra infecciones por CVP2, que comprenden administrar a dicho animal una proteína, ácido nucleico o composición de vacuna como se definió anteriormente.

10 La invención también se refiere a una proteína o antígeno como se definió anteriormente para su uso para tratar o prevenir enfermedades asociadas a CVP2 en un mamífero no humano.

Según otro aspecto, la presente invención describe un método para diagnosticar la presencia de virus CVP2 en una muestra, reactivos usados para ello, así como equipos de diagnóstico y pruebas de diagnóstico.

15 La invención también se refiere a una célula recombinada que comprende un ácido nucleico como se definió anteriormente que codifica una proteína de la invención.

La invención se refiere además a un método para producir una proteína de la invención que comprende cultivar una célula como se definió anteriormente en condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico y la recuperación de la proteína.

#### Breve descripción de los dibujos

20 Figura 1: Detección de BaculoPRO1 por inmunotransferencia Western. 1. Biorad All Blue Standards (161-0373) 2. Referencia positiva con etiqueta Flag. 3. Células Sf9 (referencia negativa) 4. Fracción soluble de la serie de producción n° 1 (PRO1) (tras exposición a ultrasonidos) 5. Precipitado del extracto celular de la serie de producción n° 1 (PRO1) 6. Pocillo vacío 7. Fracción soluble de la serie de producción n° 2 (PRO1) (tras la exposición a ultrasonidos) 8. Precipitado del extracto celular de la serie de producción n° 2 (PRO1).

#### 25 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere, entre otros, a proteínas sintéticas, ácidos nucleicos, así como a composiciones de vacuna adecuadas para prevenir enfermedades asociadas a CVP2 en animales no humanos.

Proteína sintética de la cápside

30 Un objeto de la invención se refiere a proteínas sintéticas de la cápside con propiedades mejoradas. Estas proteínas son útiles, p. ej., para generar anticuerpos, composiciones inmunógenas o vacunas.

Las proteínas de la invención han sido diseñadas por los inventores para proporcionar propiedades inmunógenas y de expresión mejoradas. Son distintas de las proteínas de la cápside de origen natural del circovirus porcino. Estas proteínas presentan una capacidad inmunógena específica y potente, lo que permite la generación de una inmunidad protectora en los animales. Estas proteínas pueden expresarse de manera eficiente en células anfitrionas biotecnológicas. Estas proteínas, o sus fragmentos, representan, por lo tanto, nuevos agentes activos que pueden usarse para producir composiciones de vacuna eficientes.

40 Por lo tanto, un objeto de la invención se refiere a una proteína que comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID n°: 2, 4 o 6, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID n°: 2, 4 o 6, incluso más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97% o 98%. La extensión de la identidad de secuencia puede determinarse utilizando cualquier programa informático y los parámetros asociados, incluidos BLAST 2.2.2 o FASTA versión 3.0t78, con los parámetros predeterminados.

En una realización particular, la proteína comprende la secuencia de SEQ ID n°: 2 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente al menos 95%.

45 La invención también describe una proteína o péptido que comprende al menos la SEQ ID n°: 7, o cualquier fragmento de al menos 8 restos de aminoácidos consecutivos de la SEQ ID n°: 7.

SFTKKKFKKK K (NorH) K (TorP) KTHV (SorG) Q V (VorL) KKKT (RorW) VL (QorH) TK (YorH) KFKWKKR

50 La SEQ ID n°: 7 corresponde esencialmente a los aminoácidos 3-42 de la SEQ ID n°: 2. Esta secuencia contiene epítomos que contribuyen a la actividad inmunógena de las proteínas de la invención. En la SEQ ID n°: 7, el aminoácido en la posición 12 es N o H, el aminoácido en la posición 14 es T o P, el aminoácido en la posición 19 es S o G, el aminoácido en la posición 22 es V o L, el aminoácido en la posición 27 es R o W, el aminoácido en la posición 30 es Q o H, y el aminoácido en la posición 33 es Y o H.

La invención describe especialmente una proteína o péptido que comprende al menos los aminoácidos 1-11 de la SEQ ID n°: 7.

La invención también describe una proteína o péptido que comprende al menos los aminoácidos 12-26 de la SEQ ID

nº: 7.

La invención describe además una proteína o péptido que comprende al menos los aminoácidos 25-35 de la SEQ ID nº: 7.

5 Como se indicó anteriormente, otro objeto de la invención reside en un fragmento de una proteína como se definió anteriormente. Un ejemplo particular de dicho fragmento es la forma madura de la proteína, que está desprovista de una secuencia de péptidos principal y/o de una secuencia previa. Un ejemplo determinado y preferido de dicha proteína comprende los restos de los aminoácidos 43 a 234 de la SEQ ID nº: 2.

10 Las proteínas preferidas de la invención contienen menos de 300 aminoácidos. Las proteínas más preferidas de la invención son inmunógenas en un mamífero y pueden provocar o estimular una respuesta inmunitaria contra un virus CVP2.

15 Las proteínas de la invención pueden modificarse además para mejorar, p. ej., su estabilidad o actividad. A este respecto, en una realización concreta, las proteínas o péptidos de la invención contienen una secuencia portadora de aminoácidos, que puede fusionarse con un extremo de la proteína o insertarse dentro de la secuencia de proteína. El término "fusionado" o "insertado" indica normalmente que los dos restos están unidos mediante un enlace peptídico. Sin embargo, puede contemplarse cualquier otro enlace, p. ej., químico. Además, dos restos pueden fusionarse ya sea directamente o mediante una secuencia espaciadora, para facilitar, p. ej., la clonación y/o la escisión posterior. El portador puede fusionarse al extremo del terminal N de la proteína o péptido, o a su extremo del terminal C. La secuencia de aminoácidos del portador puede ser sintética, natural o artificial, y se usa para conferir al polipéptido de fusión una expresión, purificación o propiedades inmunógenas mejoradas. La secuencia transportadora puede contener, p. ej., de 3 a 500 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos del portador es preferiblemente inmunológicamente inerte y/o no altera la inmunorreactividad de la proteína o el péptido. En una realización concreta, el vehículo es una proteína, especialmente una proteína de mamífero, tal como albúmina del suero (p. ej., especie humana, bovina, porcina). A este respecto, un objetivo concreto de la invención reside en un polipéptido de fusión que comprende una proteína o péptido de la invención fusionado en su extremo terminal N o C con una albúmina o un dominio de albúmina. La invención demuestra sorprendentemente que estos montajes se expresan a rendimientos mayores en células de levadura. A este respecto, un objeto de la invención reside en una proteína de fusión que comprende (i) la secuencia de aminoácidos de un antígeno CVP2 fusionado a (ii) la secuencia de aminoácidos de una albúmina o un dominio de albúmina. Como ejemplo específico, las secuencias de aminoácidos de un dominio de una albúmina de cerdo o dominio 1 de albúmina de cerdo se proporcionan como SEQ ID nº: 8 y nº: 9, respectivamente. Estas secuencias de aminoácidos se fusionan preferiblemente al aminoácido N-terminal de un antígeno de proteína CVP2.

25 En otra realización, la secuencia de aminoácidos portadora es una secuencia con etiqueta (o indicador), que puede insertarse en la proteína. Un ejemplo de una etiqueta es, por ejemplo, la secuencia DYKDDDDK (SEQ ID nº: 10). Dicha secuencia puede insertarse, p. ej., entre los aminoácidos 1 y 2 de una proteína de SEQ ID nº: 2, 4 o 6, para facilitar la purificación o identificación.

35 Las proteínas, péptidos o polipéptidos de la invención pueden producirse por técnicas biotecnológicas, o pueden producirse artificialmente. Pueden estar en forma soluble, o en fase sólida. En particular, pueden estar unidos a membranas celulares o vesículas lipídicas, o a soportes sintéticos tales como vidrio, plástico, polímeros, filtros, membranas, p. ej., en forma de perlas, columnas, placas y similares.

40 Las proteínas, péptidos o polipéptidos de la invención se proporcionan normalmente en forma aislada. El término "aislado" se refiere a una proteína que está en un medio que no es natural. Por ejemplo, la proteína puede ser un componente de un cultivo celular u otro medio artificial; un componente de una composición farmacéutica; o parcial o completamente purificado de su medio natural.

45 En una realización particular, se usa una composición que comprende la proteína como un sobrenadante celular parcialmente purificado. El sobrenadante celular puede contener proteínas celulares, fragmentos de ADN y similares. El sobrenadante está preferiblemente enriquecido para la proteína de la invención y, aún más preferiblemente, tratado para inactivar o destruir cualquier ácido nucleico o virus presente en la composición.

50 Las proteínas y péptidos de la invención pueden purificarse mediante técnicas conocidas por sí mismas en la técnica, y almacenarse bajo técnicas convencionales. Se pueden usar como tales, en forma purificada, solos o en combinaciones.

Moléculas de ácido nucleico y células anfitrionas recombinadas

La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína o péptido como se definió anteriormente. La invención también se refiere a un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico, normalmente bajo el control de un activador.

55 La invención también se refiere a una célula recombinada que comprende un ácido nucleico como se definió anteriormente.

La invención se refiere además a un método para producir una proteína de la invención que comprende cultivar una célula como se definió anteriormente en condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico y la recuperación

de la proteína.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser ADN o ARN, bicatenarios o monocatenarios, análogos de ADN y ARN, tales como los que contienen ejes centrales modificados. El ADN o ARN monocatenario puede ser la cadena codificante, también conocida como la cadena transcrita, o puede ser la cadena no codificante, también denominada cadena complementaria.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención normalmente comprenden:

a) una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID n°: 1, n°: 3 o n°: 5, o una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, con cualquiera de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID n°: 1, n°: 3 o n°: 5, o

b) una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse con una secuencia de nucleótidos de las SEQ ID n°: 1, n°: 3 o n°: 5, en condiciones de alta severidad, o

c) una secuencia correspondiente a una secuencia de a) o b) dentro de la degeneración del código genético.

El grado de homología entre dos secuencias de ácido nucleico puede determinarse por medio de programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionado en el paquete de programa GCG (Manual del programa para el paquete de Wisconsin, versión 8, agosto de 1996, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU. 5371 1) (Needleman, SB y Wunsch, CD., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, 443-453). Usando GAP con las siguientes configuraciones para la comparación de secuencia de ADN: penalización por creación de GAP de 5,0 y penalización de ampliación de GAP de 0,3. Las moléculas de ácido nucleico pueden alinearse entre sí utilizando el programa informático Pileup de alineación, disponible como parte del paquete de programa GCG, utilizando, por ejemplo, la configuración predeterminada de penalización por creación de hueco de 5 y penalización por ancho de hueco de 0,3.

Las condiciones experimentales adecuadas para determinar si una molécula de ácido nucleico dada se hibrida con un ácido nucleico específico pueden implicar el remojo previo de un filtro que contiene una muestra relevante del ácido nucleico a examinar en 5 x SSC durante 10 minutos, e hibridación previa del filtro en una solución de 5 x SSC, 5 x solución de Denhardt, SDS al 0,5% y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado expuesto a ultrasonidos, seguido de hibridación en la misma solución que contiene una concentración de 10 ng/ml de una sonda marcada con P-dCTP durante 12 horas a aproximadamente 45°C, según los métodos de hibridación descritos en Sambrook *et al.* (1989; *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York). El filtro se lava después dos veces durante 30 minutos en 2 x SSC, SDS al 0,5% al menos a 55°C (baja severidad), al menos a 60°C (media severidad), al menos a 65°C (media/alta severidad), al menos a 70°C (alta severidad) o al menos a 75°C (muy alta severidad). La hibridación puede detectarse mediante la exposición del filtro a una película de rayos X.

Las moléculas de ácido nucleico según la invención pueden proporcionarse en forma de una molécula de ácido nucleico propiamente dicha, tales como moléculas de ácido nucleico puro; un vector; virus o célula anfitrión, etc., ya sea de origen procariótico o eucariótico. Los vectores incluyen vectores de expresión que contienen una molécula de ácido nucleico de la invención. Los vectores de la presente invención pueden comprender, por ejemplo, un activador de transcripción y un terminador de transcripción, en donde el activador está unido operativamente a la molécula de ácido nucleico, y en donde la molécula de ácido nucleico está operativamente unida al terminador de transcripción.

A este respecto, un objeto específico de la invención es un vector de baculovirus que comprende un ácido nucleico como se definió anteriormente.

El uso de un sistema de expresión de baculovirus es conveniente ya que proporciona altos rendimientos de material antigénico máximo adecuado para la vacunación. Además, no hay necesidad de purificar la proteína ya que el baculovirus (preferiblemente inactivado) puede usarse directamente en la vacuna. En el vector de baculovirus, el ácido nucleico de la invención debe insertarse bajo el control de un activador, preferiblemente un activador endógeno de baculovirus, tal como la polihedrina o el activador del gen p10.

Una vez que la proteína se produce dentro de las células infectadas con baculovirus recombinados, las células se rompen normalmente por medios físicos (p. ej., ultrasonidos, congelación-descongelación u homogenización a alta presión) para liberar la proteína producida de las células. El lisado de células de insecto en bruto se elimina luego por centrifugación, y el sobrenadante se puede usar como antígeno para la vacuna. El lisado de células de insecto rotas puede contener baculovirus vivo recombinado en título alto. Incluso si el baculovirus recombinado no es capaz de vivir/replicarse en una vacuna formulada o si se inyecta en cerdos, el baculovirus preferiblemente se inactiva o mata antes del uso del antígeno, usando técnicas conocidas por sí mismas en la técnica.

También pueden usarse otros sistemas de expresión y vectores, tales como plásmidos que se replican y/o integran en células de levadura.

Una realización específica de la invención es un vector que comprende un ácido nucleico de la invención y una molécula de ácido nucleico adicional que codifica un antígeno vírico o patógeno distinto. Dicho vector se puede usar como una vacuna polivalente, o para producir una vacuna polivalente. Los ejemplos específicos de antígenos víricos o patógenos distintos incluyen cualquier proteína (p. ej., glucoproteína, proteína de cápside o uno de sus fragmentos

de antígeno) de un virus o patógeno seleccionado de, p. ej., *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Adenovirus; Alfavirus tales como virus de encefalomiелitis equina oriental; *Balantidium coli*; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., preferiblemente *B. hyodentheriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *Brucella suis*, preferiblemente biovars 1, 2 y 3; virus de la peste porcina clásica, virus de la peste porcina africana; *Chlamydia* y *Chlamydomphila* sp. y preferiblemente *C. pecorum* y *C. abortus*; *Clostridium* spp., preferiblemente *Cl. difficile*, *Cl. perfringens* tipos A, B y C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; Coronavirus digestivo y respiratorio; *Cryptosporidium parvum*; *Eimeria* spp; *Eperythrozoonis suis* actualmente denominado *Mycoplasma haemosuis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, preferiblemente subtipos 1, 7 y 14; virus de la encefalomiелitis hemaglutinante; *Isospora suis*; virus de la encefalitis japonesa; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira* spp., preferiblemente *Leptospira australis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagicae*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira pomona* y *Leptospira tarassovi*; *Mannheimia haemolytica*; *Mycobacterium* spp. preferiblemente, *M. avium*, *M. intracellular* y *M. bovis*; *Mycoplasma hyponeumoniae*; Parvovirus; *Pasteurella multocida*; Citomegalovirus porcino; Parvovirus porcino, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino: virus de la pseudorabia; Rotavirus; virus Sagiyama; *Salmonella* spp. preferiblemente, *S. thyphimurium* y *S. choleraesuis*; *Staphylococcus* spp. preferiblemente, *S. hyicus*; *Streptococcus* spp., preferiblemente *Strep. suis*; Citomegalovirus porcino; virus del herpes porcino; virus de la gripe porcina; virus de la viruela porcina; *Toxoplasma gondii*; virus de la estomatitis vesicular y virus de exantema porcino; u otras cepas y subtipos de circovirus porcino. En dicho vector, al menos los dos ácidos nucleicos codificantes pueden estar bajo el control del mismo o distinto activador. Pueden estar en la misma u opuesta orientación.

En otra realización adicional de la invención, se proporciona una célula anfitriona transformada con una molécula o vector de ácido nucleico según la invención. Los expertos en la técnica conocerán ejemplos adecuados de células anfitrionas o podrán seleccionarlas fácilmente. Las células anfitrionas pueden incluir, por ejemplo, células eucariotas y procariotas. Los ejemplos de células eucarióticas incluyen células de mamífero (p. ej., cerdo), fúngicas (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*, *pichia*, *aspergillus*, *fusarium*), de insectos y plantas. Las células procariotas incluyen, por ejemplo, *E. coli*. Las células anfitrionas preferidas de la invención son células de insecto (en tal caso, el vector es preferiblemente un vector de baculovirus) o células de levadura.

La invención también se refiere a un método para preparar una proteína, péptido o polipéptido de la invención, comprendiendo el método cultivar una célula anfitriona que contiene un ácido nucleico o vector como se definió anteriormente en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico y recuperar la proteína, péptido o polipéptido. Como se indicó anteriormente, las proteínas y péptidos se pueden purificar según técnicas conocidas por si mismas en la técnica. La invención también proporciona equipos de expresión que comprenden (a) una célula anfitriona (preferiblemente células de insecto o células de levadura), (b) medios para expresar una proteína, péptido o polipéptido de la invención, p. ej. que comprende un sistema de vector capaz de replicarse en dicha célula y (c) medios para recuperar la proteína o péptido de la invención.

#### Composiciones de vacunas

El término "vacuna" como se emplea en la presente memoria incluye un agente que puede usarse para provocar, estimular o amplificar el sistema inmunitario de animales (p. ej., cerdos) contra un patógeno. Las vacunas de la invención son capaces de causar, estimular o amplificar la inmunidad contra un virus CVP2.

El término "inmunización" incluye el proceso de administrar un inmunógeno a un sujeto. La inmunización puede, por ejemplo, permitir un alto nivel continuo de anticuerpos y/o respuesta celular en la que los linfocitos T pueden matar o suprimir el patógeno en el animal no humano inmunizado, como el cerdo, que se dirige contra un patógeno o antígeno al que el animal ha sido previamente expuesto.

Las vacunas de la invención comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de una proteína o péptido como se describió anteriormente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como resultado de la vacunación con una composición de la invención, los animales se vuelven al menos parcial o completamente inmunes a las infecciones por CVP2, o resistentes al desarrollo de infecciones moderadas o graves por CVP2. Las vacunas contra CVP2 se pueden usar para provocar una respuesta humoral y/o celular.

Las infecciones por CVP2 o enfermedades asociadas incluyen, entre otros, síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS), dermatitis porcina y síndrome de nefropatía (PDNS), complejo de enfermedad respiratoria porcina (PRDC), trastornos reproductivos, enteritis granulomatosa, epidermitis exudativa, linfadenitis necrosante y temblores congénitos. Preferiblemente, un sujeto animal no humano, tal como el cerdo, está protegido en un grado en el que uno a todos los síntomas o efectos fisiológicos adversos de las infecciones por CVP2 se reducen significativamente, mejoran o evitan totalmente.

La presente invención también se refiere a una vacuna combinada que comprende una proteína de la invención combinada con al menos un antígeno de proteína de CVP2 adicional [Gupi P. S. Nayar *et al.* (*Can. Vet. J.*, vol. 38, 1997: 385-387) y Clark E. G. (*Proc. Am. Assoc. Swine Prac.* 1997; 499-501)].

En la práctica, la cantidad exacta requerida para una dosis inmunológicamente eficaz puede variar de un sujeto a otro dependiendo de factores tales como la edad y el estado general del sujeto, la naturaleza de la formulación y el modo de administración. La "cantidad efectiva" apropiada puede ser determinada por un experto en la técnica usando solo experimentación rutinaria. Por ejemplo, en la técnica se conocen métodos para determinar o valorar dosis adecuadas de una vacuna para encontrar dosis mínimas eficaces basadas en el peso del sujeto animal no humano, la concentración de la vacuna y otros factores típicos.

En una realización típica, la vacuna comprende una dosis unitaria de entre 0,1-50 µg, preferiblemente entre 0,1 y 25, incluso más preferiblemente entre 1 y 15 µg, normalmente aprox. 10 µg, de antígeno proteico o peptídico de la invención.

5 La dosis de la vacuna, la concentración de los componentes en la misma y el momento de administrar la vacuna, que provocan una respuesta inmunitaria adecuada, pueden determinarse por métodos tales como valoraciones de anticuerpos de sueros, p. ej., por ELISA y/o análisis por ensayo de seroneutralización y/o por evaluación por prueba de vacunación.

En una realización específica, la vacuna comprende el antígeno proteico o peptídico de la invención en forma purificada.

10 En otra realización específica, el antígeno proteico o peptídico está unido a un material portador. A este respecto, en una realización específica, la proteína o péptido se manifiesta mediante un baculovirus.

Las vacunas pueden comprender otros ingredientes, conocidos de por sí por un experto en la técnica, tales como vehículos, excipientes, diluyentes, adyuvantes, estabilizadores de secado por congelación, agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores del pH, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, y conservantes farmacéuticamente aceptables, dependiendo de la vía de administración.

15 Los ejemplos de vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a agua desmineralizada o destilada; solución salina; aceites a base de vegetales tales como aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semillas de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo o aceite de coco; aceites de silicona, incluidos los polisiloxanos, tales como metilpolisiloxano, fenilpolisiloxano y metilfenilpolisiloxano; siliconas volátiles; aceites minerales tales como aceite de parafina líquido ligero o aceite de parafina líquido pesado; escualeno; derivados de celulosa tales como metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, sal sódica de carboximetilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa; alcoholes inferiores, por ejemplo, etanol o isopropanol; aralcoholes inferiores; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles inferiores, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina; ésteres de ácidos grasos tales como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo u oleato de etilo; polividona; agar-agar; carragenina; goma tragacanto o goma arábiga y vaselina. Normalmente, el portador o portadores formarán de 10% a 99,9% en peso de la composición de vacuna y se pueden amortiguarse por métodos convencionales usando reactivos conocidos en la técnica, tales como fosfato disódico, fosfato monosódico, fosfato dipotásico, fosfato monopotásico, una de sus mezclas y similares.

30 Los ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, emulsiones de aceite en agua, hidróxido de aluminio (alumbre), complejos inmunoestimulantes, polímeros o copolímeros de bloque no iónicos, citocinas (como IL-1, IL-2, IL-7, IFN-[alfa], IFN-[beta], IFN-γ, etc.), saponinas, monofosforil-lípido A (MLA), muramil-dipéptidos (MDP) y similares. Otros adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, sulfato de aluminio y potasio, enterotoxina(s) termolábiles o termoestables aisladas de *Escherichia coli*, toxina del cólera o su subunidad B, toxina diftérica, toxina del tétanos, toxina de la tos ferina, adyuvante incompleto o completo de Freund, etc. Los adyuvantes a base de toxinas, tales como la toxina diftérica, la toxina tetánica y la toxina de la tos ferina pueden inactivarse antes de su uso, por ejemplo, mediante tratamiento con formaldehído.

Ejemplos de estabilizador de liofilización pueden ser, por ejemplo, hidratos de carbono tales como sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa, proteínas tales como albúmina o caseína, y sus derivados.

40 Las vacunas pueden comprender además al menos un inmunógeno de al menos un patógeno más, p. ej., un patógeno porcino tal como *Actinobacillus pleuropneumonia*; Adenovirus; Alfavirus tales como los virus de la encefalomielititis equina oriental; *Balantidium coli*; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., preferiblemente *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *Brucella suis*, preferiblemente biovars 1, 2 y 3; virus de la peste porcina clásica, virus de la peste porcina africana; *Chlamydia* y *Chlamydophila* sp. y preferiblemente *C. pecorum* y *C. abortus*; *Clostridium* spp., preferiblemente *Cl. difficile*, *Cl. perfringens* tipos A, B y C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; Coronavirus digestivo y respiratorio; *Cryptosporidium parvum*; *Eimeria* spp.; *Eperythrozoonis suis* actualmente llamado *Mycoplasma haemosuis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, preferiblemente subtipos 1, 7 y 14; virus de la encefalomielititis hemaglutinante; *Isospora suis*; virus de la encefalitis japonesa; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira* spp., preferiblemente *Leptospira australis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira pomona* y *Leptospira tarassovi*; *Mannheimia haemolytica*; *Mycobacterium* spp. preferiblemente, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. bovis*; *Mycoplasma hyponeumoniae*; Parvovirus; *Pasteurella multocida*; Citomegalovirus porcino; parvovirus porcino, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino: virus de la pseudorabia; Rotavirus; virus Sagiyama; *Salmonella* spp. preferiblemente, *S. thyphimurium* y *S. choleraesuis*; *Staphylococcus* spp. preferiblemente, *S. hyicus*; *Streptococcus* spp., preferiblemente *Strep. suis*; Citomegalovirus porcino; virus del herpes porcino; virus de la gripe porcina; virus de la viruela porcina; *Toxoplasma gondii*; virus de la estomatitis vesicular y virus del exantema porcino; u otras cepas y subtipos de circovirus porcino.

60 Las composiciones de vacuna de la invención pueden ser formulaciones líquidas tales como una solución acuosa, emulsión de agua en aceite o aceite en agua, jarabe, un elixir, una tintura, un preparado para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (p. ej., administración inyectable), tal como suspensiones o emulsiones estériles. Dichas formulaciones son conocidas en la técnica y se preparan normalmente

por disolución del antígeno y otros aditivos típicos en los sistemas de vehículo o disolvente apropiados. Las formulaciones líquidas también pueden incluir suspensiones y emulsiones que contienen agentes de suspensión o emulsionantes.

5 La vía de administración puede ser percutánea, por administración en la mucosa, o por vía parenteral (intradérmica, intramuscular, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal). Las composiciones de vacunas según la presente invención pueden administrarse solas, o pueden administrarse conjuntamente o secuencialmente con otros tratamientos o terapias. Las vacunas de la invención pueden comprender, además, uno o varios antígenos proteicos más de diferentes serotipos de CVP2.

10 La presente invención también describe métodos para inmunizar o provocar una respuesta inmunitaria en mamíferos no humanos (p. ej., cerdos) que comprenden administrar a dicho mamífero una proteína, péptido, ácido nucleico o vacuna como se describió anteriormente.

La presente invención también describe métodos de tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas a CVP2 en mamíferos no humanos (p. ej., cerdos) que comprenden administrar a dicho mamífero una proteína, péptido, ácido nucleico o vacuna como se describió anteriormente.

15 Como se mencionó anteriormente, las infecciones por CVP2 o enfermedades asociadas incluyen, entre otros, síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS), dermatitis porcina y síndrome de nefropatía (PDNS), complejo de enfermedad respiratoria porcina (PRDC), trastornos reproductivos, enteritis granulomatosa, epidermitis exudativa, linfadenitis necrosante y temblores congénitos.

20 La vacuna de la invención se puede administrar convenientemente por vía intranasal, transdérmica (es decir, aplicada sobre o en la superficie de la piel para absorción general), parenteral, ocular, etc. La vía de administración parenteral incluye, pero no se limita a, las vías intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y similares.

La dosis de las vacunas de la presente invención dependerá de la especie, raza, edad, tamaño, antecedentes de vacunación, estado de salud del animal a vacunar, así como de la vía de administración, p. ej., administración subcutánea, intradérmica, oral, intramuscular o intravenosa.

25 Las vacunas de la invención se pueden administrar como monodosis o en dosis repetidas. Las vacunas de la invención pueden administrarse solas, o pueden administrarse simultánea o sucesivamente con una u otras composiciones más, tales como, por ejemplo, otras composiciones inmunógenas o de vacunas porcinas. Cuando las composiciones se administran en diferentes momentos, las administraciones pueden estar separadas entre sí o superponerse en el tiempo.

30 En una realización, las composiciones de vacuna de la invención se administran a un sujeto propenso o de otro modo en riesgo de infección por CVP2 para mejorar las capacidades de respuesta inmunitaria propias del sujeto. El sujeto al que se administra la vacuna es en una realización un cerdo. El animal puede ser propenso a la infección por CVP2 o un virus estrechamente relacionado.

35 Las vacunas de la invención se administran preferiblemente a cerdos, cerdos adultos, pero también a cerdos jóvenes, lechones o hembras preñadas, o a otros tipos de mamíferos no humanos. La vacunación de hembras embarazadas es especialmente conveniente ya que confiere inmunidad pasiva a los recién nacidos a través de la transmisión de anticuerpos maternos. Los cerdos pueden tener menos de 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 semana de vida; 1 a 6 semanas de vida; 2 a 5 semanas de vida; o de 3 a 4 semanas de vida. Por ejemplo, a los animales "de prueba" se les puede administrar la vacuna de la invención para evaluar el rendimiento de la vacuna con vistas a un eventual uso o desarrollo de una vacuna para cerdos. Deseablemente, la vacuna se administra a un sujeto que aún no ha sido expuesto a un virus CVP2. Preferiblemente, el sujeto es un cerdo que no necesita vacunación contra el síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS) y/o la dermatitis porcina y el síndrome de nefropatía (PDNS).

45 La presente invención también incluye una vacuna mixta, que comprende vacunas de la invención y al menos un componente activo inmunógeno eficaz contra otro organismo causante de enfermedad en el ganado porcino tal como, por ejemplo, *Actinophacillus pleuropneumoniae*; Adenovirus; Alfavirus tales como virus de encefalomiелitis equina oriental; *Balantidium coli*; *Bordetella bronchiseptica*; *Brachyspira* spp., preferiblemente *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. innocens*, *Brucella suis*, preferiblemente biovars 1, 2 y 3; virus de la peste porcina clásica, virus de la peste porcina africana; *Chlamydia* y *Chlamydophila* sp. y preferiblemente *C. pecorum* y *C. abortus*; *Clostridium* spp., preferiblemente *Cl. difficile*, *Cl. perfringens* tipos A, B y C, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. tetani*; Coronavirus digestivo y respiratorio; *Cryptosporidium parvum*; *Eimeria* spp; *Eperythrozoonis suis* actualmente llamado *Mycoplasma haemosuis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus parasuis*, preferiblemente subtipos 1, 7 y 14; virus de la encefalomiелitis hemaglutinante; *Isospora suis*; Vvirus de la encefalitis japonesa; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira* spp., preferiblemente *Leptospira australis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagicae*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira pomona* y *Leptospira tarassovi*; *Mannheimia haemolytica*; *Mycobacterium* spp. preferiblemente, *M. avium*, *M. intracellular* y *M. bovis*; *Mycoplasma hyponeumoniae*; Parvovirus; *Pasteurella multocida*; Citomegalovirus porcino; Parovirus porcino, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino: virus de la pseudorrabia; Rotavirus; virus Sagiyama; *Salmonella* spp. preferiblemente, *S. thyphimurium* y *S. choleraesuis*; *Staphylococcus* spp. preferiblemente, *S. hyicus*; *Streptococcus* spp., preferiblemente *Strep. suis*; Citomegalovirus porcino; virus del herpes porcino; virus de la gripe porcina; virus de la viruela porcina; *Toxoplasma*



*gondii*; virus de la estomatitis vesicular y virus de exantema porcino u otras cepas y subtipos de circovirus porcino.

La presente invención también proporciona un recipiente que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de una proteína, ácido nucleico o vacuna como se describió anteriormente. La invención también proporciona equipos de vacunación que comprenden un recipiente opcionalmente estéril que comprende una cantidad

5 inmunológicamente eficaz de la vacuna, medios para administrar la vacuna a animales, y opcionalmente un manual de instrucciones que incluye información para la administración de la cantidad inmunológicamente eficaz de la composición para tratar y/o prevenir las enfermedades asociadas a CVP2.

Composiciones y métodos de diagnóstico

Una descripción adicional de la invención reside en un método para diagnosticar la presencia de un circovirus en

10 animales no humanos, reactivos usados para los mismos y equipos de diagnóstico.

En base a las secuencias de nucleótidos como se describió anteriormente, es posible producir reactivos capaces de reconocer circovirus porcinos. Una persona experta en la técnica podría seleccionar fragmentos de alrededor de 20 a 50 pb dentro de la SEQ ID n°: 1, 3 o 5, para llevar a cabo un diagnóstico específico. Por lo tanto, las secuencias de ADN descritas en la presente memoria y sus fragmentos pueden usarse como sondas y/o cebadores para detectar

15 la presencia de circovirus por hibridación o experimentos de PCR. Los antígenos codificados por el virus o expresados mediante un vector también pueden usarse como un reactivo para diagnóstico que puede detectarse por inmunofluorescencia o experimentos de transferencia Western. Los anticuerpos monoclonales o policlonales como se describió anteriormente se pueden usar en pruebas de diagnóstico y reactivos según técnicas que son bien conocidas en la técnica, por ejemplo por ELISA e inmunocromatografía.

La presente invención describe además un método para generar un anticuerpo que es capaz de unirse a un virus CVP2. El método puede comprender inmunizar un animal no humano, tal como un conejo, cobaya o roedor, con una proteína o péptido de la invención y recoger el anticuerpo producido de ese modo. Los anticuerpos de la invención pueden ser preparados de anticuerpos policlonales o monoclonales, antisueros monoespecíficos, anticuerpos humanos, o pueden ser anticuerpos híbridos o mixtos, tales como anticuerpos humanizados, fragmentos de

20 anticuerpos alterados (Fab')<sub>2</sub>, fragmentos F(ab), fragmentos Fc, anticuerpos de un solo dominio, fragmentos o montajes de anticuerpos diméricos o triméricos o fragmentos funcionales de los mismos que se unen al antígeno en cuestión. Los anticuerpos pueden producirse empleando técnicas bien conocidas de por sí para los expertos en la técnica y descritas en "*A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1988)".

El equipo de diagnóstico por lo tanto puede comprender sondas o cebadores de ADN, antígenos y/o anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para las proteínas de la invención, y las pruebas de diagnóstico pueden realizarse en una muestra de fluido fisiológico (sangre, plasma, suero y similares) o un muestra de tejido (ganglios, hígado, pulmones, riñones y similares) obtenida de un cerdo a analizar.

30

La invención describe además un anticuerpo (o un derivado o uno de sus fragmentos) que se une específicamente a una proteína o péptido de la invención.

La invención también describe un anticuerpo (o un derivado o uno de sus fragmentos) que se une a un epítipo contenido en la SEQ ID n°: 7.

35

Otros aspectos y ventajas de la invención se proporcionan en el apartado siguiente, que debe considerarse solamente ilustrativo.

### Ejemplos

#### A. Síntesis y estructura de PRO1 y PRO2

40

PRO1 (SEQ ID n°: 2) y PRO2 (SEQ ID n°: 4) fueron diseñados por los inventores para proporcionar vacunas mejoradas contra la infección por CVP2. Partiendo de un análisis de múltiples proteínas víricas de la cápside de origen natural, los inventores han diseñado y concebido proteínas nuevas y artificiales. Estas proteínas son estructuralmente distintas de las proteínas de la cápside de origen natural y presentan potente inmunogenia. Se

45 pueden producir de manera eficiente a partir de células anfitrionas recombinadas.

Se produjeron dos proteínas. Su secuencia se expone en las SEQ ID n°: 2 y n°: 4. La secuencia de un ácido nucleico codificante se representa en las SEQ ID n°: 1 y n°: 3, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de estas proteínas se construyeron y clonaron en un vector de expresión. El vector de expresión se usó para (i) replicar y mantener el ácido nucleico en un anfitrión bacteriano y (ii) para producir la proteína.

50

#### B. Síntesis y estructura de PRO3 (SEQ ID n°: 6)

La secuencia PRO2 (SEQ ID n°: 4) se utilizó como una secuencia de referencia y se modificó además para crear la secuencia PRO3: Entre otras, se realizaron las siguientes optimizaciones:

Se eliminó un punto de escisión potencial en la posición de aminoácido 165.

Se introdujo una mutación en la posición 200.

Se hizo una sustitución en la posición 161.

55

Se hizo una sustitución en la posición 170.

Se sustituyó el resto S en la posición 225 por un D.

Se hizo una sustitución en la posición 143.

Se hicieron dos sustituciones en el terminal N de la secuencia (posiciones 13 y 20).

- 5 La secuencia de nucleótidos se construyó y se clonó en un vector de expresión. La secuencia se representa en la SEQ ID n°: 5. La secuencia de proteína codificada se representa como SEQ ID n°: 6. El vector de expresión se usa para (i) replicar y mantener el ácido nucleico en un anfitrión bacteriano y (ii) para producir la proteína.

#### C. Expresión de PRO1 e inmunogenia

- 10 Se logró expresar PRO1 en células Sf9 dando como resultado un producto que tenía las propiedades antigénicas esperadas. La transferencia Western demostró que la proteína tiene el peso molecular esperado y se detectó la proteína PRO1 por diferentes mAAb de CVP2 en experimentos de ELISA.

#### C1: Generación de baculovirus recombinantes

- 15 El ADN de baculovirus linealizado (ADN viral BD BaculoGold™, n° en Cat. 554739), ADN de vector de transferencia de baculovirus recombinante que contiene el gen de inserción (pVL1393-Flag-PRO1 y Reactivo de Transfección PolyFect (Qiagen n° en Cat. 301105) se mezclaron en medio sin proteína Xpress de insecto (Lonza, n° en Cat. 12-730Q) y se incubaron con células de insecto Sf9 recién sembradas (Invitrogen n° 12659-017) a 27°C durante 6 días.

#### C2: Amplificación de virus

- 20 Se utilizaron células Sf9 en fase logarítmica en un matraz de cultivo hístico de 175 cm<sup>2</sup> (al 50-70% de confluencia, aproximadamente 2,5 a 3,5 x 10<sup>7</sup> células/matraz). Se mezcló y se añadió a las células 1 ml de solución madre de virus (véase el ejemplo 1) y 4 ml de medio sin suero Lonza reciente enriquecido con solución de Penicilina-Estreptomicina (n° en Cat. Sigma: P4333). Las células se incubaron a 27°C durante 3 horas y luego se añadieron 15 ml de medio reciente a las células infectadas, y las células se incubaron a 27°C durante 5-6 días más. Dado que las partículas de virus se liberaron en el medio, el sobrenadante se recogió pipeteando el medio en un tubo de polipropileno estéril de 50 ml. La suspensión se centrifugó a 2.000 g durante 5 minutos y la solución madre se almacenó a 4°C. La amplificación de virus se realizó varias veces para lograr un alto valor de virus. Para la primera amplificación se usó el sobrenadante de la cotransfección, más tarde las soluciones madre de virus generadas. La solución madre de virus del pase 3 se utilizó para la producción de proteínas.
- 25

#### C3: expresión de proteína recombinada en células Sf9

- 30 Se usaron células Sf9 en fase logarítmica en matraces de cultivo hístico de 175 cm<sup>2</sup> (confluencia 70-80%). Se añadieron a las células medio ml de solución madre vírica de alto valor y medio reciente enriquecido con penicilina-estreptomicina. Se incubaron las células a 27°C durante 3 horas, luego se añadieron 15 ml de medio nuevo a las células transfectadas. Las células se incubaron más a 27°C durante 4-5 días. Se retiraron las células del matraz con un raspador celular (Sarstedt 83.1830) y se centrifugaron a 2.500 g durante 5 minutos. Después de descartar el sobrenadante, los cultivos celulares se volvieron a poner en suspensión en 1 ml de amortiguador PBS (GIBCO, n° en Cat.: 14040). Las células en suspensión se recogieron, la suspensión se sometió a ultrasonidos cuatro veces durante 40 segundos. La suspensión sometida a ultrasonidos se centrifugó a 3.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó a 5.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a -20°C.
- 35

#### C4: Detección del antígeno Baculo-PRO1 por inmunofluorescencia

- 40 Se infectaron células Sf9 en placas de 24 pocillos (4 x 10<sup>6</sup>/pocillo) con diluciones de 10 veces del virus Baculo PRO1. Las placas se incubaron durante 4 días a 27°C. Después de la incubación, las placas se fijaron con acetona preenfriada durante 30 minutos a 4°C. Después de la fijación, las placas se lavaron tres veces en solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Después del lavado, el antígeno primario (VMRD, n° en Cat.: PAB-CVP2, dilución 1:500) se dispuso en capas sobre los pocillos y se incubó durante 30 minutos a 37°C, luego se lavó tres veces en PBS. Por último, el conjugado secundario (anticuerpo anti-IgG-FITC de cerdo producido en conejo, SIGMA, n° en Cat.: F-1638, dilución 1:1000) se dispuso en capas sobre el cultivo hístico fijado durante 30 minutos a 37°C, luego se lavaron las placas tres veces en PBS. La presencia de Baculo PRO1 se detectó al microscopio de UV.
- 45

#### C5: Inactivación de Baculo PRO1 y formulación

- 50 La muestra de BaculoPRO1 recolectada se inactivó con 300 µg/ml de etilenimina a 37°C durante 24 horas. El control de la inactivación se realizó en la estirpe celular Sf9.

El baculovirus inactivado no puede infectar las células Sf9.

En los ejemplos siguientes, la composición de la vacuna utilizada comprende el baculoPRO1 inactivado formulado en una emulsión de agua en aceite.

#### C6: Detección de la proteína Baculo PRO1 por inmunotransferencia Western

En el terminal N de la proteína Baculo PRO1, una etiqueta FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) sirve para identificación ulterior. Las proteínas se introdujeron en un medio reductor y se transfirieron a una membrana. El anticuerpo primario monoclonal anti-Flag M2 (Sigma) se usó en dilución 1:1000. Se aplicó IgG Ap anti-ratón (en dilución 1:2500) como anticuerpo secundario. Se usó NBT-BCIP para la detección. La figura 1 muestra los resultados de dos series de producción.

D. La proteína PRO1 es inmunorreactiva con anticuerpos anti-CVP2

Para determinar la especificidad inmunógena de PRO1 se usó un ELISA de tipo sándwich como se describe a continuación.

Recubrimiento: el anticuerpo monoclonal específico para CVP2 (36F1 de Ingenasa) se deja que se adsorba a la superficie de la microplaca de plástico (placa ELISA). Después de un período de incubación, la solución de recubrimiento se elimina y se lava la placa.

El antígeno (p. ej., BaculoPRO1) se agrega a la prueba. Después de la incubación, se elimina el antígeno no unido y se lava la placa.

Conjugado/anticuerpo secundario: se agrega a la placa de prueba anticuerpo monoclonal específico para CVP2 marcado con biotina (conjugado). Después de la incubación, se eliminan los anticuerpos unidos a biotina no unida y se lava la placa.

Se agrega a cada pocillo una solución de tetrametil-bencidina y mezcla de peróxido de hidrógeno (sustrato) para visualizar el conjugado anti-CVP2 unido mediante una reacción de color catalizada por la enzima. La reacción se interrumpe con ácido sulfúrico.

La absorbancia se lee a 450 nm en un espectrofotómetro (lector de ELISA). La intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Las concentraciones netas de muestra se calculan sobre la base de los factores de dilución con un programa de evaluación de ELISA.

Los resultados demuestran que PRO1 es inmunorreactivo con un anticuerpo anti-CVP2.

E. PRO1 provoca una respuesta inmunitaria protectora *in vivo*

La seguridad, inmunogenia y eficacia de la proteína PRO1 como vacuna se evaluaron en cerdos de 3 semanas de vida con anticuerpos maternos contra CVP2.

Los lechones de tres semanas de vida se seleccionaron de una granja de cerdas convencionales, seropositivas a CVP2. Los animales seleccionados se transportaron a las instalaciones experimentales y se aclimataron durante 5 días hasta la primera vacunación. Durante este período, los animales se pesaron y se tomaron muestras de sangre para evaluar el estado serológico de los lechones utilizando un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IIF) (véase más adelante). Los lechones se dividieron en cuatro grupos, cada uno con 7 animales.

El día 0, se vacunó a un grupo de lechones con 10 µg de vacuna con la subunidad BaculoPRO1 (con adyuvante). Otro grupo se vacunó con 20 µg de una vacuna de referencia (Porcilis PCV<sup>R</sup>) y dos grupos de referencia (un grupo sometido a la prueba de provocación y una referencia no sometida a la prueba de provocación) también participaron en el ensayo. Se inyectó un volumen de 2 ml de las vacunas (o PBS) por vía intramuscular. El día 21, tres semanas después de la vacunación, todos los cerdos (excepto las referencias negativas) se sometieron a la prueba de provocación por administración intranasal de suspensión de virus CVP2B Rm que contenía 5 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml de la cepa (3 ml/orificio nasal, 6 ml/lechón). Se registraron las temperaturas rectales 3 días antes de la primera vacunación (días -3, -2, -1, el día 0 antes de la vacunación y 4 horas después de la vacunación y en los días 1, 2 y 3).

Se tomaron muestras de sangre 5 días antes de la primera vacunación (día -5), 10 días después de la vacunación (día 10), en el momento de la prueba de provocación (día 21) y en los días 37 y 44 para la PCR cuantitativa. El día 44 (23 días después de la prueba de provocación) se sacrificaron todos los cerdos y se sometieron a necropsia. Las amígdalas y los ganglios linfáticos se recogieron para PCR cuantitativa e inmunohistoquímica.

Síntomas clínicos:

No se observaron signos clínicos atribuibles a las vacunas o al virus de la prueba de provocación durante el experimento.

La PCR en tiempo real se realizó según el método descrito por Brunborg *et al.* (2004, Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR (*Journal of Virological Methods* 122: 171-178)). La carga vírica de CVP2 se cuantificó utilizando secuencias de CVP2 que contenían ADN plásmido. El número de copias de CVP2 de los ganglios linfáticos y la cantidad de animales virémicos se muestran en la tabla a continuación.

## ES 2 655 013 T3

Grupos	Número medio de copias de CVP2 del grupo geo/ml en LN mesentérico	Número de cerdos virémicos/número total de cerdos el D44
A: BaculoPRO1 + adyuvante	$3,08 \cdot 10^4$	0/7
B: vacuna de referencia	$3,30 \cdot 10^3$	0/7
Referencia positiva: PBS + prueba de provocación	$1,87 \cdot 10^6$	4/7
Referencia negativa	-	0/7

5 No se encontraron cerdos virémicos en el grupo A. Además, el número de copias de CVP2 se redujo sustancialmente en el Grupo A en comparación con la referencia positiva. La diferencia entre el Grupo A y B no fue significativa. En el grupo de referencia positiva, el número de copias de CVP2 de los ganglios linfáticos fue significativamente alto y se encontraron 4 animales con viremia.

Inmunohistoquímica:

10 La inmunohistoquímica se realizó en base al método descrito por Opriessnig *et al.* (2007; Opriessnig T, Meng X, Halbur P: 2007, Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis and intervention strategies *J. Vet. Diagn. Invest.* 19: 591-615). Para la detección se usó anticuerpo monoclonal 36A9 producido en ratón y un equipo HRP anti-ratón de EnVision (Dako, Glostrup, Dinamarca). Las muestras se puntuaron según los siguientes criterios:

0 = sin antígeno

1 = se detecta antígeno en menos del 10% de los folículos

2 = se detecta antígeno en 10-50% de los folículos

15 3 = se detecta antígeno en más del 50% de los folículos

El antígeno vírico se detectó en el citoplasma y el núcleo de los macrófagos.

Grupos	Nódulos linfáticos mediastínicos	Nódulos linfáticos mesentéricos	Nódulos linfáticos inguinales
A: Baculo PRO1 + adyuvante	0	0	0
B: Vacuna de referencia	0	0	0
Referencia positiva	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
Referencia negativa	0	0	0

No se encontraron muestras positivas en los grupos vacunados con inmunohistoquímica.

20 Los resultados anteriores demuestran que el grupo vacunado con BaculoPRO1 estaba claramente protegido contra la provocación con CVP2B. Los resultados demuestran que PRO1 es eficaz *in vivo* y provoca una fuerte respuesta inmunitaria protectora contra el virus CVP2 de origen natural, incluso a dosis tan bajas como 10 µg. Una respuesta inmunitaria celular fue provocada también por PRO1, medida por la liberación de IFNgamma (datos no mostrados). Además, a la mitad de la dosis (10 µg frente a 20 µg), la protección obtenida con la vacuna de la invención fue similar a la proporcionada por la vacuna de referencia, mostrando un efecto muy potente de las proteínas sintéticas de la invención.

25

**Lista de secuencias****SEQ ID nº : 1 (PRO1)**

ATGGCATCCTTCACCAAAAAAAAAATTCAAAAAGAAGAAAAACAAAACAAAAACTCATGTCTCACAAAGTCGTCAAAAAG  
 AAGACTAGAGTCTTGCAAACAAAATACAAATTCAAATGGAAAAAGAGAAAGGGAGTCTTGAACACCAGATTGTCTAGA  
 ACCTTCGGTTACACCATTAAGAGAACCACCGTCAAAACCCCATCTTGGGCTGTCGATATGATGAGATTCAACATCAAC  
 GATTTCTGTCACCTGGTGGTGGATCAAACCCTAGATCCGTTCCATTGAGTACTACAGAATCAGAAAAGTCAAAGTC  
 GAGTTCGGCCATGCTCTCCTATTACTCAGGGTATAGAGGAGTTGGATCAACTGCCGTCATCTTGGATGACAACTTC  
 GTCACTAAGGCTACTGCCTTGACCTACGATCCTTACGTCAATTACTCTAGTAGACACACCATCACCCAACCATTCCTCA  
 TACCATTCCAGATACTTCACTCCAAAACCTGTCTTGGACTCAACCATCGATTACTTTCAACCAAAACAACAAGAGAAAC  
 CAATTGTGGTTGAGATTGCAAACCTGCCGGTAACGTGATCATGTGCGGATTGGGAACCGCCTTCGAAAACCCAAATAC  
 GACCAGGAGTACAACATTAGAGTCACCATGTACGTCCAATTCAGAGAGTTCAACTTGAAGGACCCACCATTGAACCCA  
 TAA

**SEQ ID nº : 2 (PRO1)**

MASFTKKKFKKKKNTKTHVSQVVKKTRVLQTKYKFKWKKRKGVLNTRLRSRTFGYTIKRTTVKTPSWAVDMMRFNIN  
 DFPVPPGGGSNPRSVPFYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTITQPFS  
 YHSRYFTPKPVL DSTIDYFQPNKRNQLWLRQLTAGNV DHVGLGTAFENSKYDQEYNI RVTMYVQFREFNLKDPPLNP

**SEQ ID nº : 3 (PRO2)**

ATGGCTTCTTTACCAAAAAAAAAATTCAAAAAAAAAAAAAACAAAACAAAAACCCATGTCCGGTCAAGTCTTGAAAAA  
 AAGACCTGGGTCTTGACACTAAACACAAATTCAAATGGAAAAAGAGAAACGGAATCTTCAACGCCAGATTGTCTAGA  
 ACTTTTCGGTTACACCATTAAGAGAACCACCGTCAAAACACCATCTTGGGCTGTCGACATGTTGAGATTCAACATCAAC  
 GATTTCTTGCCACCTGGTGGAGGATCAAACCCTAGATCCGTTCCCTTTTGAATACTACAGAATCAGAAAAATCAAAGTC  
 GAGTTCGGCCATGCTCACCTGTTACTCAAGGAGACAGAGGAGTTGGATCATCTGCAATCATCTTGGACGACAACCTTC  
 GTTCCAAAAGCAAACGCTTTGACCTACGACCTTACATCAATTACTCTAGTAGACACACCATCACCCAACCATTCCTCA  
 TACCATTCCAGATACTTCAACCCTAGACCTGTCTTGGATTCCACTATCAACTACTTCCAACCAAAACAACAAAAAAC  
 CAATTGTGGTTGAGATTGCAAACCTGCCGGTAATATCGATCATGTGCGGATTGGGAACCTGCTTTCGACAATCCATCTAC  
 GATCAGGAGTACAACATTAGAATCACCATGTACGTTCAATTCAGAGAGTTTTCATTGAAGGACCCACCTTTGAACCCA  
 TAA

**SEQ ID nº : 4 (PRO2)**

MASFTKKKFKKKKHKPKTHVQVLKKTWVLTHTKHKFKWKKRNGIFNARLSRTFGYTIKRTTVKTPSWAVDMLRFNIN  
 DFLPPGGGSNPRSVPFYRIRKIKVEFWPCSPVTQDGRGVGSSAIILDDNFVTPKANALTYDPYINYSSRHTITQPFT  
 YHSRYFTPRPVL DSTINYFQPNKKNQLWLRQLTAGNI DHVGLGTAFDNSIYDQEYNI RITMYVQFREFSLKDPPLNP

**SEQ ID nº : 5 (PRO3)**

ATGGCTTCTTTACCAAAAAAAAAATTCAAAAAAAAAAAAAACAAAACAAAAACCCATGTCTCACAAAGTCTTGAAAAA  
 AAGACCTGGGTCTTGACACTAAACACAAATTCAAATGGAAAAAGAGAAACGGAATCTTCAACGCCAGATTGTCTAGA  
 ACTTTTCGGTTACACCATTAAGAGAACCACCGTCAAAACTCCATCTTGGGCTGTCGACATGTTGAGATTCAACATCAAC  
 GATTTCTTGCCACCTGGTGGAGGATCAAACCCTAGATCCGTTCCCTTTTGAATACTACAGAATCAGAAAAATCAAAGTC  
 GAGTTCGGCCATGCTCCCCTGTTACTCAAGGAGATAGAGGAGTCCGTTTCATCCGCTATCATTTTGGACGACAACCTTC  
 GTTCCAAAAGGCAATGCCTTGACTTACGACCCATACGTGATTACTCTAGTAGACACACCATCACCCAACCATTCCTCA  
 TACCATTCCAGATACTACACCCTAAACCTGTCTTGGACTCTTCCATCGACTACTTCCAACCAAAACAACAAAAAAC  
 CAATTGTGGTTGAGATTGCAAACCTGCCGGTAACGTGACCATGTGCGGATTGGGAATGCTTTCGAAAACCCATTTAC  
 GACCAGGAGTACAACATTAGAATCACCATGTACGTTCAATTCAGAGAGTTGACTTGAAGGACCCACCTTTGAACCCA  
 TAA

SEQ ID nº: 6 (PRO3)

MASFTKKKFKKKKNKPKTHVSQVLKKTWVLHTKHKFKWKKRNGIFNARLSRTFGYTIKRTTVKTPSWAVDMLRFNIN  
DFLPPGGGSNPRSVPFEYYRIRKIKVEFWPCSPVTQGDGRGVGSSAI ILDDMFVPKANALTYDPYVDYSSRHTITQPFS  
YHSRYTTPKPVLDSSIDYFQPNKKNLWLRLQTAGNVHDVGLGIAFENSIYDQEYNI RITMYVQFREFDLKDPPLNP

SEQ ID nº: 7

SFTKKKFKKK K (NorH) K (TorP) KTHV (SorG) Q V (VorL) KKKT (RorW) VL (QorH) TK (YorH) KFKWKKR

SEQ ID nº: 8: Dominio 1 de albúmina de cerdo

MKWVTFISLLFLFSSAYSARGVFRDRTYKSEIAHRFKDLGEQYFKGLVLIAFSQHLQQCPYEEHVKLVREVTEFAKTCV  
ADESAENCDKSIHTLFGDKLCAIPSLREHYGDLADCEKEEPPERNECFLQHKNDMPDIPKLPDPVALCADFQEDEQK  
FWGKYLIEIARRHPYFYAPELLEYAI IYKDVFSECCQAADKAAACLLPKIEHLREKVLTSAAKQRLK

SEQ ID nº: 9: Albúmina de cerdo

MKWVTFISLLFLFSSAYSARGVFR  
DTYKSEIAHRFKDLGEQYFKGLVLIAFSQHLQQCPYEEHVKLVREVTEFAKTCVADESAENCDKSIHTLFGDKLCAIP  
SLREHYGDLADCEKEEPPERNECFLQHKNDMPDIPKLPDPVALCADFQEDEQKFWGKYLIEIARRHPYFYAPELLEY  
AIIYKDVFSECCQAADKAAACLLPKIEHLREKVLTSAAKQRLK  
CASIQKFGERAFKAWSLARLSQRFPKADFTEISKIVTDLAKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDTISTKLKE  
CCDKPLLEKSHCIAEAKRDELADLNPLEHDFVEDKEVCKNYKEAKHVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRIAKIYEA  
TLEDCCAKEDPPACYATVDFKQPLVDEPKNLKQNCLEKFEKLGEYGFQNALIVRYTKKVPQVSTPTLVEVARKLGLV  
GSRCKRPEEERLSAEDYLSLVNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYKPKFVEGTFTFHA  
DLCTLPEDEKQIKKQTALVELLKHKPHATEEQLRVTVLGNFAAFVQKCCAAPDHEACFAVEGPKFVIEIRGILA

SEQ ID nº: 10 : Flag

DYKDDDDK

**Lista de secuencias**

	<110> CEVA SANTE ANIMAL	
5	<120> PROTEÍNAS SINTÉTICAS DE LA CÁPSIDE Y USOS DE LAS MISMAS	
	<130> B1226	
	<160> 10	
10	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 705	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia sintética	
	<220>	
	<221> CDS	
20	<222> (1)..(705)	
	<400> 1	
	atg gca tcc ttc acc aaa aaa aaa ttc aaa aag aag aaa aac aaa aca	48
	Met Ala Ser Phe Thr Lys Lys Lys Phe Lys Lys Lys Lys Asn Lys Thr	
	1 5 10 15	
	aaa act cat gtc tca caa gtc gtc aaa aag aag act aga gtc ttg caa	96
	Lys Thr His Val Ser Gln Val Val Lys Lys Lys Thr Arg Val Leu Gln	
	20 25 30	
	aca aaa tac aaa ttc aaa tgg aaa aag aga aag gga gtc ttg aac acc	144
	Thr Lys Tyr Lys Phe Lys Trp Lys Lys Arg Lys Gly Val Leu Asn Thr	
	35 40 45	
	aga ttg tct aga acc ttc ggt tac acc att aag aga acc acc gtc aaa	192
	Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys	
	50 55 60	
	acc cca tct tgg gct gtc gat atg atg aga ttc aac atc aac gat ttc	240
	Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe	
	65 70 75 80	
	gtc cca cct ggt ggt gga tca aac cct aga tcc gtt cca ttc gag tac	288
	Val Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr	
	85 90 95	
	tac aga atc aga aaa gtc aaa gtc gag ttc tgg cca tgc tct cct att	336
	Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile	
	100 105 110	
	act cag ggt gat aga gga gtt gga tca act gcc gtc atc ttg gat gac	384
	Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp	
	115 120 125	
	aac ttc gtc act aag gct act gcc ttg acc tac gat cct tac gtc aat	432
	Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn	
	130 135 140	
	tac tct agt aga cac acc atc acc caa cca ttc tca tac cat tcc aga	480
	Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg	
	145 150 155 160	





ES 2 655 013 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 705

5 <212> DNA

<213> Secuencia sintética

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(705)

<400> 3

atg gct tct ttc acc aaa aaa aaa ttc aaa aaa aaa aaa cac aaa cca 48  
Met Ala Ser Phe Thr Lys Lys Lys Phe Lys Lys Lys Lys His Lys Pro  
1 5 10 15

aaa acc cat gtc ggt caa gtc ttg aaa aaa aag acc tgg gtc ttg cac 96  
Lys Thr His Val Gly Gln Val Leu Lys Lys Lys Thr Trp Val Leu His  
20 25 30

act aaa cac aaa ttc aaa tgg aaa aag aga aac gga atc ttc aac gcc 144  
Thr Lys His Lys Phe Lys Trp Lys Lys Arg Asn Gly Ile Phe Asn Ala  
35 40 45

aga ttg tct aga act ttc ggt tac acc att aag aga acc acc gtc aaa 192  
Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys  
50 55 60

aca cca tct tgg gct gtc gac atg ttg aga ttc aac atc aac gat ttc 240  
Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Leu Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe  
65 70 75 80

ttg cca cct ggt gga tca aac cct aga tcc gtc cct ttc gaa tac 288  
Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr  
85 90 95

tac aga atc aga aaa atc aaa gtc gag ttc tgg cca tgc tca cct gtt 336  
Tyr Arg Ile Arg Lys Ile Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Val  
100 105 110

ES 2 655 013 T3

act caa gga gac aga gga gtt gga tca tct gca atc atc ttg gac gac 384  
 Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Ile Ile Leu Asp Asp  
 115 120 125

aac ttc gtt cca aaa gca aac gct ttg acc tac gac cct tac atc aat 432  
 Asn Phe Val Pro Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Ile Asn  
 130 135 140

tac tct agt aga cac acc atc acc caa cca ttc act tac cat tcc aga 480  
 Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Thr Tyr His Ser Arg  
 145 150 155 160

tac ttc acc cct aga cct gtc ttg gat tcc act atc aac tac ttc caa 528  
 Tyr Phe Thr Pro Arg Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asn Tyr Phe Gln  
 165 170 175

cca aac aac aaa aaa aac caa ttg tgg ttg aga ttg caa act gcc ggt 576  
 Pro Asn Asn Lys Lys Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly  
 180 185 190

aat atc gat cat gtc gga ttg gga act gct ttc gac aat tcc atc tac 624  
 Asn Ile Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Asp Asn Ser Ile Tyr  
 195 200 205

gat cag gag tac aac att aga atc acc atg tac gtt caa ttc aga gag 672  
 Asp Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu  
 210 215 220

ttt tca ttg aag gac cca cct ttg aac cca taa 705  
 Phe Ser Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro  
 225 230

<210> 4  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia sintética

5

<400> 4  
 Met Ala Ser Phe Thr Lys Lys Lys Phe Lys Lys Lys Lys His Lys Pro  
 1 5 10 15

Lys Thr His Val Gly Gln Val Leu Lys Lys Lys Thr Trp Val Leu His  
 20 25 30

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

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

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

Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr  
 85 90 95

ES 2 655 013 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ser Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro  
 225 230

<210> 5

<211> 705

5 <212> DNA

<213> Secuencia sintética

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(705)

<400> 5

atg gcc tct ttc acc aaa aaa aaa ttc aaa aaa aaa aac aaa cca 48  
 Met Ala Ser Phe Thr Lys Lys Lys Phe Lys Lys Lys Lys Asn Lys Pro  
 1 5 10 15

aaa acc cat gtc tca caa gtc ttg aaa aaa aag acc tgg gtc ttg cac 96  
 Lys Thr His Val Ser Gln Val Leu Lys Lys Lys Thr Trp Val Leu His  
 20 25 30

act aaa cac aaa ttc aaa tgg aaa aag aga aac gga atc ttc aac gcc 144  
 Thr Lys His Lys Phe Lys Trp Lys Lys Arg Asn Gly Ile Phe Asn Ala  
 35 40 45

aga ttg tct aga act ttc ggt tac acc att aag aga acc acc gtc aaa 192  
 Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys

ES 2 655 013 T3

50	55	60	
act cca tct tgg gct gtc gac atg ttg aga ttc aac atc aac gat ttc			240
Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Leu Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe			
65	70	75	80
ttg cca cct ggt gga gga tca aac cct aga tcc gtc cct ttc gaa tac			288
Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr			
	85	90	95
tac aga atc aga aaa atc aaa gtc gag ttc tgg cca tgc tcc cct gtt			336
Tyr Arg Ile Arg Lys Ile Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Val			
	100	105	110
act caa gga gat aga gga gtc ggt tca tcc gct atc att ttg gac gac			384
Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Ile Ile Leu Asp Asp			
	115	120	125
aac ttc gtt cca aag gcc aat gcc ttg act tac gac cca tac gtc gat			432
Asn Phe Val Pro Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asp			
	130	135	140
tac tct agt aga cac acc atc acc caa cca ttc tca tac cat tcc aga			480
Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg			
	145	150	155
tac tac acc cct aaa cct gtc ttg gac tct tcc atc gac tac ttc caa			528
Tyr Tyr Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Ser Ile Asp Tyr Phe Gln			
	165	170	175
cca aac aac aaa aaa aac caa ttg tgg ttg aga ttg caa act gcc ggt			576
Pro Asn Asn Lys Lys Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly			
	180	185	190
aac gtc gac cat gtc gga ttg gga att gcc ttc gaa aac tcc att tac			624
Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Ile Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr			
	195	200	205
gac cag gag tac aac att aga atc acc atg tac gtt caa ttc aga gag			672
Asp Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu			
	210	215	220
ttc gac ttg aag gac cca cct ttg aac cca taa			705
Phe Asp Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro			
	225	230	
<210> 6			
<211> 234			
5 <212> PRT			
<213> Secuencia sintética			
<400> 6			
Met Ala Ser Phe Thr Lys Lys Lys Phe Lys Lys Lys Lys Asn Lys Pro			
1	5	10	15
Lys Thr His Val Ser Gln Val Leu Lys Lys Lys Thr Trp Val Leu His			
	20	25	30
Thr Lys His Lys Phe Lys Trp Lys Lys Arg Asn Gly Ile Phe Asn Ala			

ES 2 655 013 T3

	35		40		45														
	Arg	Leu	Ser	Arg	Thr	Phe	Gly	Tyr	Thr	Ile	Lys	Arg	Thr	Thr	Val	Lys			
	50						55					60							
	Thr	Pro	Ser	Trp	Ala	Val	Asp	Met	Leu	Arg	Phe	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe			
	65					70					75					80			
	Leu	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Arg	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Tyr			
					85					90					95				
	Tyr	Arg	Ile	Arg	Lys	Ile	Lys	Val	Glu	Phe	Trp	Pro	Cys	Ser	Pro	Val			
				100					105					110					
	Thr	Gln	Gly	Asp	Arg	Gly	Val	Gly	Ser	Ser	Ala	Ile	Ile	Leu	Asp	Asp			
			115					120						125					
	Asn	Phe	Val	Pro	Lys	Ala	Asn	Ala	Leu	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Val	Asp			
	130						135					140							
	Tyr	Ser	Ser	Arg	His	Thr	Ile	Thr	Gln	Pro	Phe	Ser	Tyr	His	Ser	Arg			
	145					150					155					160			
	Tyr	Tyr	Thr	Pro	Lys	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Ser	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln			
					165					170					175				
	Pro	Asn	Asn	Lys	Lys	Asn	Gln	Leu	Trp	Leu	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala	Gly			
				180					185						190				
	Asn	Val	Asp	His	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser	Ile	Tyr			
			195					200					205						
	Asp	Gln	Glu	Tyr	Asn	Ile	Arg	Ile	Thr	Met	Tyr	Val	Gln	Phe	Arg	Glu			
	210						215					220							
	Phe	Asp	Leu	Lys	Asp	Pro	Pro	Leu	Asn	Pro									
	225					230													

<210> 7

<211> 40

5 <212> PRT

<213> Secuencia sintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

10 <222> (12)..(12)

<223> N ó H

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

15 <222> (14)..(14)

<223> T ó P

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

20 <222> (19)..(19)

<223> S ó G

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (22)..(22)  
 <223> V ó L  
 5

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (27) .. (27)  
 <223> R ó W  
 10

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (30)..(30)  
 <223> Q ó H  
 15

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (33)..(33)  
 <223> Y ó H  
 20

<400> 7  
 Ser Phe Thr Lys Lys Lys Phe Lys Lys Lys Lys Xaa Lys Xaa Lys Thr  
 1 5 10 15  
 His Val Xaa Gln Val Xaa Lys Lys Lys Thr Xaa Val Leu Xaa Thr Lys  
 20 25 30  
 Xaa Lys Phe Lys Trp Lys Lys Arg  
 35 40

<210> 8  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 <213> Albúmina de cerdo dominio 1  
 25

<400> 8  
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Thr Tyr Lys Ser Glu Ile Ala  
 20 25 30  
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Gln Tyr Phe Lys Gly Leu Val Leu  
 35 40 45

30 Ile Ala Phe Ser Gln His Leu Gln Gln Cys Pro Tyr Glu Glu His Val

ES 2 655 013 T3

50

55

60

Lys Leu Val Arg Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp  
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Ile His Thr Leu Phe Gly Asp  
85 90 95

Lys Leu Cys Ala Ile Pro Ser Leu Arg Glu His Tyr Gly Asp Leu Ala  
100 105 110

Asp Cys Cys Glu Lys Glu Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln  
115 120 125

His Lys Asn Asp Asn Pro Asp Ile Pro Lys Leu Lys Pro Asp Pro Val  
130 135 140

Ala Leu Cys Ala Asp Phe Gln Glu Asp Glu Gln Lys Phe Trp Gly Lys  
145 150 155 160

Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu  
165 170 175

Leu Leu Tyr Tyr Ala Ile Ile Tyr Lys Asp Val Phe Ser Glu Cys Cys  
180 185 190

Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Ile Glu His Leu  
195 200 205

Arg Glu Lys Val Leu Thr Ser Ala Ala Lys Gln Arg Leu Lys  
210 215 220

<210> 9

<211> 607

5 <212> PRT

<213> Albúmina de cerdo

<400> 9

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Thr Tyr Lys Ser Glu Ile Ala  
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Gln Tyr Phe Lys Gly Leu Val Leu  
35 40 45

Ile Ala Phe Ser Gln His Leu Gln Gln Cys Pro Tyr Glu Glu His Val





ES 2 655 013 T3

Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Ala Lys Arg Asp Glu  
 305 310 315 320

Leu Pro Ala Asp Leu Asn Pro Leu Glu His Asp Phe Val Glu Asp Lys  
 325 330 335

Glu Val Cys Lys Asn Tyr Lys Glu Ala Lys His Val Phe Leu Gly Thr  
 340 345 350

Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu  
 355 360 365

Leu Leu Arg Ile Ala Lys Ile Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Asp Cys Cys  
 370 375 380

Ala Lys Glu Asp Pro Pro Ala Cys Tyr Ala Thr Val Phe Asp Lys Phe  
 385 390 395 400

Gln Pro Leu Val Asp Glu Pro Lys Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu  
 405 410 415

Leu Phe Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu Ile Val  
 420 425 430

Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu  
 435 440 445

Val Ala Arg Lys Leu Gly Leu Val Gly Ser Arg Cys Cys Lys Arg Pro  
 450 455 460

Glu Glu Glu Arg Leu Ser Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Leu Val Leu  
 465 470 475 480

Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Val  
 485 490 495

Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser  
 500 505 510

Ala Leu Thr Pro Asp Glu Thr Tyr Lys Pro Lys Glu Phe Val Glu Gly  
 515 520 525

Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Leu Cys Thr Leu Pro Glu Asp Glu Lys  
 530 535 540

Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His Lys Pro  
 545 550 555 560

His Ala Thr Glu Glu Gln Leu Arg Thr Val Leu Gly Asn Phe Ala Ala  
 565 570 575

Phe Val Gln Lys Cys Cys Ala Ala Pro Asp His Glu Ala Cys Phe Ala  
 580 585 590

Val Glu Gly Pro Lys Phe Val Ile Glu Ile Arg Gly Ile Leu Ala  
 595 600 605

<210> 10

<211> 8  
<212> PRT  
<213> Flag

5 <400> 10  
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína que comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID n°: 2, 4 o 6, o una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con una cualquiera de dichas secuencias y es capaz de provocar o estimular una respuesta inmunitaria contra un virus CVP2.
- 5 2. Una proteína de la reivindicación 1, que comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID n°: 2, 4 o 6 o que comprende los restos de aminoácido 43 a 234 de la SEQ ID n°: 2.
3. Una proteína de la reivindicación 1, que consiste en una secuencia seleccionada de la SEQ ID n°: 2, 4 o 6 o de los restos de aminoácido 43 a 234 de la SEQ ID n°: 2.
4. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 10 5. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4, preferiblemente bajo el control de un activador.
6. Una composición que comprende una proteína, ácido nucleico o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y, opcionalmente, un excipiente y/o un adyuvante.
- 15 7. Una composición de vacuna que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de una proteína, ácido nucleico o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un excipiente y/o un adyuvante.
8. Una proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso para tratar o prevenir una enfermedad asociada a CVP2 en un mamífero no humano.
9. Un ácido nucleico o vector de la reivindicación 4 o 5, para su uso para tratar o prevenir una enfermedad asociada a CVP2 en un mamífero no humano.
- 20 10. Una célula recombinada que comprende un ácido nucleico o un vector de la reivindicación 4 o 5.
11. Un método para producir una proteína que comprende cultivar una célula de la reivindicación 10 en condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico y la recuperación de la proteína.

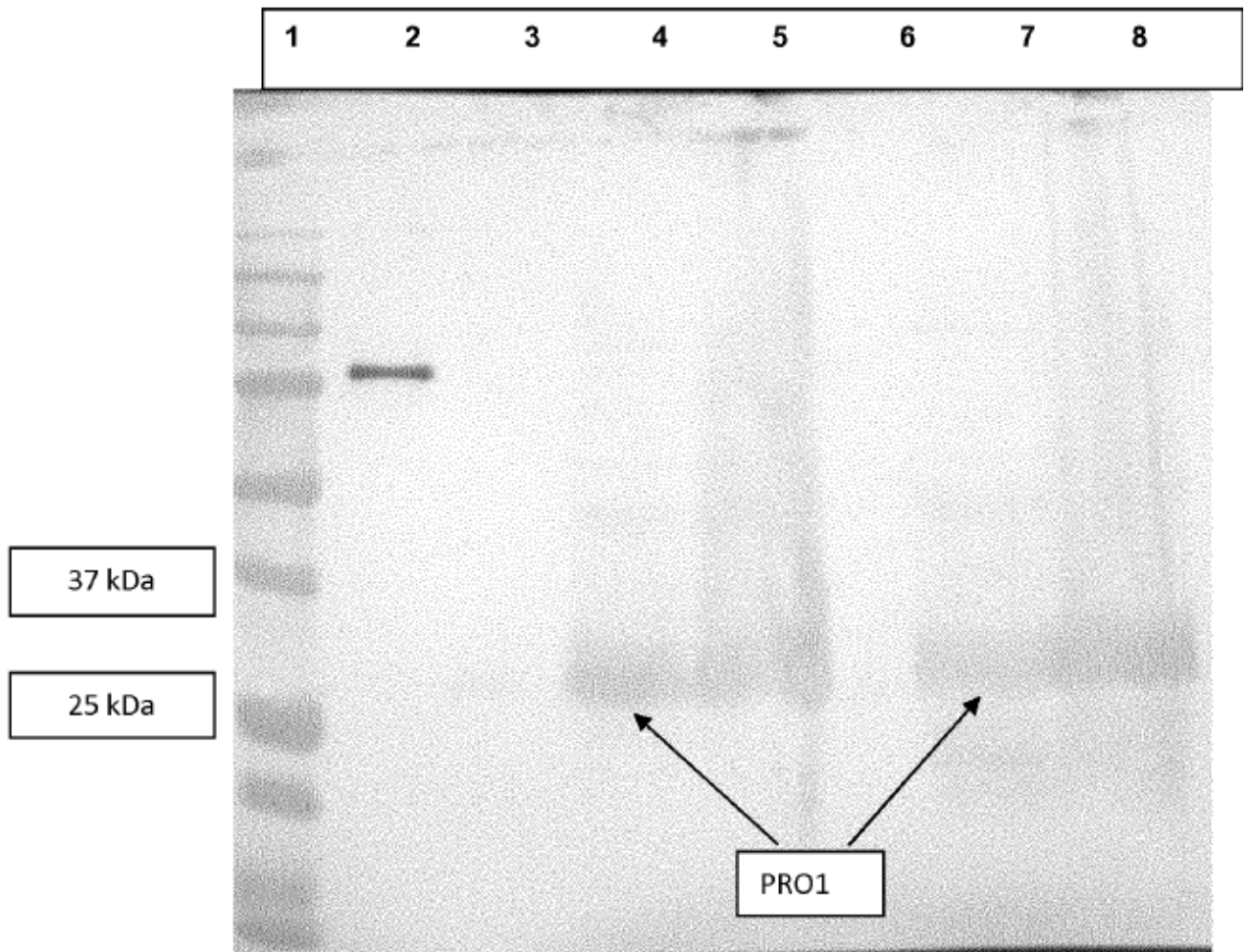


Figura 1