

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 026**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/01** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61P 31/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2012 PCT/CN2012/085907**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13083036**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2012 E 12855059 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2789627**

54 Título: **Vacuna de subunidades de circovirus porcino tipo 2**

30 Prioridad:

**06.12.2011 US 201161567248 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.03.2018**

73 Titular/es:

**SBC VIRBAC LIMITED (100.0%)  
Flat/RM 2201-2207, Tower Two Times Square, 1  
Matheson Street  
Causeway Bay, Hong Kong, CN**

72 Inventor/es:

**KUO, TSUN-YUNG;  
CHEN, HSU-CHUNG GABRIEL;  
YANG, SHU-HSIANG y  
CHEN, YU-SAN**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

ES 2 661 026 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 subunidades de circovirus porcino tipo 2**

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 1. CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a una vacuna de subunidades de circovirus porcino tipo 2 (PCV2), en particular a una vacuna de subunidades de PCV2 que comprende un péptido de PCV2 de marco de lectura abierto (ORF2) que puede expresarse abundantemente como un antígeno y adicionalmente un vehículo o adyuvante adecuados.

2. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 Es sabido que el circovirus porcino tipo 2 (PCV2) está relacionado con el síndrome multisistémico de desmedro posdestete (PMWS) y el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS, por sus siglas en inglés). El PMWS se descubrió por primera vez en cerdos en Canadá en 1991 y posteriormente se ha dado informado del mismo en todo el mundo. El síndrome ha causado enormes pérdidas en la industria productora de cerdos a escala mundial. Entre los síntomas principales del PMWS se incluyen pérdida de peso progresiva, taquipnea, disnea, 15 ictericia, etcétera. Entre los cambios visiblemente patológicos en los tejidos se incluyen infiltrado linfocitario y granulomatoso, linfadenopatía, hepatitis linfocitaria y granulomatosa y nefritis.

El circovirus porcino (PCV) fue reconocido por primera vez en una línea celular de riñón de cerdo (PK-15, ATCC CCL33) en 1982. Aunque el circovirus porcino puede contaminar continuamente células PK-15, el virus no causa un efecto citopático (CPE) en las células PK-15 contaminadas. Aunque el circovirus porcino puede 20 infectar a cerdos, no causa lesiones en los cerdos infectados. El virus se denomina circovirus porcino tipo 1 (PCV1). El PCV1 es un virus ADN monocatenario icosaédrico con un genoma circular de 1.759 ppbb. El PCV derivado de PK-15 se clasificó en la familia *Circoviridae* en 1995.

El PCV1 derivado de PK-15 se considera apatógeno. En cambio, la mutación del virus aislada de cerdos con PMWS en 1997 es patógena y se denomina circovirus porcino tipo 2 (PCV2). El síndrome multisistémico de 25 desmedro posdestete (PMWS) es una enfermedad porcina muy contagiosa. Infecta principalmente a cerdas preñadas y sus lechones y afecta gravemente a la salud de los cerdos.

El PCV2 es un ADN-virus monocatenario circular con un diámetro de 17 nm y su genoma tiene un tamaño de 1,76 kb. El análisis genómico con software muestra un total de 11 marcos de lectura abiertos (ORF) transcritos en el sentido de las agujas del reloj y en sentido opuesto a las agujas del reloj. Entre los 11 ORF, el ORF1 y el 30 ORF2 son probablemente los genes más importantes. El gen de ORF1 codifica proteínas Rep y Rep', que están relacionadas con la replicación vírica. Se sabe que el gen de ORF2 codifica la proteína de cápside de estructura inmunógena de PCV2, que se utiliza para inducir una respuesta inmunitaria en organismos.

La vacuna de PCV2 inactivado es la vacuna de PCV comercialmente disponible más común. Sin embargo, el desarrollo de una vacuna inactivada requiere que las líneas celulares estén libres de contaminantes y la 35 posibilidad de una inactivación incompleta del virus mediante agentes químicos es la desventaja más importante de la vacuna inactivada. Otra desventaja es que las estructuras antigénicas del virus pueden verse alteradas por un tratamiento químico, lo que lleva a que no sea posible inducir una respuesta inmunitaria suficiente para eliminar el virus y que no sea posible proteger a los cerdos contra una infección por la enfermedad. Por tanto, el desarrollo de una vacuna inactivada puede ser difícil y costoso y la seguridad de la 40 vacuna puede ser preocupante.

A diferencia de la vacuna inactivada, en la que todo el virus es el antígeno de la vacuna, la vacuna de subunidades utiliza parte de las proteínas del patógeno como proteínas antigénicas y la proteína antigénica se 45 inoculara a animales o humanos para inducir la inmunidad. La vacuna de subunidades puede prepararse clonando genes que codifican proteínas antigénicas de patógenos y produciendo a continuación grandes cantidades de las proteínas antigénicas por ingeniería genética. La seguridad es la ventaja más importante de la vacuna de subunidades, ya que ésta utiliza parte de un patógeno en lugar de un patógeno completo para la vacunación de cerdos, sin el problema de una inactivación incompleta. La vacuna de subunidades de PCV2 convencional utiliza la proteína de ORF2 de PCV2 como proteína antigénica; sin embargo, el nivel de expresión de la proteína de ORF2 de PCV2 de longitud completa en sistemas de expresión procarióticos es bastante bajo 50 y no cumple los requisitos de la producción de vacunas. Por tanto, el desarrollo de fragmentos antigénicos de ORF2 de PCV2 que puedan expresarse altamente en sistemas de expresión biológicos es útil para la aplicación comercial de la vacuna de subunidades de PCV2.

5 El documento WO 99/29871 A1 y las publicaciones SHANG S. B. y col.: "Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus Type 2", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 46, nº 3, 1 de enero de 2009, páginas 327-334, ZHONG-ZI LOU y col.: "Prokaryotic expression and potential application of the truncated PCV-2 capsid protein", VIROLOGICA SINICA, vol. 25, nº 2, 1 de abril de 2010 (2010-04-01), páginas 88-97 y GUO, LONGJUN y col.: "Identification of Antigenic Epitope Located at the N Terminal Nuclear Localization Signal Region in Capsid Protein of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2)", SCIENTIA AGRICULTURA SINICA, vol. 43, nº 7, julio de 2010, páginas 1480-1486, se refieren al circovirus porcino.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

10 La descripción proporciona secuencias de ADN que codifican fragmentos de proteína de ORF2 de PCV2 y los fragmentos de proteína de ORF2 de PCV2 pueden expresarse altamente en sistemas de expresión biológicos.

15 La descripción proporciona también una vacuna de subunidades de PCV2 en la que se utilizan fragmentos de proteína de ORF2 de PCV2, que pueden expresarse altamente en sistemas de expresión biológicos, como proteínas antigénicas a inocular a animales para inducir una inmunidad suficiente contra la infección por PCV2 en los animales.

La descripción proporciona además una vacuna de subunidades desarrollada por ingeniería genética para producir una vacuna de subunidades de PCV2 de bajo coste, alta pureza y alta seguridad, con procesos de producción sencillos.

20 Debido al hecho de que el nivel de expresión de la proteína de ORF2 de PCV2 de longitud completa en sistemas de expresión biológicos es bastante bajo, se utilizó ingeniería genética para lograr los objetivos arriba indicados. Se cortaron en fragmentos de diferentes tamaños secuencias de ADN (tales como la SEQ ID nº: 1) que codifican proteínas de ORF2 de PCV2 de longitud completa y los fragmentos de ADN se insertaron en vectores de expresión y a continuación se expresaron en huéspedes. Se evaluaron los niveles de las proteínas expresadas para determinar qué fragmentos de ADN pueden producir altos niveles de proteínas en sistemas de expresión de proteínas.

25 Los resultados de los análisis de secuencia de las proteínas y los ensayos de expresión de proteínas demuestran que hay aproximadamente 30 argininas en una proteína de ORF2 de PCV2 de longitud completa, donde al menos dos tercios de las argininas están situadas en el extremo N de la proteína de ORF2 de PCV2, y que cuantas más argininas se supriman en el extremo N, tanto mayor es el nivel del fragmento de proteína de ORF2 expresado. Además, una vez suprimidos los primeros 234 nucleótidos en el extremo 5' de una secuencia de ADN de longitud completa de ORF2 de PCV2, el fragmento de proteína codificado por el fragmento de ADN remanente (es decir desde el nucleótido 235 en el extremo 5' a un codón de parada) puede expresarse ampliamente.

30 Por tanto, la vacuna de subunidades de PCV2 proporcionada en la descripción comprende un péptido antigénico de PCV2 con un vehículo o adyuvante adecuado. El péptido antigénico puede expresarse ampliamente en sistemas de expresión y es un péptido no rico en arginina de un ORF2 de PCV2. Los índices de arginina del péptido no rico en arginina del ORF2 de PCV2 son iguales a no más de la mitad (1/2) de los índices de arginina de un dominio rico en arginina en el extremo N del ORF2 de PCV2 de longitud completa. Cuando el índice de arginina de un dominio rico en arginina en el extremo N de un ORF2 de PCV2 de longitud completa es 20, el índice de arginina del péptido no rico en arginina del ORF2 de PCV2 es un número entero entre 0 y 10. Alternativamente, cuando el índice de arginina de un dominio rico en arginina en el extremo N de un ORF2 de PCV2 de longitud completa es 21, el índice de arginina del péptido no rico en arginina del ORF2 de PCV2 es un número entero entre 0 y 10. Alternativamente, cuando el índice de arginina de un dominio rico en arginina en el extremo N de un ORF2 de PCV2 de longitud completa es 22, el índice de arginina del péptido no rico en arginina del ORF2 de PCV2 es un número entero entre 0 y 11. En la descripción, el dominio rico en arginina tiene residuos 1-78 en el extremo N de un ORF2 de PCV2 de longitud completa (que está codificado por los nucleótidos 1-234 en el extremo 5' de una secuencia de ADN de cadena completa del ORF2 de PCV2). En la descripción, el péptido no rico en arginina tiene la secuencia peptídica desde el residuo 79 hasta el último residuo de aminoácido en el extremo C de un ORF2 de PCV2 de longitud completa (que está codificado por la secuencia de ADN desde el nucleótido 235 en el extremo 5' hasta un codón de parada en el extremo 3' de una secuencia de ADN de longitud completa del ORF2 de PCV2).

El ORF2 de PCV2 descrito aquí tiene una secuencia peptídica de longitud completa de una de las siguientes: SEQ ID nº: 2, SEQ ID nº: 16, SEQ ID nº: 20, SEQ ID nº: 51 y SEQ ID nº: 53.

55 Además, la descripción proporciona una proteína de fusión de ORF2 de PCV2 como péptido antigénico empleando las funciones del dominio de unión a receptor I y el dominio diana transmembrana II de la exotoxina

A de *Pseudomonas aeruginosa* (es decir proteína PE) y una señal de retención de retículo endoplásmico (RE) (es decir el "péptido señal KDEL").

5 La proteína PE de *Pseudomonas aeruginosa* puede utilizarse como guía de una proteína diana con respecto a su ubicación objetivo mediante el procedimiento siguiente. En primer lugar, el dominio de unión al receptor de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* es responsable de la unión a los receptores de membrana de las células diana (células CD8 + T) y a continuación los complejos ligando-receptor entran en los endosomas de las células diana por endocitosis. Tras una escisión enzimática con una proteasa en los endosomas, se suministran a los aparatos de Golgi y al retículo endoplásmico (RE) fragmentos de proteína truncados (que contienen el dominio de guía transmembrana y la proteína diana enlazada), que posteriormente son sometidos a translocación al citoplasma de las células diana por el dominio de guiado transmembrana.

Además, cuando se enlaza un péptido señal KDEL en el extremo C de una proteína diana, ésta será transportada al RE por el péptido señal KDEL y a continuación interactuará en el RE.

15 Por tanto, la descripción proporciona una proteína de fusión de ORF2 de PCV2 como péptido antigénico utilizando las funciones de la proteína PE y del péptido señal KDEL. La proteína PE y el péptido señal KDEL se fusionan con un fragmento de proteína de ORF2 de PCV2 y los extremos N y C, respectivamente, para producir la proteína de fusión (PE-fragmento ORF2-KDEL) a inocular a animales con el fin de inducir una inmunidad suficiente contra la infección por PCV2 en los animales.

20 En algunas realizaciones, los péptidos antigénicos utilizados aquí incluyen fragmentos de ORF2 de PCV2. Los fragmentos de ORF2 tienen una secuencia peptídica según una de las SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 57 y se obtuvieron por ingeniería genética. Las secuencias de ADN (SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 17, 21, 54, 56) que codificaban los fragmentos de ORF2 de PCV2 se clonaron en vectores de expresión para obtener plásmidos que contenían un fragmento de ADN que codificaba un péptido antigénico. A continuación se transformaron los plásmidos en células huésped para expresar los péptidos antigénicos.

25 Las proteínas de fusión (PE-fragmento ORF2-KDEL) aquí descritas se obtuvieron por ingeniería genética. Las secuencias de ADN (SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 17, 21, 54, 56) que codificaban los fragmentos de ORF2 de PCV2, la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 34) que codificaba la proteína PE y la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 30) que codificaba el péptido de señal KDEL se clonaron en vectores de expresión para obtener plásmidos que contenían un fragmento de ADN que codificaba una proteína de fusión. A continuación se transformaron los plásmidos en células huésped para expresar las proteínas de fusión.

35 Entre los vectores de expresión se incluyen, de forma no exclusiva, vectores pET y vectores pGEX. En una realización, el vector de expresión es pET24a. Entre los sistemas de expresión (células huésped) se incluyen, de forma no exclusiva, sistemas de expresión procarióticos (como *Escherichia coli*), sistemas de expresión eucarióticos (como células animales (por ejemplo células CHO) y células vegetales). En una realización, el sistema de expresión es *E. coli*.

Entre los adyuvantes se incluyen, de forma no exclusiva, adyuvantes acuosos (como hidróxido de aluminio), alumbre de potasio, adyuvante incompleto de Freund, adyuvantes de tipo oleoso, adyuvantes solubles en agua o adyuvantes de emulsión agua en aceite en agua (W/O/W). En una realización, el adyuvante es un adyuvante de tipo oleoso.

40 La composición inmunógena descrita aquí comprende además péptidos de otros ORF de PCV2. Entre los otros ORF de PCV2 se incluyen, de forma no exclusiva, ORF1 y ORF3. Además, la composición inmunógena aquí descrita comprende también un antígeno de patógeno. El antígeno de patógeno se selecciona del grupo consistente en antígeno de virus de la gripe porcina (SIV), antígeno de virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), antígeno de micoplasma, antígeno de parvovirus porcino (PPV), antígeno de erisipela y antígeno de virus de seudorrabia (enfermedad de Aujeszky).

Además, la composición inmunógena aquí descrita comprende también uno o más de uno de los siguientes: vehículos, disolventes, emulsionantes, agentes de suspensión, agentes de descomposición, agentes de unión, excipientes, estabilizantes, quelantes, diluyentes, gelificantes, conservantes, lubricantes, tensioactivos, adyuvantes y portadores biológicos.

50 El significado de los términos técnicos y científicos aquí descritos puede ser entendido claramente por una persona con conocimientos ordinarios de la técnica.

La presente invención se describe más detalladamente en los siguientes ejemplos ilustrativos. Aunque los ejemplos solo pueden representar realizaciones seleccionadas de la invención, debería entenderse que los siguientes ejemplos son ilustrativos y no limitativos.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- FIG. 1: proporciona un análisis filogenético de secuencias de genoma de PCV2.
- FIG. 2: diagrama esquemático de los fragmentos de ORF2 de PCV2 donde pF1, pF2, pF3, pF4, pR1, pR2 y pR3 son cebadores para la PCR.
- 5 FIG. 3: muestra los resultados del análisis SDS-PAGE de proteínas recombinantes de diferentes fragmentos 2a-ORF2 de PCV2 expresados en *E. coli*. Se recogieron proteínas completas de *E. coli* 6 horas después de una inducción con IPTG, que a continuación se resolvieron mediante SDS-PAGE al 15%, en la que las pistas 1-9 mostraban escaleras de peso molecular, vector pET24a vacío (como control negativo), fragmento 2a-F1 de ORF2 de PCV2 (12,7 kDa), fragmento 2a-F2 de ORF2 de PCV2 (11,6 kDa), fragmento 2a-F3 de ORF2 de PCV2 (12,1 kDa), fragmento 2a-F4 de ORF2 de PCV2 (16,5 kDa), fragmento 2a-F5 de ORF2 de PCV2 (21,4 kDa), fragmento 2a-F6 de ORF2 de PCV2 (20,8 kDa) y 2a-ORF2 de PCV2 de longitud completa (27,5 kDa), respectivamente.
- 10 FIG. 4: resultados de una transferencia *western* de proteínas recombinantes de diferentes fragmentos 2a-ORF2 de PCV2. Las pistas 1-9 muestran escaleras de peso molecular, vector pET24a vacío (como control negativo), fragmento 2a-F1 de ORF2 de PCV2 (12,7 kDa), fragmento 2a-F2 de ORF2 de PCV2 (11,6 kDa), fragmento 2a-F3 de ORF2 de PCV2 (12,1 kDa), fragmento 2a-F4 de ORF2 de PCV2 (16,5 kDa), fragmento 2a-F5 de ORF2 de PCV2 (21,4 kDa), fragmento 2a-F6 de ORF2 de PCV2 (20,8 kDa) y 2a-ORF2 de PCV2 de longitud completa (27,5 kDa), respectivamente.
- 15 FIG. 5: resultados de un ELISA de PCV2 de muestras de suero recogidas en diferentes momentos de ratas vacunadas con proteínas recombinantes de diferentes fragmentos 2a-ORF2 de PCV2, respectivamente. \*,  $p < 0,05$ . (PI: posterior a la inmunización; PR: posterior al refuerzo).
- 20 FIG. 6: resultados de un ELISA de PCV2 de muestras de suero recogidas en diferentes momentos de ratones vacunados con proteínas recombinantes del fragmento 2a-F2 y proteínas recombinantes del fragmento PE-2a-F2-KDEL, respectivamente. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; #,  $p < 0,05$ ; ##,  $p < 0,01$ ; ###,  $p < 0,001$ . (PI: posterior a la inmunización; PR: posterior al refuerzo).
- 25 FIG. 7: resultados de un ELISA de PCV2 de muestras de suero recogidas en diferentes momentos de ratones vacunados con proteínas recombinantes del fragmento PE-2a-F2-KDEL y la vacuna de virus entero PCV2, respectivamente. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; #,  $p < 0,05$ ; ##,  $p < 0,01$ ; ###,  $p < 0,001$ . (PI: posterior a la inmunización; PR: posterior al refuerzo).
- 30

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERENTE

**Ejemplo 1 Construcción y determinación de péptidos antigénicos de vacuna de subunidades de PCV2**

Debido al hecho de que el nivel de expresión de la proteína de ORF2 de PCV2 de longitud completa en sistemas de expresión biológicos es bastante bajo, se cortaron secuencias de ADN que codifican proteínas de ORF2 de PCV2 de longitud completa en fragmentos de diferentes tamaños y los fragmentos de ADN se insertaron en vectores de expresión y a continuación se expresaron en huéspedes. Se evaluaron los niveles de las proteínas expresadas para determinar qué fragmentos de ADN pueden producir altos niveles de proteínas en sistemas de expresión de proteínas.

35

En los ejemplos siguientes se utiliza para el análisis y la ilustración un sistema de expresión procariótico frecuentemente utilizado (*Escherichia coli*).

40

## 1. Amplificación de fragmentos génicos de ORF2 de PCV2 de diferentes tamaños

El gen de ORF2 de PCV2 utilizado en este ejemplo tiene la secuencia SEQ ID NO: 1. Para el análisis filogenético de la SEQ ID NO: 1 se utilizan como secuencias estándar secuencias génicas de ORF2 de PCV2 proporcionadas por Wang y col. (Wang y col., Virus Research 2009, Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2). Los resultados muestran que la secuencia de ORF2 de PCV2 (SEQ ID NO: 1) pertenece al subgrupo 2a de PCV2 (como se muestra en la FIG. 1). Los cebadores (mostrados en la Tabla 1) se diseñaron para amplificar diferentes tamaños de fragmentos del gen 2a ORF2 de PCV2 (2a-ORF2) por reacción en cadena de polimerasa (PCR).

45

Como se muestra en la FIG. 2, el gen de 2a-ORF2 de longitud completa se amplificó con los cebadores específicos pF1 (cebador directo) y pR1 (cebador inverso) por PCR. El gen de 2a-ORF2 de longitud completa (2a-ORF2) tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 1 y los diferentes tamaños de fragmentos del 2a-ORF2 de PCV2 se denominaron 2a-F1, 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4, 2a-F5 y 2a-F6, respectivamente. El fragmento 2a-F1 tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 3, que son los nucleótidos 1-234 en el extremo 5' de 2a-ORF2. El fragmento 2a-F2 tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 5, que son los nucleótidos 235-468 en el extremo 5' de 2a-ORF2. El fragmento 2a-F3 tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 7, que son los nucleótidos 469-

50

55

699 en el extremo 5' de 2a-ORF2. El fragmento 2a-F4 tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 9, que son los nucleótidos 349-699 en el extremo 5' de 2a-ORF2. El fragmento 2a-F5 tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 11, que son los nucleótidos 235-699 en el extremo 5' de 2a-ORF2. El fragmento 2a-F6 tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 13, que son los nucleótidos 1-468 en el extremo 5' de 2a-ORF2. Todos los cebadores directos tienen un sitio de restricción *Hind* III y todos los cebadores inversos tienen un sitio de restricción *Xho* I.

Tabla 1 Listado de secuencias de cebadores para la amplificación de diferentes tamaños de fragmentos de gen de ORF2 de PCV2

Fragmento	Cebador	Secuencia <sup>nota</sup>		
ORF2	pF1	Cebador directo	CCCAAGCTTGCATGACGTATCCAAGGAG GCG	SEQ ID NO: 23
	pR1	Cebador inverso	CCGCTCGAGGGGTTTAAAGTGGGGGGTCT TTA	SEQ ID NO: 24
F1	pF1	Cebador directo	CCCAAGCTTGCATGACGTATCCAAGGAG GCG	SEQ ID NO: 23
	pR3	Cebador inverso	CCGCTCGAGGTCGTTAATATTAATCTCAT C	SEQ ID NO: 28
F2	pF2	Cebador directo	CCCAAGCTTGCTTTGTTCCCCGGGAGG GGG	SEQ ID NO: 25
	pR2	Cebador inverso	CCGCTCGAGGTAGGAGAAGGGTTGGGGG ATT	SEQ ID NO: 26
F3	pF3	Cebador directo	CCCAAGCTTGCCACTCCCGGTACTTTACC CC	SEQ ID NO: 27
	pR1	Cebador inverso	CCGCTCGAGGGGTTTAAAGTGGGGGGTCT TTA	SEQ ID NO: 24
F4	pF4	Cebador directo	CCCAAGCTTGCGGAGTGGGCTCCACTGC TGT	SEQ ID NO: 29
	pR1	Cebador inverso	CCGCTCGAGGGGTTTAAAGTGGGGGGTCT TTA	SEQ ID NO: 24
F5	pF2	Cebador directo	CCCAAGCTTGCTTTGTTCCCCGGGAGG GGG	SEQ ID NO: 25
	pR1	Cebador inverso	CCGCTCGAGGGGTTTAAAGTGGGGGGTCT TTA	SEQ ID NO: 24
F6	pF1	Cebador directo	CCCAAGCTTGCATGACGTATCCAAGGAG GCG	SEQ ID NO: 23
	pR2	Cebador inverso	CCGCTCGAGGTAGGAGAAGGGTTGGGGG ATT	SEQ ID NO: 26

Nota: Las secuencias marcadas con “\_\_\_\_\_” por debajo son las secuencias del sitio de restricción *Hind* III (AAGCTT) y las secuencias marcadas con “\_\_\_\_\_” son las secuencias del sitio de restricción *Xho* I (CTCGAG).

10 Las condiciones para la reacción PCR comprenden: 95°C durante 5 minutos, 25 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, y 72°C durante 5 minutos para el alargamiento. Los tamaños de los productos de PCR 2a-ORF2, 2a-F1, 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4, 2a-F5 y 2a-F6 son 699 ppbb, 234 ppbb, 234 ppbb, 231 ppbb, 351 ppbb, 465 ppbb y 468 ppbb, respectivamente, y se confirmaron mediante electroforesis en agarosa al 2%. Tras la confirmación, los productos de PCR se purificaron con un kit de purificación PCR-M (Viogene).

15 2. Construcción de plásmidos de pET24a que contienen diferentes tamaños de fragmentos de ORF2 de PCV2

20 Un (1) µg de los productos de PCR purificados y 1 µg de vector de expresión pET24a (Novagen) se digirieron con dos enzimas de restricción (New England Biolabs), 1 µl de *Hind* III y 1 µl de *Xho* I, respectivamente, durante 8 horas a 37°C. Después de la reacción de escisión por la enzima de restricción, los productos de PCR digeridos y el vector de expresión pET24a se purificaron con PCR-M Clean up System (Viogene) respectivamente. Los productos de PCR purificados se ligaron con el vector de expresión pET24a purificado para formar los plásmidos pET24a-2a-F1, pET24a-2a-F2, pET24a-2a-F3, pET24a-2a-F4, pET24a-2a-F5, pET24a-2a-F6 y pET24a-2a-ORF2 y a continuación se transformaron los plásmidos en células huésped (*E. coli*). Se seleccionaron los transformantes que contenían los productos de PCR y se confirmaron las secuencias de ADN por secuenciación de ADN. Se obtuvieron bacterias que contenían los plásmidos arriba indicados.

25 3. Expresión de proteína y confirmación de diferentes tamaños de fragmentos de ORF2 de PCV2

Se incubaron bacterias que contenían los plásmidos arriba indicados en 2 ml de medio LB a 37°C durante 16-18 horas y a continuación se inocularon en una relación 1:50 en medio LB que contenía 25 µg/ml de kanamicina para incubarlos posteriormente en un incubador a 37°C, 200 rpm, hasta que el O.D. 600 nm fue 0,6. Después, se añadió β-D-tiogalactósido (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM y se incubaron las células huésped *E. coli* en un incubador a 37°C, 200 rpm durante 6 horas más. A continuación se centrifugó 1 ml de las células huésped *E. coli* a 10.000 xg y se trató el aglomerado con B-PERTM Bacterial Protein Extraction (comprado a PIERCE) para comprobar si las proteínas recombinantes eran proteínas solubles o en cuerpos de inclusión mediante los pasos siguientes. El aglomerado se añadió a 40 µl de reactivo, se mezcló con un agitador de vórtice durante 1 minuto y se centrifugó a 10.000 xg para separar proteínas solubles (parte superior) de cuerpos de inclusión insolubles (parte inferior). Se disolvieron las proteínas solubles en 1x tampón de muestra SDS-PAGE y se añadió el aglomerado a 2x tampón de muestra SDS-PAGE. Las muestras se colocaron en un bloque térmico a 100°C durante 20 minutos y a continuación se centrifugaron. Se analizó el sobrenadante por SDS-PAGE al 15% para medir la expresión de las proteínas recombinantes.

Las proteínas recombinantes se produjeron induciendo un cultivo bacteriano con IPTG. La proteína recombinante 2a-ORF2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. La proteína recombinante 2a-F1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. La proteína recombinante 2a-F2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. La proteína recombinante 2a-F3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. La proteína recombinante 2a-F4 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. La proteína recombinante 2a-F5 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. La proteína recombinante 2a-F6 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

La expresión de las proteínas recombinantes se analizó por SDS-PAGE y los resultados se muestran en la FIG. 3, en la que la pista 1 muestra escaleras de peso molecular, la pista 2 muestra el control de negativo (vector pET24a vacío), la pista 3 muestra la proteína recombinante 2a-F1 (12,7 kDa), la pista 4 muestra la proteína recombinante 2a-F2 (11,6 kDa), la pista 5 muestra la proteína recombinante 2a-F3 (12,1 kDa), la pista 6 muestra la proteína recombinante 2a-F4 (16,5 kDa), la pista 7 muestra la proteína recombinante 2a-F5 (21,4 kDa), la pista 8 muestra la proteína recombinante 2a-F6 (20,8 kDa) y la pista 9 muestra la proteína recombinante 2a-ORF2 de longitud completa (27,5 kDa). Entre los 6 fragmentos de 2a-ORF2, los fragmentos 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 y 2a-F5 se expresaron en grandes cantidades (FIG. 3, pistas 4-7). Los tamaños estimados de las proteínas de fragmentos 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 y 2a-F5 coinciden con sus tamaños reales de 11,6 kDa, 12,1 kDa, 16,5 kDa y 21,4 kDa, respectivamente.

A continuación se utilizó una transferencia *western* para comprobar si las proteínas recombinantes expresadas eran fragmentos de 2a-ORF2 de PCV2. Después de la electroforesis, la SDS-PAGE se transfirió sobre una membrana de nailon PVDF. La membrana resultante se bloqueó con tampón de bloqueo, TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, 0,1 % Tween 20) conteniendo un 5% de leche desnatada, durante 1 h, a temperatura ambiente, para impedir una unión no específica de proteínas. Después se identificaron las proteínas utilizando anticuerpos monoclonales anti-6x his de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (FA) contra las proteínas de fusión 6X his-tag durante 1 hora a temperatura ambiente, a lo que siguieron 6 lavados con TBST, 5 minutos en cada caso. Después del lavado se añadió sustrato NBT/BCIP (Bio-Rad). Después de 10 minutos se detuvo la reacción añadiendo agua.

Los resultados de la transferencia *western* se muestran en la FIG. 4, en la que la pista 1 muestra escaleras de peso molecular, la pista 2 muestra el control negativo (vector pET24a vacío), la pista 3 muestra la proteína recombinante 2a-F1 (12,7 kDa), la pista 4 muestra la proteína recombinante 2a-F2 (11,6 kDa), la pista 5 muestra la proteína recombinante 2a-F3 (12,1 kDa), la pista 6 muestra la proteína recombinante 2a-F4 (16,5 kDa), la pista 7 muestra la proteína recombinante 2a-F5 (21,4 kDa), la pista 8 muestra la proteína recombinante 2a-F6 (20,8 kDa) y la pista 9 muestra la proteína recombinante 2a-ORF2 de longitud completa (27,5 kDa). Los resultados de la transferencia *western* coinciden con los resultados del análisis por SDS-PAGE (como se muestra en la FIG. 3). La proteína recombinante 2a-ORF2 de longitud completa no puede expresarse (FIG. 4, pista 9). Entre los 6 fragmentos de 2a-ORF2, los fragmentos 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 y 2a-F5 se expresaron en grandes cantidades (FIG. 4, pistas 4-7). Los tamaños estimados de las proteínas de fragmentos 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 y 2a-F5 coinciden con sus tamaños reales de 11,6 kDa, 12,1 kDa, 16,5 kDa y 21,4 kDa, respectivamente. Sin embargo, no hay expresión de la proteína recombinante 2a-F1 ni de la proteína recombinante 2a-F6 (FIG. 4, pistas 3 y 8). Dado que tanto la proteína recombinante 2a-F1 como la proteína recombinante 2a-F6 contienen nucleótidos 1-234 en el extremo 5' de la secuencia de ADN de longitud completa del 2a-ORF2 de PCV2 (véase la FIG. 2), algunas secuencias en los nucleótidos 1-234 pueden afectar a la expresión de la proteína de ORF2 de PCV2. El análisis de las secuencias de aminoácidos del fragmento 2a-F1 (nucleótidos 1-234 en el extremo 5' de 2a-ORF2 de PCV2, SEQ ID NO: 3) y el fragmento 2a-F2 + 2a-F3 (nucleótidos 235-699 (sin el codón de parada) en el extremo 5' de 2a-ORF2 de PCV2, SEQ ID NO: 11) muestra que los índices de arginina de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) del fragmento 2a-F1 son dos veces o más los índices de arginina de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) del fragmento 2a-F2 + 2a-F3 (como se muestra en la Tabla

2). El análisis de adición o delección de arginina muestra que una delección excesiva de arginina puede aumentar la expresión de proteínas de ORF2 de PCV2.

Tabla 2 Análisis de índices de arginina de la secuencia de aminoácidos de 2a-ORF2 de PCV2

2a-F1			2a-F2 + 2a-F3		
Codón	Aminoácido	Cantidad	Codón	Aminoácido	Cantidad
AGA	Arginina	5	AGA	Arginina	3
AGG	Arginina	3	AGG	Arginina	3
CGA	Arginina	1	CGC	Arginina	1
CGC	Arginina	10	CGG	Arginina	1
CGT	Arginina	2	CGT	Arginina	1
Total		21	Total		9

### Ejemplo 2 Análisis de inmunogenicidad de péptidos antigénicos de vacuna de subunidades de PCV2

#### 5 1. Inmunización de ratas

Se preparó una vacuna de subunidades de PCV2 con las proteínas recombinantes 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 y 2a-F5 preparadas en el Ejemplo 1, respectivamente, y adyuvante completo de Freund. Se vacunaron ratas con la vacuna de subunidades de PCV2 para analizar la inmunogenicidad de los péptidos antigénicos de la vacuna de subunidades de PCV2.

- 10 Se dividieron aleatoriamente ratas sanas de cinco a seis semanas de edad, libres de gérmenes patógenos específicos (SPF), en 5 grupos de 3 ratas cada uno. Un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) mostró que las 15 ratas eran negativas para anticuerpos anti-PCV2. A cada rata de los 4 grupos de vacunación (grupos 1 a 4) se le inyectó vía subcutánea 200 µg de proteína recombinante, el volumen total de cada inyección de 300 µl con una relación 1:1 (v/v) proteína:formulación de adyuvante. A las ratas del grupo 5 se les inyectó 15 300 µl de PBS y éstas sirvieron de control negativo. Dos semanas después de la inmunización primaria (i.p.), las ratas de los 4 grupos de vacunación recibieron como refuerzo la misma dosis de las 4 proteínas recombinantes diferentes respectivas. Se recogieron muestras de suero en las semanas 0, 2, 4 y 8 posteriores a la inmunización primaria. Todas las muestras de suero se ensayaron mediante ELISA para medir el título de anticuerpos anti-PCV2.

#### 20 2. Detección de anticuerpos anti-PCV2 mediante ELISA

- En este ejemplo se utilizaron como placas ELISA placas de noventa y seis pocillos que contenían antígeno de patógeno PCV2 (300 ng/pocillo). Las placas ELISA se lavaron 3 veces con 50 mmol/l de PBS (pH 7,2) que contenía 500 µl/l de Tween-20 (por ejemplo PBST) durante 3 a 5 minutos cada vez. Para bloquear las placas ELISA, se añadieron 200 µl de solución de bloqueo BSA al 0,15% a cada pocillo de las placas ELISA y a 25 continuación se incubaron las placas ELISA durante 2 horas a 37°C. Después se lavaron las placas ELISA con PBS. Las muestras de suero de rata se diluyeron cincuenta veces (1:50) con PBS y a continuación se diluyeron en una relación de 1:2 en serie. Cada muestra tuvo 8 repeticiones. Las muestras de suero diluidas se añadieron a los pocillos de las placas ELISA (100 µl/pocillo) y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación, las placas se lavaron con PBS. A continuación se añadió a los pocillos anticuerpo IgG anti-rata conjugado con fosfatasa alcalina (FA). Después de incubar durante 1 hora a 37°C, las placas se lavaron con 30 PBS. Para visualizar los resultados se añadió a los pocillos para-nitrofenilfosfato (pNPP). Después de la incubación se detuvo la reacción añadiendo NaOH 1M. Se leyó la densidad óptica de cada pocillo utilizando densidad óptica a 405 nm. Cada muestra se analizó por duplicado y se calculó la media de los valores O.D. de los duplicados.

- 35 Los resultados del ELISA se muestran en la FIG. 5. Todas las proteínas recombinantes de 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 y 2a-F5 preparadas en el Ejemplo 1 son capaces de inducir anticuerpos séricos contra PCV2 en los animales sometidos a ensayo. Entre las proteínas recombinantes, la proteína recombinante 2a-F2 (SEQ ID NO: 6) indujo el mayor nivel de anticuerpo sérico contra PCV2. Para el análisis estadístico, se compararon todos los grupos con el control negativo con PBS en distintos momentos de muestreo, existiendo importantes diferencias entre 40 el control negativo y cada grupo de vacunación ( $p < 0,05$ ).

- Además, se vacunaron cerdos con las proteínas recombinantes de 2a-F2, 2a-F3, 2a-F4 y 2a-F5, respectivamente, y todas las proteínas recombinantes fueron capaces de inducir anticuerpos séricos contra PCV2 en los cerdos. Además, los cerdos vacunados fueron sometidos a una prueba de provocación con virus PCV2 para evaluar la eficacia de las proteínas recombinantes. En primer lugar, se formularon las proteínas 45 recombinantes como una vacuna de subunidades que les fue inyectada. A continuación se sometió a los cerdos a una prueba de provocación con virus PCV2. Los resultados muestran que los porcentajes de protección de los grupos de inmunización son mayores que los del control negativo (sin vacunación). Los porcentajes de

protección utilizados aquí incluyen una disminución en la viremia y una mitigación de los síntomas del PCV2. Por tanto, los resultados demuestran que la vacuna de subunidades de PCV2 preparada con las proteínas recombinantes puede inducir eficazmente inmunidad en animales y aumentar su tasa de supervivencia.

**Ejemplo 3 Construcción y expresión de péptidos antigénicos de vacuna de subunidades de PCV2 2a**

- 5 Los resultados del Ejemplo 2 demuestran que, entre las proteínas recombinantes, el péptido F2 de ORF2 de PCV2 induce el mayor nivel de anticuerpo sérico contra PCV2. Con el fin de aumentar la inmunogenicidad de la vacuna de subunidades de PCV2, se fusionaron el dominio de unión a receptor I y el dominio de guiado transmembrana II de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (es decir la proteína PE) y una señal de retención del RE - un péptido señal KDEL con el péptido 2a-F2 preparado en el Ejemplo 1 en los extremos N y C, respectivamente, para producir una proteína de fusión (PE-2a-F2-KDEL) con el fin de inducir una inmunidad suficiente contra la infección por PCV2 en animales.

15 La proteína recombinante (PE-2a-F2-KDEL) se preparó por ingeniería genética en este ejemplo. Las secuencias de ADN que codificaban las proteínas de interés se clonaron en un vector de expresión para construir el plásmido pET24a-PE-2a-F2-KDEL. Se indujo al plásmido a expresar la proteína recombinante PE-2a-F2-KDEL. En primer lugar, la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 30) que codificaba el péptido señal KDEL se clonó en un vector pET24a para formar el plásmido pET24a-KDEL. Después, la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 5) del fragmento 2a-F2 obtenido en el Ejemplo 1 se clonó en el plásmido pET24a-KDEL para formar el plásmido pET24a-2a-F2-KDEL. Finalmente, la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 34) que codificaba la proteína PE se clonó en el plásmido pET24a-2a-F2-KDEL para formar el plásmido pET24a-PE-2a-F2-KDEL.

- 20 1. Construcción de pET24a-KEDL

La secuencia de ADN que codifica el péptido señal KDEL (SEQ ID NO: 31) se muestra como SEQ ID NO: 30. La secuencia de ADN se amplificó por PCR. A continuación se muestran las secuencias de los cebadores de especificidad de KEDL.

Cebador directo (con un sitio de restricción *Hind* III):

25 **5'-CCCAAGCTTCTCAAAAAGACGAACTGAGAGATGAACTGAAAGA-3'** (SEQ ID NO: 32)

*Hind* III

Cebador inverso (con un sitio de restricción *Xho* I):

**5'-GTGGCTCGAGCAGTTCGTCTTTCAGTTCATCT-3'** (SEQ ID NO: 33)

*Xho* I

- 30 Las condiciones para la reacción PCR comprenden: 94°C durante 3 minutos, 5 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 20 segundos, y 72°C durante 1 minuto para el alargamiento. El producto de PCR y el vector pET24a se sometieron a una doble digestión con enzimas de restricción con *Hind* III y *Xho* I. Después se purificaron los productos de PCR y el vector pET24a digeridos, respectivamente, a lo que siguió una ligadura para clonar el producto de PCR en pET24a para formar pET24a-KDEL. A continuación se transformó el constructo pET24a-KEDL en células huésped (*E. coli*) para llevar a cabo una replicación en masa. Los productos de PCR replicados se confirmaron posteriormente mediante secuenciación.

- 35 2. Construcción de pET24a-2a-F2-KDEL

La secuencia de ADN 2a-F2 (SEQ ID NO: 5) obtenida en el Ejemplo 1 se amplificó por PCR. A continuación se muestran los cebadores PCR.

- 40 Cebador directo pF2-1 (con un sitio de restricción *Sac* I):

**5'-CGAGCTCTTTGTTCCCCCGGGAGGGGGG-3'** (SEQ ID NO: 38)

*Sac* I

Cebador inverso pR2-1 (con un sitio de restricción *Hind* III):

5'-CCCAAGCTTGTAGGAGAAGGGTTGGGGGATT-3' (SEQ ID NO: 39)

*Hind* III

5 Las condiciones para la reacción PCR comprenden: 95°C durante 5 minutos, 25 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, y 72°C durante 5 minutos para el alargamiento. El producto de PCR y el plásmido pET24a-KDEL se sometieron a una doble digestión por enzimas de restricción con *Sac* I y *Hind* III. Después se purificaron los productos de PCR y el plásmido pET24a-KDEL digeridos, respectivamente, a lo que siguió una ligadura para clonar el producto de PCR en pET24a-KDEL para formar pET24a-2a-F2-KDEL. A continuación se transformó el constructo en células huésped (*E. coli*) para llevar a cabo una replicación en masa. Los productos de PCR replicados se confirmaron posteriormente mediante secuenciación.

10 3. Construcción de pET24a-PE-2a-F2-KDEL

La secuencia de ADN que codifica la proteína PE (SEQ ID NO: 35) se muestra como SEQ ID NO: 34. La secuencia de ADN se amplificó por PCR. A continuación se muestran las secuencias de cebadores de especificidad de PE.

15 Cebador directo (con un sitio de restricción *Bam*H I):

5'- CGGGATCCGAAGAAGCGTTCGAC -3' (SEQ ID NO: 36)

*Bam*H I

Cebador inverso (con un sitio de restricción *Eco*RI y un sitio de restricción *Sac* I)

5'- CGGAATTCGAGCTCGCAGGTCAGGCTCACCAC-3' (SEQ ID NO: 37)

20 *Eco*RI *Sac* I

25 Las condiciones para la reacción PCR comprenden: 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 1,5 minutos, y 72°C durante 7 minutos para el alargamiento. El producto de PCR y el plásmido pET24a-2a-F2-KDEL se sometieron a una doble digestión con enzimas de restricción con *Bam*H I y *Sac* I. Después se purificaron los productos de PCR y el plásmido pET24a-2a-F2-KDEL digeridos, respectivamente, a lo que siguió una ligadura para clonar el producto de PCR en pET24a-2a-F2-KDEL para formar pET24a-PE-2a-F2-KDEL. A continuación se transformó el constructo pET24a-PE-2a-F2-KDEL en células huésped (*E. coli*) para llevar a cabo una replicación en masa. Los productos de PCR replicados se confirmaron posteriormente mediante secuenciación. La proteína de fusión antigénica PE-2a-F2-KDEL tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y la secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión es SEQ ID NO: 40.

30 4. Expresión de proteína PE-2a-F2-KDEL

Se incubó en medio LB *E. coli* que contenía el plásmido pET24a-PE-2a-F2-KEDL. Mediante la adición de IPTG, se indujo al cultivo bacteriano a expresar la proteína de fusión antigénica PE-2a-F2-KEDL (SEQ ID NO: 41). En el Ejemplo 1 se describen procedimientos para la expresión y la extracción de la proteína.

35 **Ejemplo 4 Análisis de secuencias de ORF2 de PCV2 de subgrupos diferentes**

40 Además del subgrupo 2a, existen otros subgrupos del virus PCV2. A continuación se muestran, respectivamente, los análisis de los índices de arginina de las secuencias de aminoácidos codificadas por los nucleótidos 1-234 en el extremo 5' de ORF2 de PCV2 y las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADN desde el nucleótido 235 hasta el último nucleótido de ORF2 de PCV2 de los subgrupos de PCV2 2b, 2c, 2d y 2e.

45 Para el análisis filogenético de las SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 19 se utilizan como secuencias estándar secuencias génicas de ORF2 de PCV2 proporcionadas por Wang y col. (Wang y col., Virus Research 2009, Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2). Los resultados demuestran que las secuencias SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 19 de ORF2 de PCV2 pertenecen al subgrupo 2b de PCV2 y al subgrupo 2d de PCV2, respectivamente (como se muestra en la FIG. 1). Además, las secuencias SEQ ID NO:

50 y SEQ ID NO: 52 de ORF2 de PCV2 sirven de cepa estándar del subgrupo 2c de PCV2 y el subgrupo 2e de PCV2, respectivamente.

5 Los resultados de los análisis de secuencias del subgrupo 2b de PCV2 se muestran en la Tabla 3. El fragmento de ORF2 del subgrupo 2b de PCV2 (2b-ORF2) tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. Hay 21 residuos de arginina en las secuencias de aminoácidos codificadas por los nucleótidos 1-234 en el extremo 5' de 2b-ORF2, mientras que hay 10 residuos de arginina en las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 18) codificadas por los nucleótidos 235-699 (sin el codón de terminación, SEQ ID NO: 17) de 2b-ORF2. Los resultados de los análisis de las secuencias del subgrupo 2b de PCV2 concuerdan con los del subgrupo 2a de PCV2. Los índices de arginina en el extremo N de ambas proteínas de ORF2 son dos veces o más los índices de arginina de la parte restante de las proteínas de ORF2 (como se muestra en las Tablas 2 y 3).

Tabla 3 Análisis de índices de arginina de la secuencia de aminoácidos de 2b-ORF2 de PCV2

Subgrupo PCV2-2b - nucleótidos 1-234			Subgrupo PCV2-2b - nucleótidos 235-699		
Codón	Aminoácido	Cantidad	Codón	Aminoácido	Cantidad
AGA	Arginina	5	AGA	Arginina	5
AGG	Arginina	3	AGG	Arginina	1
CGA	Arginina	1	CGA	Arginina	0
CGC	Arginina	9	CGC	Arginina	3
CGG	Arginina	1	CGG	Arginina	0
CGT	Arginina	2	CGT	Arginina	1
Total		21	Total		10

15 Los resultados de los análisis de secuencias del subgrupo 2c de PCV2 se muestran en la Tabla 4. El fragmento de ORF2 del subgrupo 2c de PCV2 (2c-ORF2) tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 50 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51. Hay 20 residuos de arginina en las secuencias de aminoácidos codificadas por los nucleótidos 1-234 en el extremo 5' de 2c-ORF2, mientras que hay 10 residuos de arginina en las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 55) codificadas por los nucleótidos 235-702 (SEQ ID NO: 54) de 2c-ORF2. Los resultados de los análisis de las secuencias del subgrupo 2c de PCV2 concuerdan con los del subgrupo 2a de PCV2 y el subgrupo 2b de PCV2. Los índices de arginina en el extremo N de las tres proteínas de ORF2 son dos veces o más los índices de arginina de la parte restante de las proteínas de ORF2 (como se muestra en las Tablas 2, 3 y 4).

Tabla 4 Análisis de índices de arginina de la secuencia de aminoácidos de 2c-ORF2 de PCV2

Subgrupo PCV2-2c - nucleótidos 1-234			Subgrupo PCV2-2c - nucleótidos 235-702		
Codón	Aminoácido	Cantidad	Codón	Aminoácido	Cantidad
AGA	Arginina	5	AGA	Arginina	6
AGG	Arginina	3	AGG	Arginina	1
CGA	Arginina	0	CGA	Arginina	0
CGC	Arginina	9	CGC	Arginina	2
CGG	Arginina	1	CGG	Arginina	0
CGT	Arginina	2	CGT	Arginina	1
Total		20	Total		10

25 Los resultados de los análisis de las secuencias del subgrupo 2d de PCV2 se muestran en la Tabla 5. El fragmento de ORF2 del subgrupo 2d de PCV2 (2d-ORF2) tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. Hay 21 residuos de arginina en las secuencias de aminoácidos codificadas por los nucleótidos 1-234 en el extremo 5' de 2d-ORF2, mientras que hay 10 residuos de arginina en las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 21) codificadas por los nucleótidos 235-702 (sin el codón de parada, SEQ ID NO: 22) de 2d-ORF2. Los resultados de los análisis de secuencias del subgrupo 2d de PCV2 concuerdan con los del subgrupo 2a de PCV2, el subgrupo 2b de PCV2 y el subgrupo 2c de PCV2. Los índices de arginina en el extremo N de las cuatro proteínas de ORF2 son dos veces o más los índices de arginina de la parte restante de las proteínas de ORF2 (como se muestra en las Tablas 2, 3, 4 y 5).

Tabla 5 Análisis de índices de arginina de la secuencia de aminoácidos de 2d-ORF2 de PCV2

Subgrupo PCV2-2d - nucleótidos 1-234			Subgrupo PCV2-2d - nucleótidos 235-702		
Codón	Aminoácido	Cantidad	Codón	Aminoácido	Cantidad
AGA	Arginina	5	AGA	Arginina	4
AGG	Arginina	3	AGG	Arginina	3
CGA	Arginina	1	CGA	Arginina	0
CGC	Arginina	10	CGC	Arginina	1

Subgrupo PCV2-2d - nucleótidos 1-234			Subgrupo PCV2-2d - nucleótidos 235-702		
CGG	Arginina	0	CGG	Arginina	1
CGT	Arginina	2	CGT	Arginina	1
Total		21	Total		10

Los resultados de los análisis de las secuencias del subgrupo 2e de PCV2 se muestran en la Tabla 6. El fragmento de ORF2 del subgrupo 2e de PCV2 (2e-ORF2) tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 52 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53. Hay 20 residuos de arginina en las secuencias de aminoácidos codificadas por los nucleótidos 1-234 en el extremo 5' de 2e-ORF2, mientras que hay 9 residuos de arginina en las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 57) codificadas por los nucleótidos 235-699 (sin el codón de parada, SEQ ID NO: 56) de 2e-ORF2. Los resultados de los análisis de secuencias del subgrupo 2e de PCV2 concuerdan con los del subgrupo 2a de PCV2, el subgrupo 2b de PCV2, el subgrupo 2c de PCV2 y el subgrupo 2d de PCV2. Los índices de arginina en el extremo N de las cinco proteínas de ORF2 son dos veces o más los índices de arginina de la parte restante de las proteínas de ORF2 (como se muestra en las Tablas 2, 3, 4, 5 y 6).

Tabla 6 Análisis de índices de arginina de la secuencia de aminoácidos de 2e-ORF2 de PCV2

Subgrupo PCV2-2e - nucleótidos 1-234			Subgrupo PCV2-2e - nucleótidos 235-699		
Codón	Aminoácido	Cantidad	Codón	Aminoácido	Cantidad
AGA	Arginina	5	AGA	Arginina	4
AGG	Arginina	3	AGG	Arginina	2
CGA	Arginina	0	CGA	Arginina	0
CGC	Arginina	9	CGC	Arginina	2
CGG	Arginina	1	CGG	Arginina	0
CGT	Arginina	2	CGT	Arginina	1
Total		20	Total		9

Los niveles de expresión de proteína de los dominios ricos en arginina y los dominios no ricos en arginina del subgrupo 2b de PCV2, el subgrupo 2c de PCV2, el subgrupo 2d de PCV2 y el subgrupo 2e de PCV2 se analizan también por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Los resultados concuerdan con los resultados del Ejemplo 1. El nivel de expresión de proteína de los dominios ricos en arginina en el extremo N es bajo, mientras que el nivel de expresión de proteína del dominio no rico en arginina es alto. Además, el análisis de la adición o delección de la arginina muestra que la delección de la arginina excesiva puede aumentar la expresión de proteínas de ORF2 de PCV2, lo que también concuerda con los resultados del subgrupo 2a de PCV2.

El dominio rico en arginina tiene una secuencia de aminoácidos de aproximadamente los residuos 1-78 en el extremo N del péptido de longitud completa de ORF2 de PCV2 y el dominio no rico en arginina tiene una secuencia de aminoácidos aproximadamente desde el residuo 79 hasta el último residuo en el extremo C.

#### Ejemplo 5 Construcción y expresión de péptidos antigénicos de vacuna de subunidades de PCV2 2b

##### 1. Construcción y expresión de pET24a-2b-F2

En este ejemplo se utilizó el gen de ORF2 del subgrupo 2b de PCV2 del Ejemplo 4 en la construcción del péptido antigénico de la vacuna de subunidades de PCV2. Como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 3, el fragmento de F2 (nucleótidos 235-468 en el extremo 5' de la secuencia de ADN de longitud completa del gen de 2b ORF2 de PCV2, fragmento 2b-F2) se clona en un vector de expresión. El fragmento 2b-F2 del subgrupo 2b de PCV2 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. La secuencia de nucleótidos del fragmento 2b-F2 se amplificó por PCR. A continuación se muestran los cebadores de la PCR.

Cebador directo pF-2b (con un sitio de restricción *Sac* I):

5'- CGAGCTCTTTCTTCCCCCAGGAGGGGGC -3' (SEQ ID NO: 42)

*Sac* I

Cebador inverso pR-2b (con un sitio de restricción *Hind* III):

5'- CCCAAGCTTGTAGGAGAAGGGCTGGGTTAT-3' (SEQ ID NO: 43)

35

*Hind* III

Las condiciones para la reacción PCR comprenden: 95°C durante 5 minutos, 25 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, y 72°C durante 5 minutos para el alargamiento. El producto de PCR y el vector de expresión pET24a (Novagen) se sometieron a una doble digestión por enzimas de restricción con *Sac* I y *Hind* III. Después se purificaron los productos de PCR y el vector de expresión pET24a digeridos, respectivamente, a lo que siguió una ligadura para clonar el producto de PCR en el vector de expresión pET24a para formar el plásmido pET24a-2b-F2. A continuación se transformó el constructo en células huésped (*E. coli*) para llevar a cabo una replicación en masa. Los productos de PCR replicados se confirmaron posteriormente por secuenciación. Se incubó en medio LB *E. coli* que contenía el plásmido pET24a-2b-F2. Mediante la adición de IPTG, se indujo al cultivo bacteriano a expresar la proteína antigénica 2b-F2 (SEQ ID NO: 18). En el Ejemplo 1 se describen procedimientos para la expresión y la extracción de la proteína.

## 2. Construcción y expresión de pET24a-PE-2b-F2-KDEL

Además de utilizar el péptido 2b-F2 como péptido antigénico de la vacuna de subunidades de PCV2, en este ejemplo se fusionaron la proteína PE y el péptido de señal KDEL con el péptido 2b-F2 en los extremos N y C, respectivamente, para producir la proteína de fusión recombinante PE-2b-F2-KDEL con el fin de inducir la suficiente inmunidad contra la infección por PCV2 en animales.

La proteína de fusión recombinante PE-2b-F2-KDEL tiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 44 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45. La estrategia para la construcción del plásmido que expresa la proteína de fusión recombinante PE-2b-F2-KDEL (pET24a-PE-2b-F2-KDEL) es la misma que la estrategia descrita en el Ejemplo 3. En primer lugar, la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 30) que codifica el péptido de señal KDEL se clonó en un vector pET24a para formar el plásmido pET24a-KDEL. El procedimiento para la construcción del plásmido pET24a-KDEL se describe en el Ejemplo 3. Después, la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 17) del fragmento 2b-F2 se clonó en el plásmido pET24a-KDEL para formar el plásmido pET24a-2b-F2-KDEL. Finalmente, la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 34) que codifica la proteína PE se clonó en el plásmido pET24a-2b-F2-KDEL para formar el plásmido pET24a-PE-2b-F2-KDEL. El procedimiento para la construcción del plásmido pET24a-PE-2b-F2-KDEL se describe en el Ejemplo 3. A continuación, se incubó en medio LB *E. coli* que contenía el plásmido pET24a-PE-2b-F2-KDEL. Mediante la adición de IPTG, se indujo al cultivo bacteriano a expresar la proteína recombinante PE-2b-F2-KDEL (SEQ ID NO: 45). En el Ejemplo 1 se describen procedimientos para la expresión y la extracción de la proteína.

## 30 Ejemplo 6 Construcción y expresión de péptidos antigénicos de vacuna de subunidades de PCV2 2d

### 1. Construcción y expresión de pET24a-2d-F2

En este ejemplo se utilizó el gen de ORF2 del subgrupo 2d de PCV2 del Ejemplo 4 en la construcción del péptido antigénico de la vacuna de subunidades de PCV2. Como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 3, el fragmento de F2 (nucleótidos 235-468 en el extremo 5' de la secuencia de ADN de longitud completa del gen de 2d ORF2 de PCV2, fragmento 2d-F2) se clona en un vector de expresión. El fragmento 2d-F2 del subgrupo 2d de PCV2 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 21 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22. La secuencia de nucleótidos del fragmento 2d-F2 se amplificó por PCR. A continuación se muestran los cebadores de PCR.

Cebador directo pF-2d (con un sitio de restricción *Sac* I):

40 5'- CGAGCTCTTTCTTCCCCCAGGAGGGGGC -3' (SEQ ID NO: 46)

*Sac* I

Cebador inverso pR-2d (con un sitio de restricción *Hind* III):

45 5'- CCCAAGCTTGTAGGAGAAGGGCTGGGTTAT -3' (SEQ ID NO: 47)

*Hind* III

Las condiciones para la reacción PCR comprenden: 95°C durante 5 minutos, 25 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, y 72°C durante 5 minutos para el alargamiento. El producto de PCR y el vector de expresión pET24a (Novagen) se sometieron a una doble digestión con enzimas de restricción con *Sac* I y *Hind* III. Después se purificaron los productos de PCR y el vector de expresión pET24a digeridos, respectivamente, a lo que siguió una ligadura para clonar el producto de PCR en el vector de expresión pET24a para formar el plásmido pET24a-2d-F2. A continuación se transformó

el constructo en células huésped (*E. coli*) para llevar a cabo una replicación en masa. Los productos de PCR replicados se confirmaron posteriormente mediante secuenciación. Se incubó en medio LB *E. coli* que contenía el plásmido pET24a-2d-F2. Mediante la adición de IPTG, se indujo al cultivo bacteriano a expresar la proteína antigénica 2d-F2 (SEQ ID Bo: 22). En el Ejemplo 1 se describen procedimientos para la expresión y la extracción de la proteína.

## 2. Construcción y expresión de pET24a-PE-2d-F2-KDEL

Además de utilizar el péptido 2d-F2 como péptido antigénico de la vacuna de subunidades de PCV2, en este ejemplo se fusionaron la proteína PE y el péptido de señal KDEL con el péptido 2d-F2 en los extremos N y C, respectivamente, para producir la proteína de fusión recombinante PE-2d-F2-KDEL con el fin de inducir la suficiente inmunidad contra la infección por PCV2 en animales.

La proteína de fusión recombinante PE-2d-F2-KDEL tiene una secuencia de ADN de SEQ ID NO: 48 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49. La estrategia para la construcción del plásmido que expresa la proteína de fusión recombinante PE-2d-F2-KDEL (pET24a-PE-2d-F2-KDEL) es la misma que la estrategia descrita en el Ejemplo 3. En primer lugar, la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 30) que codifica el péptido de señal KDEL se clonó en un vector pET24a para formar el plásmido pET24a-KDEL. El procedimiento para la construcción del plásmido pET24a-KDEL se describe en el Ejemplo 3. Después, la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 21) del fragmento 2d-F2 se clonó en el plásmido pET24a-KDEL para formar el plásmido pET24a-2d-F2-KDEL. Finalmente, la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 34) que codifica la proteína PE se clonó en el plásmido pET24a-2d-F2-KDEL para formar el plásmido pET24a-PE-2d-F2-KDEL. El procedimiento para la construcción del plásmido pET24a-PE-2d-F2-KDEL se describe en el Ejemplo 3. A continuación, se incubó en medio LB *E. coli* que contenía el plásmido pET24a-PE-2d-F2-KDEL. Mediante la adición de IPTG, se indujo al cultivo bacteriano a expresar la proteína recombinante PE-2d-F2-KDEL (SEQ ID NO: 49). En el Ejemplo 1 se describen procedimientos para la expresión y la extracción de la proteína.

## **Ejemplo 7 Análisis de inmunogenicidad de péptidos antigénicos de la vacuna de subunidades de PCV2 - 1**

### 1. Inmunización de ratones

Se preparó vacuna de subunidades de PCV2 con la proteína recombinante 2a-F2 (SEQ ID NO: 6) preparada en el Ejemplo 1 y la proteína recombinante PE-2a-F2-KDEL (SEQ ID NO: 41) preparada en el Ejemplo 3, respectivamente, y adyuvante completo de Freund. Se vacunaron ratones con la vacuna de subunidades de PCV2 para analizar la inmunogenicidad de los péptidos antigénicos de la vacuna de subunidades de PCV2.

Se dividieron aleatoriamente ratones sanos SPF de cinco a seis semanas de edad en 3 grupos de 3 ratones cada uno. Un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) mostró que los 9 ratones eran negativos para anticuerpos anti-PCV2. A cada ratón de los 2 grupos de vacunación (grupos 1 y 2) se le inyectaron vía intraperitoneal 100 µg de proteína recombinante. A los ratones del grupo 3 se les inyectó PBS y éstos sirvieron de control negativo. Dos semanas después de la inmunización primaria (i.p.), los ratones de los 2 grupos de vacunación recibieron como refuerzo la misma dosis de las 2 proteínas recombinantes diferentes, respectivamente. Se recogieron muestras de suero en las semanas 2, 4, 5 y 8 posteriores a la inmunización primaria. Todas las muestras de suero se ensayaron mediante ELISA para medir el título de anticuerpos anti-PCV2.

### 2. Detección de anticuerpos anti-PCV2 mediante ELISA

En este ejemplo se utilizaron como placas ELISA placas de noventa y seis pocillos que contenían antígeno de patógeno PCV2 (300 ng/pocillo). Las placas ELISA se lavaron 3 veces con 50 mmol/l de PBS (pH 7,2) que contenía 500 µl/l de Tween-20 (por ejemplo PBST) durante 3 a 5 minutos cada vez. Para bloquear las placas ELISA se añadieron 200 µl de solución de bloqueo de BSA al 0,15% a cada pocillo de las placas ELISA y a continuación se incubaron las placas ELISA durante 2 horas a 37°C. Después se lavaron las placas ELISA con PBS. Las muestras de suero de ratón se diluyeron cincuenta veces (1:50) con PBS y a continuación se diluyeron en una relación de 1:2 en serie. Cada muestra tuvo 8 repeticiones. Las muestras de suero diluidas se añadieron a los pocillos de las placas ELISA (100 µl/pocillo) y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación, las placas se lavaron con PBS. A continuación se añadió a los pocillos anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (FA). Después de incubación durante 1 hora a 37°C, las placas se lavaron con PBS. Para visualizar los resultados se añadió a los pocillos para-nitrofenilfosfato (pNPP). Después de la incubación se detuvo la reacción añadiendo NaOH 1M. Se leyó la densidad óptica de cada pocillo utilizando densidad óptica a 405 nm. Cada muestra se analizó por duplicado y se calculó la media de los valores O.D. de los duplicados.

Los resultados del ELISA se muestran en la FIG. 6. La proteína recombinante PE-2a-F2-KDEL (SEQ ID NO: 41) induce en los animales ensayados un mayor nivel de anticuerpos séricos contra PCV2 que la proteína recombinante 2a-F2 (SEQ ID NO: 6). Existen importantes diferencias entre los niveles de anticuerpos séricos contra PCV2 en el Grupo 1 y el Grupo 2 en la semana 4 posterior a la inmunización primaria ( $p < 0,05$ ). Las diferencias entre los niveles de anticuerpos séricos contra PCV2 en el Grupo 1 y el Grupo 2 son más importantes en la semana 6 posterior a la inmunización primaria ( $p < 0,01$ ). Adicionalmente, en comparación con el nivel de anticuerpos del control negativo, los niveles de anticuerpos del Grupo 1 y el Grupo 2 son considerablemente mayores ( $p < 0,01$ ).

5

### **Ejemplo 8 Análisis de inmunogenicidad de péptidos antigénicos de la vacuna de subunidades de PCV2 - 2**

10

#### 1. Inmunización de ratones

En este ejemplo, la inmunogenicidad de la proteína recombinante PE-2a-F2-KDEL aquí descrita memoria en animales sometidos a ensayo se compara con la inmunogenicidad del virus PCV2 íntegro en animales sometidos a ensayo.

15

Se produjo una vacuna de subunidades de PCV2 con la proteína recombinante PE-2a-F2-KDEL (SEQ ID NO: 41) preparada en el Ejemplo 3 y adyuvante de tipo oleoso Montanide ISA 206 (Seppic, Francia). Además, se produjo vacuna de virus PCV2 íntegro con virus PCV2 íntegro inactivado ( $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml (TCID = dosis infecciosas de cultivo tisular) y adyuvante de tipo oleoso Montanide ISA 206 (Seppic, Francia). En una sola dosis de la vacuna de virus PCV2 íntegro hay 100  $\mu$ l de virus PCV2 íntegro inactivado y 250  $\mu$ l de adyuvante. Las dos vacunas se utilizaron para vacunar ratones.

20

Se dividieron aleatoriamente ratones sanos SPF de cinco a seis semanas de edad en 3 grupos de 5 ratones cada uno. Un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) mostró que los 15 ratones eran negativos para anticuerpos anti-PCV2. A cada ratón del Grupo 1 se le inyectó vía intraperitoneal 100  $\mu$ g de proteína recombinante. A cada ratón del Grupo 2 se le inyectó vía intraperitoneal una sola dosis de vacuna de virus PCV2 íntegro. A los ratones del grupo 3 se les inyectó adyuvante de tipo oleoso Montanide ISA 206 y éstos sirvieron de control negativo. Tres semanas después de la inmunización primaria (i.p.), los ratones de los 2 grupos de vacunación recibieron como refuerzo la misma dosis de las 2 vacunas diferentes, respectivamente. Se recogieron muestras de suero en las semanas 0, 1, 2, 3, 4 y 5 posteriores a la inmunización primaria. Todas las muestras de suero se ensayaron mediante ELISA para medir el título de anticuerpos anti-PCV2.

25

#### 30 2. Detección de anticuerpos anti-PCV2 mediante ELISA

El procedimiento ELISA para la detección de anticuerpos anti-PCV2 se describe en el Ejemplo 7. Los resultados del ELISA se muestran en la FIG. 7. La proteína recombinante PE-2a-F2-KDEL (SEQ ID NO: 41) induce un mayor nivel de anticuerpos séricos contra PCV2 en animales sometidos a ensayo que el antígeno de virus PCV2 íntegro inactivado. Existen importantes diferencias entre los niveles de anticuerpos séricos contra PCV2 en el Grupo 1 y el Grupo 2 en la semana 1 posterior a la inmunización primaria ( $p < 0,001$ ). Adicionalmente, en comparación con el nivel de anticuerpos del control negativo, el nivel de anticuerpos de los ratones vacunados con la proteína recombinante PE-2a-F2-KDEL (Grupo 1) es considerablemente mayor ( $p < 0,001$ ).

35

Además, se vacunaron cerdos con las proteínas recombinantes de 2a-F2 y PE-2a-F2-KDEL, respectivamente, y ambas proteínas recombinantes fueron capaces de inducir anticuerpos séricos contra PCV2 en los cerdos. Además, los cerdos vacunados fueron sometidos a una prueba de provocación con virus PCV2 para evaluar la eficacia de las proteínas recombinantes. En primer lugar se formularon las proteínas recombinantes como una vacuna de subunidades y se inyectaron las mismas a cerdos. A continuación se sometió a los cerdos a una prueba de provocación con virus PCV2. Los resultados muestran que los porcentajes de protección de los grupos de inmunización son mayores que los del control negativo (sin vacunación). Los porcentajes de protección utilizados aquí incluyen una disminución en la viremia y una mitigación de los síntomas del PCV2. Por tanto, los resultados demuestran que la vacuna de subunidades de PCV2 preparada con las proteínas recombinantes puede inducir eficazmente inmunidad en animales y aumentar su tasa de supervivencia.

40

45

Adicionalmente se prepararon proteínas de ORF2 o fragmentos del mismo del subgrupo 2b de PCV2, el subgrupo 2c de PCV2, el subgrupo 2d de PCV2 y el subgrupo 2e de PCV2 mediante los procedimientos descritos en los Ejemplos 1-3, respectivamente, y se analizó la inmunogenicidad de las proteínas de ORF2 o de los fragmentos del mismo mediante los procedimientos descritos en los Ejemplos 7 y 8. Los resultados muestran que los fragmentos de ORF2 de estos subgrupos de PCV2 (por ejemplo, fragmento F2) y las proteínas de fusión recombinantes de los mismos (por ejemplo, PE-F2-KDEL) pueden inducir inmunidad en animales (tales como cerdos) e impedir que éstos se infecten con PCV2.

50

La vacuna de subunidades de PCV2 proporcionada en la descripción tiene las siguientes ventajas, en comparación con otras técnicas convencionales.

5 La vacuna de subunidades de PCV2 proporcionada en la descripción se prepara por ingeniería genética, donde unos fragmentos de proteína de ORF2 de PCV2 que pueden expresarse altamente en sistemas de expresión biológicos se clonan y se utilizan como péptidos antigénicos de la vacuna de subunidades. La vacuna de subunidades puede inducir suficiente inmunidad contra la infección por PCV2 en animales y los fragmentos de proteína de ORF2 de PCV2 pueden producirse en masa mediante ingeniería genética para reducir el coste de fabricación de la vacuna.

10 Otra vacuna de subunidades de PCV2 proporcionada en la descripción contiene una proteína de fusión antigénica PE-F2-KDEL, que es una proteína recombinante de péptido F2 de ORF2 de PCV2, proteína PE y péptido de señal KDEL. Los experimentos con animales demuestran que esta vacuna de subunidades de PCV2 puede inducir eficazmente una mayor inmunidad contra la infección por PCV2 en animales.

15 La vacuna de subunidades proporcionada en la descripción se desarrolla por ingeniería genética y la vacuna tiene las ventajas de un proceso de producción sencillo, bajo coste, gran pureza, alto rendimiento y buena seguridad.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SBC Virbac Biotech Co., Ltd.

20 <120> Vacuna de subunidades de circovirus porcino tipo 2 (PCV2)

<130> P14-0100

<150> US 61/567,248

<151> 2011-12-06

25

<150> PCT/CN2012/085907

<151> 2012-12-05

<160> 57

30

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 699

35

<212> ADN

<213> Circovirus porcino

<400> 1

```

atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcgag ccatcttggc      60
cagatcctcc gccgcccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg      120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctagc      180
acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatattaa cgactttggt      240
ccccggggag gggggaccaa caaaatctct ataccctttg aatactacag aataagaaag      300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc      360
actgctgtta ttctagatga taactttgta actaaggcca cagccctaac ctatgacccc      420
tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctcctacca ctcccgttac      480
tttaccctaa aacctgtcct tgattccact attgattact tccaaccaa cagcaaaagg      540
aatcagatth ggctgaggct acaaacctcg gcaaagtgg accacgtagg cctcggctact      600
gcgttcgaaa acagtaaata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaactat gtatgtacaa      660
40  ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaacc      699

```

<210> 2

ES 2 661 026 T3

<211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Circovirus porcino

5 <400> 2  
 Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro  
 20 25 30  
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35 40 45  
 Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Ser Thr Val Arg Thr  
 50 55 60  
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Val  
 65 70 75 80  
 Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr  
 100 105 110  
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn  
 115 120 125  
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr  
 130 135 140  
 Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro  
 165 170 175  
 Asn Ser Lys Arg Asn Gln Ile Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Ala Asn  
 180 185 190  
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp  
 195 200 205  
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe  
 210 215 220  
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro  
 225 230

<210> 3  
 <211> 234  
 10 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino

<400> 3

ES 2 661 026 T3

atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60  
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc cccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120  
 aaaaatggca tcttaaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctagc 180  
 acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatattaa cgac 234

<210> 4

<211> 78

<212> PRT

5 <213> *Circovirus porcino*

<400> 4

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

10

<210> 5

<211> 234

<212> ADN

<213> *Circovirus porcino*

15

<400> 5

tttgttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac ctttgaata ctacagaata 60  
 agaaaggtta aggttgaatt ctggccctgc tcccacatca cccagggtga caggggagtg 120  
 ggctccactg ctgttattct agatgataac tttgtaacta aggccacagc cctaacctat 180  
 gaccctatg taaactactc ctcccgccat acaatcccc aacccttctc ctac 234

20

<210> 6

<211> 78

<212> PRT

<213> *Circovirus porcino*

25

<400> 6

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

ES 2 661 026 T3

Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val  
 50 55 60  
 Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr  
 65 70 75

5 <210> 7  
 <211> 231  
 <212> ADN  
 <213> *Circovirus porcino*

10 <400> 7  
 cactcccggg actttacccc aaaacctgtc cttgattcca ctattgatta cttccaacca 60  
 aacagcaaaa ggaatcagat ttggctgagg ctacaaacct cggcaaatgt ggaccacgta 120  
 ggccctcggt ctgctgtcga aaacagtaaa tacgaccagg actacaatat ccggtgtaact 180  
 atgtatgtac aattcagaga atttaattctt aaagaccccc cacttaaacc c 231

15 <210> 8  
 <211> 77  
 <212> PRT  
 <213> *Circovirus porcino*

20 <400> 8  
 His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp  
 1 5 10 15  
 Tyr Phe Gln Pro Asn Ser Lys Arg Asn Gln Ile Trp Leu Arg Leu Gln  
 20 25 30  
 Thr Ser Ala Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn  
 35 40 45  
 Ser Lys Tyr Asp Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln  
 50 55 60  
 Phe Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro  
 65 70 75

25 <210> 9  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> *Circovirus porcino*

30 <400> 9  
 ggagtgggct cactgctgt tattctagat gataactttg taactaaggc cacagcccta 60  
 acctatgacc cctatgtaaa ctactcctcc cgccatacaa tcccccaacc cttctcctac 120  
 cactcccggg actttacccc aaaacctgtc cttgattcca ctattgatta cttccaacca 180  
 aacagcaaaa ggaatcagat ttggctgagg ctacaaacct cggcaaatgt ggaccacgta 240  
 ggccctcggt ctgctgtcga aaacagtaaa tacgaccagg actacaatat ccggtgtaact 300  
 atgtatgtac aattcagaga atttaattctt aaagaccccc cacttaaacc c 351

35 <210> 10  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> *Circovirus porcino*

ES 2 661 026 T3

<400> 10

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

- 5 <210> 11  
 <211> 465  
 <212> ADN  
 <213> *Circovirus porcino*

10 <400> 11

tttgttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac ctttgaata ctacagaata           60  
 agaaaggtta aggttgaatt ctggccctgc tccccaatca cccagggtga caggggagtg           120  
 ggctccactg ctgttattct agatgataac tttgtaacta aggccacagc cctaacctat           180  
 gaccctatg taaactactc ctcccgccat acaatcccc aacccttctc ctaccactcc           240  
 cgg tacttta ccccaaac tgccttgat tccactattg attacttcca accaaacagc           300  
 aaaaggaatc agatttggt gaggctacaa acctcggcaa atgtggacca cgtaggcctc           360  
 ggtactgcgt tcgaaaacag taaatacgac caggactaca atatccgtgt aactatgtat           420  
 gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccactta aacc                   465

- 15 <210> 12  
 <211> 155  
 <212> PRT  
 <213> *Circovirus porcino*

20 <400> 12

# ES 2 661 026 T3

```

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

```

```

5 <210> 13
  <211> 468
  <212> ADN
  <213> Circovirus porcino

```

```

10 <400> 13
    atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc      60
    cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc caccgccgc accgttaccg ctggagaagg      120
    aaaaatggca tcttcaaac cgcctctcc cgcaccttc gatatactgt caaggctagc      180
    acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatattaa cgactttggt      240
    cccccgggag gggggaccaa caaatctct atacccttg aatactacag aataagaaag      300
    gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc      360
    actgctgtta ttctagatga taactttgta actaaggcca cagccctaac ctatgacccc      420
    tatgtaaact actctcccg ccatacaate cccaaccct tctctac      468

```

```

15 <210> 14
    <211> 156
    <212> PRT
    <213> Circovirus porcino

```

```

<400> 14

```

ES 2 661 026 T3

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

<210> 15  
 <211> 702  
 5 <212> ADN  
 <213> *Circovirus porcino*

<400> 15  
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccggaga agaagacacc gccccgcag ccatcttgga 60  
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc caccgccg accgttaccg ctggagaagg 120  
 aaaaatggca tcttcaaac cgcctctcc cgcacctcg gatatactat caagcgaacc 180  
 acagtcaaaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgat tcaatattaa tgactttctt 240  
 10 cccccaggag ggggtcaaaa cccccgctct gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300  
 gttaagggtg aattctggcc ctgctccccg atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360  
 agtgctgta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctcac ctatgacccc 420  
 tatgtaaact actcctccc ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgtac 480  
 tttacccca aacctgtcct agattccact attgattact tccaacaaa caacaaaaga 540  
 aatcagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600  
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660  
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaccctt aa 702

<210> 16  
 <211> 233  
 15 <212> PRT  
 <213> *Circovirus porcino*

<400> 16

ES 2 661 026 T3

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro  
 20 25 30  
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35 40 45  
 Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr  
 50 55 60  
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr  
 100 105 110  
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn  
 115 120 125  
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr  
 130 135 140  
 Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro  
 165 170 175  
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn  
 180 185 190  
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp  
 195 200 205  
 Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe  
 210 215 220  
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro  
 225 230

5 <210> 17  
 <211> 234  
 <212> ADN  
 <213> *Circovirus porcino*

10 <400> 17  
 tttcttcccc caggaggggg ctcaaacc ccgctctgtgc cctttgaata ctacagaata 60  
 agaaaggtta aggttgaatt ctggccctgc tccccgatca cccagggtga caggggagtg 120  
 ggctccagtg ctgttattct agatgataac tttgtaacaa aggccacagc cctcacctat 180  
 gaccctatg taaactactc ctcccgccat accataacc agcccttctc ctac 234

<210> 18  
 <211> 78  
 <212> PRT  
 15 <213> *Circovirus porcino*

ES 2 661 026 T3

<400> 18

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

5

<210> 19  
 <211> 705  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino

10

<400> 19  
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga cgaagacacc gccccgcgag ccatcttggc            60  
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctagtc cacccecgcc accggtaccg ctggagaagg            120  
 aaaaatggca tcttcaacac cgcctctccc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc            180  
 acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatattaa tgattttctt            240  
 cccccaggag ggggctcaag cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag            300  
 gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgagctcc            360  
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc            420  
 tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccggtag            480  
 tttaccccga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga            540  
 aatcaactct ggtgtagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact            600  
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataacat gtatgtacaa            660  
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta agtga                    705

15

<210> 20  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Circovirus porcino

20

<400> 20

ES 2 661 026 T3

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro  
 20 25 30  
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35 40 45  
 Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val Arg Thr  
 50 55 60  
 Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Ser Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr  
 100 105 110  
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Ser Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn  
 115 120 125  
 Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr  
 130 135 140  
 Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro  
 165 170 175  
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr Gly Asn  
 180 185 190  
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp  
 195 200 205  
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Ile Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe  
 210 215 220  
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys  
 225 230

5 <210> 21  
 <211> 234  
 <212> ADN  
 <213> *Circovirus porcino*

10 <400> 21  
 tttcttcccc caggaggggg ctcaagcccc ctactgtgc ctttgaata ctacagaata 60  
 aggaaggtta aggttgaatt ctggcctgc tcccacatca cccagggtga caggggagtg 120  
 agctccactg ctgttattct agatgataac tttgtaacaa aggccaatgc cctaacctat 180  
 gaccctatg taaactactc ctcccgccat accataaccc agcccttctc ctac 234

<210> 22  
 <211> 78  
 <212> PRT  
 15 <213> *Circovirus porcino*

# ES 2 661 026 T3

<400> 22

```

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

```

5

<210> 23  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Cebador directo para F1 de ORF2 de PCV2

15

<400> 23  
 cccaagcttg catgacgtat ccaaggaggc g 31

20

<210> 24  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para F1 de 2a ORF2 de PCV2

25

<400> 24  
 ccgctcgagg ggttaagtg ggggtcttt a 31

30

<210> 25  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo para F2 de 2a ORF2 de PCV2

35

<400> 25  
 cccaagcttg cttgttccc ccgggagggg g31

40

<210> 26  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para F2 de 2a ORF2 de PCV2

45

<400> 26  
 ccgctcgagg taggagaagg gttgggggat t 31

50

<210> 27  
 <211> 31

ES 2 661 026 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador directo para F3 de 2a ORF2 de PCV2  
  
 <400> 27  
 cccaagcttg ccaactccgg tactttacc c 31  
  
 10 <210> 28  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Cebador inverso para F3 de 2a ORF2 de PCV2  
  
 <400> 28  
 cgctcgagg tcgtaatat taaatctcat c 31  
 20  
 <210> 29  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Cebador directo para F4 de 2a ORF2 de PCV2  
  
 <400> 29  
 30 cccaagcttg cggagtgggc tccactgctg t31  
  
 <210> 30  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 35 <213> *Escherichia coli*  
  
 <400> 30  
 ctcaaaaaag acgaactgag agatgaactg aaagacgaac tgtaatga 48  
  
 40 <210> 31  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*  
  
 45 <400> 31  
 Leu Lys Lys Asp Glu Leu Arg Asp Glu Leu Lys Asp Glu Leu  
 1 5 10  
  
 <210> 32  
 <211> 44  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo para KDEL  
 55  
 <400> 32  
 cccaagcttc tcaaaaaaga cgaactgaga gatgaactga aaga 44  
  
 <210> 33  
 60 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 661 026 T3

<220>

<223> Cebador inverso para KDEL

<400> 33

5 gtgctcgagc agttcgtctt tcagttcatc t 31

<210> 34

<211> 1116

<212> ADN

10 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<300>

<308> Genbank / K01397

<309> 2002-02-11

15 <313> (821)..(1936)

<400> 34

```

gccgaagaag ctttcgacct ctggaacgaa tgcgccaaag cctgctgtgt cgacctcaag      60
gacggcgtgc gttccagccg catgagcgtc gaccgggcca tcgccgacac caacgggccag      120
ggcgtgtgtc actactccat ggtcctggag ggcggcaacg acgcgtcaa gctggccatc      180
gacaacgccc tcagcatcac cagcgacggc ctgaccatcc gcctcgaagg cggcgtcgag      240
ccgaacaagc cggtgcgcta cagctacaag cgccaggcgc gcggcagttg gtcgctgaac      300
tggctggtac cgatcggcca cgagaagccc tcgaacatca aggtgttcat ccacgaactg      360
aacgccggca accagctcag ccacatgtcg ccgatctaca ccaccgagat gggcgacgag      420
ttgctagcga agctggcgcg cgatgccacc ttcttcgtca gggcgcacga gagcaacgag      480
atgcagccga cgctcgccat cagccatgcc ggggtcagcg tggcatggc ccagaccag      540
ccgcgccggg aaaagcgtg gagcgaatgg gccagcggca aggtgttgtg cctgctcgac      600
ccgctggacg gggctctaaa ctacctgcc cagcaacgct gcaacctcga cgatacctgg      660
gaaggcaaga tctaccgggt gctcgcggc aaccggcgga agcatgacct ggacatcaaa      720
cccacggtea tcagtcatcg cctgcacttt cccgagggcg gcagcctggc cgcgctgacc      780
gcgaccagc cttgccacct gccgctggag actttcacc gtcacgcca gccgcgaggc      840
tgggaacaac tggagcagtg cggctatccg gtgcagcggc tggtcgccct ctacctggcg      900
gcgcggtgt cgtggaacca ggtcgaccag gtgatccgca acgccctggc cagccccggc      960
agcggcggcg acctaggcga agcgatccgc gacgagccgg agcaggcccg tctggccctg     1020
accctggccg ccgccgagag cgagcgcttc atccggcagg gcaccggcaa cgacgaggcc     1080
ggcgcggcca acgccgacgt ggtgagcctg acctgc                                  1116

```

20 <210> 35

<211> 372

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

25 <400> 35

ES 2 661 026 T3

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

ES 2 661 026 T3

Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His  
 115 120 125  
 Met Ser Pro Ile Tyr Thr Thr Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys  
 130 135 140  
 Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu  
 145 150 155 160  
 Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met  
 165 170 175  
 Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser  
 180 185 190  
 Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr  
 195 200 205  
 Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile  
 210 215 220  
 Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys  
 225 230 235 240  
 Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu  
 245 250 255  
 Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe  
 260 265 270  
 Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly  
 275 280 285  
 Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser  
 290 295 300  
 Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly  
 305 310 315 320  
 Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala  
 325 330 335  
 Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Ile Arg  
 340 345 350  
 Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val  
 355 360 365  
 Ser Leu Thr Cys  
 370

- <210> 36
- <211> 23
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Cebador directo para PE
  
- 10 <400> 36
- cgggatccga agaagcggtc gac 23

## ES 2 661 026 T3

- <210> 37  
<211> 32  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Cebador inverso para PE
- 10 <400> 37  
cggaattcga gctcgcaggt caggctcacc ac 32
- <210> 38  
<211> 28  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Cebador directo para F1 de 2a ORF2 de PCV2
- 20 <400> 38  
cgagctcttt gttccccgg gagggggg 28
- <210> 39  
<211> 31  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
30 <223> Cebador inverso para F1 de 2a ORF2 de PCV2
- <400> 39  
cccaagcttg taggagaagg gttgggggat t 31
- 35 <210> 40  
<211> 1413  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>  
<223> Secuencia de ADN combinada de PE, F2 de 2a ORF2 de PCV2, y KDEL
- <400> 40

## ES 2 661 026 T3

```

ggatccgaag aagcgttcga cctctggaac gaatgcgcc aagcctgcgt gctcgacctc      60
aaggacggcg tgcgttccag ccgcatgagc gtcgacctcg ccatcgccga caccaacggc      120
cagggcgctg tgcactactc catggctctg gagggcgcca acgacgcgct caagctggcc      180
atcgacaacg ccctcagcat caccagcgac ggctgacca tccgcctcga aggcggcgctc      240
gagccgaaca agccggtgcg ctacagctac acgcgccagg cgcgcggcag ttggtcgctg      300
aactggctgg taccgatcgg ccacgagaag ccctcgaaca tcaaggtggt catccacgaa      360
ctgaacgccg gcaaccagct cagccacatg tcgccgatct acaccaccga gatggggcgac      420
gagttgctag cgaagctggc gcgcgatgcc accttcttcg tcagggcgca cgagagcaac      480
gagatgcagc cgacgctcgc catcagccat gccgggggtca gcgtggtcat ggcccagacc      540
cagccgcgcc gggaaaagcg ctggagcgaa tgggccagcg gcaaggtggt gtgcctgctc      600
gacccgctgg acggggtcta caactacctc gccagcaac gctgcaacct cgacgatacc      660
tggaaggca agatctaccg ggtgctcgcc ggcaaccggc cgaagcatga cctggacatc      720
aaaccacgg tcatcagtca tcgcctgcac tttcccgagg gcggcagcct ggccgcgctg      780
accgcgcacc aggcttgcca cctgccgctg gagactttca cccgtcatcg ccagccgcgc      840
ggctgggaac aactggagca gtgcggctat ccggtgcagc ggtggtcgc cctctacctg      900
gcggcgcgcg tgtcgtgaa ccaggctgac caggtgatcc gcaacgccct ggccagcccc      960
ggcagcggcg gcgacctagg cgaagcgatc cgcgagcagc cggagcaggc ccgtctggcc     1020
ctgaccctgg ccgccccga gagcgagcgc ttcatccggc agggcaccgg caacgacgag     1080
gccggcgcgg ccaacgccga cgtggtgagc ctgacctgcg agctctttgt tccccggga     1140
ggggggacca aaaaaatctc tataaccttt gaataactaca gaataagaaa ggttaagggt     1200
gaattctggc cctgctcccc aatcaccagc ggtgacaggg gagtgggctc cactgctggt     1260
attctagatg ataactttgt aactaaggcc acagccctaa cctatgacct ctatgtaaac     1320
tactcctccc gccatacaat cccccaacct ttctcctaca agcttctcaa aaaagacgaa     1380
ctgagagatg aactgaaaga cgaactgctc gag                                     1413

```

<210> 41

<211> 471

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos combinada de PE, F2 de 2a ORF2 de PCV2, y KDEL

<400> 41

# ES 2 661 026 T3

Gly	Ser	Glu	Glu	Ala	Phe	Asp	Leu	Trp	Asn	Glu	Cys	Ala	Lys	Ala	Cys	1	5	10	15
Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	Arg	Ser	Ser	Arg	Met	Ser	Val	Asp	20	25	30	
Pro	Ala	Ile	Ala	Asp	Thr	Asn	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	His	Tyr	Ser	Met	35	40	45	
Val	Leu	Glu	Gly	Gly	Asn	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Ala	Ile	Asp	Asn	Ala	50	55	60	
Leu	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	Gly	Leu	Thr	Ile	Arg	Leu	Glu	Gly	Gly	Val	65	70	75	80
Glu	Pro	Asn	Lys	Pro	Val	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Arg	Gln	Ala	Arg	Gly	85	90	95	
Ser	Trp	Ser	Leu	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	His	Glu	Lys	Pro	Ser	100	105	110	
Asn	Ile	Lys	Val	Phe	Ile	His	Glu	Leu	Asn	Ala	Gly	Asn	Gln	Leu	Ser	115	120	125	
His	Met	Ser	Pro	Ile	Tyr	Thr	Thr	Glu	Met	Gly	Asp	Glu	Leu	Leu	Ala	130	135	140	
Lys	Leu	Ala	Arg	Asp	Ala	Thr	Phe	Phe	Val	Arg	Ala	His	Glu	Ser	Asn	145	150	155	160
Glu	Met	Gln	Pro	Thr	Leu	Ala	Ile	Ser	His	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Val	165	170	175	
Met	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Trp	Ser	Glu	Trp	Ala	180	185	190	
Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Asp	Gly	Val	Tyr	Asn	195	200	205	
Tyr	Leu	Ala	Gln	Gln	Arg	Cys	Asn	Leu	Asp	Asp	Thr	Trp	Glu	Gly	Lys	210	215	220	
Ile	Tyr	Arg	Val	Leu	Ala	Gly	Asn	Pro	Ala	Lys	His	Asp	Leu	Asp	Ile	225	230	235	240
Lys	Pro	Thr	Val	Ile	Ser	His	Arg	Leu	His	Phe	Pro	Glu	Gly	Gly	Ser	245	250	255	
Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	His	Gln	Ala	Cys	His	Leu	Pro	Leu	Glu	Thr	260	265	270	
Phe	Thr	Arg	His	Arg	Gln	Pro	Arg	Gly	Trp	Glu	Gln	Leu	Glu	Gln	Cys	275	280	285	
Gly	Tyr	Pro	Val	Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Leu	Tyr	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	290	295	300	
Ser	Trp	Asn	Gln	Val	Asp	Gln	Val	Ile	Arg	Asn	Ala	Leu	Ala	Ser	Pro	305	310	315	320
Gly	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Gly	Glu	Ala	Ile	Arg	Glu	Gln	Pro	Glu	Gln	325	330	335	

# ES 2 661 026 T3

Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Ile	340	345	350
Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val	355	360	365
Val Ser Leu Thr Cys Glu Leu Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn	370	375	380
Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val	385	390	395
Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly	405	410	415
Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala	420	425	430
Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro	435	440	445
Gln Pro Phe Ser Tyr Lys Leu Leu Lys Lys Asp Glu Leu Arg Asp Glu	450	455	460
Leu Lys Asp Glu Leu Leu Glu	465	470	

5 <210> 42  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador directo para F2 de 2b ORF2 de PCV2

<400> 42  
 cgagctcttt cttccccag gagggggc 28

15 <210> 43  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador inverso para F2 de 2b ORF2 de PCV2

<400> 43  
 cccaagcttg taggagaagg gctgggttat 30

25 <210> 44  
 <211> 1413  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia de ADN combinada de PE, F2 de 2b ORF2 de PCV2, y KDEL

35 <400> 44

## ES 2 661 026 T3

```

ggatccgaag aagcgttcga cctctggaac gaatgcgcca aagcctgcgt gctcgacctc      60
aaggacggcg tgcgttccag ccgcatgagc gtcgacctcg ccatcgccga caccaacggc      120
cagggcgctg tgcactactc catggctcctg gagggcgcca acgacgcgct caagctggcc      180
atcgacaacg ccctcagcat caccagcgac ggctgacca tccgcctcga agggcgctc      240
gagccgaaca agccggtgcg ctacagctac acgcgccagg cgcgcggcag ttggtcgtg      300
aactggctgg taccgatcgg ccacgagaag ccctcgaaca tcaagtggtt catccacgaa      360
ctgaacgccg gcaaccagct cagccacatg tcgccgatct acaccaccga gatggggcag      420
gagttgctag cgaagctggc gcgcgatgcc accttcttcg tcagggcgca cgagagcaac      480
gagatgcagc cgacgctcgc catcagccat gccgggtca gcgtggtcat ggcccagacc      540
cagccgcgcc gggaaaagcg ctggagcgaa tgggccagcg gcaagtggtt gtgcctgctc      600
gacctgctgg acgggtcta caactacctc gccagcaac gctgcaacct cgacgatacc      660
tggaaggca agatctaccg ggtgctcgcc ggcaacctcg cgaagcatga cctggacatc      720
aaaccacgg tcatcagtca tcgcctgcac tttcccgagg gcggcagcct ggccgcgctg      780
accgcgacc aggcttgcca cctgcccgtg gagactttca cccgtcatcg ccagccgcgc      840
ggctgggaac aactggagca gtgcggctat ccggtgcagc ggctggtcgc cctctacctg      900
gcggcgcgcg tgtcgtgaa ccaggctgac caggtgatcc gcaacgccct ggccagcccc      960
ggcagcggcg gcgacctagg cgaagcgatc cgcgagcagc cggagcaggc ccgtctggcc     1020
ctgacctg   ccgccccga gagcgagcgc ttcacccggc agggcaccgg caacgacgag     1080
gccggcgcgg ccaacgccga cgtggtgagc ctgacctgcg agctctttct tccccagga     1140
gggggctcaa acccccgctc tgtgcccttt gaatactaca gaataagaaa ggtaagggtt     1200
gaattctggc cctgctcccc gatcaccagc ggtgacaggg gagtgggctc cagtgctggt     1260
attctagatg ataactttgt aacaaggcc acagccctca cctatgacc ctatgtaaac     1320
tactcctccc gccataccat aaccagccc ttctcctaca agcttctcaa aaaagacgaa     1380
ctgagagatg aactgaaaga cgaactgctc gag                                     1413

```

<210> 45

<211> 471

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos combinada de PE, F2 de 2b ORF2 de PCV2, y KDEL

<400> 45

# ES 2 661 026 T3

Gly	Ser	Glu	Glu	Ala	Phe	Asp	Leu	Trp	Asn	Glu	Cys	Ala	Lys	Ala	Cys
1				5					10					15	
Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	Arg	Ser	Ser	Arg	Met	Ser	Val	Asp
			20					25					30		
Pro	Ala	Ile	Ala	Asp	Thr	Asn	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	His	Tyr	Ser	Met
			35				40					45			
Val	Leu	Glu	Gly	Gly	Asn	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Ala	Ile	Asp	Asn	Ala
		50				55					60				
Leu	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	Gly	Leu	Thr	Ile	Arg	Leu	Glu	Gly	Gly	Val
65					70					75					80
Glu	Pro	Asn	Lys	Pro	Val	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Arg	Gln	Ala	Arg	Gly
				85					90					95	
Ser	Trp	Ser	Leu	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	His	Glu	Lys	Pro	Ser
			100					105					110		
Asn	Ile	Lys	Val	Phe	Ile	His	Glu	Leu	Asn	Ala	Gly	Asn	Gln	Leu	Ser
		115					120					125			
His	Met	Ser	Pro	Ile	Tyr	Thr	Thr	Glu	Met	Gly	Asp	Glu	Leu	Leu	Ala
		130				135					140				
Lys	Leu	Ala	Arg	Asp	Ala	Thr	Phe	Phe	Val	Arg	Ala	His	Glu	Ser	Asn
145					150					155					160
Glu	Met	Gln	Pro	Thr	Leu	Ala	Ile	Ser	His	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Val
				165					170					175	
Met	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Trp	Ser	Glu	Trp	Ala
			180					185					190		
Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Asp	Gly	Val	Tyr	Asn
		195					200					205			
Tyr	Leu	Ala	Gln	Gln	Arg	Cys	Asn	Leu	Asp	Asp	Thr	Trp	Glu	Gly	Lys
		210				215					220				
Ile	Tyr	Arg	Val	Leu	Ala	Gly	Asn	Pro	Ala	Lys	His	Asp	Leu	Asp	Ile
225					230					235					240
Lys	Pro	Thr	Val	Ile	Ser	His	Arg	Leu	His	Phe	Pro	Glu	Gly	Gly	Ser
			245						250					255	
Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	His	Gln	Ala	Cys	His	Leu	Pro	Leu	Glu	Thr
			260					265					270		
Phe	Thr	Arg	His	Arg	Gln	Pro	Arg	Gly	Trp	Glu	Gln	Leu	Glu	Gln	Cys
		275					280					285			
Gly	Tyr	Pro	Val	Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Leu	Tyr	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu
		290				295					300				
Ser	Trp	Asn	Gln	Val	Asp	Gln	Val	Ile	Arg	Asn	Ala	Leu	Ala	Ser	Pro
305					310					315					320
Gly	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Gly	Glu	Ala	Ile	Arg	Glu	Gln	Pro	Glu	Gln

# ES 2 661 026 T3

	325	330	335
Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Ile			
	340	345	350
Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val			
	355	360	365
Val Ser Leu Thr Cys Glu Leu Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn			
	370	375	380
Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val			
	385	390	400
Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly			
	405	410	415
Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala			
	420	425	430
Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr			
	435	440	445
Gln Pro Phe Ser Tyr Lys Leu Leu Lys Lys Asp Glu Leu Arg Asp Glu			
	450	455	460
Leu Lys Asp Glu Leu Leu Glu			
	465	470	

5 <210> 46  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador directo para F2 de 2d ORF2 de PCV2

<400> 46  
 cgagctctt cttccccag gagggggc 28

15 <210> 47  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador inverso para F2 de 2d ORF2 de PCV2

<400> 47  
 cccaagcttg taggagaagg gctgggttat 30

25 <210> 48  
 <211> 1413  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia de ADN combinada de PE, F2 de 2d ORF2 de PCV2, y KDEL

<400> 48

## ES 2 661 026 T3

```

ggatccgaag aagcgttcga cctctggaac gaatgcgcca aagcctgcgt gctcgacctc      60
aaggacggcg tgcgttccag ccgcatgagc gtcgacccgg ccatcgccga caccaacggc      120
cagggcgtgc tgcactactc catggtcctg gagggcggca acgacgcgct caagctggcc      180
atcgacaacg ccctcagcat caccagcgac ggctgacca tccgcctcga aggcgcgctc      240
gagccgaaca agccggtgog ctacagctac acgcgccagg cgcgcggcag ttggtcgctg      300
aactggctgg taccgatcgg ccacgagaag ccctcgaaca tcaaggtggt catccacgaa      360
ctgaacgccg gcaaccagct cagccacatg tcgccgatct acaccaccga gatgggagac      420
gagttgctag cgaagctggc gcgcgatgcc accttcttcg tcagggcgca cgagagcaac      480
gagatgcagc cgacgctcgc catcagccat gccggggtca gcgtgggcat ggcccagacc      540
cagccgcgcc gggaaaagcg ctggagcgaa tgggccagcg gcaaggtggt gtgcctgctc      600
gaccgctgg acggggtcta caactacctc gccagcaac gctgcaacct cgacgatacc      660
tgggaaggca agatctaccg ggtgctcgcc ggcaaccggc cgaagcatga cctggacatc      720
aaaccacgg tcatcagtca tcgcctgcac tttcccagg gcggcagcct ggccgcgctg      780
accgcgacc aggcttgcca cctgccgctg gagactttca cccgtcatcg ccagccgcgc      840
ggctgggaac aactggagca gtgcggctat ccggtgcagc ggctgggctgc cctctacctg      900
gcggcgcggc tgtcgtggaa ccaggtcgac caggatgatc gcaacgccct ggccagcccc      960
ggcagcggcg gcgacctagg cgaagcgatc cgcgagcagc cggagcaggc ccgtctggcc      1020
ctgaccctgg ccgccgccga gagcgagcgc ttcattccggc agggcaccgg caacgacgag      1080
gccggcgcgg ccaacgccga cgtggtgagc ctgacctgcg agctctttct tccccagga      1140
gggggctcaa gccccctcac tgtgcccttt gaatactaca gaataaggaa ggttaaggtt      1200
gaattctggc cctgctcccc aatcaccagc ggtgacagg gagtgagctc cactgctggt      1260
attctagatg ataactttgt aacaaaggcc aatgccctaa cctatgacct ctatgtaaac      1320
tactctccc gccataccat aaccagccc ttctctaca agcttctcaa aaaagacgaa      1380
ctgagagatg aactgaaaga cgaactgctc gag                                     1413

```

<210> 49

<211> 471

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos combinada de PE, F2 de 2d ORF2 de PCV2, y KDEL

<400> 49

## ES 2 661 026 T3

Gly	Ser	Glu	Glu	Ala	Phe	Asp	Leu	Trp	Asn	Glu	Cys	Ala	Lys	Ala	Cys
1				5					10					15	
Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	Arg	Ser	Ser	Arg	Met	Ser	Val	Asp
			20					25						30	
Pro	Ala	Ile	Ala	Asp	Thr	Asn	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	His	Tyr	Ser	Met
		35					40					45			
Val	Leu	Glu	Gly	Gly	Asn	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Ala	Ile	Asp	Asn	Ala
	50					55					60				
Leu	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	Gly	Leu	Thr	Ile	Arg	Leu	Glu	Gly	Gly	Val
65					70					75					80
Glu	Pro	Asn	Lys	Pro	Val	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Arg	Gln	Ala	Arg	Gly
			85						90					95	
Ser	Trp	Ser	Leu	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	His	Glu	Lys	Pro	Ser
			100					105						110	
Asn	Ile	Lys	Val	Phe	Ile	His	Glu	Leu	Asn	Ala	Gly	Asn	Gln	Leu	Ser
		115					120					125			
His	Met	Ser	Pro	Ile	Tyr	Thr	Thr	Glu	Met	Gly	Asp	Glu	Leu	Leu	Ala
	130					135					140				
Lys	Leu	Ala	Arg	Asp	Ala	Thr	Phe	Phe	Val	Arg	Ala	His	Glu	Ser	Asn
145					150					155					160
Glu	Met	Gln	Pro	Thr	Leu	Ala	Ile	Ser	His	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Val
				165						170				175	
Met	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Trp	Ser	Glu	Trp	Ala
			180						185					190	
Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Asp	Gly	Val	Tyr	Asn
		195					200					205			
Tyr	Leu	Ala	Gln	Gln	Arg	Cys	Asn	Leu	Asp	Asp	Thr	Trp	Glu	Gly	Lys
	210					215						220			
Ile	Tyr	Arg	Val	Leu	Ala	Gly	Asn	Pro	Ala	Lys	His	Asp	Leu	Asp	Ile
225					230						235				240
Lys	Pro	Thr	Val	Ile	Ser	His	Arg	Leu	His	Phe	Pro	Glu	Gly	Gly	Ser
				245						250				255	
Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	His	Gln	Ala	Cys	His	Leu	Pro	Leu	Glu	Thr
			260						265					270	
Phe	Thr	Arg	His	Arg	Gln	Pro	Arg	Gly	Trp	Glu	Gln	Leu	Glu	Gln	Cys
		275						280						285	
Gly	Tyr	Pro	Val	Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Leu	Tyr	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu
	290					295					300				
Ser	Trp	Asn	Gln	Val	Asp	Gln	Val	Ile	Arg	Asn	Ala	Leu	Ala	Ser	Pro
305					310						315				320

ES 2 661 026 T3

Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln  
 325 330 335  
 Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Ile  
 340 345 350  
 Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val  
 355 360 365  
 Val Ser Leu Thr Cys Glu Leu Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Ser  
 370 375 380  
 Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val  
 385 390 395 400  
 Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Ser  
 405 410 415  
 Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala  
 420 425 430  
 Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr  
 435 440 445  
 Gln Pro Phe Ser Tyr Lys Leu Leu Lys Lys Asp Glu Leu Arg Asp Glu  
 450 455 460  
 Leu Lys Asp Glu Leu Leu Glu  
 465 470

<210> 50  
 <211> 705  
 5 <212> ADN  
 <213> *Circovirus porcino*

<400> 50

atgacgtatc caaggaggcg ttaccggaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60  
 catatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc cccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120  
 aaaaatggaa tcttcaatgc cgcctctcc cgctcctttg tttataccgt taatgcctca 180  
 caggtctcac caccctcttg ggcggtggac atgatgagat ttaatattaa ccaatttctt 240  
 cccccaggag ggggctcaaa ccccctcact gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300  
 gttaaagtgg aattctttgc aagatcccc atcaccaag gtgacagggg agtgggctcc 360  
 actgctgtta ttctaaatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacccc 420  
 tatgtaaact actcctcccg ccataaccata acccaaccct tctcctacca ctcccgtac 480  
 tttaccccca aacctgtcct tgattccact attgattact tccaaccaa taacaaaaga 540  
 aatcagctgt ggatgagact acaaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggacac 600  
 gcctttcaaa acagtacaaa tgcccaggcc tacaatgtcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660  
 10 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaacccta agtga 705

<210> 51  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 15 <213> *Circovirus porcino*

<400> 51

ES 2 661 026 T3

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg  
1 5 10 15  
Ser His Leu Gly His Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro  
20 25 30  
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Ala Arg  
35 40 45  
Leu Ser Arg Ser Phe Val Tyr Thr Val Asn Ala Ser Gln Val Ser Pro  
50 55 60  
Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Gln Phe Leu  
65 70 75 80  
Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu Tyr Tyr  
85 90 95  
Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Phe Ala Arg Ser Pro Ile Thr  
100 105 110  
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asn Asp Asn  
115 120 125  
Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr  
130 135 140  
Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr  
145 150 155 160  
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro  
165 170 175  
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Leu Gln Thr Thr Gly Asn  
180 185 190  
Val Asp His Val Gly Leu Gly His Ala Phe Gln Asn Ser Thr Asn Ala  
195 200 205  
Gln Ala Tyr Asn Val Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe  
210 215 220  
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys  
225 230

- <210> 52
- 5 <211> 702
- <212> ADN
- <213> *Circovirus porcino*

<400> 52

ES 2 661 026 T3

atgacgtatc caaggaggcg ttaccggaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60  
 catatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120  
 aaaaatggca ttttcaacag cgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180  
 acagtcacaa cgcctcctg ggcggtggac atgctgagat tcaatattga cgactttctt 240  
 cccccgggag gggggaccaa caaatctct ataccctttg agtactacag aataagaaag 300  
 gttaagggtg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agttggatcc 360  
 agtgcgtgtaa ttctagatga taactttttc cctaagtcca cagccctaac ctatgacccc 420  
 tacgtaaact actcctcccg ccataccata cccagccct tctcctacca ctcccgtac 480  
 tttaccccca aacctgtcct tgattccacc attgattact tccaacaaa taacaaaagg 540  
 aatcagctgt ggatgagaat tcaaaccagt aaaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600  
 gcgttcgaaa acagtaaata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660  
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

<210> 53

<211> 233

5 <212> PRT

<213> *Circovirus porcino*

<400> 53

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

ES 2 661 026 T3

180 185 190  
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp  
 195 200 205  
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe  
 210 215 220  
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro  
 225 230

5 <210> 54  
 <211> 471  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino

10 <400> 54  
 tttcttcccc caggaggggg ctcaaaccct ctcactgtgc ctttgaata ctacagaata 60  
 agaaaggtta aagtggaatt ctttgcaaga tccccatca cccaaggatga caggggagtg 120  
 ggctccactg ctgttattct aaatgataac tttgtaacaa aggccacagc cctaacctat 180  
 gaccctatg taaactactc ctcccgccat accataacc aacccttctc ctaccactcc 240  
 cgctacttta cccccaaacc tgccttgat tccactattg attacttcca accaaataac 300  
 aaaagaaatc agctgtggat gagactacaa actactggaa atgtagacca tgtaggcctc 360  
 ggacacgcct ttcaaaacag tacaatgcc caggcctaca atgtccgtgt aaccatgtat 420  
 gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccactta accctaagtg a 471

15 <210> 55  
 <211> 156  
 <212> PRT  
 <213> Circovirus porcino

15 <400> 55  
 Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu  
 1 5 10 15  
 Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Phe Ala Arg Ser Pro  
 20 25 30  
 Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asn  
 35 40 45  
 Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val  
 50 55 60  
 Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser  
 65 70 75 80  
 Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe  
 85 90 95

ES 2 661 026 T3

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Leu Gln Thr Thr  
 100 105 110  
 Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly His Ala Phe Gln Asn Ser Thr  
 115 120 125  
 Asn Ala Gln Ala Tyr Asn Val Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg  
 130 135 140  
 Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Lys  
 145 150 155

5 <210> 56  
 <211> 468  
 <212> ADN  
 <213> Circovirus porcino

<400> 56

tttcttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac cctttgagta ctacagaata 60  
 agaaaggtta aggttgaatt ctggccctgc tcccacatca cccaggggta caggggagtt 120  
 ggatccagtg ctgtaattct agatgataac tttttcccta agtccacagc cctaacctat 180  
 gaccctacg taaactactc ctcccgccat accatacccc agcccttctc ctaccactcc 240  
 cgctacttta ccccaaac tgctctgat tccaccattg attacttcca accaaataac 300  
 aaaaggaatc agctgtggat gagaattcaa accagtaaaa atgtagacca cgtaggcctc 360  
 ggcactgcgt tcgaaaacag taaatacgac caggactaca atatccgtgt aaccatgtat 420  
 10 gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccactta aaccctaa 468

15 <210> 57  
 <211> 155  
 <212> PRT  
 <213> Circovirus porcino

<400> 57

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu  
 1 5 10 15  
 Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro  
 20 25 30  
 Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp  
 35 40 45  
 Asp Asn Phe Phe Pro Lys Ser Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val  
 50 55 60  
 Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser  
 65 70 75 80  
 Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe

ES 2 661 026 T3

				85					90					95		
Gln	Pro	Asn	Asn	Lys	Arg	Asn	Gln	Leu	Trp	Met	Arg	Ile	Gln	Thr	Ser	
			100					105					110			
Lys	Asn	Val	Asp	His	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser	Lys	
			115				120					125				
Tyr	Asp	Gln	Asp	Tyr	Asn	Ile	Arg	Val	Thr	Met	Tyr	Val	Gln	Phe	Arg	
			130				135					140				
Glu	Phe	Asn	Leu	Lys	Asp	Pro	Pro	Leu	Lys	Pro						
			145				150					155				

**Reivindicaciones**

1. Composición inmunogénica de circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), que comprende un péptido antigénico seleccionado de uno de:
  - 5 a) un péptido no rico en arginina de un marco de lectura abierto 2 (ORF2) de PCV2 seleccionado del grupo consistente en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 57; o
  - 10 b) una proteína de fusión recombinante que comprende, desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo de la proteína de fusión recombinante:
    - un péptido PE que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 35;
    - el péptido no rico en arginina del ORF2 de PCV2 (a); y
    - un péptido señal KDEL que tiene la secuencia de SEQ ID No: 31.
2. Composición inmunogénica de PCV2 según la reivindicación 1, que además comprende marcos de lectura abiertos (ORF) distintos del ORF2 del PCV2 y en la que los ORF distintos de ORF2 comprenden ORF1 y ORF3.
- 15 3. Composición inmunogénica de PCV2 según la reivindicación 1, que además comprende al menos un antígeno de patógeno seleccionado del grupo consistente en un antígeno de virus de la gripe porcina (SIV), un antígeno de virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), un antígeno de micoplasma, antígeno de parvovirus porcino (PPV), un antígeno de erisipela y un antígeno de virus de seudorrabia.
- 20 4. Composición inmunogénica según la reivindicación 1, que además comprende al menos un agente seleccionado del grupo consistente en vehículos, disolventes, emulsionantes, agentes de suspensión, agentes de descomposición, agentes de unión, excipientes, agentes estabilizantes, agentes quelantes, diluyentes, agentes gelificantes, conservantes, lubricantes, agentes tensioactivos, adyuvantes y portadores biológicos.
- 25 5. Procedimiento para producir un fragmento de antígeno de PCV2, que comprende:
  - 30 disponer una secuencia de ADN que codifica un péptido no rico en arginina de un ORF2 de PCV2 en un sistema de expresión procarionota, seleccionándose el péptido no rico en arginina del ORF2 de PCV2 del grupo consistente en las SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 57; y
  - expresar la secuencia de ADN que codifica el péptido no rico en arginina del ORF2 de PCV2 para obtener un fragmento de antígeno de la composición inmunogénica de PCV2.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, donde la secuencia de ADN que codifica el péptido no rico en arginina del ORF2 de PCV2 se selecciona del grupo consistente en las SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 56.

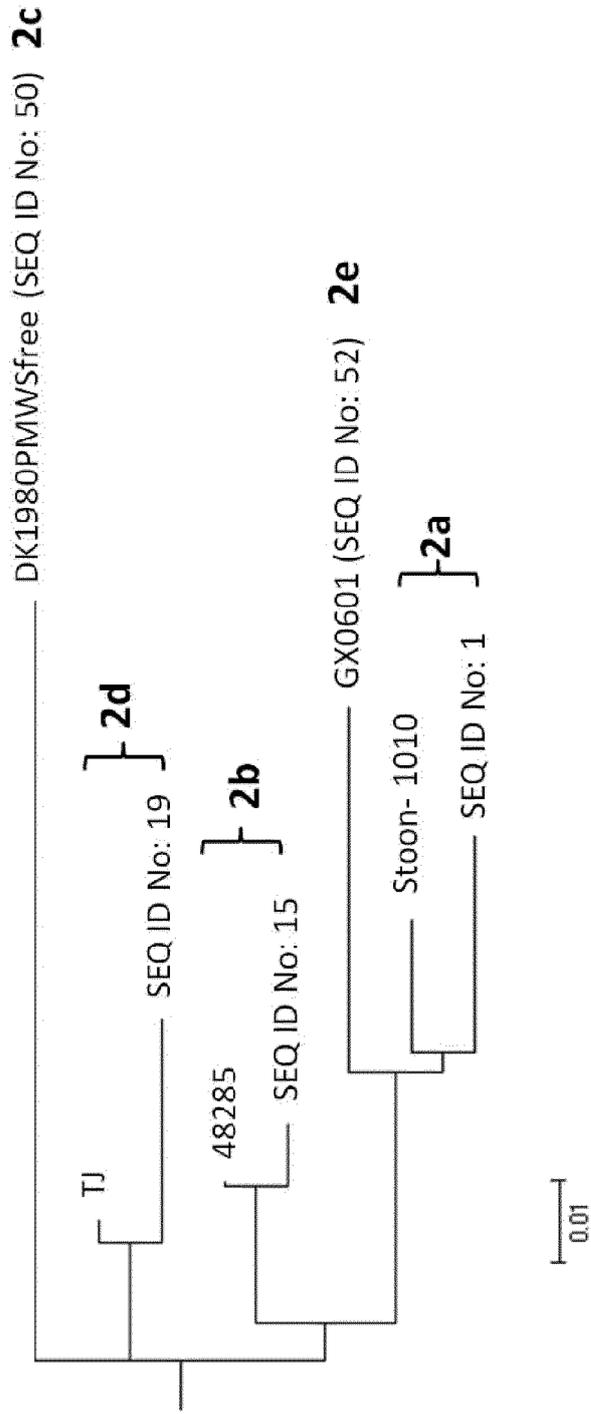


FIG. 1

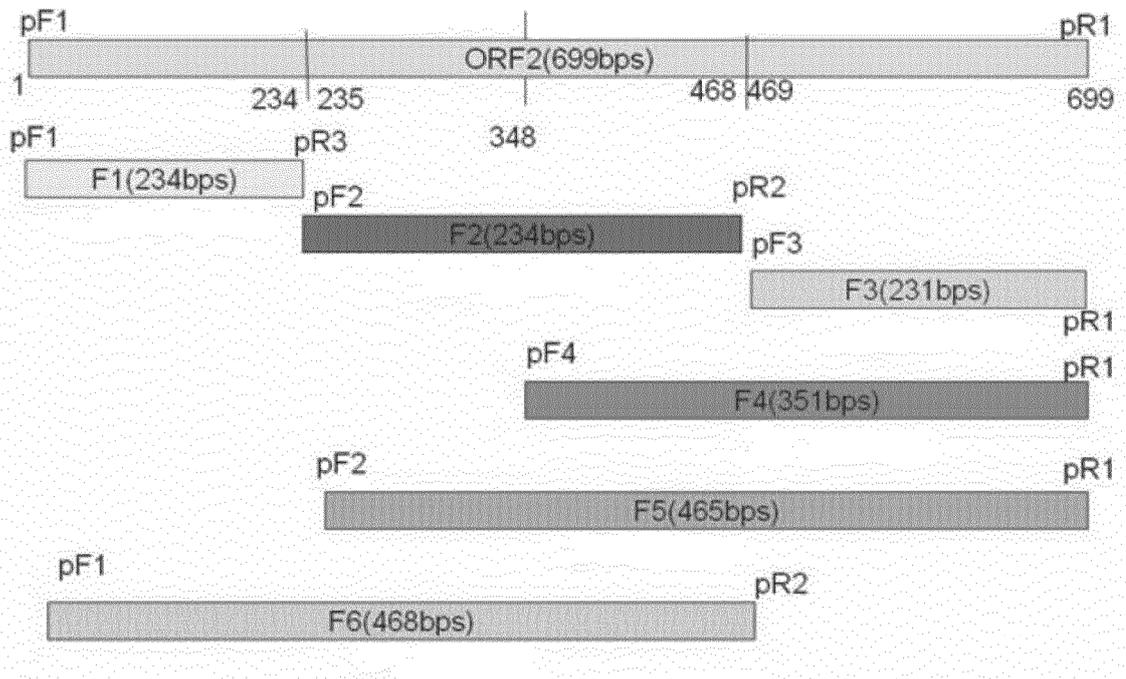


FIG. 2

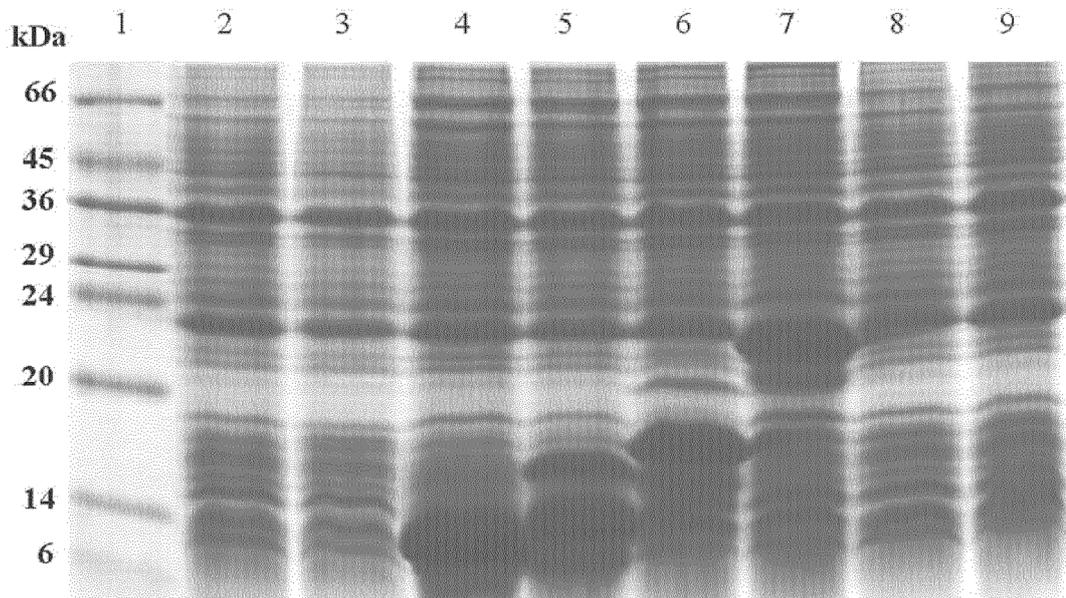


FIG. 3

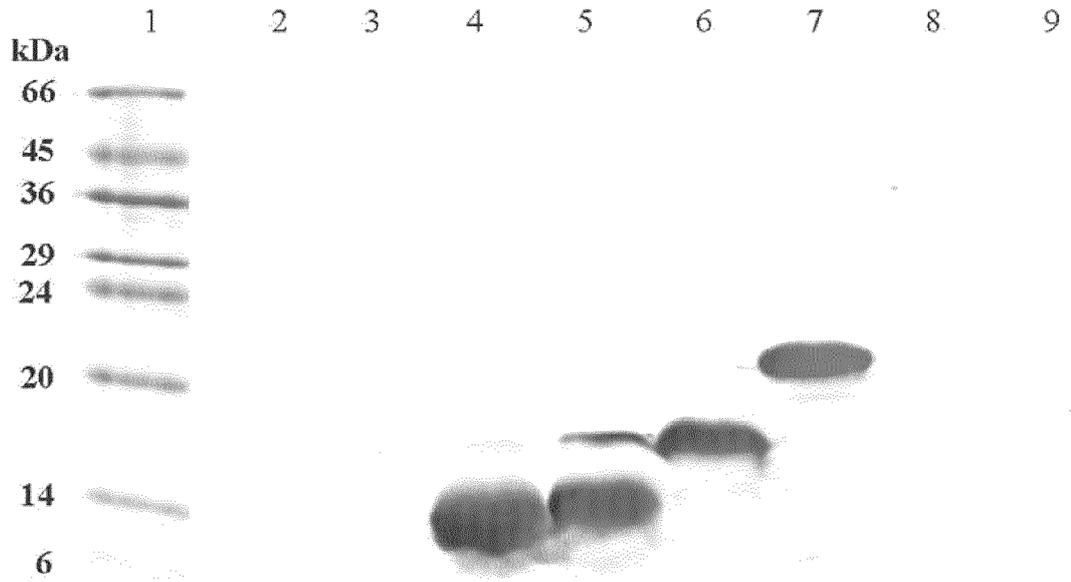


FIG. 4

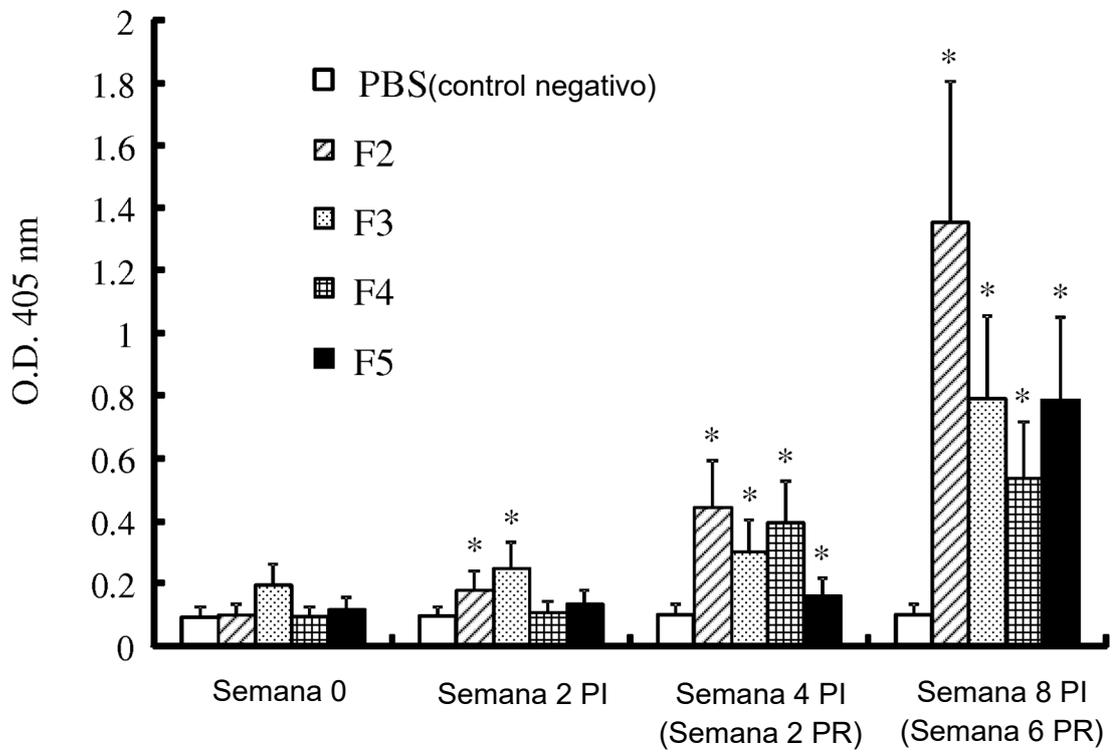


FIG. 5

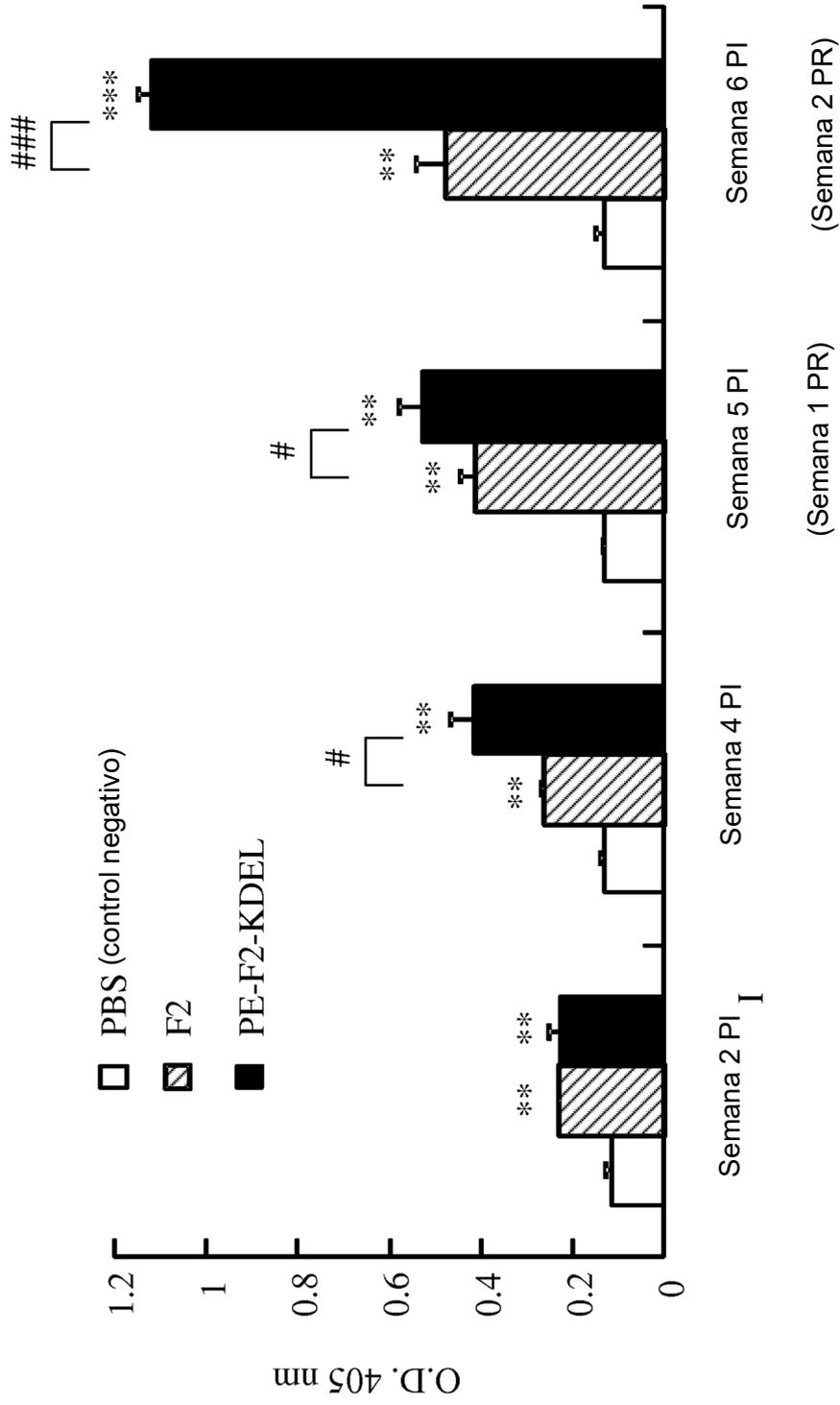


FIG. 6

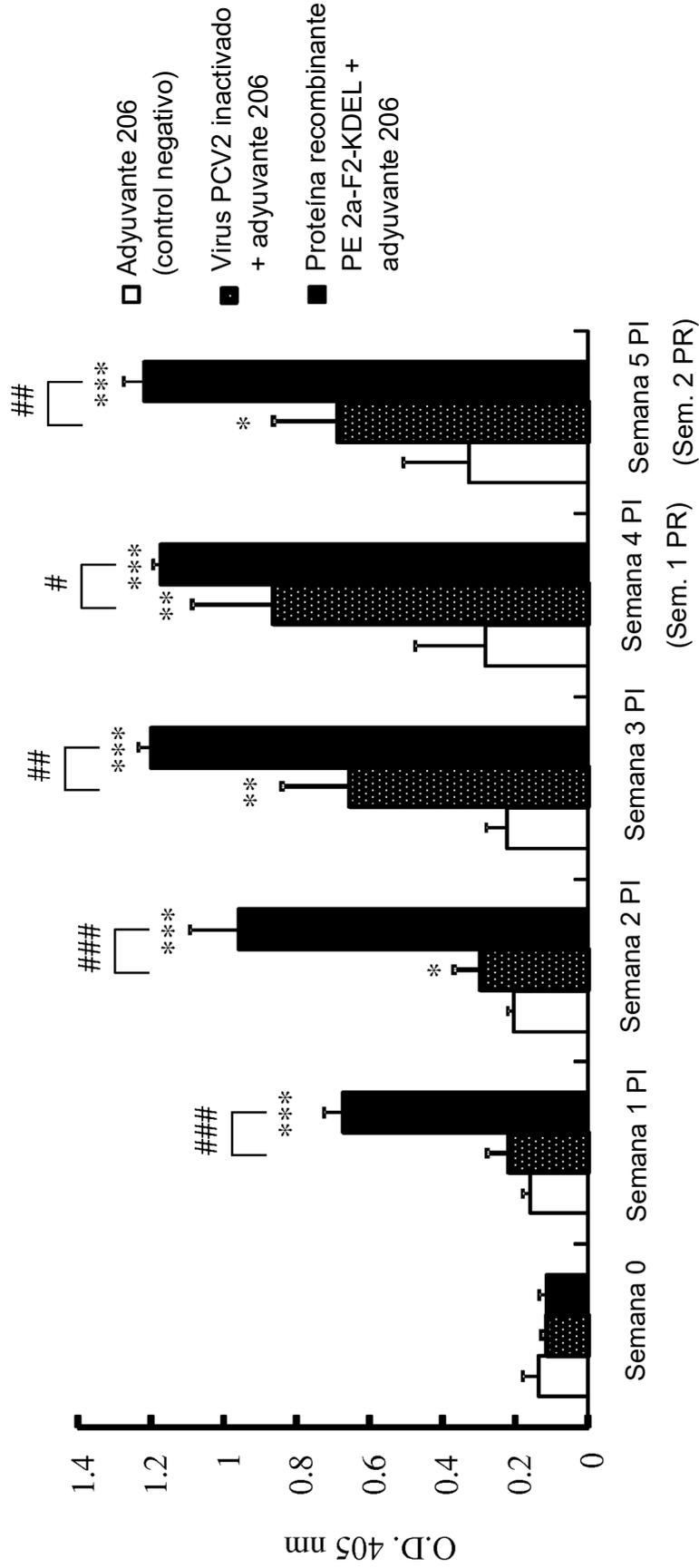


FIG. 7